

**Analyse der Zellwand-Architektur von  
*Staphylococcus aureus* Stämmen mit  
reduzierter Vancomycin-Empfindlichkeit**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Michael Hort**

aus

Aachen

Bonn, November 2021

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie angefertigt.

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Tanja Schneider

Fachnahes Mitglied: Prof. Dr. rer. nat. Gabriele König

Fachangrenzendes Mitglied: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Kubitscheck

Tag der Promotion: 25.01.2022

Erscheinungsjahr: 2022

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	1
1.2 Vancomycin-intermediär resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
1.2.1 <i>S. aureus</i> VC40 .....	7
1.2.2 <i>S. aureus</i> VC40R .....	8
1.2.3 <i>S. aureus</i> VraS(VC40) .....	9
1.2.4 <i>S. aureus</i> 137/93A .....	9
1.3 Zellwand .....	10
1.4 Autolyse .....	12
1.5 Wandteichonsäuren .....	14
1.6 Zweikomponentensysteme .....	16
1.6.1 VraSR .....	17
1.6.2 WalRK .....	18
1.7 Ziel der Arbeit .....	19
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1 Material-Verzeichnisse .....	21
2.1.1 Chemikalienverzeichnis .....	21
2.1.2 Kits .....	24
2.1.3 Instrumentenverzeichnis .....	24
2.1.4 Softwareverzeichnis .....	26
2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen .....	27
2.2 Mikrobiologische Methoden .....	32
2.2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Wachstumsbedingungen .....	32
2.2.2 Photometrische Wachstumsbestimmung .....	36
2.2.3 Bestimmung der minimalen Hemm-konzentration .....	36
2.2.3.1 Gradienten-MHK .....	36
2.2.3.2 Schachbrett-MHK .....	37
2.2.4 Cytochrom C-Assay .....	38
2.2.5 Analyse der Vancomycin-Bindekapazität .....	38
2.2.6 Lyse-Assays .....	39
2.2.6.1 Autolyse induziert durch Triton X-100 .....	39
2.2.6.2 Lyse induziert durch aufgereinigte Autolysine .....	39
2.2.6.3 Überprüfung der AtIA-Bindung an das Peptidoglykan .....	40
2.2.7 Untersuchung der Biofilmbildung .....	40
2.2.8 Bestimmung der Carotinoid-Konzentration .....	40
2.2.9 Bestimmung der Membran-Fluidität mittels Laurdan .....	41
2.2.10 Delta-Hämolsin-Expression .....	41
2.2.11 Phagentypisierung .....	42
2.2.12 Phagen-Adsorptions-Assay .....	42
2.2.13 Aufreinigung von Zellbestandteilen .....	43
2.2.13.1 Präparation der Zellmembran für das Proteinprofil .....	43
2.2.13.2 Präparation der Zellmembran für die Analyse der PBPs .....	43
2.2.13.3 Präparation von Peptidoglykan (saurer pH) .....	44

2.2.13.4	Präparation von Peptidoglykan (basischer pH).....	44
2.2.13.5	Präparation von Wandteichonsäuren.....	44
2.2.13.6	Präparation von Wandteichonsäuren für die NMR-Spektroskopie .....	45
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>46</b>
2.3.1	Isolierung von genomischer DNA .....	46
2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA .....	46
2.3.3	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren .....	46
2.3.4	Polymerasekettenreaktion .....	46
2.3.4.1	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	47
2.3.4.2	Kolonie-PCR.....	47
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.3.5.1	Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	48
2.3.5.2	RNA-Gelelektrophorese .....	48
2.3.6	Restriktionsverdau.....	48
2.3.7	Ligation .....	49
2.3.8	Transformation.....	49
2.3.8.1	Herstellung von elektrokompetenten <i>S. aureus</i> Zellen .....	49
2.3.8.2	Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	50
2.3.8.3	Herstellung von chemokompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	50
2.3.8.4	Transformation von <i>S. aureus</i> Zellen .....	50
2.3.8.5	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen .....	50
2.3.9	DNA-Sequenzierung.....	51
2.3.10	Induzierbare Überexpression von Proteinen .....	51
2.3.11	Allel-Austausch durch homologe Rekombination .....	52
2.3.12	QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenese .....	54
2.3.13	Isolierung der Gesamt-RNA.....	55
2.3.13.1	cDNA-Synthese .....	56
2.3.13.2	Quantitative Real-Time-PCR .....	56
2.3.13.3	RNA-seq .....	57
<b>2.4</b>	<b>Biochemische Methoden.....</b>	<b>57</b>
2.4.1	Bestimmung des Phosphat-Gehaltes der WTA.....	57
2.4.2	Bestimmung des D-Alanin-Gehaltes der WTA .....	58
2.4.3	Bestimmung des Glycerin-Gehaltes der WTA.....	59
2.4.4	Bestimmung des Zucker-Gehaltes der WTA .....	59
<b>2.5</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>60</b>
2.5.1	Proteinaufreinigung.....	60
2.5.1.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Protein Assay .....	63
2.5.1.2	Dialyse der Proteine.....	64
2.5.2	SDS-PAGE.....	64
2.5.2.1	Membranprotein-Profil.....	65
2.5.2.2	Profil der Penicillin-bindenden Proteine.....	65
2.5.2.3	Alcian-Blue SDS-PAGE .....	65
2.5.2.4	Phos-Tag SDS-PAGE.....	66
2.5.2.5	Silberfärbung der SDS-Gele.....	67
2.5.2.6	Proteinextraktion .....	67
2.5.2.7	Zymographische Analyse der Autolysin-Extrakte .....	67
2.5.2.8	In vitro Proteolyse-Assay .....	68
<b>2.6</b>	<b>Analytische Methoden .....</b>	<b>68</b>
2.6.1	Massenspektrometrie von VraR(M54T) .....	68
2.6.2	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) der WTA .....	68



2.6.3	Analyse des Peptidoglykans mittels UPLC .....	69
<b>2.7</b>	<b>Statistische Methoden</b> .....	<b>69</b>
2.7.1	Student's <i>t</i> -Test .....	69
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>70</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Zellwand</b> .....	<b>70</b>
3.1.1	UPLC-Analyse der Quervernetzung des Peptidoglykans .....	70
3.1.2	Nachweis der PBP4-Aktivität .....	72
3.1.3	Quantifizierung der Bindungskapazität der Zellwand für Vancomycin .....	73
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der Zellmembran</b> .....	<b>74</b>
3.2.1	Analyse des Membranprotein-Profiles .....	74
3.2.2	Untersuchung des Zweikomponentensystems VraSR .....	76
3.2.2.1	Analyse der Phosphorylierung von VraR.....	78
3.2.2.2	Untersuchung von aufgereinigtem VraR mittels Massenspektrometrie .....	79
3.2.3	Überprüfung der Membranfluidität durch Laurdan .....	80
3.2.4	Untersuchung der Zellhülle mittels Cytochrom C-Assay .....	80
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung des Autolyseverhaltens</b> .....	<b>82</b>
3.3.1	Analyse der Autolyse .....	82
3.3.1.1	Untersuchung des aufgereinigten AtIA mittels Zymographie.....	84
3.3.2	Weiterführende Untersuchung der extrazellulären Autolysine .....	87
3.3.3	Überprüfung der Bindekapazität der Zellwand für AtIA .....	88
3.3.4	Triton X-100 induzierte Autolyse.....	90
3.3.5	Untersuchung der Prozessierung von AtIA .....	91
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung der Wandteichonsäuren</b> .....	<b>94</b>
3.4.1	Quantifizierung der WTA mittels Phosphat-Test.....	95
3.4.2	Analyse der WTA-Substitution mit D-Alanin.....	96
3.4.3	Analyse der WTA-Substitution mit D-Glucosamin .....	98
3.4.3.1	Analyse der Glykosylierung der WTA in den <i>tarM/S</i> -Überexpressionsstämmen .....	99
3.4.3.2	Untersuchung der Phagentypisierung .....	100
3.4.3.3	Untersuchung der Adsorption von Phagen an ganze Zellen.....	102
3.4.3.4	Nachweis des WTA-Glykosylierungsmuster durch NMR-Spektroskopie .....	103
3.4.4	Untersuchung des Glycerol-Gehaltes .....	105
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung der Transkription</b> .....	<b>106</b>
3.5.1	Expression des VraSR-Regulon .....	108
3.5.1.1	Validierung der <i>vraS</i> -Expression durch qRT-PCR .....	110
3.5.2	Expression des WalRK-Regulon .....	110
3.5.3	Expression der Gene involviert in die Autolyse .....	113
3.5.4	Expression der Gene involviert in die WTA-Biosynthese.....	114
3.5.5	Expression der Gene involviert in die Zellwand-Biosynthese.....	116
3.5.6	Expression der Gene involviert in die Virulenz .....	117
3.5.7	Expression weiterer Gene.....	121
3.5.8	Unterschiede in der Gen-Expression zwischen <i>S. aureus</i> VC40 und <i>S. aureus</i> VC40R.....	122
<b>3.6</b>	<b>Charakterisierung der Virulenz</b> .....	<b>124</b>
3.6.1	Analyse der Biofilmbildung.....	124
3.6.2	Nachweis der Hämolyse-Aktivität.....	125
3.6.3	Quantifizierung des Carotinoid-Gehalts .....	126
<b>3.7</b>	<b>Charakterisierung der Antibiotika-Empfindlichkeit</b> .....	<b>127</b>
3.7.1	Untersuchung der Synergie zwischen Vancomycin und Tunikamycin.....	127
3.7.2	Untersuchung der Kongorot-MHK.....	129
3.7.3	Untersuchung der Vancomycin-MHK der Überexpressionsstämmen .....	130
3.7.4	Untersuchung der Vancomycin-MHK der Mutanten mit einem Allel-Austausch.....	132

3.7.5	Untersuchung des Einflusses von Salzstress auf die Vancomycin-MHK .....	133
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>135</b>
4.1	Die bakterielle Zellhülle von <i>Staphylococcus aureus</i> als zentraler Faktor in der verringerten Vancomycin-Empfindlichkeit der VISA-Stämme.....	135
4.2	Untersuchung der reduzierten Autolyse in VISA-Stämmen.....	142
4.3	Einfluss von Wandteichonsäuren auf die Reduktion der Vancomycin-Empfindlichkeit.....	151
4.3.1	Auswirkung von $\beta$ -glykosylierten Wandteichonsäuren auf die Ausprägung des VISA-Phänotyps....	157
4.4	Bedeutung des Zweikomponentensystems VraSR in VISA-Stämmen.....	159
4.5	Rolle der Virulenz in den untersuchten VISA-Stämmen .....	163
4.6	Ausblick .....	167
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>170</b>
	Literaturverzeichnis.....	XI
	Anhang.....	XXXII
	Publikationen.....	L
	Danksagung.....	LII

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
% (v/v)	Prozentualer Volumenanteil
% (w/v)	Prozentualer Massenanteil pro Volumenanteil
®	Registered trademark (registrierte Warenmarke)
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
∞	Unendlichkeitszeichen
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIP	Autoinducing peptide (Selbstinduzierendes Peptid)
AM	N-Acetyl-Muramoyl-L-Alanin-Amidase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain-heart infusion medium (Hirn-Herz Infusionsmedium)
BLAST	Basic local alignment search tool
BM	Basic Medium (Einfaches Medium)
Br.	Bremse
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
C <sub>55</sub> P	Undecaprenylphosphat-Lipid-Carrier
ca.	Circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAMP	Cationic antimicrobial peptide (kationisches antimikrobielles Peptid)
CDP	Cytidindiphosphat
CFU	Colony forming units (Koloniebildende Einheit)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institut
Cm	Chloramphenicol
D <sub>2</sub> O	Deuteriumoxid (schweres Wasser)
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektor
DDM	n-Dodecyl β-D-Maltosid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOI	Digital object identifier (Digitaler Objektbezeichner)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Erythromycin
et al.,	et alii (und andere)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F	Farad (Elektrische Kapazität)
FIC	Fractional inhibitory concentration (Fraktionale Hemmkonzentration)

Abkürzung	Bedeutung
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GISA	Glycopeptid-intermediär resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
GL	Endo-β-N-Acetyl-Glucosaminidase
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GP	Generalized polarization (Generalisierte Polarisation)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	Reinstwasser
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	PCR-Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
hVISA	Heterogener Vancomycin-intermediär resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IS	Insertionssequenz
K	Kelvin
k	Kilo
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
Laurdan	6-Dodecanoyl-2-Dimethylaminonaphthalen
LB	Lysogeny broth (lysogene Brühe)
LC-MS	Liquid chromatography mass spectrometry (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
LiCl	Lithiumchlorid
LTA	Lipoteichoic acids (Lipoteichonsäuren)
M	Molar (Mol pro Liter)
MCS	Multiple Cloning Site (Polylinker)
MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MH	Müller-Hinton broth (Müller-Hinton Brühe)
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MHz	Megahertz
min	Minute
MLST	Multilocus sequence typing (Multi-Locus-Sequenztypisierung)
MM	Master Mix
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (Mikrobielle Oberflächenkomponenten, welche adhäsive Matrixmoleküle erkennen)

Abkürzung	Bedeutung
MSSA	Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
MurNAc	N-Acetyl-Muraminsäure
N	Normal
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamadendenindinukleotid
NADPH	Nicotinamadendenindinukleotidphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanz)
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PGN	Peptidoglykan
pH	Potentia Hydrogenii (Maß für die H <sup>+</sup> Konzentration)
PIA	Polysaccharid interzelluläres Adhesin
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR (Quantitative Echtzeit-PCR)
RIN	RNA Integritätsnummer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RR	Responseregulator
RT	Raumtemperatur
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
ST	Sequenz-Typ
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TB	Terrific Broth (Wunderbare Brühe)
TCS	Two-component system (Zweikomponentensystem)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
Tm	Annealing Temperature (Primerhybridisierungs-Temperatur)
TM	Unregistered trademark (unregistrierte Warenmarke)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	Tryptic soy agar (Trypton Soja Agar)
TSB	Tryptic soy broth (Trypton Soja Brühe)
u	Unit (Enzymeinheit)
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
ÜN	Über Nacht
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography (Ultraleistungsflüssigkeitschromatographie)
UV	Ultraviolett

---

Abkürzung	Bedeutung
V	Volt (Elektrische Spannung)
Vgl.	vergleiche
VISA	Vancomycin-intermediär resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
VSSA	Vancomycin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
WT	Wildtyp
WTA	Wall teichoic acids (Wandteichonsäuren)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
ZW	Zellwand
$\sigma$	Standardabweichung
$\Omega$	Ohm (Elektrischer Widerstand)

---

## 1 Einleitung

### 1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* gehört zu der Familie der *Staphylococcaceae* innerhalb der Ordnung *Bacillales* und dem Phylum *Firmicutes*. Es handelt sich um ein Gram-positives, fakultativ anaerobes, unbewegliches Bakterium, welches keine Sporen bildet und einen niedrigen GC-Gehalt aufweist (Gatermann und Miksits, 2009). Erstmals wurde *S. aureus* 1880 aus dem Eiter eines Abszesses am Bein eines Patienten identifiziert (Ogston, 1880) und später von Friedrich Rosenbach (1884) als *Staphylococcus* beschrieben. Der Name basiert auf dem traubenförmigen („staphyle“, griechisch: Weintrauben) mikroskopischen Bild, sowie der gelben Pigmentierung („aurum“, lateinisch: Gold) des makroskopischen Wachstums auf Agar. Abbildung 1 zeigt das klassische mikroskopische Wachstum der Staphylokokken, welches aufgrund der Zellteilung in drei orthogonalen, asymmetrischen Ebenen zustande kommt (Monteiro et al., 2015). Die Pigmentierung geht auf die Synthese von Staphyloxanthin zurück, einem

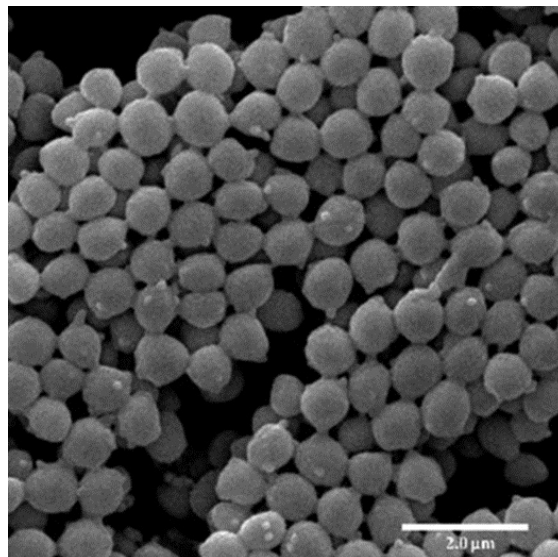


Abbildung 1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines MRSA-Stammes, entnommen aus Nishio et al., (2016).

membrangebundenen Tetraterpen (Carotinoid), welches die Zelle vor reaktiven Sauerstoffverbindungen schützt (Clauditz et al., 2006). *S. aureus* ist ein sehr widerstandsfähiges Bakterium, das einer großen Breite an Umweltfaktoren standhält und ubiquitär verbreitet ist. So übersteht der Organismus Hitzeeinwirkung von 60 °C für 30 Minuten, überlebt die menschliche Magensäure, ist halotolerant bis 15 % NaCl und überdauert monatelang auf trockenen Oberflächen. Das

## Einleitung

---

Wachstumsoptimum liegt zwischen 30 – 37 °C und ist an den Menschen angepasst (Gatermann und Miksits, 2009). Es wird angenommen, dass circa 20 % der menschlichen Population persistente Träger von *S. aureus* sind (van Belkum et al., 2009). Zumeist befindet sich der Erreger im Nasenvorhof und gehört in der Regel zur normalen Haut- und Schleimhautflora von Säugetieren (Krismer et al., 2017). Menschen mit engem Patientenkontakt, etwa klinisches Personal, haben eine höhere Rate an persistenten Trägern (Gatermann und Miksits, 2009). Neben der kommensalen Besiedelung des Menschen kann es auch zu teils schwerwiegenden Infektionen kommen. *S. aureus* ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium, welches vor allem für nosokomiale Infektionen bekannt ist. Die Übertragung erfolgt meist als Schmierinfektion. Eine Infektion mit *S. aureus* lässt sich klinisch in drei Gruppen einteilen: (I) eine Lokalfektion (Furunkel, Karbunkel, Impetigo) oder invasive Infektion (Pneumonie, Osteomyelitis, Sinusitis, Endokarditis), (II) eine Sepsis und (III) toxinbedingte Syndrome (Toxic-Shock-Syndrom, Staphylococcal Scalded-Skin-Syndrom, Nahrungsmittelvergiftung). Für die Pathogenität und Ausbildung der genannten Syndrome sind Virulenzfaktoren verantwortlich, die nicht in allen Stämmen gleichzeitig vorkommen müssen (Gatermann und Miksits, 2009). Zunächst wird die Adhärenz der Bakterien an die Wirtszellen durch Adhäsine wie Thrombin-, Kollagen- und Fibronectinbinde-Proteine, beispielsweise dem Clumping-Faktor A und B, begünstigt. Es folgt die Invasion in tiefere Gewebsschichten durch zersetzende Enzyme, wie Lipasen, Kollagenasen, Hyaluronidasen und DNasen. Zur Abwehr des Immunsystems, insbesondere der Phagozytose, bildet *S. aureus* unter anderem Protein A, welches die Fc-Region von Antikörpern bindet, und Koagulase, die zu einer Fibrinhülle führt (Tam und Torres, 2019). Viele Stämme besitzen die Fähigkeit eine Kapsel aus Polymeren der Glukosaminuronsäure oder der Mannosaminuronsäure zu bilden (Gatermann und Miksits, 2009). Zusätzlich kann *S. aureus* Toxine produzieren, wie Hämolyse gegen Erythrozyten, Leukozidine gegen Makrophagen und Granulozyten, und Enterotoxine. Die letztgenannten Toxine wirken auch als Superantigene. Seltener Toxine dieser Bakterien sind das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1, die Exfoliativ-Toxine und das Panton-Valentine-Leukozidin (Tam und Torres, 2019). Eine Infektion mit *S. aureus* kann einen chronischen Verlauf nehmen, falls beispielsweise Kleinkolonie-Varianten entstehen. Diese meist auxotrophen Stamm-Varianten haben eine hohe Persistenz durch ein geringes Wachstum und einen reversiblen intrazellulären Lebensstil, der vor Antibiotika und dem Immunsystem schützt und die Diagnose erschwert (Kahl et al., 2016). Aus klinischer Sicht ist ebenfalls die Ausbildung von Biofilmen in Kathetern oder an Endoprothesen, gesteuert über das „Quorum Sensing“, welches durch *agr* kontrolliert wird, zu beachten (Moormeier und Bayles, 2017).

In den 1940er Jahren erfolgte die Therapie von *S. aureus* durch die Gabe von Penicillin. Diese Substanz gehört zu den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und bindet an die Penicillin-bindenden-Proteine, welche als Transpeptidasen und Transglykosylasen des Peptidoglykan für den Zellwandaufbau wichtig sind (Sauvage et al., 2008). Relativ schnell entwickelten sich aufgrund des Selektionsdrucks des Anti-



## Einleitung

biotikums Penicillinase-bildende Stämme, wie in der Zeitleiste (Abb. 2) zu erkennen ist. In den 1950er Jahren wurden zwei weitere Antibiotika gegen *S. aureus* entwickelt, Methicillin und Vancomycin. Methicillin ist ein Isoxazolylpenicillin und stabil gegen Penicillinasen. Aufgrund der besseren

### *Staphylococcus aureus* Drug Resistance and Epidemics

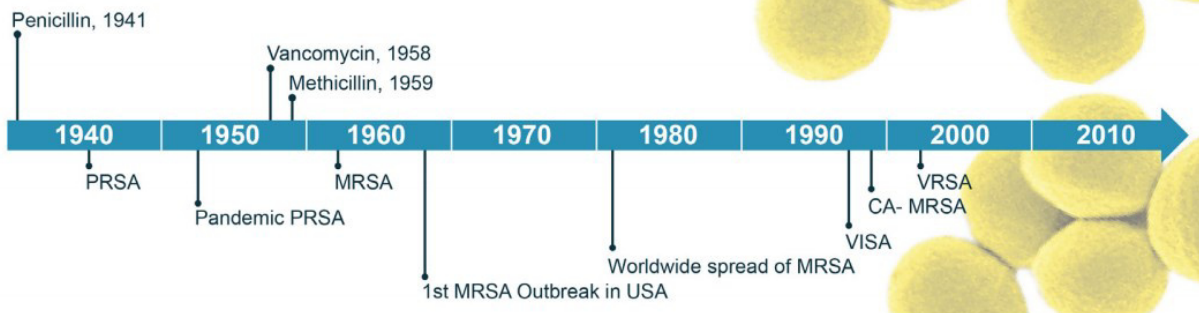


Abbildung 2 Zeitleiste der Einführung von Antibiotika zur Behandlung von *S. aureus* und Entstehung von resistenten Stämmen, entnommen aus McGuinness et al., (2017).

Verträglichkeit gegenüber Vancomycin, wurde Methicillin zur ersten Wahl in der Therapie von *Staphylococcus aureus*. Allerdings entwickelten sich auch gegen dieses Antibiotikum innerhalb weniger Jahre Resistenzen. Die Resistenz in Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) Stämmen basiert auf der Aufnahme einer Genkassette (SCCmec), welche das *mecA*-Gen trägt und für ein zusätzliches Penicillin-bindendes-Protein PBP2a kodiert. PBP2a hat eine geringe Affinität gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Liu et al., 2016a). MRSA erzeugen eine der führenden nosokomialen Infektionen weltweit und es kommt zunehmend auch zu Übertragungen außerhalb von klinischen Einrichtungen, sogenannte „community-associated“ MRSA (Chambers und Deleo, 2009). Die vermehrte Gabe von Vancomycin als Reserveantibiotikum seit Ende der 1980er Jahren führte dann zur erstmaligen Isolation von Vancomycin-intermediären *S. aureus* (VISA) und Vancomycin-resistenten *S. aureus* (VRSA) Stämmen. Neben Vancomycin sind auch Clindamycin, Rifampicin, Teicoplanin, Linezolid und Daptomycin gegen resistente *S. aureus* Stämme in der Klinik im Einsatz (Gatermann und Miksits, 2009). Dabei ist Daptomycin eines der wenigen Antibiotika zur Behandlung von MRSA, das von ähnlicher Wirksamkeit wie Vancomycin ist. Jedoch entstehen häufig Kreuzresistenzen zwischen den beiden Antibiotika (Holmes et al., 2015).

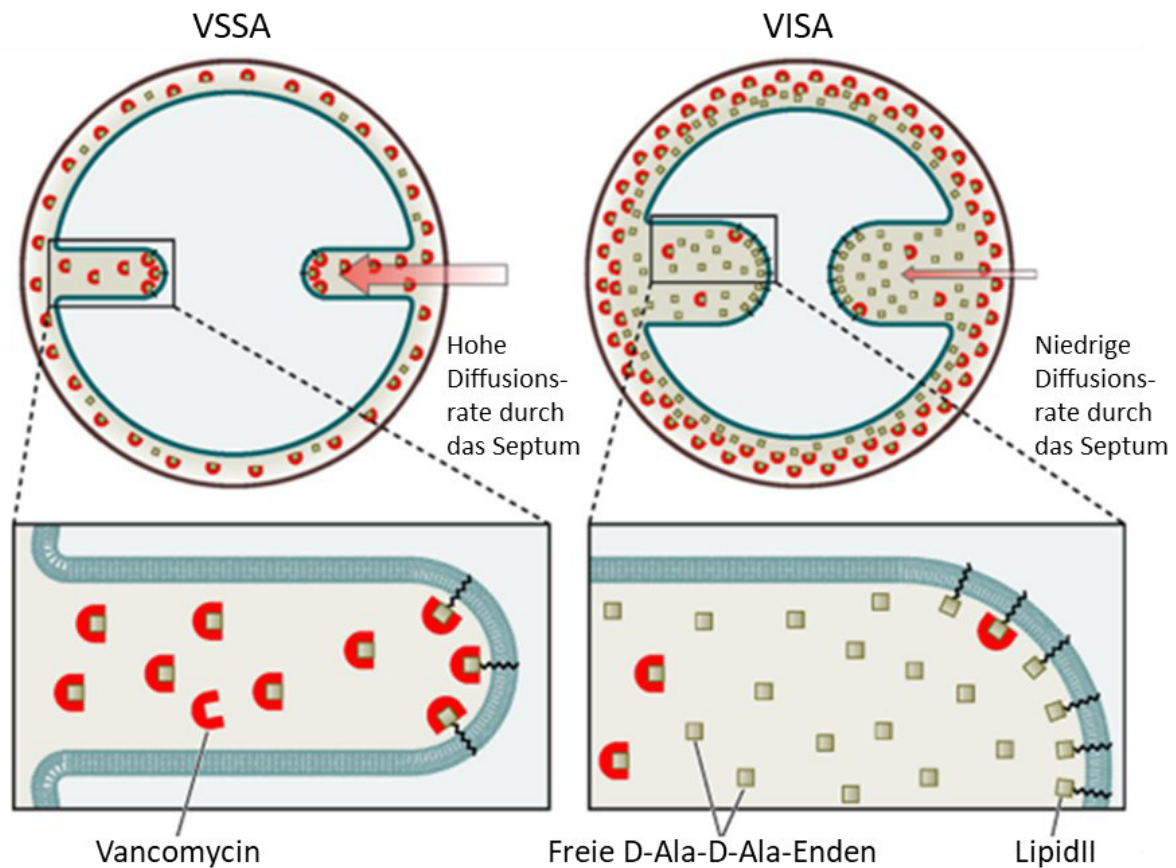
### 1.2 Vancomycin-intermediär resistenter *Staphylococcus aureus*

Vancomycin gehört zu der Gruppe der Glykopeptid-Antibiotika und wurde erstmalig 1955 aus dem Bodenbakterium *Amycolatopsis orientalis* isoliert (Levine 2006). Glykopeptide sind eine Klasse von glykosylierten, zyklischen nicht-ribosomalen Peptiden, denen neben Vancomycin auch die zugelassenen Antibiotika Teicoplanin, Telavancin und Dalbavancin angehören (Lebreton und Cattoir, 2020). Der Wirkmechanismus wurde 1984 erstmalig beschrieben (Barna und Williams, 1984) und basiert auf der Bildung von nicht-kovalenten Wasserstoffbindungen zwischen Vancomycin und den endständigen D-Ala-D-Ala-Resten von Lipid II. Dadurch wird die Zelle an der Quervernetzung der Mureinschichten durch Ausbildung einer Pentaglycinbrücke gehindert (Howden et al., 2010). Vancomycin ist ein Reserve-Antibiotikum und findet Einsatz gegen Gram-positive Bakterien, vor allem MRSA, Methicillin-resistente *Staphylococcus epidermidis* und *Clostridium difficile*. Anwendung findet es ebenfalls bei Patienten mit einer Penicillin-Allergie (Fille et al., 2009). Das nephrotoxische Antibiotikum wird meist parenteral, in seltenen Fällen einer *C. difficile* Infektion oral, verabreicht (Rubinstein und Keynan 2014). Für *S. aureus* ist die Einteilung der Vancomycin-Empfindlichkeit durch das Clinical and Laboratory Standards Institut (CLSI) seit 2006 wie folgt festgelegt: Vancomycin-empfindliche *S. aureus* (VSSA) mit einer MHK  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ , Vancomycin-intermediär resistente *S. aureus* (VISA) mit einer MHK von 4 – 8  $\mu\text{g/mL}$  und Vancomycin-resistente *S. aureus* (VRSA) mit einer MHK  $\geq 16\mu\text{g/mL}$  (Howden et al., 2010). Viele nicht pathogene Gram-positive Bakterien, wie *Leuconostoc*, *Pediococcus* und *Lactobacillus*, haben eine intrinsische Resistenz gegen Vancomycin, basierend auf dem Einbau von D-Lactat anstelle von D-Alanin in Position 5 des Pentapeptides von Lipid II (Handwerker et al., 1994). Der Austausch des endständigen D-Alanin spielt auch in der erworbenen Resistenz eine große Rolle. Ende der 80er Jahre wurden erstmals *Enterococcus*-Spezies mit einer hohen Resistenz gegen Vancomycin beschrieben. Die Resistenz basierte auf einem extrachromosomalen *van*-Gencluster. Mittlerweile wurden 11 *van*-Gencluster (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanF*, *vanI*, *vanM*, *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanN*) entdeckt (Cong et al., 2020). Der erste klinische VRSA-Stamm wurde 2002 in Michigan beschrieben (Chang et al., 2003). Innerhalb der Art *S. aureus* ist jedoch nur das *vanA*-Gencluster nachgewiesen worden (Werner et al., 2008). Dieses besteht aus *vanS*, *vanR*, *vanH*, *vanA* und *vanX*. Die Gene *vanS* und *vanR* kodieren für ein Zweikomponentensystem, welches das Gencluster in Anwesenheit von Vancomycin hochreguliert. Die Dehydrogenase VanH reduziert Pyruvat zu D-Lactat. VanX agiert als Dipeptidase und hydrolysiert das native D-Ala-D-Ala. Schließlich katalysiert VanA die Bildung des D-Ala-D-Lac Depsipeptides. Durch die Veränderung des terminalen D-Ala-D-Ala-Restes sinkt die Affinität von Vancomycin an Lipid II um das 1000-fache (McGuinness et al., 2017). Bis 2020 wurden nur insgesamt 52 VRSA-Stämme isoliert. Zudem

## Einleitung

---

gibt es keinen Hinweis auf eine Ausbreitung dieser Stämme, da der Phänotyp in *S. aureus* häufig instabil ist und der horizontale Gentransfer zwischen Spezies eine hohe Hürde darstellt. Die größten Risikofaktoren für eine Infektion mit VRSA sind eine Vancomycin-Therapie und die Ko-Infektion mit Vancomycin-resistenten Enterokokken (Cong et al., 2020). Insgesamt stellen VISA-Stämme die größere Gefährdung des Therapie-Erfolges bei der Gabe von Vancomycin dar. Vancomycin-intermediäre *S. aureus* Stämme besitzen kein *van*-Operon, sondern entwickelten eine reduzierte Vancomycin-Empfindlichkeit durch die Akkumulation von Einzelmutationen während der Behandlung mit dem Antibiotikum (Howden et al., 2010). Der erste klinische VISA-Stamm *S. aureus* Mu50 wurde 1996 in Japan entdeckt und beschrieben (Hiramatsu et al., 1997). Oftmals zeigen klinische VISA-Stämme einzelne Subpopulationen mit reduzierter Vancomycin-Empfindlichkeit, sogenannte heterogene Vancomycin-intermediär resistente *S. aureus* Stämme (hVISA) (Hiramatsu et al., 2014). VISA-Stämme zeigen einige gemeinsame Charakteristika im Vergleich zu VSSA. Dazu zählt eine reduzierte Autolyse, die mit einer verdickten Zellwand einhergeht (Sieradzki und Tomasz 2003; Howden et al., 2006; Nelson et al., 2007; Gardete et al., 2012; Peng et al., 2018). Die Zellwand besitzt zudem oft eine geringe Quervernetzung, wodurch viele freiliegende D-Ala-D-Ala-Gruppen vorliegen (Sieradzki und Tomasz, 1997; Finan et al., 2001; Komatsuzawa et al., 2002; Reipert et al., 2003). Die Bindung von Vancomycin an das Substrat in der Zellwand kann so zu einem „Clogging-Effekt“ durch eine gehinderte Diffusion führen (Cui et al., 2000; Cui et al., 2006a), wodurch sich keine letale Dosis an Vancomycin in der Teilungssepte aufbaut (siehe Abb. 3). VISA haben zudem oft eine abgemilderte Virulenz und eine geringere Wachstumsrate (Sieradzki und Tomasz 1999; Mongodin et al., 2003; Peleg et al., 2009; Hu et al., 2016). Die Ausbildung des VISA Phänotyp ist mit Mutationen in vielen Genen assoziiert. Am häufigsten sind Mutationen in Zweikomponentensystemen, wie *graRS*, *walRK* und *vraSR* beschrieben (Hu et al., 2016). Dabei scheint auch der Sequenz-Typ (ST) von Bedeutung zu sein, da beispielsweise *S. aureus* Stämme des ST8, Mutationen in *vraS* und *vraR* gegenüber solchen in *walK* und *walR* präferieren (Hafner et al., 2012). Das *VraSR*-TCS spielt eine zentrale Rolle in der Hochregulation der Zellwand-Biosynthese durch das Zellwandstress-Regulon unter dem Einfluss von Vancomycin und anderen Zellwand-Biosynthesehemmern (Kuroda et al., 2003). Außerdem führen kationische antimikrobielle Peptide (CAMPs) zu einer Aktivierung von *GraRS* in Zusammenspiel mit *GraX* und dem ABC-Transportersystem *VraFG*, welche auch oft Mutationen in VISA aufweisen (Meehl et al., 2007; Falord et al., 2011). In *GraRS*-Knockout-Mutanten ist die Expression einer Vielzahl von Genen verändert, unter anderem Gene der Biofilm-Biosynthese (*icaABCD*), Gene für die D-Alanylierung der WTA (*dltABD*), Gene des Urease-Metabolismus (*ureABCDEFGF*), Gene der Kapsel-Biosynthese (*capAHJK*) und Gene einiger Regulatoren (*mgrA*, *rot*, *walRK*) (Herbert et al., 2007). Das *WalRK*-TCS ist ebenfalls mit der Größe der Zellwand assoziiert und reguliert hauptsächlich die Autolysine und Virulenz (Delaune et al.,



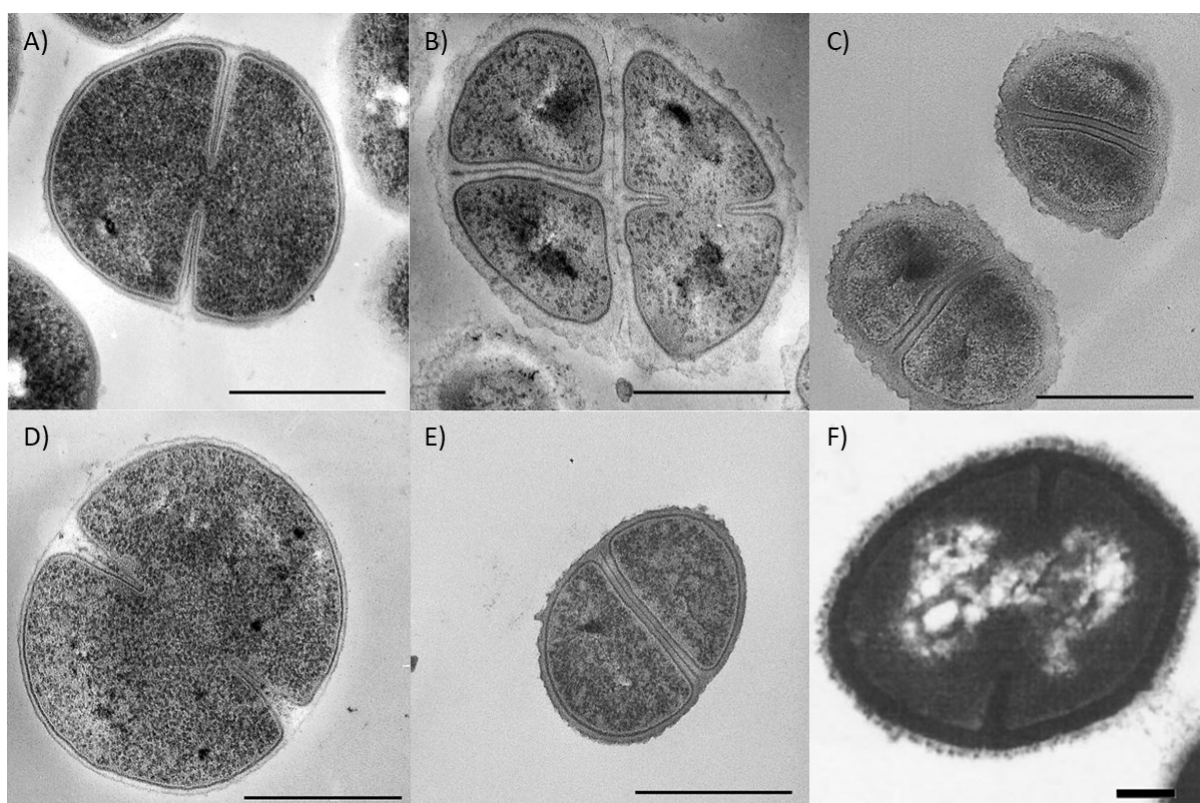
**Abbildung 3** Model der Wirkung von Vancomycin in einem VSSA und einem VISA mit dicker Zellwand und vielen freien D-Ala-D-Ala-Resten. Die Diffusionsrate zur Teilungssepte mit Lipid II in dem VISA-Stamm ist reduziert, wodurch die Zellwand-Synthese und Zellteilung wenig beeinträchtigt ist (modifiziert aus Howden et al., (2010)).

2012). Zwei weitere Gene *yycH1*, akzessorische Gene für die *walRK*-Expression (Gajdiss et al., 2020), und *stp1* (*prpC*), ein Gen für eine Serin-Threonin-Phosphatase, die Stk1 (PknB) dephosphorylieren kann, sind in VISA ebenso von Mutationen betroffen (Mwangi et al., 2007; Renzoni et al., 2011). In *Bacillus subtilis* führt ein analoges System (*prpC/prkC*) zur Phosphorylierung von WalR in vitro und in vivo (Libby et al., 2015). Mutationen in zwei globale Regulatoren, *mgrA* und *sarA*, sind genauso involviert in die Ausbildung des VISA-Phänotyps (Trotonda et al., 2009). Auch einzelne nicht-regulatorische Gene stehen in Verbindung mit der Entstehung von VISA-Stämmen zum Beispiel *pbp4*, zuständig für die Quervernetzung der Zellwand, *clpP*, involviert in dem Abbau von Proteinen durch das Proteasom, *mprF*, entscheidend für die Ladung der Zellmembran durch Lysylphosphatidylglycerol, *prsA*, beteiligt in der extrazellulären Faltung von Proteinen, und *rpoB*, eine DNA-abhängige RNA-Polymerase (Finan et al., 2001; Nishi et al., 2004; Mwangi et al., 2007; Cui et al., 2010; Shoji et al., 2011). Im Allgemeinen reicht eine einzelne Mutation nicht aus, um einen VSSA-Stamm in einen VISA-Stamm zu konvertieren, jedoch konnte gezeigt werden, dass die WalR(K208R) Mutation eines klinischen Isolates eine Vancomycin-MHK von 4 µg/mL erreichte (Howden et al., 2011; Hu et al., 2016). Aufgrund der vielfältigen Mutationen und den beteiligten regulatorischen Genen ist der zugrunde-

liegende molekulare Mechanismus der intermediären Vancomycin-Resistenz nicht abschließend geklärt.

## 1.2.1 *S. aureus* VC40

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf dem Stamm *S. aureus* VC40. Entstanden ist dieser durch die mehrfache Passage des Elternstammes *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* (ST8) in Medium mit steigenden Vancomycin-Konzentrationen. Der Mutatorstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* (Zellwanddurchmesser 16 nm) weist dabei eine Inaktivierung von *mutS* durch eine Insertion auf. Dadurch ist die DNA-Reparatur beeinträchtigt, wodurch die Mutationsfrequenz ansteigt. Eine erhöhte Vancomycin-MHK entsteht



**Abbildung 4** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* (A), *S. aureus* VC40 (B), *S. aureus* VC40R (C), *S. aureus* NCTC8325 (D), *S. aureus* VraS(VC40) (E) und *S. aureus* 137/93A (F), entnommen und modifiziert aus Berscheid (2013) und Reipert et al., (2003). Die Linien repräsentieren eine Länge von 0,5  $\mu$ m (A-E) beziehungsweise 0,1  $\mu$ m (F).

dementsprechend schneller in dem Mutatorstamm mit höherer Mutationsfrequenz gegenüber dem Wildtyp *S. aureus* RN4220 mit 5 zu 19 Passagen. Letztendlich wurde der Stamm *S. aureus* VC40 mit einer Vancomycin-MHK von 64  $\mu$ g/mL isoliert (Schaaff et al., 2002). Eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* VC40 mit der stark verdickten Zellwand (Zellwanddurchmesser 62 nm), sowie den weiteren VISA Isolaten, ist in Abbildung 4 dargestellt. Entsprechend der MHK ist der Stamm den

VRSA zuzurechnen. Da jedoch diese Gruppe nur aus Stämmen mit *vanA*-Gencluster besteht, und *S. aureus* VC40 durch seinen Geno- und Phänotyp eher den klassischen VISA-Stämmen entspricht, wurde zur Vereinfachung die Klassifizierung als VISA beibehalten. Ähnlich zu anderen VISA-Stämmen konnte eine Kreuzresistenz gegenüber Daptomycin (8 µg/mL) nachgewiesen werden (Berscheid et al., 2014). Die Wachstumsrate von *S. aureus* VC40 ist mit einer Verdopplungszeit von 120 Minuten gegenüber dem Elternstamm *S. aureus* RN4220Δ*mutS* (42 min) drastisch reduziert (Schaaff et al., 2002). Der VISA-Stamm *S. aureus* VC40 zeigt des Weiteren eine geringe Autolyse und eine geringe Sensitivität gegenüber Lysostaphin, sowie eine hohe Resistenz gegenüber Bakteriophagen des Internationalen Phagensatzes (Berscheid, 2013). *S. aureus* VC40 hat insgesamt 79 Mutationen in 75 Genen akkumuliert (vergleiche Tab. 44), darunter solche in Loki für Proteine, die mit einer verringerten Vancomycin-Empfindlichkeit assoziiert sind, wie *VraS*(D242G; L114S), *WalK*(I544M), *MprF*(H224Y) und *VraG*(G570R). Der Aminosäureaustausch in *WalK* führt zu einer stark verringerten Autophosphorylierung der Histidin-Kinase *in vitro* (Kienemund, 2016). Insgesamt befinden sich neun Mutationen in regulatorischen Genen und elf in Genen mit Verbindung zur Zellhülle, darunter zwei in Autolysinen. Interessanterweise ist dieser Stamm im Gegensatz zum Elternstamm *agr+*, durch eine 1 bp-Deletion in *agrA*, die den Frameshift im Elternstamm korrigiert (Berscheid, 2013). In einem Microarray zeigte sich, dass viele Gene unter der Kontrolle von *vraSR* (*cwrA*, *lytU*, *relP*, *sgtB*, *tcaA*, *spsA*, *recU*, *proP*, *vraU*, *fntA*, *htrA1*, *murZ*, *lcpC*, *pbp2*, *vraR*, *ctpA*, *vraT*, *vraS*, *opuD1*) in *S. aureus* VC40 hochreguliert waren. Erstaunlicherweise waren auch viele Autolysine (*AtlA*, *LytM*, *Sle1*, *SceD*, *SsaA*, *IsaA*, *LytD*, *LytU*) hochreguliert, obwohl der Stamm insgesamt eine geringe Autolyse aufwies (Berscheid et al., 2014).

### 1.2.2 *S. aureus* VC40R

Der Stamm *S. aureus* VC40R wurde aus einer Kultur von *S. aureus* VC40 isoliert und eine Genomsequenzierung ergab eine relevante zusätzliche Mutation in *vraR*, die zu dem Aminosäureaustausch M54T führt. Daneben zeigt die Illumina-Sequenzierung des Stammes weitere Aminosäureaustausche in der Pyruvat-Format Lyase *PflB*(R430C), dem hypothetischen Protein *MrnC*(H26Y), der Serin-Protease *HtrA1*(G377S), dem Fibrinogen-binde-Protein *SdrH*(N153K), der Format-Dehydrogenase *FdhA*(D788G), dem Aminosäure-Transporter *TcyC*(M224T) und der Nickel-Permease *NixA*(A162T). Dieser Stamm besitzt eine reduzierte Vancomycin-MHK von 4 µg/mL, sodass *S. aureus* VC40R als Revertante angesehen wurde (Berscheid, 2013). Revertanten sind Rückmutanten, bei denen der vorherige Phänotyp durch eine Reparatur der originalen Gensequenz (wahre Revertante) oder durch eine kompensierende, zusätzliche Mutation (Pseudorevertante) wiederhergestellt wurde (Rosenberg 2013). Anhand der MHK ist der Stamm weiterhin den VISA zuzuordnen. Der Stamm weist eine verdickte

Zellwand mit einem Durchmesser von 55 nm, ein reduziertes Wachstum und eine ähnliche Resistenz gegenüber Lysostaphin und dem Internationalen Phagensatz auf wie *S. aureus* VC40. Eine qRT-PCR zeigte, dass auch *S. aureus* VC40R viele Autolysine überexprimiert. Im Gegensatz zu *S. aureus* VC40 lysiert der Stamm jedoch unter Einwirkung von Triton X-100 (Berscheid, 2013).

### 1.2.3 *S. aureus* VraS(VC40)

In diesem Stamm wurden die beiden *vraS*-Mutationen aus *S. aureus* VC40 in den Hintergrund des VSSA-Stammes *S. aureus* NCTC8325 (ST8) durch einen Allelaustausch eingebracht. Der Stamm *S. aureus* NCTC8325 wurde aufgrund dem zu *S. aureus* VC40 identischen *agr*-Hintergrund ausgewählt. Eine qRT-PCR zeigte, dass der Stamm *S. aureus* VraS(VC40), im Vergleich zu *S. aureus* NCTC8325, Gene innerhalb des *vraSR*-Regulons (*vraS*, *sgtB*) hochreguliert hat (Berscheid et al., 2014). Neben dem Austausch in VraS(D242G; L114S) besitzt der Stamm noch weitere Hintergrundmutationen in den hypothetischen Proteinen GdpP(P13L), SAOUHSC\_00274 (Q28K), SAOUHSC\_01465 (F8L), SAOUHSC\_02067 (T207A), SAOUHSC\_02150 (V93M), SAOUHSC\_02191 (I11S), SAOUHSC\_02911 (H108R), der Pyruvat-Format Lyase PflA(G72D), der Phosphofruktokinase FruB(G39V), der tRNA Ribosyltransferase-Isomerase QueA(P152R) und dem Siderophor-Biosynthese-Protein SfnA (Q199stop). Durch die Mutationen in *vraS* hat sich die Vancomycin-MHK in dem VISA-Stamm *S. aureus* VraS(VC40) auf 4 µg/mL erhöht, im Vergleich zu 1 µg/mL in *S. aureus* NCTC8325. Der Stamm weist ebenfalls eine verdickte Zellwand mit einem Durchmesser von 38 nm (Wildtyp *S. aureus* NCTC8325 16 nm Durchmesser) und eine geringfügig niedrigere Wachstumsrate als der Wildtyp auf. Die Lyse durch Lysostaphin ist in *S. aureus* VraS(VC40) verzögert und die Empfindlichkeit gegenüber Phagen vergleichbar mit der Kontrolle. Auffällig ist die reduzierte Lyse, induziert durch Triton X-100, wobei *lytM* in *S. aureus* VraS(VC40) hochreguliert wurde, nicht jedoch *atIA* (Berscheid, 2013).

### 1.2.4 *S. aureus* 137/93A

Der Stamm *S. aureus* 137/93A ist ein klinisches Isolat aus dem Jahre 1993 und wurde 1999 bei einem Screening der Stammkollektion des Staphylokokken-Referenzzentrums der Universität Bonn als VISA charakterisiert (Bierbaum et al., 1999). *S. aureus* 137/93A hat eine Vancomycin-MHK von 8 µg/mL. Der Stamm zeigt eine verdickte Zellwand mit einem Durchmesser von 35 nm und eine geringe Quervernetzung von 66 %, wobei der Gehalt an Monomeren und Dimeren in der Peptidoglykan-Analyse erhöht ist. Interessanterweise konnte für den Stamm kein PBP4, welches für die Quervernetzung der

Zellwand verantwortlich ist, in der Membran nachgewiesen werden, wobei keine Mutation in dem entsprechenden Gen vorliegt (Reipert et al., 2003). Jansen et al., (2007) fand heraus, dass in dem Stamm *S. aureus* 137/93A das Zweikomponentensystem *walRK* hochreguliert ist. Die Genomsequenzierung ergab eine Insertion eines IS256-Elementes in die Promotorregion des TCS, wodurch eine potenzielle Verstärkung des Promotors entstanden sein könnte (Maki und Murakami, 1997; Jansen et al., 2007). Insertionssequenzen (IS-Element) sind kurze, springende DNA-Sequenzen, welche sich selbstständig innerhalb des Genoms bewegen können, ohne eine DNA-Homologie zu benötigen und meistens alle Gene für die Transposition beinhalten (Curcio und Derbyshire, 2003). Diese IS256-Insertion in *walRK* fehlte in revertierten Vergleichsstämmen. Die Xylose-induzierbare Überexpression von *walRK* durch den pTX15 Vektor in *S. aureus* NCTC8325-4 SH1000 zeigt eine verstärkte Vancomycin-Resistenz (Jansen et al., 2007). Daneben besitzt *S. aureus* 137/93A weitere Mutationen, unter anderem in Genen für die Proteine LytN (Autolysin), PBP2 (Penicillinbinde-Protein), FmtB (Zellwand-Biosynthese), FtsZ (Zellteilung) und CodY (Regulation). Als Vergleichsstamm wurde in dieser Arbeit *S. aureus* 1450/94 (Reipert et al., 2003), ein klinisches MRSA-Isolat des Norddeutschen Epidemie-Typs, zugehörig zum gleichen Sequenz-Typ wie *S. aureus* 137/93A (ST247), eingesetzt.

## 1.3 Zellwand

Seit dem Einsatz von Penicillin gegen *S. aureus* Infektionen in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts ist die Untersuchung der bakteriellen Zellwand entscheidend für die Erforschung der Aktivitätsmechanismen von Zellwand-Biosynthesehemmern und der entstehenden Resistenzmechanismen. In der Tat stellen die Zellwandbiosynthese-Inhibitoren, wie beispielsweise  $\beta$ -Laktame, Glykopeptide, Tunikamycin, Lantibiotika, Cycloserin, Fosfomycin und Bacitracin, den größten Teil der entdeckten Antibiotika dar (Kresse et al., 2007; Schneider und Sahl, 2010; Grein et al., 2019). Die Zellwand von *Staphylococcus aureus* besteht aus Peptidoglykan (PGN), einer alternierenden Kette von N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) und N-Acetyl-Muraminsäure (MurNAc) Einheiten, verbunden über  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen, die über eine Peptidseitenkette und Pentaglycin-Querbrücke miteinander quervernetzt sind (Caveney et al., 2018). Daneben befinden sich auch Proteine, Wandteichonsäuren (kovalent an die Zellwand gebunden) und Lipoteichonsäuren (über einen Lipidanker integriert in die Zellmembran) in der Zellwand (Radkov et al., 2018). Im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien hat das Peptidoglykan von *S. aureus* viel mehr Mureinschichten und weist keine äußere Membran auf. Typischerweise besteht das PGN in *S. aureus* aus kurzen Glykan-Ketten (5 bis 25 Disaccharid-Einheiten), ist stark quervernetzt und hat insgesamt eine Dicke von 20 bis 30 nm (Boneca et al., 2000; Sobral und



# Einleitung

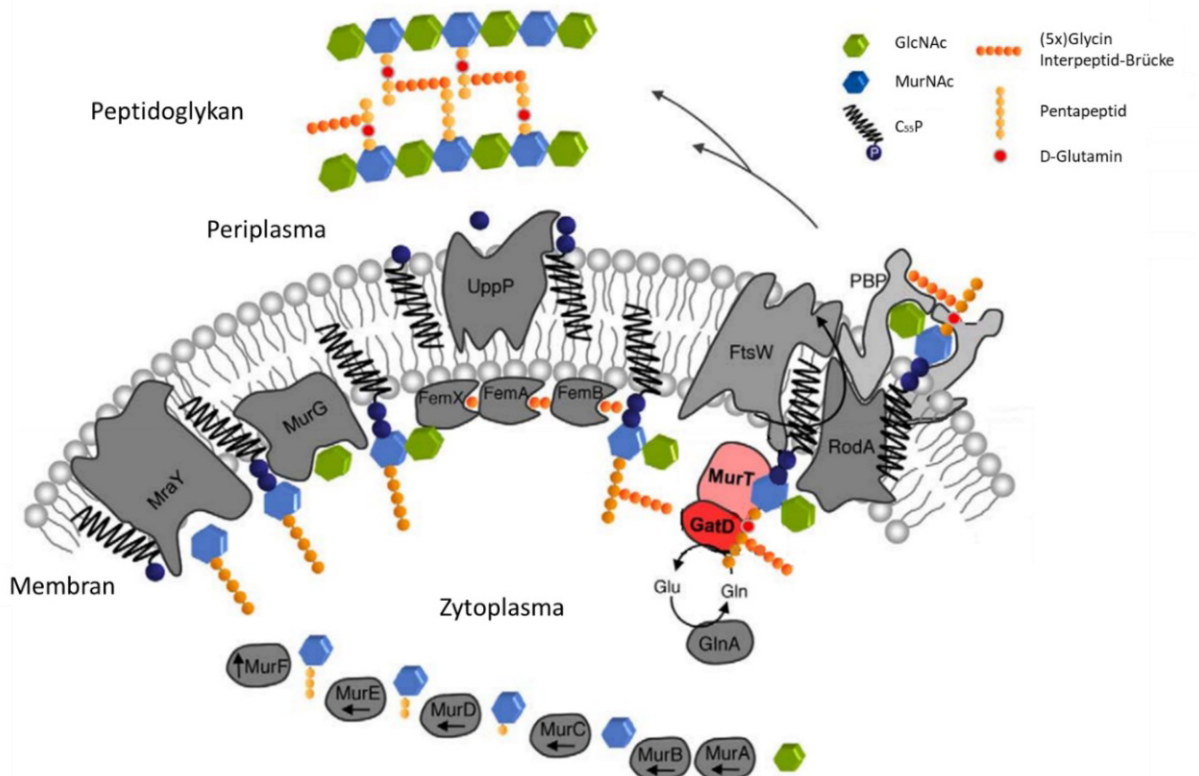


Abbildung 5 Model der Zellwand-Biosynthese in *S. aureus*, modifiziert aus Münch et al., (2012).

Tomasz, 2019). Die Funktion der Zellwand ist das Standhalten gegen osmotischen Druck und die Erhaltung der Zellintegrität (Vollmer et al., 2008a). Der Aufbau und die Biosynthese des Peptidoglykans sind in Abbildung 5 dargestellt. Zuerst wird im Zytoplasma der UDP-MurNAc-Präkursor aus UDP-GlcNAc hergestellt, katalysiert durch MurA und MurB. Anschließend werden die Aminosäuren für das Pentapeptid (L-Alanin, D-Glutaminsäure, L-Lysin, D-Alanin, D-Alanin) durch die Enzyme MurC, MurD, MurE und MurF angehängt (El Zoeiby et al., 2003). Vor dem letzten Schritt konvertiert die D-Alanin-Racemase Alr zwei L-Alanin zu D-Alanin und die D-Ala-Ligase DdIA verbindet beide durch eine Peptidbindung (Walsh, 1989). Danach transferiert das Enzym MraY das UDP-MurNAc-Pentapeptid unter Abspaltung von UMP an den membrangebundenen Undecaprenylphosphat-Lipid-Carrier (C<sub>55</sub>P), wodurch Lipid I entsteht. Durch MurG wird unter Abspaltung von UDP ein GlcNAc an Lipid I angehängt, wodurch Lipid II entsteht (Pinho et al., 2013). Anschließend werden durch die Enzyme FemX, FemA und FemB fünf Glycin-Reste an das L-Lysin des Pentapeptides angehängt (Schneider et al., 2004). Außerdem wird die D-Glutaminsäure des Pentapeptides durch den MurT/GatD-Komplex zu D-Glutamin amidiert, wobei die Glutamin-Synthetase GlnA involviert ist (Münch et al., 2012). Danach wird das Lipid II durch die potenzielle Flippase MurJ über die Membran ins Periplasma überführt (Monteiro et al., 2018). Dort wird es durch PBPs (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4) in Zusammenarbeit mit FtsW und RodA in das vorhandene Peptidoglykan durch Transpeptidierung und Transglykosylierung eingebaut (Reichmann et al., 2019; Monteiro et al., 2018). Auch SgtB und FmtA werden PGN-

Transglykosylierungs-Eigenschaften zugeschrieben (Fan et al., 2007; Sauvage et al., 2008; Reed et al., 2011). Das C<sub>55</sub>P wird durch UppP wieder recycelt (Caveney et al., 2018).

## 1.4 Autolyse

Neben dem Zellwandaufbau ist auch der Abbau der Zellwand ein wichtiger Mechanismus für das Wachstum der Zelle, vor allem während der Zellteilung. Beide Prozesse sind miteinander verbunden und werden in *S. aureus* reguliert, um die Zellintegrität zu erhalten. Der Ab- und Umbau des polymerischen Peptidoglykans wird in *S. aureus* durch Zellwand-Hydrolasen, auch Autolysine genannt, durchgeführt (Vermassen et al., 2019). Sie dienen der Regulierung des Wachstums, der Zellteilung und der Freisetzung von Signalmolekülen für das Bakterium und andere Organismen (Vollmer et al., 2008b). Dadurch sind Autolysine auch in die Biofilmbildung involviert (Bose et al., 2012). Die erste Peptidoglykan-Hydrolase wurde 1922 von Alexander Flemming aus dem Nasenschleim eines Patienten mit Rhinitis isoliert und als Lysozym bezeichnet (Fleming, 1922; Do et al., 2020). Seitdem sind insgesamt 13 annotierte Autolysine und zwei weitere hypothetische Autolysine (vergleiche Tab. 26) in *S. aureus* identifiziert worden. Die Autolysine können basierend auf der Schnittstelle im Peptidoglykan (Abb. 6) und der Hydrolase-Reaktion in mehrere Kategorien eingeordnet werden (Vollmer et al., 2008b). *Staphylococcus aureus* besitzt N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen (AtIA), die die Bindung zwischen der N-Acetyl-Muraminsäure und dem Pentapeptid spalten, und N-Acetyl-D-Glucosaminidasen (AtIA, LytN, LytH, ScaH, Sle1, SagA, LytD), die die Bindung zwischen N-Acetyl-Muraminsäure und N-Acetyl-Glucosamin spalten (Oshida et al., 1995; Fujimura und Murakami, 1997; Kajimura et al., 2005; Pasztor et al., 2010; Wheeler et al., 2015). Die lytischen Transglykosylasen (IsaA, SceD), auch N-Acetyl-Muramidase genannt, spalten ebenfalls zwischen den beiden Zuckern GlcNAc und MurNAc, jedoch unter Bildung eines 1,6-Anhydro-MurNAc Ringes (Stapleton et al., 2007). Zudem exprimiert das Bakterium sowohl Glycyl-Glycin-Endopeptidasen (LytM, LytU) als auch D-Alanyl-Glycin-Endopeptidasen (LytN, SsaA, SsaA2), welche die Amid-Bindungen zwischen den Aminosäuren der Interpeptidbrücke spalten (Ramadurai und Jayaswal, 1997; Frankel et al., 2011; Raulinaitis et al., 2017). Einzelne Autolysine sind dementsprechend redundant in *S. aureus* (Hirschhausen et al., 2012). Autolysine in *S. aureus* werden hauptsächlich durch das essenzielle Zweikomponentensystem WalRK reguliert (Dubrac et al., 2007). Daneben konnte gezeigt werden, dass auch das *cidAB/lrgAB*-Operon, innerhalb des Regulons des LytSR-TCS, und die ArIRS- und GraRS-TCS die Aktivität von Zellwand-Hydrolasen regulieren (Brunskill und Bayles, 1996; Fournier und Hooper, 2000; Rice et al., 2003; Herbert et al., 2007).

## Einleitung

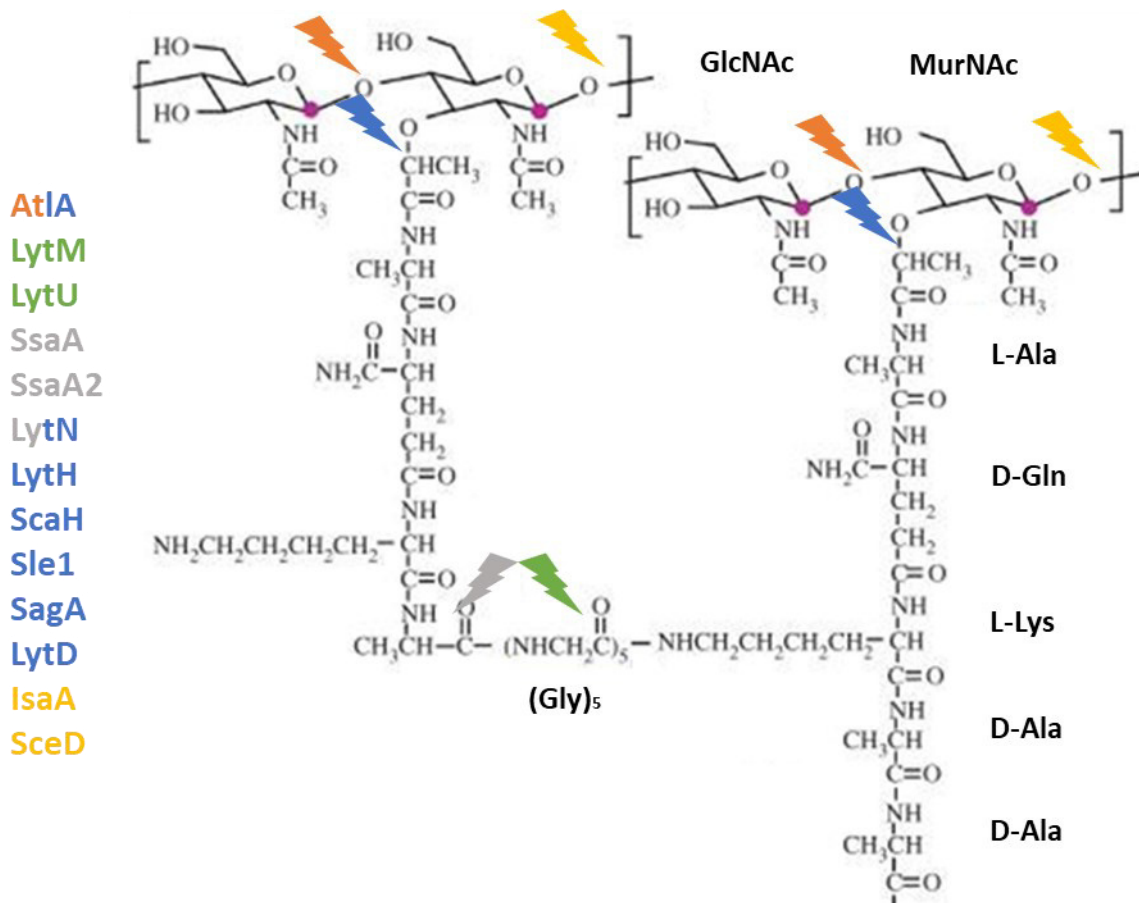


Abbildung 6 Aufbau von quervernetztem Peptidoglykan und Angriffspunkte verschiedener Zellwandhydrolasen (Amidase, Glucosaminidase, Endopeptidase (Glycyl-Glycin), Endopeptidase (D-Alanyl-Glycin), Muramidase) aus *Staphylococcus aureus*, modifiziert nach Romaniuk und Cegelski (2015).

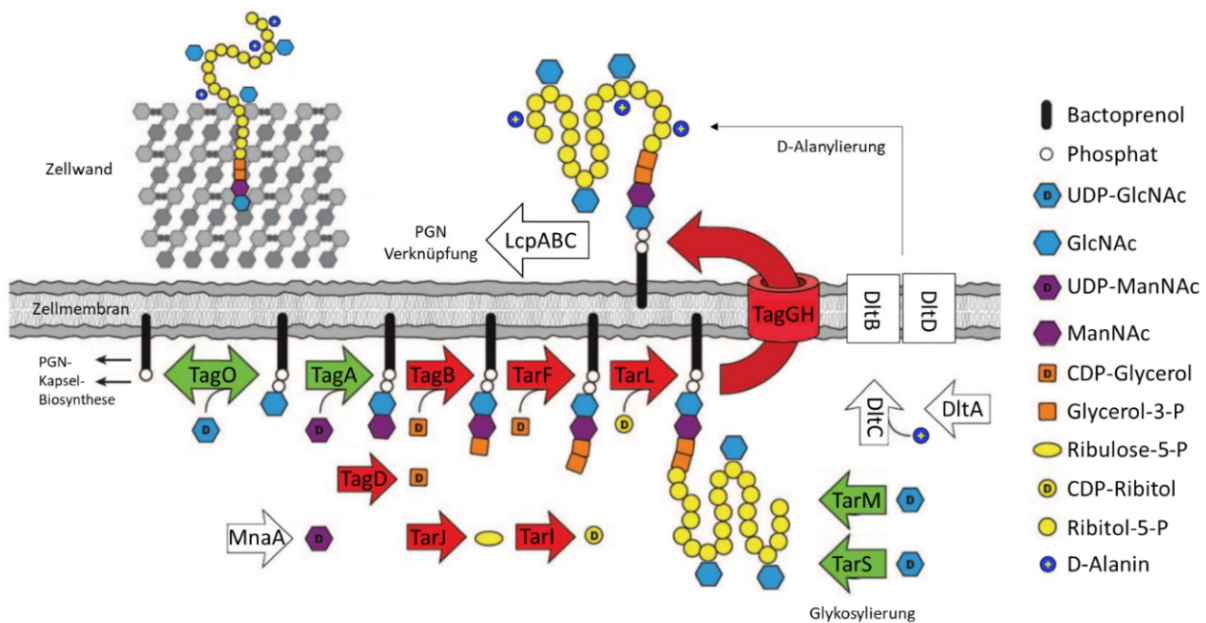
Das Hauptautolysin in *S. aureus* ist das bifunktionelle Protein AtIA (vergleiche Abb. 41). Es wurde 1994 von Oshida et al., (1995) entdeckt. AtIA ist circa 137 kDa groß und hoch konserviert in Staphylokokken. Durch eine proteolytische Spaltung entstehen zwei Peptidoglykan-Hydrolasen, eine 62 kDa große N-terminale N-Acetyl-Muramoyl-L-Alanin-Amidase (AM), mit einer katalytischen und zwei Repeat-Domänen, und eine 51 kDa große C-terminale Endo- $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase (GL), mit einer Repeat- und einer katalytischen Domäne (Büttner et al., 2014; Götz et al., 2014). Dabei sind die Repeat-Regionen für die Bindung zum Substrat verantwortlich (Biswas et al., 2006). Die Glucosaminidase hat zudem auch die Fähigkeit unspezifisch an DNA zu binden (Grilo et al., 2014). Sowohl Signal-Sequenz als auch Propeptid liegen N-Terminal und werden ebenfalls abgespalten. Es wird vermutet, dass das Propeptid der AtIA Translokation dient (Demleitner und Götz 1994). Der Mechanismus dieser Prozessierungen, sowie die beteiligten Enzyme, sind unbekannt (Schlag et al., 2010; Götz et al., 2014; Grilo et al., 2014; McCarthy et al., 2016). Es konnte jedoch eine Verbindung zwischen dem *msaABC*-Operon, welches viele Proteasen reguliert, und der Rate der Prozessierung von AtIA gezeigt werden (Sahukhal et al., 2015). Eine *S. aureus* AtIA-Deletionsmutante zeigte die Bildung von großen Zell-Clustern unter dem Lichtmikroskop. Die hydrolytischen Fragmente von AtIA sind damit in der Trennung

der Tochterzellen nach der Zellteilung involviert (Biswas et al., 2006). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Lipoteichonsäuren (LTA) und die Abwesenheit von Wandteichonsäuren (WTA) für die Lokalisation von AtlA an die Teilungssepte entscheidend sind (Yamada et al., 1996; Schlag et al., 2010; Biswas et al., 2012; Zoll et al., 2012). Interessanterweise sind weder WTA noch LTA bei Temperaturen unter 30 °C essenziell für *S. aureus*, jedoch können nicht beide Polymere gleichzeitig deletiert werden (Oku et al., 2009).

### 1.5 Wandteichonsäuren

Ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von Gram-positiven Bakterien sind die Wandteichonsäuren (WTA). Dabei ist die WTA-Struktur sehr divers innerhalb der Gram-positiven Bakterien und oft Spezies-spezifisch (Weidenmaier und Peschel, 2008). Erstmals isoliert wurden WTA von Armstrong et al., (1958). Oftmals ist die Konzentration an WTA ungefähr gleich mit der Konzentration an Peptidoglykan in der Zellwand (Sewell und Brown, 2014). In *S. aureus* bestehen die Wandteichonsäuren aus 11-40 Ribitol-Phosphat-Einheiten, die mit D-Alanin und N-Acetyl-Glucosamin substituiert sind und kovalent an eine N-Acetyl-Muraminsäure des Peptidoglykan gebunden sind. Diese Bindung an das Peptidoglykan besteht aus einem Disaccharid aus N-Acetyl-Glucosamin-1-Phosphat und N-Acetyl-Mannosamin gefolgt von zwei Glycerol-3-Phosphat-Einheiten (Winstel et al., 2014). Die Synthese der WTA erfolgt im Zytoplasma an der Zellmembran (Abb. 7). Initiiert wird die Biosynthese von TagO durch die Übertragung von GlcNAc auf den C<sub>55</sub>P Lipidcarrier. TagA transferiert ManNAc auf den Präkursor (Ginsberg et al., 2006). UDP-ManNAc wird von der Epimerase MnaA hergestellt und findet in dem primären Metabolismus von *S. aureus* sonst keine Verwendung (Soldo et al., 2002; Xia et al., 2010a). Anschließend wird durch TagD, TagB und TarF CDP-Glycerol synthetisiert und zweimal an den Anker der WTA angehängen (Badurina et al., 2003; Brown et al., 2008). Die Synthese der Ribitol-Kette erfolgt durch TarJ, TarI und TarL ausgehend von Ribulose-5-Phosphat-Einheiten (Pereira et al., 2008). Dabei wird die Länge der Ribitol-Kette von *agr* beeinflusst (Meredith et al., 2008). Der letzte Schritt im Zytoplasma ist die Substituierung der WTA mit N-Acetyl- Glucosamin durch die Glykosyltransferasen TarM und TarS. Dabei bindet TarM ausschließlich Zucker in Alpha-Konfiguration ( $\alpha$ -Glykosylierung) und TarS nur Zucker in Beta-Konfiguration ( $\beta$ -Glykosylierung) an die Ribitol-Einheiten (C4) der WTA (Vinogradov et al., 2006; Winstel et al., 2014). Abschließend werden die Wandteichonsäuren durch

## Einleitung



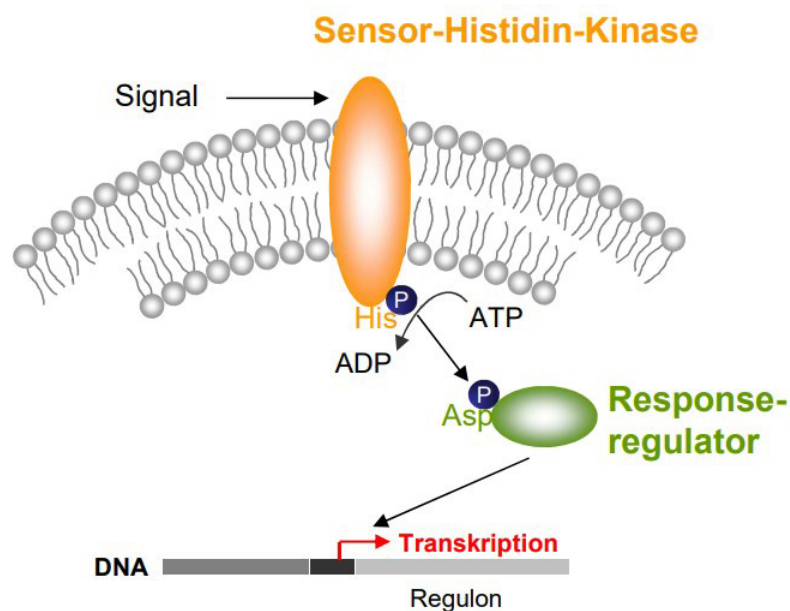
**Abbildung 7** Model der Wandteichonsäure-Biosynthese und Substitution mit D-GlcNAc und D-Alanin in *S. aureus*, modifiziert nach Swoboda et al., (2010)

den ABC-Transporter TagGH nach außen verlagert (Schirner et al., 2011) und durch LcpABC mit dem Peptidoglykan verknüpft (Kawai et al., 2011; Dengler et al., 2012). Ebenfalls erfolgt dort die D-Alanylierung der Wandteichonsäuren an den Ribitol-Einheiten (C2) durch DltABCD (Neuhaus und Baddiley, 2003; Vinogradov et al., 2006), welches durch das TCS GraRS reguliert wird (Falord et al., 2011). Insgesamt sind Gene mit der Bezeichnung *tag* involviert in stark konservierten Schritten, die zwischen WTA aus Glycerol (*B. subtilis*) und Ribitol (*S. aureus*) gleich sind. Alle zusätzlichen Gene für WTA mit Ribitol sind mit *tar* bezeichnet (Xia et al., 2010a). Nicht-essenzielle Gene sind in der Abbildung grün gefärbt und führen bei Deletion zu einem avirulenten Phänotyp. Essenzielle Gene der WTA-Biosynthese sind rot gefärbt und wirken bei Deletion letal, außer in einem  $\Delta tagO$  oder  $\Delta tagA$  Hintergrund (Swoboda et al., 2009). Die Wandteichonsäuren in *S. aureus* haben vielfältige Funktionen für das Bakterium. So schützen WTA die Zelle vor antimikrobiellen Peptiden und Fettsäuren, Antibiotika wie Vancomycin und Enzymen wie Lysozym. Der Schutz entsteht durch die Ladungsverteilung von D-Alanin, sowie chemisch-hydrophobe Eigenschaften (Peschel et al., 1999; Bera et al., 2007; Vergara-Irigaray et al., 2008; Kohler et al., 2009; Sewell und Brown, 2014). Des Weiteren sind WTA an der Kontrolle des Peptidoglykan-Aufbaus und -Abbaus beteiligt. Die Abwesenheit von Wandteichonsäuren hindert sowohl PBP4 als auch AtIA an der korrekten Lokalisation. Somit dienen WTA der zeitlichen und räumlichen Regulation dieser beiden Enzyme. In einer *S. aureus*  $\Delta tagO$  Mutante waren beide Proteine gleichmäßig innerhalb der gesamten Zelloberfläche verteilt und nicht wie im Wildtyp an der Teilungssepte konzentriert (Atilano et al., 2010; Schlag et al., 2010). Außerdem sind WTA nötig für die Kolonisation des Nasenvorhofs (Weidenmaier et al., 2004; Winstel et al., 2015). Neben diesen Funktionen für das Bakterium interagieren die WTA auch mit der Umwelt, zum einen

mit dem tierischen Immunsystem und zum anderen mit Bakteriophagen (van Dalen et al., 2020). Phagen erkennen entweder das Rückgrat der bakteriellen WTA oder die angehängenen Zucker-Konfigurationen und infizieren das Bakterium (Xia und Wolz, 2014). Bis auf die genannten Systeme *agr* und *graRS* ist die Regulation der WTA Biosynthese wenig erforscht (Keinhörster et al., 2019a).

## 1.6 Zweikomponentensysteme

Bakterien reagieren auf Umwelteinflüsse und Veränderungen, durch die Signaltransduktion von Zweikomponentensystemen (TCS). Dadurch können die Zellen ihre Protein-Expression basierend auf Temperatur, Druck, Salzgehalt, Toxinen, Antibiotika oder der Anwesenheit anderer Bakterien anpassen. Die tatsächlichen Signale, welche von dem Bakterium durch die TCS wahrgenommen werden, sind jedoch oft unbekannt (Jacob-Dubuisson et al., 2018). TCS bestehen generell mindestens aus zwei Bestandteilen (Abb. 8), einer membranständigen Sensor-Histidin-Kinase, die basierend auf einem



**Abbildung 8** Model eines Zweikomponentensystems (TCS) aus Sensor-Histidin-Kinase und korrespondierendem Response-Regulator. Ausgehend von einem Signal erfolgt die Autophosphorylierung der Kinase und die Übertragung des Phosphats auf den Regulator, der sodann die Transkription der im Regulon enthaltenen Gene hemmt bzw. induziert (entnommen aus Türck, 2009).

äußeren Signal ein Histidin an der Zell-Innenseite autophosphoryliert, und einem kognaten Response-Regulator, welcher durch die Kinase phosphoryliert wird, meistens an einem Aspartat-Rest, und eine Konformationsänderung erfährt. Der Regulator hemmt oder induziert die Transkription von Genen mit entsprechender Bindungs-Sequenz an der DNA (Kalantari et al., 2015). *S. aureus* besitzt insgesamt 16 Zweikomponentensysteme (WalRK, HptSR, LytSR, GraRS, SaeRS, TCS7SR, ArlRS, SrrAB, PhoPR, AirSR,

VraSR, AgrCA, KdpDE, HssRS, NreBC, BraSR), wobei nur WalRK essenziell ist (Rapun-Araiz et al., 2020). Zweikomponentensysteme sind auch im Fokus der Forschung nach neuen Antibiotika, aufgrund der essenziellen Natur und Spezifität mancher TCS, beispielsweise hemmen Signermycin B und Waldiomycin die Phosphorylierung von WalK in *S. aureus* (Bem et al., 2014; Cardona et al., 2018).

### 1.6.1 VraSR

Das VraSR-TCS wurde erstmals von Kuroda et al., (2000) in dem VISA-Stamm *S. aureus* Mu50 identifiziert. Vancomycin, sowie andere Zellwand-schädigende Antibiotika, führen zu einer Induktion des Systems und einer erhöhten Expression von Genen des VraSR-Zellwandstress-Regulon (vergleiche Tab. 22). Darunter fallen zum Beispiel Gene der Zellwand-Biosynthese (*sgtB*, *pbp2*, *fmtA*, *murZ*) (Kuroda et al., 2003). Das „vancomycin-resistance associated“ (Vra) TCS spielt durch die Kontrolle von *pbp2* auch eine Rolle in der Resistenz gegen Methicillin. Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von VraS zu einer erneuten Sensibilisierung gegenüber Oxacillin in MRSA führt (Boyle-Vavra et al., 2006). Das VraSR-TCS funktioniert wie oben beschrieben. Zuerst erkennt die membranständige Sensor-Histidin-Kinase VraS ein unbekanntes Signal und führt eine Autophosphorylierung durch. Diese passiert in vitro innerhalb von 10 Minuten nach Signaleingang, wodurch die Antwort auf Zellwandstress schneller erfolgt als die Zellteilung. Innerhalb von 30 Sekunden erfolgt der Phosphotransfer von VraS auf den Response-Regulator VraR an der Aminosäure D55 in vitro (Belcheva und Golemi-Kotra, 2008; Galbusera et al., 2011). Die Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung in VraR und erleichtert die Bildung von Dimeren. Im dimerisierten Zustand ist die Bindung von VraR an die DNA erhöht (Belcheva und Golemi-Kotra, 2008; Leonard et al., 2013). Eine Grundexpression des *vra*-Operons durch VraR erfolgt auch unabhängig von einer Phosphorylierung (Belcheva et al., 2009), wobei in beiden Fällen der Transkriptionsfaktor Sigma A involviert ist (Belcheva et al., 2011). Neben VraS erfolgt ein Phosphotransfer auch von der Serin/Threonin Kinase Stk1 auf VraR, jedoch an den Stellen T106, T119, T175 oder T178, wodurch die Aktivität der DNA-Bindung abnimmt (Canova et al., 2014; Kalantari et al., 2015). Innerhalb des *Vra*-Operons (Abb. 9A) liegen noch zwei weitere Gene, *vraU* und *vraT*. Das Gen *vraU* hat keine bekannte Funktion und eine Deletion hat keinen Einfluss auf die Expression des Zellwandstress-Regulons. Im Gegensatz dazu scheint das Gen *vraT*, wie auch die beiden Teile des TCS, essenziell für die Regulation zu sein. Es scheint dabei entweder als Aktivator (McCallum et al., 2011; Boyle-Vavra et al., 2013) oder Repressor (Gardete et al., 2012; Karinou et al., 2019) der Aktivität von VraSR zu dienen.



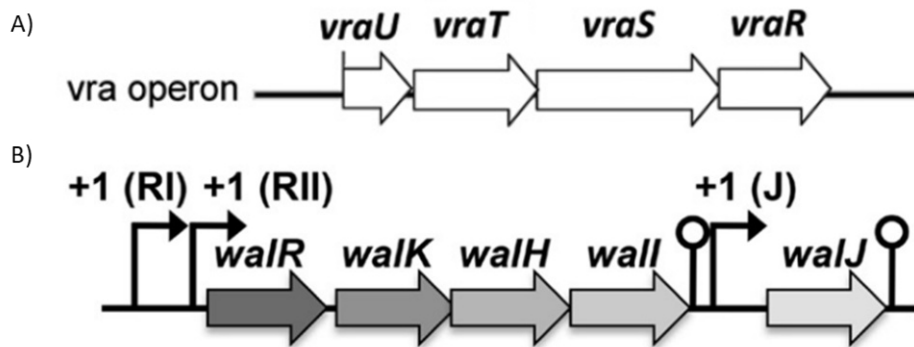


Abbildung 9 A) *vra*-Operon aus *S. aureus*, modifiziert aus Boyle-Vavra et al., (2013). B) *wal*-Operon aus *S. aureus* mit Transkriptionsstart (RI, RII, J) und Transkriptionsstopp (O), modifiziert aus Poupel et al., (2016).

## 1.6.2 WalRK

Das Zweikomponentensystem WalRK, auch VicRK oder YycFG genannt, ist das einzig essenzielle TCS in *S. aureus* und wurde erstmalig in *Bacillus subtilis* entdeckt. Es ist spezifisch für das Phylum der Firmicutes und dort ubiquitär verbreitet (Dubrac et al., 2008). Die Expression erfolgt vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase und ist stark reduziert in der stationären Wachstumsphase (Fabret und Hoch, 1998). In *S. aureus* besteht das Wal-Operon aus fünf Genen (Abb. 9B). WalR und WalK stehen für den Response-Regulator beziehungsweise die Histidin-Kinase. WalK hat eine Metall-Bindestelle für ein Zink-Ion in der zytoplasmatischen PAS-Domäne. Die Bindung setzt die Aktivität der Kinase herab (Monk et al., 2018). In *B. subtilis* und *S. aureus* lokalisiert die Histidin-Kinase an der Teilungssepte und interagiert mit Proteinen der Zellteilung, wie DivIB, FtsL, Pbp2B und FtsW (Poupel et al., 2016; Fukushima et al., 2011). Der Regulator WalR wird an Aminosäure D53 von der Kinase durch Phosphotransfer phosphoryliert und erfährt eine Konformationsänderung (Doi et al., 2010). Daraufhin dimerisiert WalR und kontrolliert die Expression (vergleiche Tab. 24) von Zellwand-Hydrolasen (*sceD*, *ssaA*, *ssaA2*, *lytM*, *isaA*, *atlA*, *sle1*, *lytD*) (Dubrac et al., 2004; Dubrac et al., 2007). Es ist diesbezüglich essenziell für den Zellwand-Metabolismus und die Zellteilung (Bisicchia et al., 2007). Des Weiteren wird auch die Transkription einiger Virulenz-Gene (*emp*, *icaR*, *spdC*, *spa*, *sbi*, *coa*, *vwb*, *chp*, *scn*, *hla*, *hlgA*, *hlgB*, *hlgC*, *fnbA*, *fnbB*, *ecb*, *efb*, *scc*, *ebpS*, *set*, *lukH*, *lukG*, *sleX*) in einer Mutante mit konstitutiv aktivem WalR aktiviert (Delaune et al., 2012). Der Regulator WalR kann zusätzlich durch die Serin/Threonin Kinase PknB (Stk1) an der Stelle T101 phosphoryliert werden (Libby et al., 2015; Hardt et al., 2017). Neben dem TCS sind im *wal*-Operon auch noch drei weitere Gene enthalten, *walH*, *wall* und *walJ*. Dabei wird das Gen *walJ* monocistronisch exprimiert (Wang et al., 2004). Die Funktion von WalJ ist unbekannt, jedoch wird eine Beteiligung am Zellwand-Metabolismus oder der Zellteilung vermutet (Biller et al., 2011; Poupel et al., 2016; Takada und Yoshikawa, 2018). WalH und Wall sind positive Regulatoren der Aktivität der WalK Kinase (Gajdiss et al., 2020).



## 1.7 Ziel der Arbeit

Die vermehrte Isolation von multiresistenten Bakterien und das nachlassende Interesse der Pharmaindustrie in Bezug zur Erforschung und Zulassung von neuen Antibiotika-Klassen seit den 1990er Jahren stellen ein immer größer werdendes Problem im klinischen Alltag dar. Vor allem nosokomiale MRSA, als einer der ESKAPE Organismen (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter spec.*), führen zu klinischen Komplikationen, chronischen Infektionen und Todesfällen (Mulani et al., 2019). Die häufigste Standardbehandlung von MRSA erfolgt durch die Therapie mit Vancomycin, neben Linezolid, Daptomycin und Cephalosporinen der 5. Gruppe (Gatermann und Miksits, 2009). Jedoch treten seit der Entdeckung des ersten klinischen VISA-Isolates *S. aureus* Mu50 (Hiramatsu et al., 1997) vermehrt Stämme mit geringer Vancomycin-Empfindlichkeit auf. Der zugrundeliegende Mechanismus dieser verminderten Empfindlichkeit ist nicht abschließend geklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war die weiterführende Charakterisierung der im Labor hergestellten VISA-Isolate *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40), aufbauend auf der Arbeit von Berscheid (2014). Die Laborstämme sollten des Weiteren mit dem klinischen VISA-Isolat *S. aureus* 137/93A, gekennzeichnet durch eine Überexpression des *walRK*-Zweikomponentensystems, verglichen werden. Es sollte zum einen die Zellwand der Stämme weiter untersucht werden. Hierbei lag der Fokus auf der Analyse der Quervernetzung des Peptidoglykan, der Ladung der Zellhülle und insbesondere auf den Wandteichonsäuren. Vor allem die WTA sollten detailliert betrachtet werden, bezüglich der Konzentration einzelner Bestandteile, der Substitution mit D-Alanin und D-Glucosamin, sowie der Konfiguration der Zucker-Substituenten. Zum anderen sollte die Autolyse der Stämme untersucht werden. Dafür sollten die Autolysine der Stämme isoliert und in einem Zymogramm, sowie einem Lyse-Assay gegen PGN getestet werden. Ebenfalls sollte die Adsorption von aufgereinigtem AtlA, dem Hauptautolysin in *S. aureus*, an die Zellwand der Stämme untersucht werden. Zusätzlich sollte von allen Stämmen eine Transkriptom-Analyse mittels RNA-seq durchgeführt werden, um Unterschiede in der Expression von Genen, vor allem bezüglich der Autolysine und den Regulons der TCS VraSR und WalRK, zu erkennen. Beide TCS sollten in einem *S. aureus* NCTC8325 Hintergrund mittels pTX15 Vektors überexprimiert werden, um den Effekt auf die Vancomycin-MHK zu testen. Der Aminosäureaustausch VraR(M54T) in *S. aureus* VC40R sollte durch Phosphorylierungs-Assays und eine Phos-Tag SDS-PAGE ebenfalls näher charakterisiert werden. Schließlich sollte der Einfluss einzelner Mutation aus *S. aureus* VC40, die zu einem Aminosäureaustausch oder einer Insertion, beziehungsweise Deletion, im Protein führten, auf die Verringerung der Vancomycin-Empfindlichkeit getestet werden. Dazu sollten diese Mutationen durch ei-

## Einleitung

---

nen Allelaustausch mittels pMAD Vektor in den VSSA *S. aureus* NCTC8325 eingebracht und die Vancomycin-MHK bestimmt werden.

Die Hypothese dieser Arbeit besagt, dass die Mutationen in *S. aureus* VC40, vor allem in den TCS *vraSR* und *walRK*, zu einer biochemischen Veränderung in den WTA führen, die im Gegenzug sowohl die Autolyse als auch die Quervernetzung der Zellwand beeinflusst, wodurch eine verdickte Zellwand entsteht, die mehr Vancomycin binden kann und zu einer geringeren Vancomycin-Empfindlichkeit beiträgt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material-Verzeichnisse

#### 2.1.1 Chemikalienverzeichnis

Tabelle 1 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Hersteller
10x DNase I Puffer	Thermo Scientific, Schwerte
10x FastDigest Green Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
10x T4 DNA-Ligase Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
1-Butanol	AppliChem, Darmstadt
2-Propanol	AppliChem, Darmstadt
4x Laemmli Buffer	Bio-Rad Laboratories, München
5x Phusion HF Buffer	Thermo Scientific, Schwerte
6x Loading Dye & SDS Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
Acrylamid 4K Lösung	AppliChem, Darmstadt
ADP	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Agar	Oxoid, Wesel
Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Aktivkohle	Apotheke Universitätsklinikum Bonn, Bonn
Alcian-Blue 8GX	Alfa Aesar, Kandel
Ammoniumheptamolybdat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin-Natrium Salz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ampuwa® PCR-Wasser	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
APS	Merck, Darmstadt
ATP	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bacto™ Tryptone	BD, Heidelberg
Benzonase® Nuclease	Merck, Darmstadt
Benzyl-Alkohol	Merck, Darmstadt
BHI-Medium	Oxoid, Wesel
Bocillin™ FL Penicillin-Natrium Salz	Invitrogen, Schwerte
Bromophenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Thermo Scientific, Schwerte
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Columbia-Agarplatte (5 % Schafsblut)	BD, Heidelberg
Concanavalin A-FITC Konjugat aus <i>Canavalia ensiformis</i>	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg

## Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller
Cytochrom C	Sigma Aldrich, Taufkirchen
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
D <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich, Taufkirchen
D-Alanin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
D-Aminosäureoxidase	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Daptomycin (Cubicin®)	Novartis Pharma, Nürnberg
DDM	Carl Roth, Karlsruhe
DMF	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Serva, Heidelberg
DNA Exitus Plus™ IF	AppliChem, Darmstadt
DNase I	Thermo Scientific, Schwerte
dNTPs	Thermo Scientific, Schwerte
DTT	Sigma Aldrich, Taufkirchen
D-Xylose	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Eisessig	AppliChem, Darmstadt
Erythromycin	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
FastDigest BamHI	Thermo Scientific, Schwerte
FastDigest EcoRI	Thermo Scientific, Schwerte
FastDigest NcoI	Thermo Scientific, Schwerte
FastDigest XhoI	Thermo Scientific, Schwerte
Flüssigstickstoff	Linde, Troisdorf
Formamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
GeneRuler™ 100 bp DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HCl	KMF Laborchemie, Köln
Hefeextrakt	Oxoid, Wesel
HEPES	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	Merck, Darmstadt
InstantBlue™ Coomassie Protein Stain	Expedeon, Heidelberg
IPTG	Thermo Scientific, Schwerte
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Kalium-Acetat	Merck, Darmstadt
Kanamycin-Sulfat (BioChemica)	AppliChem, Darmstadt
Katalase	Sigma Aldrich, Taufkirchen
KCl	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
KOH	Merck, Darmstadt
Kongorot	Alfa Aesar, Kandel
Kreatinphosphat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kreatin-Phosphokinase	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe
Lactat-Dehydrogenase	Sigma Aldrich, Taufkirchen
L-Ascorbinsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Laurdan	Ana Spec, Seraing (Belgien)
LiCl	Merck, Darmstadt
Lithium-Kalium-Acetylphosphat	Sigma Aldrich, Taufkirchen

## Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller
Lysostaphin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Lysozym	Fluka,
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt
MES-Hydrat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> -Hexahydrat	Merck, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub> -Heptahydrat	Merck, Darmstadt
MH-Medium	Oxoid, Wesel
Midori Green Direct	Nippon Genetics, Düren
MnCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
NADH <sub>2</sub> -Na	Carl Roth, Karlsruhe
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Dihydrat	Merck, Darmstadt
Nährstoff-Bouillon	Oxoid, Wesel
NaOH	Merck, Darmstadt
Narl	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Native Mark™ Unstained Protein Marker	Invitrogen, Schwerte
Natrium-Acetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Nickel-NTA Agarose	Serva, Heidelberg
NZ Amine (Casein Hydrolysat)	Merck, Darmstadt
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder #26619	Thermo Scientific, Schwerte
PageRuler™ Unstained Protein Ladder #26614	Thermo Scientific, Schwerte
Peptidoglycan ( <i>S. aureus</i> )	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Perchlorsäure	Merck, Darmstadt
Phos-tag™ Acrylamide AAL-107	Wako Chemicals, Neuss
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific, Schwerte
Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets	Thermo Scientific, Schwerte
Proteinase K	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNAprotect® Bacteria Reagent	Qiagen, Hilden
RNase A	Thermo Scientific, Schwerte
Saccharose	Merck, Darmstadt
Sodium-Dodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Soja-Pepton	Merck, Darmstadt
Stopp Puffer NuPAGE	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Sure/Cut™ Puffer M	Sigma Aldrich, Taufkirchen
T4 DNA-Ligase	Thermo Scientific, Schwerte
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
TE-Puffer (RNase-frei)	Alfa Aesar, Kandel
Tetrazyklin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tricine	Bio-Rad Laboratories, München
Tris Base	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
Trypsin	Carl Roth, Karlsruhe
TSA-Medium	Oxoid, Wesel

# Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller
TSB-Medium	Oxoid, Wesel
Tunikamycin	AppliChem, Darmstadt
Vancomycin	Lilly Pharma, Gießen
X-Gal	Thermo Scientific, Schwerte
Xylencyanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
$\alpha$ -Methylglucosid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

## 2.1.2 Kits

Tabelle 2 In dieser Arbeit verwendete Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Acetat Assay Kit	Megazyme, Wicklow (Irland)
Bradford Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, München
D-Glucosamine Assay Kit	Megazyme, Wicklow (Irland)
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, Schwerte
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific, Schwerte
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, Schwerte
Monarch™ PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Pierce™ Silver Stain Kit	Thermo Scientific, Schwerte
PrestoSpin D Bug DNA Purification Kit	Molzym, Bremen
PrimeScript™ RT Reagent Kit	Takara, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
Quik Change Lightning Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
Triglycerid Colorimetric Assay Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor (USA)

## 2.1.3 Instrumentenverzeichnis

Tabelle 3 In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
96-Well Platte (flach)	167008	Thermo Scientific, Schwerte
96-Well Platte (qRT-PCR)	HSP9601	Bio-Rad Laboratories, München
96-Well Platte (rund)	650101	Greiner Bio-one, Frickenhausen
96-Well Platte (schwarz)	655076	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Agarose-Gelkammer	PerfectBlue™ Gel System Midi	PeqLab, Erlangen
Analysenwaage	P1200N	Mettler-Toledo, Gießen
Autoklav	Laboklav Eco	SHP Steriltechnik, Haldensleben
Brutschrank	Function Line	Heraeus, Hanau
Dewargefäß	Typ B	KGW Isotherm, Karlsruhe
Dialyse Kassetten	Slide-A-Lyzer Cassette G2 10.000 MWCO	Thermo Scientific, Schwerte
Eismaschine	ZBE 30-10 CoolNat	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen

## Material und Methoden

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Elektroporationsküvette	2081600B (2 mm)	Labomedic, Bonn
Elektroporator	Micro-Pulser™	Bio-Rad Laboratories, München
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer 7	Carl Zeiss, Oberkochen
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 2-4 LSC	Christ, Osterode am Harz
Gel Imager	Molecular Imager® Gel Doc™ XR+	Bio-Rad Laboratories, München
Glasperlen	0.1 mm dia. Glass Beads	Carl Roth, Karlsruhe
Gram-Färbung	PolyStainer	IUL Instruments, Barcelona (Spanien)
Heißluftsterilisator	ST6120	Heraeus, Hanau
Heizbad	Pura 4	Julabo, Seelbach
Heizblock	QBH2	Grant Instruments, Shepreth (UK)
Homogenisator (2 mL)	Precellys® 24	Peqlab, Erlangen
Homogenisator (7 mL)	Bead Ruptor 12	Omni International, Kennesaw (USA)
Impfeschlinge	86.1567.050	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Nalgene® cryoware	Thermo Scientific, Schwerte
Küvetten	67.742 (10x4x45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Küvetten	634-0675 macro	VWR, Darmstadt
Lichtmikroskop	Axioskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer	Pyro-Mag Stir	Cenco Instrumenten, Breda (Niederlande)
Mikroplattenschüttler	Titertek	Flow Laboratories
Mikrowaage	CP2P	Sartorius, Göttingen
Mini-Zentrifuge	Sprout®	Heathrow Scientific, Vernon Hills (USA)
NanoDrop	NanoDrop™ One	Thermo Scientific, Schwerte
NMR-Röhrchen	Norell® Standard Series™ 5 mm	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Objektträger	76x26 mm	Engelbrecht, Edermünde
PCR-Cycler	Labcycler Gradient	SensoQuest, Göttingen
Petrischalen	632102 (94x16 mm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
pH-Meter	pH522	WTW, Weilheim
Photometer	UVi Line 9400	Schott Instruments, Mainz
Pipetten	Pipetman	Gilson, Villiers le Bel (Frankreich)
Plattenleser	Infinite M Plex	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Proteinaufreinigung	Polypropylene Columns 1 mL	Qiagen, Hilden
qRT-PCR-Cycler	C1000™ Thermal Cycler, CFX96™ Real Time System	Bio-Rad Laboratories, München
Reinstwasser-Anlage	MilliQ® Biocel System A10	Millipore, Schwalbach
Schüttler	Infors HT TR-250	Infors, Einsbach
SDS-PAGE-Gelkammer (groß)	Vertical Gel Electrophoresis Sys- tems Model V161	Bethesda Research Laboratories, Rockville (USA)
SDS-PAGE-Gelkammer (klein)	Mini Protean II™	Bio-Rad Laboratories, München
Single-Well Platte	Nunc™ OmniTray™	Thermo Scientific, Schwerte
Spritze	Discardit™ II 10 mL	BD, Heidelberg
Sterilbank	Antair BSK	Bio Flow Technik, Meckenheim
Sterilfilter	Acrodisc® Syringe Filters 25 mm (0,2 µm Porengröße)	Pall Corporation, Dreieich
Stromquelle	Desatron 2000/300	Desaga, Heidelberg
Taumelwipptisch	Rocker 3D Digital	IKA®, Staufen

## Material und Methoden

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Thermoschüttler	Infors HT Ecotron	Infors, Einsbach
Tischzentrifuge	Sigma 2K15; Rotor 12148-H	B. Braun, Melsungen
Ultrafiltration	Vivaspin 6	Sartorius
Ultraschallbad	1210 Ultrasonic Cleaner	Branson Ultrasonic Corporation, Danbury (USA)
Ultraschallgerät	Sonopuls HD 3100	Bandelin electronic, Berlin
Ultrazentrifuge	Sorvall® Discovery M120 SE; Rotor S80AT3-0255	Thermo Scientific, Schwerte
Ultrazentrifugenbecher	6 pc thick-walled tube	Hitachi Koki, Hitachinaka (Japan)
UV-Tisch	Chroma 43	Vetter, Wiesloch
Vortex	MS1 Minishaker	IKA®, Staufen
Wasserbad	TW8	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Multifuge 1 S-R; Rotor FA12.94	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Sorvall® Evolution RC; Rotor SLC-4000	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifugenbecher	Nalgene™ 1 Liter-Superspeed-Zentrifugenflaschen	Thermo Scientific, Schwerte
Zentrifugenröhrchen	REF 352098	Falcon®, Corning
Zinnkartuschen	HE25208000 10x10 mm	HEKAtech, Wegberg

### 2.1.4 Softwareverzeichnis

Tabelle 4 In dieser Arbeit verwendete Software.

Bezeichnung	Version	Entwickler
Bestellanforderung	CS-Anforderung 7	Con-Sense GmbH
Fluoreszenz Mikroskop	Zen 2.6 pro	Carl Zeiss
Gel-Analyse	GelAnalyzer 2010 19.1	Istvan Lazar
Gel-Analyse	ImageLab 5.2.1	Bio-Rad Laboratories
Gentechnik-Aufzeichnung	GenTech Explorer	Strack IT Solutions
Ligationsrechner	<a href="http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation">http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation</a>	New England Biolabs
NanoDrop	NanoDrop™ One Local Control Software 1.4.2	Thermo Scientific
NMR-Visualisierung	MestReNova 14.1	Mestrelab Research S.L.
Nukleotide-BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	NCBI
Oligonukleotidanalyse	<a href="http://eu.idtdna.com/calc/analyzer">http://eu.idtdna.com/calc/analyzer</a>	Integrated DNA Technologies
Plattenleser	i-control 2.0	Tecan
Primer-Design	<a href="http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi">http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi</a>	Whitehead Institute for Biomedical Research
Protein-BLAST	<a href="https://www.uniprot.org/blast/">https://www.uniprot.org/blast/</a>	Uniprot Consortium
qRT-PCR	CFX Manager IVD 1.6	Bio-Rad Laboratories
QuikChange Primer-Design	<a href="http://www.agilent.com/genomics/qcpd">http://www.agilent.com/genomics/qcpd</a>	Agilent Technologies
Restriktionsenzym-Karte	<a href="http://nc2.neb.com/NEBcutter2/">http://nc2.neb.com/NEBcutter2/</a>	New England Biolabs



## Material und Methoden

Bezeichnung	Version	Entwickler
<i>S. aureus</i> Annotation-Datenbank	<a href="http://aureowiki.med.uni-greifswald.de/Main_Page">http://aureowiki.med.uni-greifswald.de/Main_Page</a>	Fuchs et al., 2018
<i>S. aureus</i> Transkriptom-Meta-Datenbank	<a href="https://satmd.org/">https://satmd.org/</a>	Informatics LLC
Sequenzdatenanalyse	Geneious 7.1.2	Biomatters
Statistiksoftware	Prism 5	Graphpad Software
Tabellenkalkulation	Excel 2016	Microsoft
Tm-Rechner	<a href="http://tmcalculator.neb.com/#!/">http://tmcalculator.neb.com/#!/</a>	New England Biolabs
Vektorkarten	<a href="https://www.genscript.com/gene-and-plasmid-construct-design.html">https://www.genscript.com/gene-and-plasmid-construct-design.html</a>	GenScript Biotech
Venn-Diagramm-Visualisierung	RStudio 1.2.5042 mit eulerr 6.1.0 Paket	RStudio PBC

### 2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 5 Liste und Herstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Medien, Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Herstellung	Lagerung
<b>Medium</b>		
BHI-Medium	37 g/L BHI in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	4 °C
BM-Medium	10 g/L Soja-Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 1 g/L Glukose, 1 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; pH 7,2	4 °C
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; pH 7,5	4 °C
MH-Medium	21 g/L MH in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	4 °C
Nährstoff-Medium	13 g/L Nährstoff-Medium in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	4 °C
NZY+ Medium	10 g/L NZ Amine, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; pH 7,5; 20 mL 20 % (w/v) Glukose (separat autoklavieren), 25 mL 0,5 M MgCl <sub>2</sub> , 25 mL 0,5 M MgSO <sub>4</sub> sterilfiltrieren	4 °C
TB-Medium	20 g/L Trypton, 24 g/L Hefeextrakt, 4 mL/L 100 % (v/v) Glycerin in 0,9 L H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; 2,31 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 12,54 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 0,1 L H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> (separat autoklavieren)	4 °C
TSB-Medium	30 g/L TSB in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	4 °C
TYM-Medium	20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5,84 g/L NaCl, 2,46 g/L MgSO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	4 °C
<b>Antibiotika</b>		
Ampicillin	100 mg/mL Ampicillin in H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C
Chloramphenicol	50 mg/mL Chloramphenicol in H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C
Daptomycin	1 mg/mL Daptomycin in DMSO	-20 °C
Erythromycin	20 mg/mL Erythromycin in Ethanol	-20 °C
Kanamycin	50 mg/mL Kanamycin in H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C

## Material und Methoden

Bezeichnung	Herstellung	Lagerung
Tetrazyklin	25 mg/mL Tetrazyklin in Ethanol	-20 °C
Tunikamycin	1 mg/mL Tunikamycin in DMSO	-20 °C
Vancomycin	10 mg/mL Vancomycin in H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C
<b>Stammlösungen</b>		
Aktivkohle	10 g/L Aktivkohle in H <sub>2</sub> O	RT
Alcian-Blue Entfärbelösung	100 mL Essigsäure (10 % (v/v)), 200 mL Ethanol (20 % (v/v)) in 1 L H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Alcian-Blue Färbelösung	1 g Alcian Blau, 50 mL Essigsäure (5 % (v/v)), 400 mL Ethanol (40 % (v/v)) in 1 L H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Ammonium-Heptamolybdat (1,25 % (w/v))	0,25 g Ammonium-Heptamolybdat in 20 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
APS	21 mg APS in 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-
Ascorbinsäure (5 % (w/v))	1 g Ascorbinsäure in 20 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-
ATP (10 mM)	0,5 g ATP in 0,1 mL H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	-20 °C
Benzyl-Alkohol (500 mM)	52 µL Benzyl-Alkohol in 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Bocillin-FL (1,5 mM)	1 mg/mL Bocillin-FL in DMSO	-20 °C
CaCl <sub>2</sub> (0,5 M)	2,77 g CaCl <sub>2</sub> in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
Coomassie Brilliant Blue R250 Lösung	0,125 g Coomassie Brilliant Blue R250 (0,25 % (w/v)), 25 mL Methanol (50 % (v/v)), 5 mL Essigsäure (10 % (v/v)) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Cytochrom C	5 mg/mL Cytochrom C in 20 mM MOPS Puffer	-20 °C
D-Alanin Lösung I (12 mM)	10 mg NADH-Na <sub>2</sub> in 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-
D-Alanin Lösung II	1 mg Katalase in 5 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-
D-Alanin Lösung III	2 mg D-Aminosäureoxidase in 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-
D-Alanin Standard (10 mM)	0,891 mg D-Alanin in 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-
DDM (250 mM)	0,89 g DDM in 7 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
DTT (1 M)	154,25 mg DTT in 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	-20 °C
EDTA (0,5 M)	9,3 g EDTA-Na <sub>2</sub> in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
Entfärbelösung	450 mL Methanol (45 % (v/v)), 100 mL Essigsäure (10 % (v/v)) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Ethidiumbromid	50 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL) in 1 L H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Imidazol (2 M)	6,8 g Imidazol in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
IPTG (1 M)	0,24 g IPTG in 1 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1 M)	0,871 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,1 M)	0,68 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 mM)	6,8 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Kongorot	10 mg/mL Kongorot in Medium	4 °C

## Material und Methoden

Bezeichnung	Herstellung	Lagerung
Kreatinphosphat (200 mM)	6,5 mg Kreatinphosphat in 0,1 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C
Kreatin-Phosphokinase	2 U/mL Kreatin-Phosphokinase in Proteolyse-Puffer	-20 °C
Kristallviolett (0,5 %)	50 mg Kristallviolett in 10 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	RT
Laurdan (10 mM)	3,5 mg Laurdan in 1 mL DMF	-20 °C
Lösung C	50 µg/mL Trypsin in H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C
Lysostaphin	10 mg/mL Lysostaphin in H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C
Lysozym	100 mg/mL Lysozym in H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C
MgCl <sub>2</sub> (0,5 M)	2,38 g MgCl <sub>2</sub> in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
MgSO <sub>4</sub> (0,5 M)	3 g MgSO <sub>4</sub> in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
MnCl <sub>2</sub> (0,5 M)	3,14 g MnCl <sub>2</sub> in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
MnCl <sub>2</sub> (10 mM)	0,2 mL 0,5 M MnCl <sub>2</sub> in 10 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
NaCl (1 M)	5,84 g NaCl in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
NaOAc (3 M)	40,82 g NaOAc-Trihydrat in 100 H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 5,1 mit Eisessig	RT
Phos-Tag (5 mM)	10 mg Phos-Tag in 3,3 mL 3 % (v/v) Methanol	4 °C
Proteinase K	20 mg/mL Proteinase K in H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C
SDS (20 % (w/v))	20 g SDS in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Silberfärbung Stopp-Lösung	5 mL Essigsäure (5 % (v/v) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-
Triton X-100 (85 mM)	0,5 mL 100 % (v/v) Triton X-100 in 10 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Trypsin-Lösung	0,2 mg/mL Trypsin in 15 mM Tris-HCl; pH 7	-20 °C
X-Gal	300 mg/L X-Gal gelöst in 1 mL DMSO	-
Xylose (25 %)	25 g Xylose in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
Zymogramm-Färbelösung	0,1 g Methylenblau (0,1 % (w/v)), 0,01 g KOH (0,01 % (w/v)) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
<b>Puffer</b>		
Alcian-Blue-Ladepuffer 5 x	6 g Tris (0,5 M), 9 g Tricine (0,5 M), 30 mL Glycerol (30 % (v/v)), 0,15 g Bromophenolblau (0,15 % (w/v)) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8,2	4 °C
Alcian-Blue-Laufpuffer	12,11 g Tris (0,1 M), 17,91 g Tricine (0,3 M), 30 mL Glycerol (30 % (v/v)) in 1 L H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8,2	RT
Autolysin-Puffer I	0,77 g Tris-HCl (50 mM), 12,7 g LiCl (3 M) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; pH 7	RT
Autolysin-Puffer II	0,77 g Tris-HCl (50 mM), 0,87 g NaCl (150 mM) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; pH 7	4 °C
D-Alanin-Puffer	1,576 g Tris-HCl (0,1 M) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; pH 8,5	4 °C
DDM-Puffer	0,2 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM), 0,07 g NaCl (300 mM), 4 mL DDM (250 mM SL), 7,5 mL Glycerol (30 % (v/v)) in 25 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8	4 °C

## Material und Methoden

Bezeichnung	Herstellung	Lagerung
Dialyse-Puffer	15,49 g HEPES (50 mM), 19,38 g KCl (200 mM), 650 mL Glycerin (50 % (v/v)) in 1,3 L H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8	4 °C
Elutions-Puffer	0,195 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Dihydrat (50 mM), 0,44 g NaCl (300 mM), 3,75 mL Imidazol (300 mM), [0,4 mL DDM (4 mM),] 7,5 mL Glycerin (30 % (v/v)), 3,5 µL β-Mercaptoethanol (2 mM) in 25 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8	4 °C
Extraktions-Puffer	0,39 g Tris-HCl (50 mM), 0,43 g NaCl (150 mM), 10 µL 0,5 M EDTA (0,1 mM), 0,25 mL 20 % (w/v) SDS (0,1 % (w/v)) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 7,5	RT
Laurdan-Puffer	0,8 g NaCl (137 mM), 0,02 g KCl (2,7 mM), 0,14 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10 mM), 0,02 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,8 mM), 0,2 g D-Glukose (0,2 % (w/v)), 1 mL DMF (1 % (v/v)) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	RT
Lyse-Puffer M1	0,468 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Dihydrat (50 mM), 1,05 g NaCl (300 mM), 0,3 mL Imidazol (10 mM), 18 mL Glycerin (30 % (v/v)), 8,4 µL β-Mercaptoethanol (2 mM) in 60 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8	4 °C
Lyse-Puffer M2	0,195 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Dihydrat (50 mM), 0,44 g NaCl (300 mM), 0,25 mL Imidazol (20 mM), 4 mL DDM (40 mM), 7,5 mL Glycerin (30 % (v/v)), 3,5 µL β-Mercaptoethanol (2 mM) in 25 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8	4 °C
Membran-Protein Waschpuffer	0,6 g Tris (50 mM), 0,87 g NaCl (150 mM), 1 mL MgCl <sub>2</sub> (0,5 M SL) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 7	4 °C
MOPS-Puffer	1,25 g MOPS (20 mM) in 300 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; pH 7	RT
Natriumacetat-Puffer	2 mL Essigsäure (100 % (v/v)) in 98 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 4,75 mit NaOH	RT
PBS 10x	4 g NaCl (1,37 M), 0,1 g KCl (27 mM), 0,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (100 mM), 0,12 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (18 mM) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 7,4	RT
PGN-Puffer	1,21 g Tris (0,1 M) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; 7,4	RT
Phosphat-Puffer	3,075 mL K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,1 M), 1,925 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,1 M) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; pH 7	RT
Phosphorylierungs-Puffer A 5x	2,98 g HEPES (250 mM), 9,32 KCl (2,5 M), 0,25 g MgCl <sub>2</sub> (25 mM), 9 mL Glycerin (18 % (v/v)) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8; 1 mL Puffer mit 2,5 µL 1 M DTT mischen	-20 °C
Phosphorylierungs-Puffer B 10x	0,6 g Tris (500 mM), 0,37 KCl (500 mM), 4 mL 0,5 M MgCl <sub>2</sub> (200 mM) in 10 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 7,4	-20 °C
Phosphorylierungs-Puffer B mit Lithium-Kalium-Acetylphosphat 10x	9,2 mg Lithium-Kalium-Acetylphosphat (500 mM) in 0,1 mL 10x Phosphorylierungs-Puffer B	-20 °C
Proteolyse-Puffer 5x	0,59 g HEPES-KOH (0,25 M), 2,98 g KCl (0,25 M), 5,69 g Magnesiumacetat (50 mM), 1,54 g DTT (25 mM) in 10 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 7,6	-20 °C
RNA-Ladepuffer	8 mL Formamid (80 % (v/v)), 25 mg Bromophenolblau (0,25 % (w/v)), 25 mg Xylencyanol (0,25 % (w/v)), 0,1 mL 0,5 M EDTA (5 mM) in 10 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	-20 °C

## Material und Methoden

Bezeichnung	Herstellung	Lagerung
R-Puffer	18,17 g Tris (3 M) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8,5	4 °C
SDS-Laufpuffer 10x	30 g Tris (250 mM), 144 g Glycin (1,92 M), 10 g SDS (1 % (w/v)) in 1 L H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8,3	RT
S-Puffer	6 g Tris (1 M), 2 mL 20 % (w/v) SDS	4 °C
TAE-Puffer 50x	121 g Tris (2 M), 50 mL 0,5 M EDTA (50 mM), 28,5 mL 100 % Essigsäure (5,7 % (v/v)) in 500 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; pH 8,5	RT
TFB-I-Puffer	0,14 g Kalium Acetat (30 mM), 0,37 g KCl (100 mM), 1 mL 0,5 M CaCl <sub>2</sub> (10 mM), 7,8 mL 0,5 M MnCl <sub>2</sub> (78 mM), 7,5 mL 100 % Glycerol (15 % (v/v)) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	4 °C
TFB-II-Puffer	1 g MOPS (100 mM), 0,03 g KCl (10 mM), 7,4 mL 0,5 M CaCl <sub>2</sub> (74 mM), 7,5 mL 100 % Glycerol (15 % (v/v)) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 7	4 °C
Waschpuffer M1	0,195 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Dihydrat (50 mM), 0,44 g NaCl (300 mM), 0,25 mL Imidazol (20 mM), [0,4 mL DDM (4 mM),] 7,5 mL Glycerin (30 % (v/v)), 3,5 µL β-Mercaptoethanol (2 mM) in 25 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8	4 °C
Waschpuffer M2	0,195 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Dihydrat (50 mM), 0,44 g NaCl (300 mM), 0,5 mL Imidazol (40 mM), [0,4 mL DDM (4 mM),] 7,5 mL Glycerin (30 % (v/v)), 3,5 µL β-Mercaptoethanol (2 mM) in 25 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 8	4 °C
WTA-Puffer I	1,08 g MES (50 mM) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; 6,5	RT
WTA-Puffer II	1,08 g MES (50 mM), 4 g SDS (4 % (w/v)) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; 6,5	RT
WTA-Puffer III	1,08 g MES (50 mM), 2 g NaCl (0,34 M) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; 6,5	RT
WTA-Puffer IV	0,24 g Tris (20 mM), 0,5 g SDS (0,5 % (w/v)) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; 8	RT
WTA-Puffer V	157, g Tris-HCl (1 M) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 7,8	RT
WTA-Puffer VI	15,7 g Tris-HCl (1 M), 5,84 NaCl (1 M) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 7,8	RT
Zitronensäure-Puffer	4,8 g Zitronensäure (0,5 M) in 50 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 3	RT
Zymogramm-Puffer	0,788 g Tris-HCl (50 mM), 2 mL 0,5 M CaCl <sub>2</sub> (10 mM), 2 mL 0,5 M MgCl <sub>2</sub> (10 mM), 0,1 mL Triton X-100 (0,1 % (v/v)) in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub> ; pH 7,5	RT

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> bzw. H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> hergestellt. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Bestandteile, die nicht autoklaviert werden konnten, wurde sterilfiltriert. Glaswaren und Metallspatel wurden im Heißluftsterilisator bei 200 °C für 4 bis 6 h sterilisiert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem jeweiligem Medium 18 g/L Agar hinzugefügt. Der abgekühlte Agar wurde in sterile Petrischalen gegossen.

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

Alle Experimente wurden maximal mit zwei technischen Replikaten pro Probe und mindestens in einer Dreifachbestimmung von biologischen Replikaten durchgeführt.

### 2.2.1 Bakterienstämme, Plasmide und Wachstumsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 6 aufgeführt. Alle weiteren in dieser Arbeit generierten Stämme sind im Anhang in Tabelle 42 zu finden. *Escherichia coli* wurde in LB-Medium (Bertani, 1951) kultiviert. *S. aureus* wurde in BHI-Medium, TSB-Medium oder MH-Medium vermehrt. Kulturen wurden, sofern nicht anders beschrieben, unter aeroben Bedingungen, bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Bakterienstämme wurden als Glycerinkultur in 50 % (v/v) Glycerol bei -80 °C gelagert und auf dem jeweiligen Agar oder Columbia-Blutagar ausgestrichen.

Tabelle 6 In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
<i>Staphylococcus aureus</i>		
NCTC8325	Laborstamm, MSSA, <i>agr+</i> , 11 bp Deletion in <i>rsbU</i> , Punktmutation in <i>tcaR</i> , drei Prophagen $\Phi$ 11, $\Phi$ 12, $\Phi$ 13	Novick und Richmond, 1965; landolo et al., 2002
RN4220	Restriktionsnegatives Derivat von <i>S. aureus</i> NCTC8325, <i>rsbU</i> <sup>-</sup> , <i>agr</i> <sup>-</sup> , keine Prophagen	Kreiswirth et al., 1983; Nair et al., 2011
RN4220 $\Delta$ <i>mutS</i>	Mutator-Phänotyp von <i>S. aureus</i> RN4220 mit einem defekten <i>mutS</i>	Schaaff et al., 2002
VC40	VISA-Mutante von <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ <i>mutS</i> , hergestellt durch Passagerversuch mit stufenweisen erhöhten Vancomycin-Konzentrationen	Schaaff et al., 2002
VC40R	VISA-Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ <i>mutS</i> VC40 durch eine weitere Mutation in <i>vraR</i> (M54T)	Hort et al., 2021
VraS(VC40)	VISA-Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit zwei Aminosäureaustauschen in <i>VraS</i> (D242G; L114S) aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ <i>mutS</i> VC40	Berscheid et al., 2014
137/93A	Klinisches VISA-Isolat, Norddeutscher Epidemiotyp, Met <sup>R</sup> , <i>spa</i> -Typ: t051, MLST: ST247	Bierbaum et al., 1999; Reipert et al., 2003
1450/94	Klinisches MRSA-Isolat, Norddeutscher Epidemiotyp, Met <sup>R</sup> , <i>spa</i> -Typ: t051, MLST: ST247	Reipert et al., 2003

## Material und Methoden

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
AraC(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit der Deletion in AraC aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
ClpX(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit dem Aminosäureaustausch in ClpX(S30R) aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Axtmann, 2019
LacE(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit dem Aminosäureaustausch in LacE(M2T) aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
LexA(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit dem Aminosäureaustausch in LexA(E173K) aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
ModA(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit der Deletion in ModA aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
MprF(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit dem Aminosäureaustausch in MprF(H224Y) aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
MraZ(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit der Insertion in MraZ aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
NsaR(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit der Insertion in NsaR aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
RecD(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit dem Aminosäureaustausch in RecD(V60A) aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
RelP(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit dem Aminosäureaustausch in RelP(H155R) aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
VraG(VC40)	Mutante entstanden aus <i>S. aureus</i> NCTC8325 mit dem Aminosäureaustausch in VraG(G570R) aus <i>S. aureus</i> RN4220 $\Delta$ mutS VC40	Diese Arbeit
$\Delta$ tarM $\Delta$ tarS	Mutante aus <i>S. aureus</i> RN4220, keine Glykosylierung der WTA	Winstel et al., 2013
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(DE3)	$B F^-$ , ompT, gal, dcm, lon, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), $\lambda$ (DE3) [lacI, lacUV5-T7p07, ind1, sam7, nin5], [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> ( $\lambda^S$ )	Studier und Moffatt, 1986
C43(DE3)	Derivat von <i>E. coli</i> BL21(DE3) zur Expression von toxischen Proteinen und Membranproteinen	Miroux und Walker, 1996

## Material und Methoden

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	Yanisch-Perron et al., 1985
DC10B	<i>mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galk, rpsL, endA1, nupG, Δdcm</i>	Monk et al., 2012
M15	F <sup>-</sup> , <i>Φ80ΔlacM15, thi, lac<sup>-</sup>, mtl<sup>-</sup>, recA, KmR</i>	Villarejo und Zabin, 1974
<i>Micrococcus luteus</i>		
ATCC4698	Sensitiver Indikatorstamm	Fleming, 1922; Young et al., 2010
<i>Staphylococcus carnosus</i>		
TM300	Biofilm negative Kontrolle	Schleifer und Fischer, 1982

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Plasmid-Karten sind im Anhang zu finden (Abb. 62-63). Der Vektor pTX15 wurde in *S. aureus* zur induzierbaren Überexpression der TCS *walRK*, *vraSR*, des *vraSR* Systems mit dem akzessorischem *vraT*, sowie den WTA-Glykosyltransferasen *tarS* und *tarM* verwendet. Für die Induktion der Expression wurde 0,5 % (w/v) Xylose verwendet. Die Selektion der Bakterien mit Vektor wurde durch 25 µg/mL Tetrazyklin erreicht. Der Allelaustausch mittels homologer Rekombination wurde mit Hilfe des pMAD Vektors durchgeführt. Hierfür wurden dem Medium 40 µg/mL Ampicillin bei *E. coli* beziehungsweise 10 µg/mL Erythromycin bei *S. aureus* Zellen hinzugefügt (30 °C). Zur Überprüfung der Integration und des Verlustes des Plasmids durch Blau-Weiß-Selektion wurden 300 mg/L X-Gal im Medium verwendet (42 °C). Die Expression der TCS-Gene *vraS*, *vraR* und des mutierten *vraR*(M54T) wurde in dem Plasmid pET22bΔpelB unter Einsatz von 40 µg/mL Ampicillin erreicht. Induziert wurde die Expression durch 1 mM IPTG. Für die Steigerung der Löslichkeit der exprimierten Proteine wurde das Plasmid pREP4groESL, welches konstitutiv die Chaperone GroESL exprimiert, verwendet. Die Aufrechterhaltung dieses Vektors wurde durch 25 µg/mL Kanamycin gewährleistet. Der pQE-32 Vektor wurde für die Expression des Hauptautolysins von *S. aureus*, AtIA, unter Verwendung von 40 µg/mL Ampicillin und 1 mM IPTG, zur Induktion, genutzt.

**Tabelle 7 In dieser Arbeit verwendete Plasmide.**

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pTX15	Xylose induzierbarer Staphylokokken Vektor, Tet <sup>R</sup>	Peschel et al., 1996
pTvicA	pTX15 Vektor mit <i>walRK</i> aus SA 137/93A	Jansen et al., 2007
pTvraSR	pTX15 Vektor mit <i>vraSR</i> aus SA NCTC8325	Diese Arbeit



## Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pTvraTSR	pTX15 Vektor mit <i>vraTSR</i> aus SA NCTC8325	Diese Arbeit
pTtarM	pTX15 Vektor mit <i>tarM</i> aus SA NCTC8325	Diese Arbeit
pTtarS	pTX15 Vektor mit <i>tarS</i> aus SA NCTC8325	Hort et al., 2021
pMAD	<i>E. coli</i> / <i>S. aureus</i> Shuttle Vektor, abgeleitet aus pE194, thermosensitiver Replikationsursprung in Gram-positiven Bakterien, Amp <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	Arnaud et al., 2004
pMAD_araC(VC40)	pMAD Vektor mit <i>araC</i> Fragment aus SA VC40	Diese Arbeit
pMAD_clpX(VC40)	pMAD Vektor mit <i>clpX</i> Fragment aus SA VC40	Axtmann, 2019
pMAD_lacE(VC40)	pMAD Vektor mit <i>lacE</i> Fragment aus SA VC40	Diese Arbeit
pMAD_lexA(VC40)	pMAD Vektor mit <i>lexA</i> Fragment aus SA VC40	Diese Arbeit
pMAD_modA(VC40)	pMAD Vektor mit <i>modA</i> Fragment aus SA VC40	Diese Arbeit
pMAD_mprF(VC40)	pMAD Vektor mit <i>mprF</i> Fragment aus SA VC40	Axtmann, 2019
pMAD_mraZ(VC40)	pMAD Vektor mit <i>mraZ</i> Fragment aus SA VC40	Diese Arbeit
pMAD_nsaR(VC40)	pMAD Vektor mit <i>nsaR</i> Fragment aus SA VC40	Diese Arbeit
pMAD_recD(VC40)	pMAD Vektor mit <i>recD</i> Fragment aus SA VC40	Diese Arbeit
pMAD_reIP(VC40)	pMAD Vektor mit <i>reIP</i> Fragment aus SA VC40	Diese Arbeit
pMAD_vraG(VC40)	pMAD Vektor mit <i>vraG</i> Fragment aus SA VC40	Diese Arbeit
pREP4	Synthetisches Plasmid, <i>lacI</i> , Kan <sup>R</sup>	Qiagen
pREP4groESL	Abgeleitet aus pREP4, Kan <sup>R</sup> , konstitutiv exprimierte Gene <i>groES</i> und <i>groEL</i> (Chaperone), $\Delta lacI$	Türck und Bierbaum, 2012
pET22b $\Delta pelB$	Abgeleitet aus dem Expressionsvektor pET22b, C-terminaler 6xHis-Tag, Deletion <i>pelB</i> -Leadersequenz, T7 <i>lac</i> -Promotor, Amp <sup>R</sup>	Sass und Bierbaum, 2007
pET22b $\Delta pelB$ _vraR	pET22b $\Delta pelB$ Vektor mit <i>vraR</i> aus SA NCTC8325	Mildenberger, 2011; Hort et al., 2021
pET22b $\Delta pelB$ _vraR(M54T)	pET22b $\Delta pelB$ Vektor mit <i>vraR</i> aus SA VC40R	Hort et al., 2021
pET22b $\Delta pelB$ _vraS	pET22b $\Delta pelB$ Vektor mit <i>vraS</i> aus SA NCTC8325	Mildenberger, 2011; Hort et al., 2021
pET22b $\Delta pelB$ _vraS(VC40)	pET22b $\Delta pelB$ Vektor mit <i>vraS</i> aus SA VC40	Berscheid, 2013

## Material und Methoden

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pQE-32_atIA	Expressionsvektor, N-terminaler 6xHis-Tag, T5 <i>lac</i> -Promotor, Amp <sup>R</sup> , Vektor mit <i>atIA</i> ohne Signalsequenz aus SA NCTC8325	Schrötter, 2018; Hort et al., 2021

### 2.2.2 Photometrische Wachstumsbestimmung

Das Wachstum von Kulturen wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Beer, 1852) durch Photometrie bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte von 1 mL Flüssigkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen. Ab einer  $OD_{600}$  von 0,5 wurde die Probe verdünnt. Es wurde angenommen, dass eine  $OD_{600}$  1 einer Zelldichte von  $2 \times 10^9$  Zellen pro mL für *S. aureus* entspricht.

### 2.2.3 Bestimmung der minimalen Hemm-konzentration

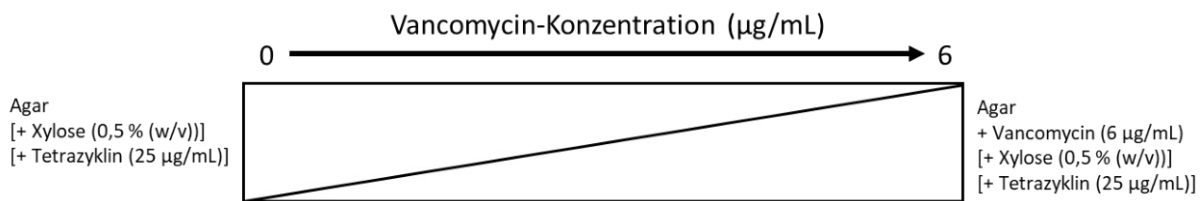
Die minimale Hemm-Konzentration (MHK) ist definiert als die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, die das sichtbare Wachstum eines Mikroorganismus verhindert. Für die Bestimmung der MHK wurde ein Mikrobouillonverdünnungstest nach EUCAST-Richtlinien in einer 96-Well-Polystyren-Mikrotiterplatte mit rundem Boden in BHI- oder MH-Medium durchgeführt (Wiegand et al., 2008). Dem MH-Medium wurden in Verbindung mit Vancomycin zusätzlich Kationen hinzugefügt, sodass es 25 mg/L  $Ca^{2+}$  und 12,5 mg/L  $Mg^{2+}$  enthielt. Für Daptomycin wurde dem Medium zusätzlich eine Endkonzentration von 50 mg/L  $Ca^{2+}$  hinzugefügt. Je nach Stamm und Plasmid wurden außerdem 0,5 % Xylose und 25 µg/mL Tetrazyklin oder 4 % (w/v) NaCl hinzugefügt. Von dem relevanten Antibiotikum wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt. Jedes Well wurden mit  $5 \times 10^5$  CFU/mL, ausgehend von einer in Medium resuspendierten Kolonie, welche nicht älter als 48 h war, inokuliert. Die Koloniesuspensionsmethode wurde gewählt, da einige der Stämme ein stark verlangsamtes Wachstum aufwiesen. Die Platten wurden anschließend bei 37 °C für 24 bzw. 48 h inkubiert. Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt.

#### 2.2.3.1 Gradienten-MHK

Für die Bestimmung geringer MHK-Differenzen zwischen einzelnen Stämmen wurde eine Gradienten-MHK durchgeführt. Hierfür wurde eine rechteckige Petrischale mit 30 mL Agar und dem entsprechenden Antibiotikum befüllt und leicht schräg gelagert, bis der Agar fest wurde. Danach wurde in waagerechter Lage eine weitere Schicht 30 mL Agar ohne Antibiotikum aufgefüllt (Abb. 10). Eine

## Material und Methoden

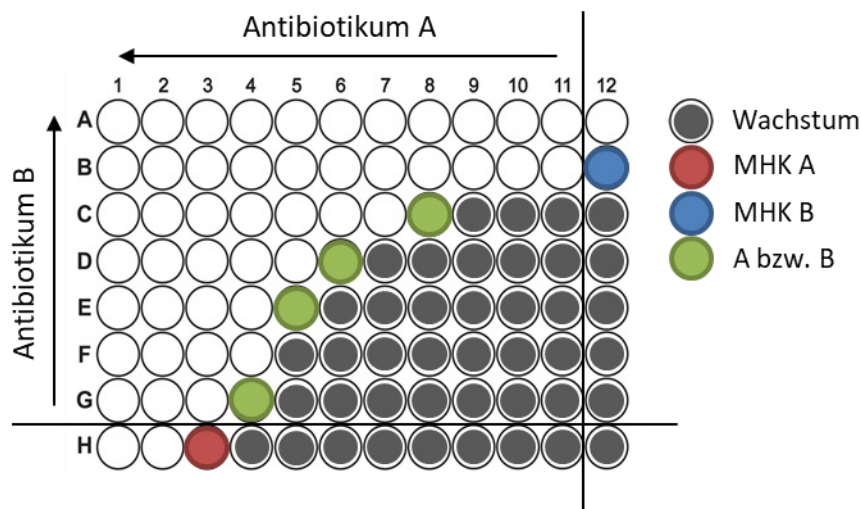
Bakteriensuspension mit OD<sub>600</sub> 0,125 wurde in Richtung des Antibiotikagradienten mit einem Wattetupfer aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 24 bzw. 48 h.



**Abbildung 10** Schematische Darstellung einer Antibiotika-Gradientenplatte. Der Vergleich von Stämmen mit Varianten des pTX15 Vektors erforderten die Zugabe von Xylose und Tetrazyklin in beide Agar-Teile.

### 2.2.3.2 Schachbrett-MHK

Die Schachbrett-MHK wurde für die gleichzeitige Betrachtung von zwei Antibiotika durchgeführt (Hsieh et al., 1993). Dadurch konnten Synergismen oder Antagonismen der Antibiotika untersucht werden. Die Platten wurden so vorbereitet, dass Antibiotikum A entlang der X-Achse abnahm und Antibiotikum B entlang der Y-Achse. Somit hatte jede Spalte die gleiche Konzentration von Antibiotikum A und jede Reihe die gleiche Konzentration von Antibiotikum B. Dabei enthielt die letzte Reihe nur Antibiotikum A und die letzte Spalte nur Antibiotikum B (Abb. 11). Dementsprechend wurde pro Stamm



**Abbildung 11** Darstellung einer 96-Well-Platte mit zwei Antibiotika zur Berechnung des FIC-Index. Das Well H12 dient der Wachstumskontrolle und enthält kein Antibiotikum.

eine komplette Platte mit  $5 \times 10^5$  CFU/mL inokuliert und für 24 bzw. 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der FIC-Index als Maß der Interaktion beider Antibiotika mit folgender Formel berechnet:

$$FIC\ Index = \frac{A}{MHK(A)} + \frac{B}{MHK(B)}$$

Dabei ist MHK(A) bzw. MHK(B) die MHK der einzelnen Antibiotika und A bzw. B die MHK einer der Kombinationen. Ein FIC-Index von < 0,5 zeigt eine Synergie und ein FIC-Index von > 4 zeigt einen Antagonismus der beiden Antibiotika.

### 2.2.4 Cytochrom C-Assay

Die relative Bestimmung der Oberflächenladung der Zellen erfolgte basierend auf dem Vergleich mit der Abstoßung von positiv geladenem Cytochrom C nach Peschel et al., (1999). Dazu wurden 20 mL Kultur bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 1 – 1,5 geerntet (10.000 g, 2 min, 4 °C) und zweimal mit 10 mL MOPS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 1 mL MOPS-Puffer gelöst. Anschließend wurden 0,9 mL Zellen mit einer OD<sub>600</sub> von 7 in MOPS-Puffer hergestellt und 0,1 mL Cytochrom C Lösung hinzugefügt. Die Zellen wurden für 10 min bei RT unter Rotation (30 rpm) inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (10.000 g, 5 min, 4 °C) und die OD<sub>530</sub> des Überstandes wurde gemessen. Anhand einer Kontrolle mit Cytochrom C in MOPS-Puffer ohne Zellen wurde der Anteil an gebundenem und nicht gebundenem Cytochrom C berechnet.

### 2.2.5 Analyse der Vancomycin-Bindekapazität

Die Quantifizierung des im Peptidoglykan gebundenen Vancomycin in den VISA-Stämmen basiert auf einem Bioassay von Cui et al., (2000). Zuerst wurden 0,6 % LB-Agarplatten mit 1 mL/L *Micrococcus luteus* OD<sub>600</sub> 0,3 gegossen. Aus dem festen Agar wurden Löcher ausgestanzt. Nebenbei wurden 50 mL TSB 1%ig mit *S. aureus* Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,5 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nachdem die Kultur auf die genannten OD<sub>600</sub> eingestellt wurde, konnte der Kultur 30 µg/mL Vancomycin hinzugefügt werden. In definierten Abständen von 0, 2, 4 und 24 h wurden 0,5 mL Probe entnommen und zentrifugiert (10.000 g, 5 min, RT). Jeweils 0,2 mL Überstand wurden abgenommen und für 10 min bei 80 °C pasteurisiert. Schließlich wurden 50 µL des Überstandes in dreifacher Ausführung in die Löcher der Agarplatte pipettiert. Zusätzlich wurde eine Standardreihe von Vancomycin (1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 µg/mL) verwendet. Die Platten wurden bei 30 °C für 24 bzw. 48 h inkubiert. Anschließend wurde der Durchmesser der Hemmhöfe gemessen und mit der Standardkurve verglichen, um die enthaltene Vancomycin-Konzentration zu ermitteln.

### 2.2.6 Lyse-Assays

#### 2.2.6.1 Autolyse induziert durch Triton X-100 (Berscheid et al., 2014)

Die Stämme wurden in 50 mL TSB bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei  $OD_{600}$  1 angezogen und geerntet (9.000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde die Probe einmalig mit 20 mL eiskaltem  $H_2O_{MilliQ}$  gewaschen und auf eine  $OD_{600}$  0,7 in 1 mL Autolysin-Puffer II mit 0,05 % Triton X-100 eingestellt. Danach wurde die Probe bei 37 °C inkubiert und es wurde alle 15 min für 2 h die  $OD_{600}$  gemessen. Vor der Messung wurde die Probe geschüttelt.

#### 2.2.6.2 Lyse induziert durch aufgereinigte Autolysine

Autolysine der verschiedenen Stämme wurden aus 100 mL Kultur in TSB mit einer  $OD_{600}$  1 isoliert. Dazu wurde die Kultur geerntet (5.800 g, 15 min, 4 °C) und einmal mit eiskaltem  $H_2O_{MilliQ}$  gewaschen. Das Pellet wurde in 0,2 mL Autolysin-Puffer I resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde die  $OD_{600}$  gemessen, um Proben untereinander vergleichen zu können. Die Probe wurde zentrifugiert (10.000 g, 5 min, 4 °C) und der Überstand mit den Autolysinen bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde Peptidoglykan mit intakten WTA ohne D-Alanin-Reste auf eine  $OD_{600}$  0,5 in Autolysin-Puffer II eingestellt, 50 µL Autolysine hinzugefügt und bei 37 °C inkubiert. Alle 15 min für 2 h wurde die  $OD_{600}$  gemessen. Als Negativkontrolle wurde Zellwand in Puffer ohne Autolysin verwendet. Die Autolysine wurden eingesetzt gegen die jeweils eigene Zellwand, gegen die Zellwand von *S. aureus* NCTC8325 und gegen tote *M. luteus* Zellen. Ebenfalls wurden die Autolysine von *S. aureus* NCTC8325 gegen die Zellwände aller anderen Stämme getestet.

Ferner wurden intrazelluläre, zytoplasmatische Autolysine aufgereinigt. Dazu wurde die geerntete Kultur in 0,01 M Phosphat-Puffer gelöst und mit Bead-Beating (6000 rpm, 5x30 s Schütteln mit 90 s Pause auf Eis) aufgeschlossen. Die Zellen wurden zentrifugiert (30.000 g, 20 min, 4 °C) und der Überstand bei -20 °C gelagert.

Die aufgereinigten Autolysine wurden ebenfalls in einem Zymogramm eingesetzt.

### 2.2.6.3 Überprüfung der AtIA-Bindung an das Peptidoglykan

Für die Analyse der Bindung von AtIA an die Zellwand wurde aufgereinigtes Peptidoglykan verwendet, welches WTA, jedoch keine D-Alanin-Substitution, enthielt. Das PGN wurde in Autolysin-Puffer II genau auf OD<sub>600</sub> 0,3 eingestellt. Dann wurde die Probe mit 1,6 µg aufgereinigtem AtIA für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Probe wurden zentrifugiert (16.000 g, 5 min, RT) und 1 mL Überstand wurde in eine Küvette überführt. Dieser Überstand wurde mit toten *M. luteus* Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt. Danach wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert und alle 15 min für 1,5 h die OD<sub>600</sub> gemessen. Als Positivkontrolle diente aufgereinigtes AtIA in Puffer ohne *S. aureus* Zellen.

### 2.2.7 Untersuchung der Biofilmbildung (Christensen et al., 1985; Ziebuhr et al., 1997)

Zur Untersuchung der Biofilmbildung wurden 5 mL TSB inklusive 0,5 % D-Glukose mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 mit frischem Medium eingestellt. Jeweils 0,2 mL der Kultur wurde in eine 96 Well-Mikrotiterplatte mit flachem Boden gefüllt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Dabei wurde *S. carnosus* TM300 (Biofilm negativ) und *S. aureus* RN4220 (Biofilm positiv) als Kontrollen verwendet. Danach wurde die Kultur aus den Vertiefungen pipettiert und die Platte dreimal mit 0,2 mL PBS-Puffer gewaschen. Der Biofilm wurde mit 0,2 mL Ethanol für 5 min fixiert. Dann wurde die Platte getrocknet und der Biofilm mit 0,1 mL 0,5 % Kristallviolett für 2 min gefärbt. Die Platte wurde erneut mit PBS gewaschen, bis sich keine Farbe mehr löste und über Nacht getrocknet. Anschließend wurde die OD<sub>570</sub> der leeren Platte gemessen.

### 2.2.8 Bestimmung der Carotinoid-Konzentration (Liu et al., 2018)

Die meisten der im Krankenhaus isolierten *S. aureus* Stämme sind pigmentiert mit einem membran-gebundenen Carotinoid, dem Staphyloxanthin. Es schützt das Bakterium unter anderem vor der Zerstörung durch reaktive Sauerstoffspezies im Phagosom (Clauditz et al., 2006; Mishra et al., 2011). Es wurden 5 mL TSB mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD<sub>600</sub> gemessen und die Kultur geerntet (8.000 g, 10 min, RT). Die Zellen wurden zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>MiliIQ</sub> gewaschen und in 0,8 mL Methanol resuspendiert. Anschließend wurden

die Proben für 10 min bei 55 °C inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (10.000 g, 5 min, RT) und die OD<sub>462</sub> des Überstandes wurde gemessen.

### 2.2.9 Bestimmung der Membran-Fluidität mittels Laurdan (Wenzel et al., 2018)

Die Fluidität der Phospholipid-Membran wurde mit Laurdan ermittelt. Laurdan ist ein Fluorophor und verändert die Wellenlänge seiner Fluoreszenzemission je nachdem, wie groß die Menge der Wassermoleküle zwischen den Lipidgruppen in der Membran ist. Somit kann die Dichte der Lipidgruppen und damit die Polarität der Membran bestimmt werden (Parasassi und Gratton, 1995; Müller et al., 2016). Für dieses Experiment wurden alle Utensilien und Geräte auf 30 °C vorgewärmt. Es wurden 10 mL Bakterienkultur in TSB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,5 bei 30 °C angezogen. Dann wurde der Kultur 10 µM Laurdan hinzugefügt und für weitere 10 min bei 30 °C im Dunkeln inkubiert. Die Kultur wurde anschließend geerntet (8.000 g, 3 min, RT) und viermal mit 1 mL Laurdan-Puffer gewaschen (16.000 g, 30 sek, RT). Als nächstes wurden die Zellen mit Puffer auf eine OD<sub>600</sub> 4 eingestellt und 0,2 mL wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Optional wurde Vancomycin (64 bzw. 3 µg/mL) oder Benzyl-Alkohol (50 bzw. 100 mM) hinzugefügt. Danach wurde die Platte im Tecan Reader Infinite M Plex für 10 min bei 30 °C mit Rotation inkubiert. Abschließend wurde die Fluoreszenz bei der Exzitation von 350 nm und der Emission von 460 nm gemessen. Die generalisierte Polarisation (GP) wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$GP = \frac{(I_{460} - I_{500})}{(I_{460} + I_{500})}$$

### 2.2.10 Delta-Hämolyisin-Expression (Sakoulas et al., 2002)

Auf einer Columbia-Blutagarplatte wurde der Stamm *S. aureus* RN4220 senkrecht in einer Linie ausgestrichen. *S. aureus* RN4220 produziert nur β-Hämolyisin. Die zu testenden Stämme wurden danach waagrecht von außen hin zum Indikatorstamm ausgestrichen. Dann wurde die Platte über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hämolyse dokumentiert. β- und δ-Hämolyisin wirken synergistisch und produzieren so eine Zone mit verstärkter Hämolyse (Abb. 12).

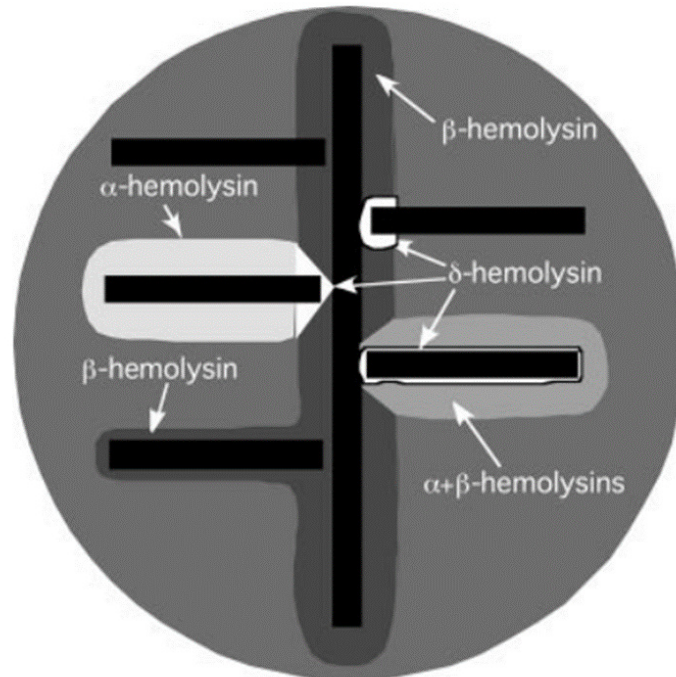


Abbildung 12 Schematische Darstellung der hämolytischen Aktivität von *S. aureus* Stämmen (horizontal) auf Blutagar mit dem Indikatororganismus *S. aureus* RN4220 (vertikal), entnommen aus Adhikari et al., (2007).

### 2.2.11 Phagentypisierung

Die Phagentypisierung ist innerhalb der Epidemiologie eine Methode zur Identifizierung und Nachverfolgung von *S. aureus* Stämmen lokaler oder globaler Ausbrüche. Die Methode wurde nach den Richtlinien des Unterkomitees für die Phagentypisierung von Staphylokokken des Nomenklatur-Komitee der Internationalen Assoziation der Mikrobiologischen Gesellschaften durchgeführt (Blair und Williams, 1961). Es wurden 3 mL Nährstoff-Medium mit mehreren Kolonien angeimpft und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium über eine Nährstoff-Agarplatte gespült und getrocknet. Dann wurde mit einer Impföse ein Tropfen Phagenlösung auf die Platte geimpft und diese über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques dokumentiert. Es wurden der Internationale Phagensatz, sowie drei Podoviridae ( $\Phi$ P68,  $\Phi$ 44,  $\Phi$ 66) und drei Myoviridae ( $\Phi$ K,  $\Phi$ SK311,  $\Phi$ 812) verwendet.

### 2.2.12 Phagen-Adsorptions-Assay

Die Phagen-Adsorption diente der relativen Bestimmung der Adsorption von Phagen an die Zellwand. Es wurden 3 mL Nährstoff-Medium mit mehreren Kolonien von *S. aureus* RN4220 bzw. *S. aureus*



NCTC8325 inokuliert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde 1 mL der Zellen zusammen mit 9 mL Nährstoff-Weichagar (0,5 %) und 5 mM CaCl<sub>2</sub> auf eine Nährstoff-Agarplatte überschichtet und getrocknet. Währenddessen wurden 0,1 mL Nährstoff-Medium mit 2 x 10<sup>9</sup> CFU/mL der zu untersuchenden Stämme inokuliert und mit 50 µg/mL Chloramphenicol und 5 mM CaCl<sub>2</sub> gemischt. Chloramphenicol unterbindet weiteres Wachstum der Zellen und CaCl<sub>2</sub> ist notwendig für die Bindung der Phagen an den Wirt. Danach wurde den Zellen 0,1 mL Phagenlösung hinzugefügt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (13.000 g, 5 min, RT) und eine Verdünnungsreihe vom Überstand wurde hergestellt (10<sup>0</sup> – 10<sup>-5</sup>). Die Verdünnungsstufen (3 µL) wurden auf die Indikatorplatte getropft und diese über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plaques im Zellrasen dokumentiert. Als Positivkontrolle diente Phagenlösung in Medium ohne Zellen. Es wurden die Phagen ΦK, Φ66, Φ54 und Φ53 eingesetzt. Die Bildung von Plaques in einer hohen Verdünnungsstufe zeigt an, dass wenig Phagen an die Zellwand gebunden haben.

### 2.2.13 Aufreinigung von Zellbestandteilen

#### 2.2.13.1 Präparation der Zellmembran für das Proteinprofil

Es wurden 100 mL Bakterienkultur in TSB bei einer OD<sub>600</sub> 1 geerntet (8.000 g, 10 min, RT). Die Zellen wurden mit Membran-Protein Waschpuffer gewaschen und in 1 mL Puffer und 0,1 mL Protease Inhibitor 10 min auf Eis inkubiert. Es wurde jeweils 1 u DNase I und 10 mg/mL RNase hinzugefügt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Bead-Beating aufgeschlossen (6.000 g, 6x30 sek mit 30 sek Pause auf Eis). Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (4.000 g, 5 min, 4 °C, Br. 5) sedimentiert und der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.13.2 Präparation der Zellmembran für die Analyse der PBPs

Die Isolation der Zellmembran für die Analyse der PBPs erfolgte anhand eines modifizierten Protokolls von Jousselin et al., (2015). Es wurden 2 L Bakterienkultur in BHI bei einer OD<sub>600</sub> 1 geerntet (8.000 g, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 20 mL PBS gewaschen (16.000 g, 5 min, 4 °C) und in 6 mL PBS durch Bead-Beating aufgeschlossen (Power Setting „High“, 6x30 sek, jeweils 30 sek Pause auf Eis). Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (4.000 g, 5 min, 4 °C, Br. 5) sedimentiert und der Überstand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.13.3 Präparation von Peptidoglykan (saurer pH)

Für die Aufreinigung von Peptidoglykan unter sauren Bedingungen wurden 40 mL Zellkultur in BHI bei einer  $OD_{600}$  1 geerntet (8.000 g, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde dann in 1,5 mL Zitronensäurepuffer gewaschen und im selben Puffer durch Bead-Beating aufgeschlossen (6.000 g, 5x30 sek mit jeweils 90 sek Pause auf Eis). Der Zellaufschluss wurde durch Gram-Färbung kontrolliert. Anschließend wurden nicht aufgeschlossene Zellen sedimentiert (2.000 g, 5 min, RT) und das Peptidoglykan im Überstand erneut zentrifugiert (16.000 g, 20 min, RT, Br. 4). Das Pellet wurde in 1,5 mL Zitronensäure-Puffer mit 2 % (v/v) SDS gelöst und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Probe dreimal mit Zitronensäure-Puffer gewaschen und in 0,1 mL Natriumacetat-Puffer gelöst. Abschließend wurde die Probe bei -20 °C eingefroren und danach lyophilisiert.

### 2.2.13.4 Präparation von Peptidoglykan (basischer pH)

Die Aufreinigung von Peptidoglykan unter basischen Bedingungen, basierend auf Kühner et al., (2014), führt zu einem Verlust der D-Alanin-Reste an den Wandteichonsäuren. Es wurden 6 mL BM-Medium mit einer Kultur in der stationären Wachstumsphase geerntet (9.000 g, 10 min, RT). Das Pellet wurde in 1 mL NaCl (1 M) für 20 min im Wasserbad bei 100 °C gekocht. Danach wurde die Probe zweimal mit 1 mL  $H_2O_{MilliQ}$  gewaschen und im Ultraschallbad für 30 min gelöst. Dann wurde 0,45 mL PGN-Puffer mit 3  $\mu$ L Benzonase hinzugefügt und die Probe 60 min bei 37 °C und Rotation (30 rpm) inkubiert. Als nächstes wurden 0,5 mL Lösung C hinzugefügt und weitere 60 min unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Enzyme wurden für 3 min bei 100 °C inaktiviert und die Probe wurde zentrifugiert (10.000 g, 5 min, RT). Danach wurde die Probe einmalig mit  $H_2O_{MilliQ}$  gewaschen und in 0,1 mL  $H_2O_{MilliQ}$  bei -20 °C gelagert. Je nach weiterer Verwendung wurde die Probe entweder lyophilisiert oder es wurden die WTA von der Zellwand gelöst. Dazu wurde die Zellwand in 0,5 mL HCl (1 M) gelöst und 4 h bei 37 °C und Rotation (30 rpm) inkubiert. Danach wurde die Probe viermalig mit  $H_2O_{MilliQ}$  gewaschen (10.000 g, 5 min, RT). Als letztes wurde die Probe auf  $OD_{600}$  3 eingestellt und 0,4 mL wurden auf Eis zur UPLC-Analyse an Dr. Ute Bertsche nach Tübingen geschickt.

### 2.2.13.5 Präparation von Wandteichonsäuren

Für die Extraktion von Wandteichonsäuren aus den Zellwänden der *S. aureus* Stämme wurde die Methode von Covas et al., (2016) angewandt. Es wurden 20 mL einer Übernachtskultur zentrifugiert (7.000 g, 15 min, RT) und das Pellet nacheinander in 20 mL WTA-Puffer I und WTA-Puffer II gelöst und

anschließend für 1 h bei 100 °C gekocht. Danach wurde die Probe mit 1,5 mL WTA-Puffer II, WTA-Puffer III und WTA-Puffer I gewaschen (16.000 g, 5 min, RT) und in 1,5 mL WTA-Puffer IV mit 2 µL Proteinase K (20 mg/mL) für 4 h bei 50 °C inkubiert. Dann wurde die Probe mit 1,5 mL WTA-Puffer III und dreimalig mit H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> gewaschen, schließlich in 0,5 mL NaOH (0,1 M) gelöst und über Nacht bei RT und Rotation (30 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe mit 125 µL WTA-Puffer V neutralisiert und zentrifugiert (16.000 g, 15 min, RT). Der Überstand mit den WTA wurde lyophilisiert.

### **2.2.13.6 Präparation von Wandteichonsäuren für die NMR-Spektroskopie**

Für die Analyse der Wandteichonsäuren durch die NMR-Spektroskopie mussten diese frei von jeglichen Verunreinigungen sein. Aus diesem Grund wurde eine Methode basierend auf Kho und Meredith (2018a) und Xia et al., (2010b) zur Aufreinigung eingesetzt. Dazu wurden 500 mL einer stationären Kultur in TSB geerntet (6.000 g, 10 min, RT) und mit 10 mL WTA-Puffer I gewaschen. Danach wurde das Pellet in 20 mL WTA-Puffer II gelöst und für 1 h bei 100 °C gekocht. Die Kultur wurde zentrifugiert (14.000 g, 15 min, RT) und nacheinander mit 10 mL PBS, WTA-Puffer IV und dreimal mit H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> gewaschen. Dann wurde das Pellet in 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> für 30 min bei 60 °C inkubiert und nochmals mit H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> gewaschen. Schließlich wurde die Probe in 10 mL Trypsin-Lösung resuspendiert und über Nacht bei 37 °C und Rotation (30 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe nacheinander mit WTA-Puffer V, WTA-Puffer IV, WTA-Puffer V und dreimalig mit H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> gewaschen, bevor diese in 10 mL 0,1 M NaOH über Nacht bei RT und Rotation (30 rpm) inkubiert wurde. Danach wurde die Probe nacheinander zweimal zentrifugiert (5.500 g, 45 min, RT) und jeweils der Überstand mit den WTA wurde überführt. Es wurde den WTA 0,1 Volumen 3 M NaOAc zur Neutralisation hinzugefügt, sowie 3 Volumen eiskaltes Ethanol (95 % (v/v)). Die WTA wurden über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Am nächsten Tag wurde die Probe zentrifugiert (5.500 g, 30 min, RT) und in 1,5 mL Ethanol (95 % (v/v)) gelöst. Anschließend wurde die Probe fünfmal mit 1 mL Ethanol (95 % (v/v)) gewaschen und an der Luft getrocknet. Danach wurde das Pellet in 0,5 mL H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> gelöst und bei -20 °C gelagert.

### 2.3 Molekularbiologische Methoden

#### 2.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolation der genomischen DNA aus *S. aureus* erfolgte aus 4 mL Übernachtskultur. Nach der Ernte (8.000 g, 5 min, RT) wurde das Pellet in 50 µL RS-Puffer gelöst und die Zellen mit 50 µg/mL Lysostaphin bei 37 °C zwischen 30 min – 2 h lysiert. Es folgte die Aufreinigung mit dem PrestoSpin D Bug DNA Purification Kit nach Angaben des Herstellers. Die Qualität und Quantität der genomischen DNA wurde mithilfe eines NanoDrop Photometers gemessen.

#### 2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte aus 4 mL Übernachtskultur mithilfe des GeneJET Plasmid Mini-prep Kit nach Herstellerangaben. *S. aureus* Stämme wurden vorher in 250 µL Resuspensions-Puffer mit 50 µg/mL Lysostaphin bei 37 °C zwischen 30 min – 2 h lysiert. Die Qualität und Quantität der DNA wurde mithilfe eines NanoDrop Photometers gemessen.

#### 2.3.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Für die Messung der Konzentration und Reinheit von DNA und RNA wurde der NanoDrop™ One von Thermo Scientific verwendet. Die Bestimmung erfolgte bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, sowie bei 280 nm und 230 nm. Zur Analyse der Qualität der Nukleinsäuren wurden die Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  herangezogen. Diese liegen bei reiner DNA >1,8 und bei reiner RNA >2,0.

#### 2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986) ist eine Methode zur in vitro Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Für die Durchführung der PCR-Reaktion wurde der Labcycler Gradient von SensoQuest, sowie die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase von Thermo Scientific nach An-

## Material und Methoden

gaben der Hersteller eingesetzt. In der folgenden Tabelle (Tab. 8) ist das Standardprotokoll dargestellt. Die verwendeten Primer und Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 43 im Anhang aufgelistet.

**Tabelle 8** In dieser Arbeit verwendeter Standard-PCR Ansatz und PCR-Programm (x und y sind Primer- bzw. Template-spezifisch).

Bestandteil	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Schritt	Zeit (s)	Temperatur ( $^{\circ}\text{C}$ )
5x Phusion HF Puffer	10	Initiale Denaturierung	30	98
dNTPs	1	Denaturierung	10	98
DMSO	1,5	Annealing	30	x
Primer forward (10 $\mu\text{M}$ )	2,5	Elongation (30 Zyklen)	y	72
Primer reverse (10 $\mu\text{M}$ )	2,5	Finale Elongation	300	72
Template (100 ng/ $\mu\text{L}$ )	1	Pause	$\infty$	4
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	ad 50			
Phusion	0,5			

### 2.3.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie anderer DNA-Fragmente erfolgte mit dem GeneJET PCR Purification Kit von Thermo Scientific oder mit dem Monarch™ PCR & DNA Cleanup Kit von NEB nach Herstellerangaben. Durch die Aufreinigung wurden die Proben von Salzen, Primern, Enzymen und anderen Bestandteilen befreit und gleichzeitig aufkonzentriert. Die Qualität und Quantität der DNA wurde mithilfe eines NanoDrop Photometers gemessen.

### 2.3.4.2 Kolonie-PCR

Eine weitere Variante der PCR ist die Kolonie-PCR. In dieser Methode wurde eine Bakterienkolonie als Template verwendet. Die Kolonie wurde in H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub> gelöst, bevor die anderen Bestandteile hinzugefügt wurden. Für den Fall eines positiven Ergebnisses wurde eine 5 mL TSB-Kultur angeimpft. Das Standard-PCR-Programm wurde verändert, sodass eine initiale Denaturierung von 98 °C für 10 min die *S. aureus* Zellen lysierte und die genomische DNA freisetzte.

### 2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA ist ein negativ geladenes Molekül, dessen Ladung direkt proportional zu seiner Länge ist und das in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden kann. Für die Trennung der DNA- und RNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit einer horizontalen Gelkammer von

Peqlab durchgeführt. Agarosegele wurden 1 %ig in TAE-Puffer (Sambrook et al., 1989) hergestellt, welcher ebenfalls als Laufpuffer verwendet wurde. Proben wurden mit 6x Ladepuffer vermischt und bei einer Spannung von 150 V aufgetrennt. Die Fragmente wurden entweder vor der Elektrophorese mit Midori Green Direct nach Herstellerangaben oder nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt und in einem Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ von Bio-Rad Laboratories dokumentiert.

### **2.3.5.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Für die Extraktion von DNA aus Gelfragmenten wurde das GeneJET Gel Extraction Kit von Thermo Scientific nach Herstellerangaben verwendet. Die Gelfragmente wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und mit 1:1 (v/w) Bindepuffer bei 60 °C aufgelöst. Die Qualität und Quantität der DNA wurde mithilfe eines NanoDrop Photometers gemessen.

### **2.3.5.2 RNA-Gelelektrophorese**

Da RNA schnell durch RNasen abgebaut wird, wurde das Protokoll für die Agarose-Gelelektrophorese abgewandelt. Alle Glas- und Metall-Utensilien wurden bei 200 °C für 6 h sterilisiert und es wurden nur RNase-freie Einwegartikel verwendet. Die Gelkammer wurde mit 0,5 M NaOH gereinigt und mit autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub> gespült. Der TAE-Puffer wurde frisch angesetzt und 1 µL Ethidiumbromid dem Gel direkt zugefügt. Es wurden 100 ng der RNA mit 3x RNA-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 65 °C denaturiert. Das Gel wurde bei 100 V für 1 h laufen gelassen und direkt im Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ angeschaut. Die Kammer wurde anschließend mit Aktivkohle dekontaminiert.

### **2.3.6 Restriktionsverdau**

Restriktionsendonukleasen schneiden Phosphodiesterbindungen von Nukleinsäuren an definierten, palindromischen Regionen innerhalb einer Erkennungssequenz. Es wurden für die Klonierung Fast-Digest® Enzyme von Thermo Scientific oder solche von NEB nach Herstellerangaben verwendet. Die einzelnen Enzyme sind in der Primer-Tabelle (Tab. 43) aufgezeigt. Die Zusammensetzung des Restriktionsverdaus ist in Tabelle 9 dargestellt. Nach dem Verdau wurden die Enzyme inaktiviert und in der Ligation eingesetzt. Zur Überprüfung einiger Plasmiden wurde teilweise ein Kontrollverdau mit nur einem Restriktionsenzym durchgeführt.

Tabelle 9 In dieser Arbeit verwendeter Standard-Restriktionsverdau.

Bestandteil	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
10x Puffer	2,5
Enzym I	1
Enzym II	1
DNA (1 $\mu\text{g}$ )	x
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	ad 25

## 2.3.7 Ligation

Die DNA-Ligase verbindet innerhalb der Klonierung das 3'-Hydroxyl-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende des Plasmids und des DNA-Inserts durch eine kovalente Phosphodiesterbindung. In Tabelle 10 ist die Zusammensetzung der Reaktion gezeigt. Das Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA betrug 5:1 und wurde mithilfe des Ligationsrechners von NEB berechnet.

Tabelle 10 In dieser Arbeit verwendeter Standard-Ligationsansatz.

Bestandteil	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
10x T4 DNA-Ligase Puffer	1
T4 DNA-Ligase	1
Vektor	x
Insert	y
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	ad 10

Die Vektor- und Insert-DNA wurde zuerst für 5 min bei 45 °C inkubiert, bevor alle anderen Bestandteile hinzugefügt wurden. Die Reaktion wurde für 1 h bei RT und über Nacht in einem Dewar-Gefäß bei 4 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die Probe bei 65 °C für 15 min inkubiert. Das Ligationsprodukt wurde anschließend in der Transformation eingesetzt.

## 2.3.8 Transformation

### 2.3.8.1 Herstellung von elektrokompetenten *S. aureus* Zellen (Schreiber, 2015)

Für die Herstellung elektrokompetenter *S. aureus* Zellen wurden 500 mL Kultur in BHI-Medium bei einer OD<sub>600</sub> 1 geerntet (4.000 g, 10 min, RT, Br. 2). Das Pellet wurde zweimal mit 500 mL sterilem

H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und einmal mit sterilem 20 mL 10 % (v/v) Glycerin gewaschen (8.000 g, 10 min, RT). Schließlich wurden die Zellen in 1 mL 10 % (v/v) Glycerin gelöst, jeweils 50 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.3.8.2 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen (Türck, 2009)**

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurden 500 mL Kultur in LB-Medium bei einer OD<sub>600</sub> 0,7 geerntet (4.000 g, 10 min, 4 °C, Br. 2). Das Pellet wurde zweimal mit 250 mL sterilem, eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und einmal mit sterilem, eiskaltem 10 mL 10 % (v/v) Glycerin gewaschen (8.000 g, 10 min, 4 °C). Schließlich wurden die Zellen in 0,5 mL eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin gelöst, jeweils 50 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.3.8.3 Herstellung von chemokompetenten *E. coli* Zellen (Berscheid, 2013)**

Es wurden 50 mL *E. coli* Zellen in TYM-Medium bei einer OD<sub>600</sub> 0,7 geerntet (8.000 g, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 5 mL eiskaltem TFB-I-Puffer gewaschen und in 2 mL eiskaltem TFB-II-Puffer resuspendiert. Jeweils 50 µL Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.3.8.4 Transformation von *S. aureus* Zellen**

Für die Elektroporation von *S. aureus* Zellen wurden 50 µL elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 5 µL Ligationsansatz oder aufgereinigtes Plasmid hinzugefügt. Die Zellen wurden bei RT für 30 min inkubiert und anschließend in eine Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Es folgte die Elektroporation mit dem STA-Programm (1,8 kV, 100 Ω, 25 µF, 2,5 ms) im MicroPulser™ von Bio-Rad Laboratories. Die Zellen wurden in 1 mL vorgewärmtem BHI resuspendiert und für 2 h bei 37 °C und 170 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf TSA-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für mehrere Tage bei 37 °C inkubiert. Kolonien wurden mithilfe von Kolonie-PCR oder Plasmid Isolation auf das Insert überprüft.

### **2.3.8.5 Transformation von *E. coli* Zellen**

Die Elektroporation von *E. coli* Zellen erfolgte mit 50 µL elektrokompetente Zellen. Diese wurden auf Eis aufgetaut und 5 µL Ligationsansatz oder aufgereinigtes Plasmid hinzugefügt. Anschließend wurden



die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Es folgte die Elektroporation mit dem EC2-Programm (2,5 kV, 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F, 4,5 ms) im MicroPulser™ von Bio-Rad Laboratories. Die Zellen wurden in 1 mL vorgewärmtem LB-Medium resuspendiert und für 2 h bei 37 °C und 170 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für mehrere Tage bei 37 °C inkubiert.

Für die Transformation von chemokompetenten *E. coli* Zellen wurden 50  $\mu$ L Zellen auf Eis aufgetaut und 5  $\mu$ L Ligationsansatz oder aufgereinigtes Plasmid hinzugefügt. Die Zellen wurden 30 min bei 4 °C inkubiert und dann einem Hitzeschock bei 42 °C für 90 s ausgesetzt. Danach wurde die Probe weitere 3 min auf Eis inkubiert und dann in 0,5 mL vorgewärmtem LB-Medium aufgenommen. Es folgte die Inkubation für 2 h bei 37 °C und 170 rpm. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für mehrere Tage bei 37 °C inkubiert. Kolonien wurden mithilfe von Kolonie-PCR oder Plasmid Isolation auf das Insert überprüft.

### 2.3.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger et al., (1977) wurde von den Firmen Microsynth (<https://www.microsynth.ch>) und Eurofins (<https://www.eurofinsgenomics.eu/de/custom-dna-sequencing/>) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 43 aufgelistet.

### 2.3.10 Induzierbare Überexpression von Proteinen

Für die induzierbare Überexpression von promotorlosen Genen, in diesem Fall die Zweikomponentensysteme *walRK*, *vraSR*, *vraSR* mit dem akzessorischen Gen *vraT*, und die Glycosyltransferasen der Wandteichonsäuren *tarM* und *tarS*, wurde der pTX15 Vektor (Peschel et al., 1996) verwendet. Der Vektor beinhaltet das *xylR*-Gen und den *xylA*-Promotor aus *Staphylococcus xylosus*. In der Abwesenheit von Xylose wird der *xylA*-Promotor durch den Repressor an einer palindromischen Sequenz nahe der -10 Region blockiert (Wieland et al., 1995). Ebenfalls wird der *xylA* Promotor durch eine Glukosebedingte Katabolitrepression reguliert. Die Transkription der klonierten Gene erfolgte mit der

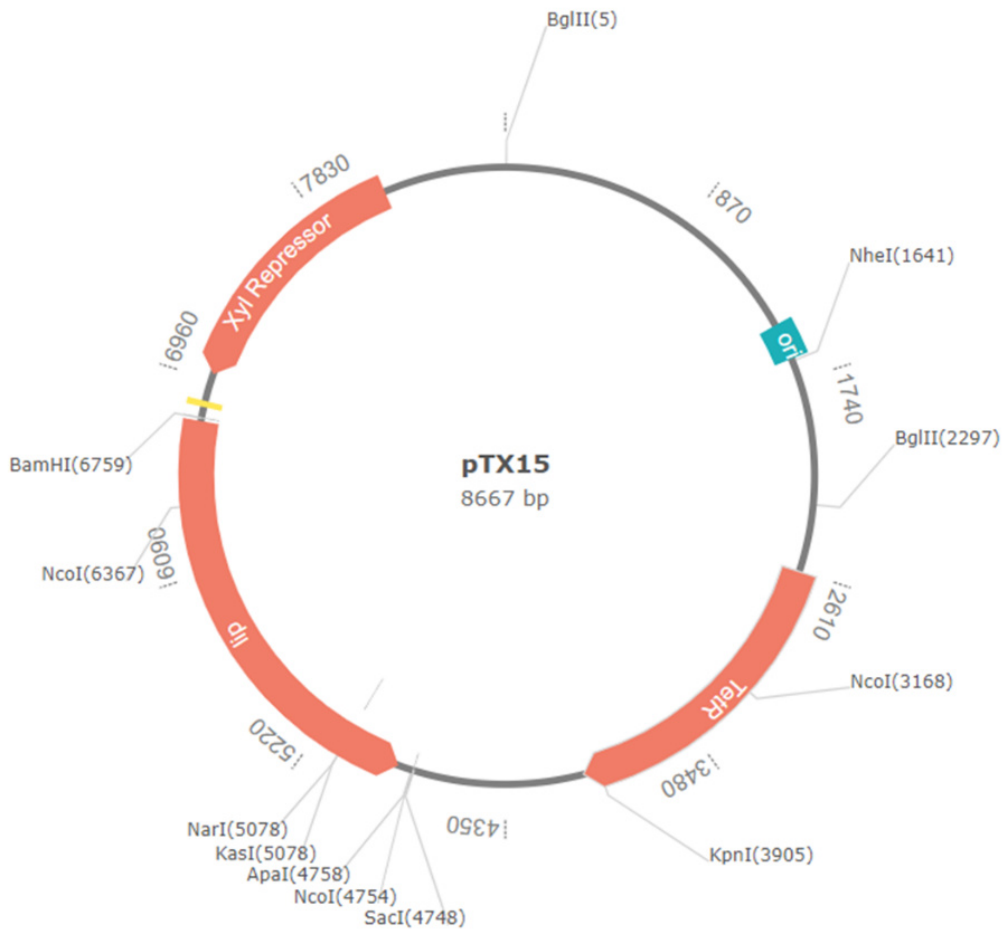


Abbildung 13 Vektor-Karte von pTX15, basierend auf Peschel et al., (1996).

Zugabe von 0,5 % Xylose. Da *S. aureus* Xylose nicht verstoffwechseln kann, reichte eine geringe Menge für die stabile Überexpression der genannten Gene. Eine Selektion des Vektors wurde durch das Antibiotikum Tetrazyklin (25 µg/mL) erzielt. In der vorangegangenen Abbildung ist die Vektor-Karte dargestellt (Abb. 13). Das *lip*-Gen befand sich im ursprünglichen pTX15 Vektor und wurde mithilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Nar*I ausgetauscht. Im Anhang befinden sich die Vektor-Karten aller pTX15-basierten Vektoren (Abb. 63).

### 2.3.11 Allel-Austausch durch homologe Rekombination

Der pMAD Vektor (Arnaud et al., 2004) ist ein 9666 bp großer, temperatursensitiver Shuttle-Vektor mit zwei Replikationsursprüngen (Abb. 14). Jeweils einer dieser ORI erlaubt die Replikation in Gram-negativen und der andere in Gram-positiven Bakterien. Der temperatursensitive Replikationsursprung für Gram-positive Bakterien verhindert die Vermehrung bei Inkubationstemperaturen über 30 °C. Somit selektieren höhere Temperaturen für Zellen, die das Plasmid über homologe Rekombination in

## Material und Methoden

ihr Genom integriert haben. Eine Selektion findet zudem über die Resistenzgene gegen Ampicillin (*bla*) in Gram-negativen Bakterien und gegen Erythromycin (*ermC*) in Gram-positiven Bakterien statt. Das konstitutiv exprimierte Gen *bgaB*, welches für eine  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, kann zu einem Blau-Weiß Screening der Kolonien verwendet werden.

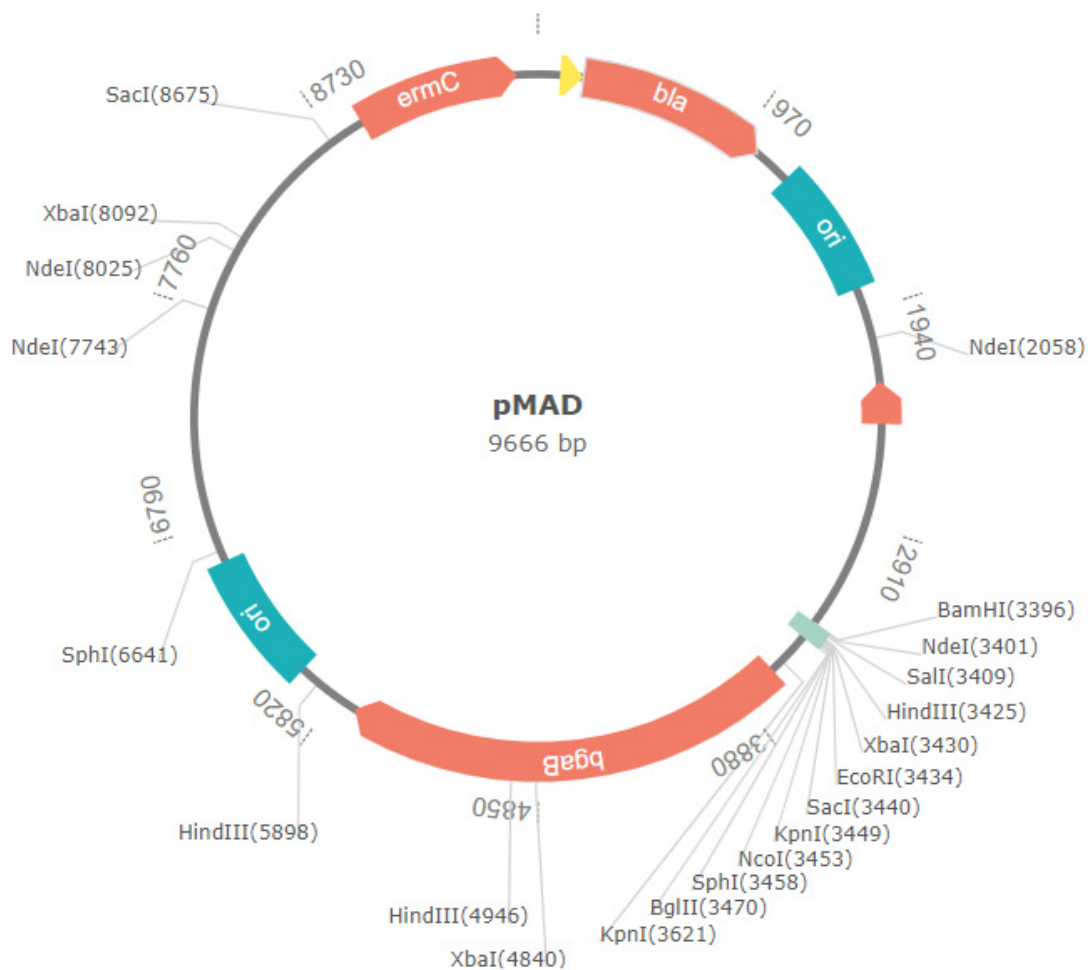
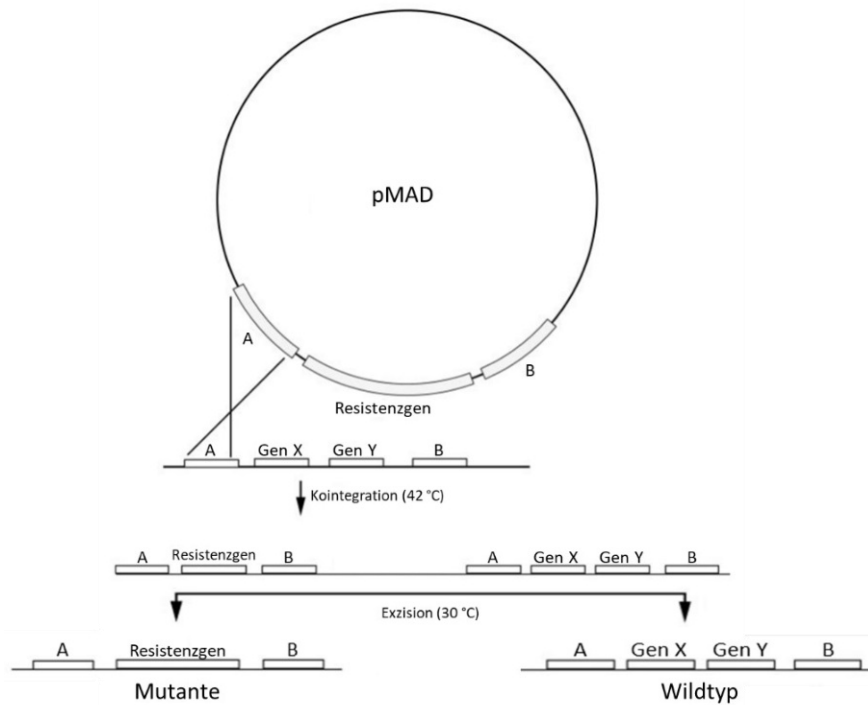


Abbildung 14 Vektor-Karte des temperatursensitiven Shuttle-Vektor pMAD, basierend auf Arnaud et al., (2004).

Eine dunkelblaue Kolonie mit freiliegenderem pMAD Plasmid wurde in 5 mL BHI mit 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Erythromycin resuspendiert und über Nacht bei 30 °C und 170 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100  $\mu\text{L}$  einer 1:10 Verdünnung auf eine BHI-Agarplatte mit 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Erythromycin und 300 mg/L X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 42 °C inkubiert. Danach wurde eine hellblaue Kolonie mit integriertem pMAD Plasmid in 5 mL BHI resuspendiert und über Nacht bei 30 °C und 170 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100  $\mu\text{L}$  einer 1:10.000 Verdünnung auf eine BHI-Agarplatte mit 300 mg/L X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 42 °C inkubiert. Schließlich wurden weiße Kolonien ohne pMAD Plasmid auf BHI-Agarplatten mit 300 mg/L X-Gal vereinzelt und auf die Veränderung im Genom untersucht. In der folgenden Abbildung 15 ist eine schematische Darstellung aufgezeigt.



**Abbildung 15** Schematische Darstellung des Allel-Austausch durch homologe Rekombination mit dem pMAD Vektor. In diesem Fall wurden Gen X und Gen Y durch ein Resistenzgen ausgetauscht und so deletiert. Die Darstellung wurde modifiziert nach Arnaud et al., (2004).

## 2.3.12 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenese

Durch die QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenese können Mutationen in vorhandene Plasmide mit Insert eingefügt werden. Es wurde das Kit von Agilent Technologies nach Herstellerangaben verwendet. In Kürze, das Plasmid pET22bΔpelB\_vraR wurde in nachfolgender Reaktion (Tab. 11) eingesetzt.

**Tabelle 11** In dieser Arbeit verwendeter QuikChange Lightning PCR-Ansatz und PCR-Programm.

Bestandteil	Volumen (µL)	Schritt	Zeit (s)	Temperatur (°C)
10x QuikChange Lightning Puffer	5	Initiale Denaturierung	120	95
dNTPs	1	Denaturierung	20	95
QuikSolution™	1,5	Annealing	10	60
Primer forward (10 µM)	2,5	Elongation (30 Zyklen)	180	68
Primer reverse (10 µM)	2,5	Finale Elongation	300	68
Template (100 ng/µL)	1	Pause	∞	4
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	ad 50			
QuikChange Lightning Enzyme	0,5			

Nach der PCR wurde der Reaktion 2  $\mu\text{L}$  *DpnI* hinzugefügt und es wurde 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Endonuklease *DpnI* ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA und wurde verwendet, um die parentalen DNA-Stränge zu zerstören (siehe Abb. 16). Anschließend erfolgte eine Transformation

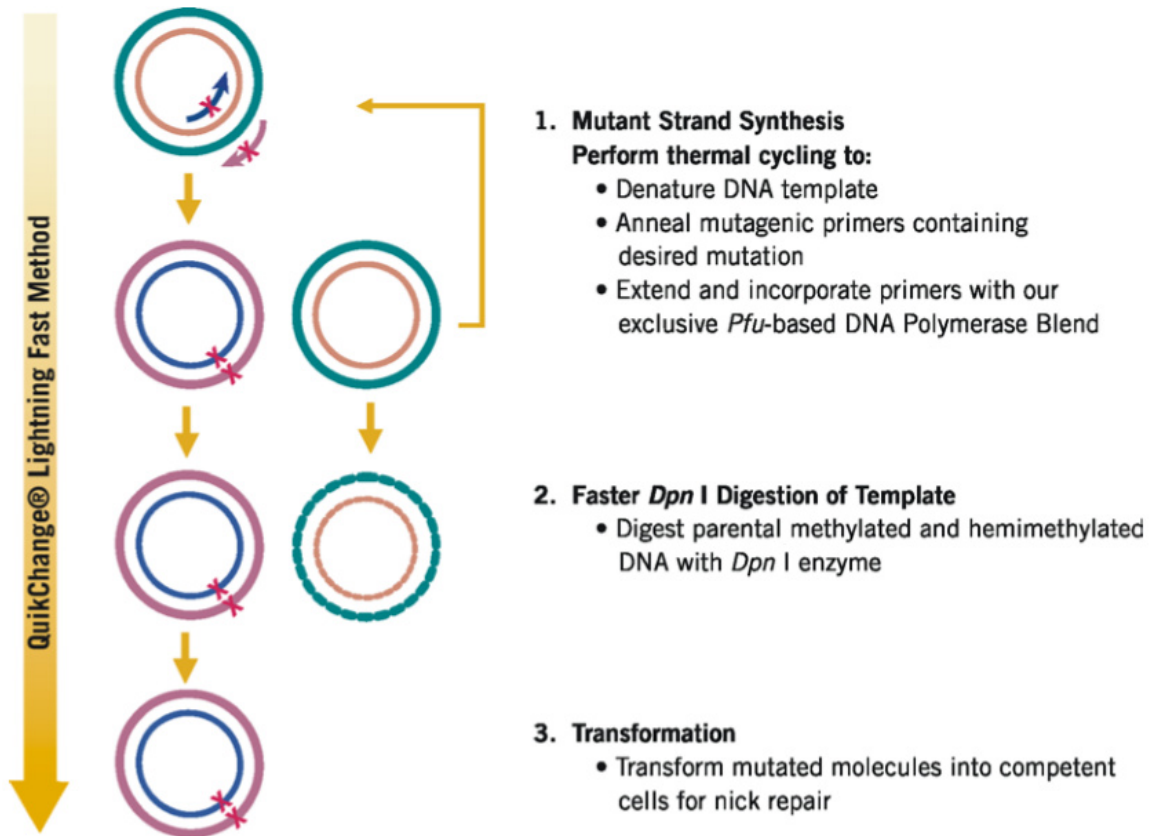


Abbildung 16 Schematische Darstellung der QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenese, entnommen aus der Anleitung des Kits (Agilent Technologies).

mit chemokompetenten *E. coli* JM109 Zellen wie oben beschrieben. Den Zellen wurde zusätzlich 2  $\mu\text{L}$   $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugefügt. Nachfolgend wurden die Zellen für 2 min auf Eis inkubiert. Es wurden 2  $\mu\text{L}$  der Reaktion zu den Zellen pipettiert und diese wurden für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden am Ende in NZY+ Medium statt LB-Medium aufgenommen.

### 2.3.13 Isolierung der Gesamt-RNA

Für die RNA-Isolation wurden alle Glas- und Metall-Utensilien bei 200 °C für 6 h sterilisiert und es wurden nur RNase-freie Einwegartikel verwendet. Alle Puffer und Lösungen wurden mit RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt. Es wurden 20 mL Kultur in TSB bei einer  $\text{OD}_{600}$  1 geerntet (8.000 g, 5 min, RT) und in 1 mL RNAprotect-Puffer von Qiagen für 5 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden einmal in RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und dann in 0,1 mL TE-Puffer (Alfa Aesar) mit 10  $\mu\text{L}$  Lysostaphin bei 37 °C für 30 min

## Material und Methoden

lysiert. Anschließend wurde die RNA mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Qualität und Quantität der Aufreinigung wurde mit dem NanoDrop Photometer bestimmt.

### 2.3.13.1 cDNA-Synthese

Die aufgereinigte RNA wurde in folgender Reaktion eingesetzt (Tab. 12). Es wurde das PrimeScript™ RT Reagent Kit von Takara nach Herstellerangaben verwendet.

**Tabelle 12** In dieser Arbeit verwendeter cDNA-Syntheseansatz und PCR-Programm.

Bestandteil	Volumen (µL)	Schritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)
5x PrimeScript™ RT Master Mix	2	Reverse Transkription	15	37
RNA (100 ng)	1	Inaktivierung	0,1	85
RNase-freies H <sub>2</sub> O	ad 10	Pause	∞	4

Die Reaktion wurde entweder in der qRT-PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

### 2.3.13.2 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR wurde die Proben-Amplifikation während der linearen log-Phase der PCR gemessen. Die präparierte cDNA wurde in einer quantitativen Real-Time-PCR eingesetzt. Dazu wurde das TB Green Premix Ex Taq II von Takara in folgender Reaktion (Tab. 13) nach Herstellerangaben verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 43 gelistet.

**Tabelle 13** In dieser Arbeit verwendeter qRT-PCR-Ansatz und qRT-PCR-Programm.

Bestandteil	Volumen (µL)	Schritt	Zeit (s)	Temperatur (°C)
2x TB Green Premix Ex Taq II	10	Initiale Denaturierung	30	95
Primer forward (10 µM)	1	Denaturierung	5	95
Primer reverse (10 µM)	1	Annealing und Elongation (40 Zyklen)	30	60
50x ROX Reference Dye II	0,4	Schmelzkurve	-	60 - 95
cDNA	2			
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	ad 20			

Es wurden die Menge an Transkripten der Gene *vraS* und *sgtB* analysiert und mit der Expression des Haushaltsgens *gyrB* verglichen. Aufgereinigte PCR-Produkte dienten der Quantifizierung und als Positivkontrolle. Die qRT-PCR erfolgte auf einem C1000™ Thermal Cycler mit dem CFX96™ Real Time System von Bio-Rad Laboratories. Die qRT-PCR-Produkte wurden mithilfe der Analyse der Schmelzkurve bestätigt.

### 2.3.13.3 RNA-seq

Es wurde für die fünf Stämme *S. aureus* RN4220Δ*mutS*, *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R, *S. aureus* NCTC8325 und *S. aureus* *VraS*(VC40) in Triplikaten eine Transkriptom-Analyse mittels RNA-seq durchgeführt. Die eingesetzte RNA hatte einen RIN über 6, eine Konzentration von mindestens 50 ng/μL, einen A260/A280 Quotient über 1,8 und eine Menge von mindestens 1 μg. Anschließend an die Qualitätskontrolle erfolgte die RNA-seq durch die Firma Genewiz in Leipzig mit einer Illumina HiSeq 2x150 bp Sequenzierung. Die Standard-Analyse und Annotierung wurden ebenfalls von Genewiz durchgeführt.

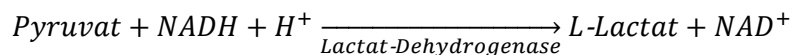
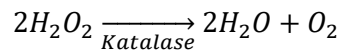
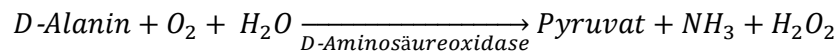
## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Bestimmung des Phosphat-Gehaltes der WTA

Der Gehalt an Phosphat in den aufgereinigten Zellwänden ist direkt proportional zu den darin enthaltenen WTA. Die Bestimmung wurde basierend auf einem Protokoll von Rouser et al., (1970) durchgeführt. Zuerst wurden 5 – 10 μL Zellwand in einem Reagenzglas bei 140 °C in einem Heizblock getrocknet. Dann wurde das Phosphat von den WTA mit 0,3 mL Perchlorsäure bei 180 °C für 1 h gelöst. Nach dem Abkühlen des Glases wurden nacheinander 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>MILLIQ</sub>, 0,4 mL Ammonium-Heptamolybdat und 0,4 mL Ascorbinsäure hinzugefügt. Die Probe wurde im Wasserbad für 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend wurde die OD<sub>797</sub> bestimmt. Der Phosphat-Gehalt wurde über eine Eichgerade von 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Stammlösung (0 - 160 nmol Phosphat) berechnet und auf das Trockengewicht (TG) bezogen.

### 2.4.2 Bestimmung des D-Alanin-Gehaltes der WTA

Der Gehalt an D-Alanin wurde indirekt über die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat durch Lactat-Dehydrogenase bestimmt. Die Messung erfolgte anhand der verschiedenen Absorptionsmaxima des Kofaktors NADH/NAD<sup>+</sup> bei OD<sub>366</sub>. Es fanden folgende Reaktionen statt:



Für die Bestimmung der D-Alanin Substitution der WTA wurden Zellwände unter sauren Bedingungen isoliert und in 0,1 mL D-Alanin-Puffer pH 8,5 resuspendiert. Die Probe wurde über Nacht bei RT und Rotation (30 rpm) inkubiert. Als nächstes wurde die Probe zentrifugiert (13.500 g, 10 min, RT, Br. 6) und 25 µL Überstand wurden abgenommen. Der Überstand wurde für die D-Alanin Bestimmung nach Graßl (1970) verwendet. Hierfür wurden 1,4 mL D-Alanin-Puffer, 25 µL Überstand, 25 µL D-Alanin Lösung I, 9 µL Lactat-Dehydrogenase (5 mg/mL) und 5 µL D-Alanin Lösung II gemischt und die OD<sub>366</sub> (E<sub>1</sub>) wurde bestimmt. Die Messung erfolgte gegen Luft als Leerwert. Dann wurde der Reaktion 50 µL D-Alanin Lösung III hinzugefügt und diese wurde für 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde nochmals die OD<sub>366</sub> (E<sub>2</sub>) bestimmt. Anhand eines D-Alanin-Standards (10 mM) sowie folgender Formel ( $\Delta E$  = Extinktionsdifferenz Probe;  $\Delta E(\text{leer})$  = Extinktionsdifferenz Puffer ohne D-Alanin;  $V$  = Gesamtvolumen (1514 µL);  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient NADH (3,3 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $d$  = Schichtdicke (1 cm);  $v$  = Probenvolumen (25 µL)) wurde die D-Alanin Konzentration berechnet:

$$\frac{(\Delta E - \Delta E(\text{leer})) \times V}{\epsilon \times d \times v} = \frac{\mu\text{mol } D\text{-Alanin}}{\text{mL Probe}}$$

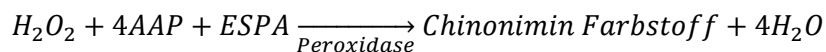
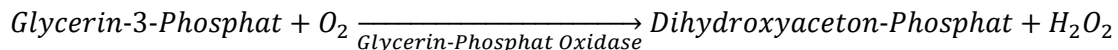
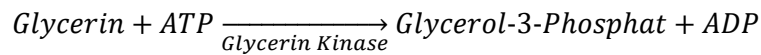
Die Konzentration wurde auf das Trockengewicht bezogen und in Verbindung zum Phosphat-Gehalt gesetzt.

Ebenfalls wurde der D-Alanin-Gehalt von ganzen Zellen bestimmt. Hierfür wurden 5 mL einer Kultur mit OD<sub>600</sub> 1,5 geerntet (8.000 g, 10 min, RT, Br. 6) und in 0,3 mL Natriumacetat-Puffer gelöst. Die Kultur wurde dann für 30 min bei 80 °C pasteurisiert und anschließend gefriergetrocknet. Abschließend wurden die Zellen in D-Alanin-Puffer pH 8,5 gelöst und der Gehalt an D-Alanin wurde wie oben beschrieben gemessen. Der D-Alanin-Gehalt von ganzen Zellen umfasst das D-Alanin sowohl von WTA als auch von LTA in der Zellwand.



### 2.4.3 Bestimmung des Glycerin-Gehaltes der WTA

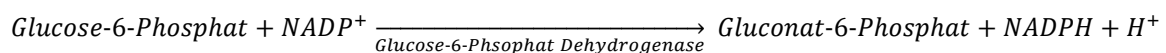
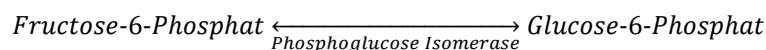
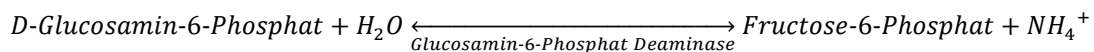
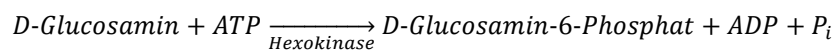
Der Glycerin-Gehalt wurde indirekt über eine Farbreaktion gemessen, die auf der Konzentration an Wasserstoffperoxid durch eine vorgeschaltete Oxidase von Glycerin-3-Phosphat basierte. Die Reaktionen sind im Folgenden dargestellt:



Für die Analyse der Glycerin-Konzentration wurden isolierte WTA mit 1 Volumen 4 N HCl gemischt und für 2 h bei 100 °C hydrolysiert. Die Probe wurde danach mit 2 Volumen 2 N NaOH neutralisiert und es wurden 10 µL in das Triglycerid Colorimetric Assay Kit von Cayman Chemical eingesetzt. Es wurden zusätzlich eine Triglyceride-Standardreihe und eine Negativkontrolle ohne Glycerin gemessen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit 2/3 Volumen. Der Glycerin-Gehalt wurde anschließend auf das Trockengewicht bezogen und mit dem Phosphat-Gehalt verglichen.

### 2.4.4 Bestimmung des Zucker-Gehaltes der WTA

Der Gehalt an Zucker wurde in diesem Versuch indirekt über den Kofaktor NADPH/NADP<sup>+</sup> bestimmt. Die chemischen Reaktionen sind im Folgenden dargestellt:



Für den Versuch wurden isolierte WTA mit 1 Volumen 4 N HCl für 2 h bei 100 °C hydrolysiert. Die Probe wurde danach mit 2 Volumen 2 N NaOH neutralisiert und 50 µL wurden in dem D-Glucosamine Assay Kit von Megazyme nach Herstellerangaben eingesetzt. Es wurde nur das halbe angegebene Volumen aller Substanzen verwendet. Anschließend wurde die D-Glucosamin-Konzentration anhand folgender Formel ( $V$  = Volumen (1170 µL);  $MW$  = Molekulargewicht D-Glucosamin (179,17 g/mol);  $\epsilon$  =

Extinktionskoeffizient NADPH ( $6300 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )  $d$  = Schichtdicke (1 cm);  $v$  = Probenvolumen (50  $\mu\text{L}$ );  $\Delta E$  = Extinktionsdifferenz Probe;  $c$  = Konzentration D-Glucosamin (mg/mL) bestimmt:

$$\frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta E = c$$

Der Zucker-Gehalt wurde anschließend auf das Trockengewicht bezogen und in Verbindung mit dem Phosphat-Gehalt gesetzt.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Proteinaufreinigung

Der C-terminale His<sub>6</sub>-Tag Protein-Expressionsvektor pET22b $\Delta$ pelB wurde für die Aufreinigung der Proteine des TCS VraSR verwendet. Durch die Deletion der *pelB*-Signalsequenz werden Proteine nicht im Periplasma, sondern im Cytoplasma des Expressionsstammes angereichert (Sass und Bierbaum, 2007). Ebenfalls besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz durch das *bla*-Gen und den T7-Transkriptionsstart vor der MCS. Die Transkription wurde durch die Bindung des Lac-Repressors (LacI) an den Lac-Operator gehindert und durch IPTG freigegeben. Die Vektor-Karte ist in Abbildung 17 dargestellt. Alle auf pET22b $\Delta$ pelB-basierten Vektoren sind im Anhang abgebildet (Abb. 62).

Zusätzlich zu dem pET22b $\Delta$ pelB enthielten die Expressionsstämme für VraS und VraR auch das pREP4groESL Plasmid (Abb. 18). Durch das Plasmid wurden das Chaperon GroEL und dessen Kofaktor GroES konstitutiv exprimiert. Chaperone unterstützen die korrekte Faltung von Proteinen und verhindern so die Bildung von Proteinaggregaten und erhöhen die Löslichkeit. Das Plasmid besitzt eine Kanamycin-Resistenz durch das *neo*-Gen. Für die Expression des Autolysins AtIA wurde das Plasmid pREP4 ohne zusätzliche Chaperone verwendet. Stattdessen enthielt diese Version einen Lac-Repressor (*lacI*), der die Transkription des pQE-32 Vektors, durch Bindung an den T5-Promotor, regulierte.

Das Plasmid pQE-32 (Abb. 19) wurde für die N-terminale His<sub>6</sub>-Tag Aufreinigung von AtIA verwendet. Es besitzt außerdem eine Ampicillin-Resistenz und einen T5-Promotor mit *lac*-Operator. Die Transkription des Polylinkers wurde durch die Zugabe von IPTG erreicht, welches an den Lac-Repressor des pREP4 Plasmids bindet.

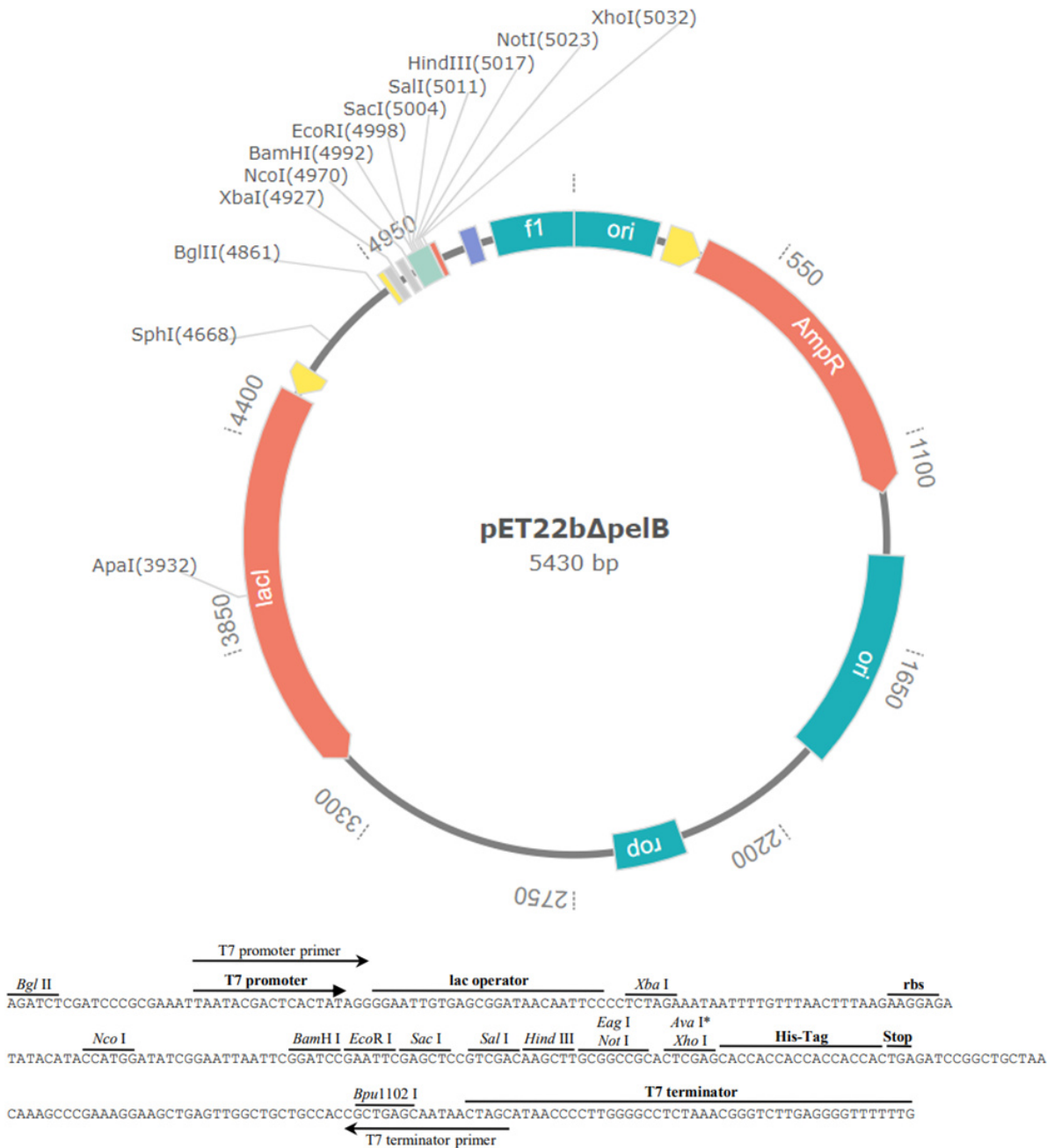
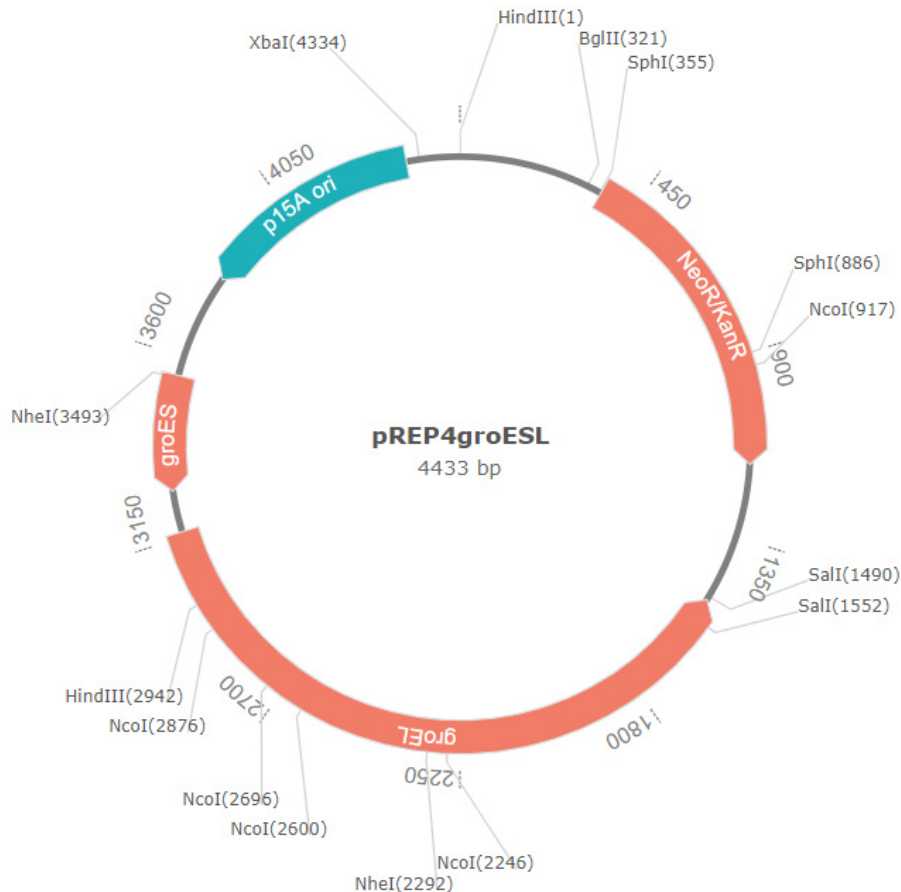


Abbildung 17 Vektor-Karte und Übersicht über die MCS des Vektors pET22bΔpelB, modifiziert nach Sass (2005).

Die Expression der rekombinanten Proteine VraS und VraR erfolgte in dem Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* C43(DE3) bei membrangebundenen Proteinen. Diese Stämme besitzen durch die Insertion des Bakteriophagen DE3 die Gene für die T7-RNA-Polymerase, sowie deren Repressor *lacI*. Der Repressor verhinderte die Expression der Polymerase in Abwesenheit von Lactose. Die Induktion der Transkription erfolgte durch die Aufnahme von IPTG. Ebenfalls fehlten den Stämmen die Gene für die Lon und die OmpT Proteasen, wodurch der Abbau heterolog exprimierter Proteine minimiert wurde. Das Autolysin AtIA wurde aus dem Expressionsstamm *E. coli* M15 aufgereinigt.



**Abbildung 18** Vektor-Karte von pREP4groESL, modifiziert nach Türck und Bierbaum (2012).

Die Proteinaufreinigung wurde für die Proteine VraS, VraS(VC40), VraR, VraR(M54T) und AtIA durchgeführt. Es wurden 0,5 L LB- bzw. TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika in einem 5 L Kolben mit 5 mL einer Übernachtskultur angeimpft und diese wurde bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Ab einer  $OD_{600}$  0,5 wurden der Kultur 0,5 mL IPTG (1 M) hinzugefügt und die Temperatur wurde für die restliche Inkubation über Nacht auf 30 °C reduziert. Am nächsten Tag wurde die Kultur geerntet (6.000 g, 6 min, 4 °C, Br.3). Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C und auf Eis. Das Pellet wurde in 20 mL Lysis-Puffer M1 resuspendiert und mit 0,2 mL Lysozym (100 mg/mL) und 20  $\mu$ L Benzonase für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschall mit dem Sonopuls HD 3100 von Bandelin mit 12 Impulsen (60 % Intensität) zu je 10 s und 30 s Pause aufgeschlossen. Die Zellen wurden dreimal sedimentiert (11.000 g, 10 min, 4 °C, Br. 5). Der Überstand wurde anschließend bei -20 °C gelagert. Membranständige Proteine (VraR, VraR(M54T)) wurden zusätzlich zweimal ultrazentrifugiert (225.000 g, 60 min, 4 °C). Dabei wurde das Pellet zwischen den Zentrifugationsschritten in Lysis-Puffer M2 resuspendiert und 30 min bei 4 °C und Rotation (Magnetrührer) inkubiert. Der Überstand wurde anschließend ebenfalls bei -20 °C gelagert. Als nächstes erfolgte die Aufreinigung His<sub>6</sub>-getaggtter Proteine mittels Nickel-NTA-Agarose. Dazu wurden die Proben mit 1 mL Nickel-NTA-

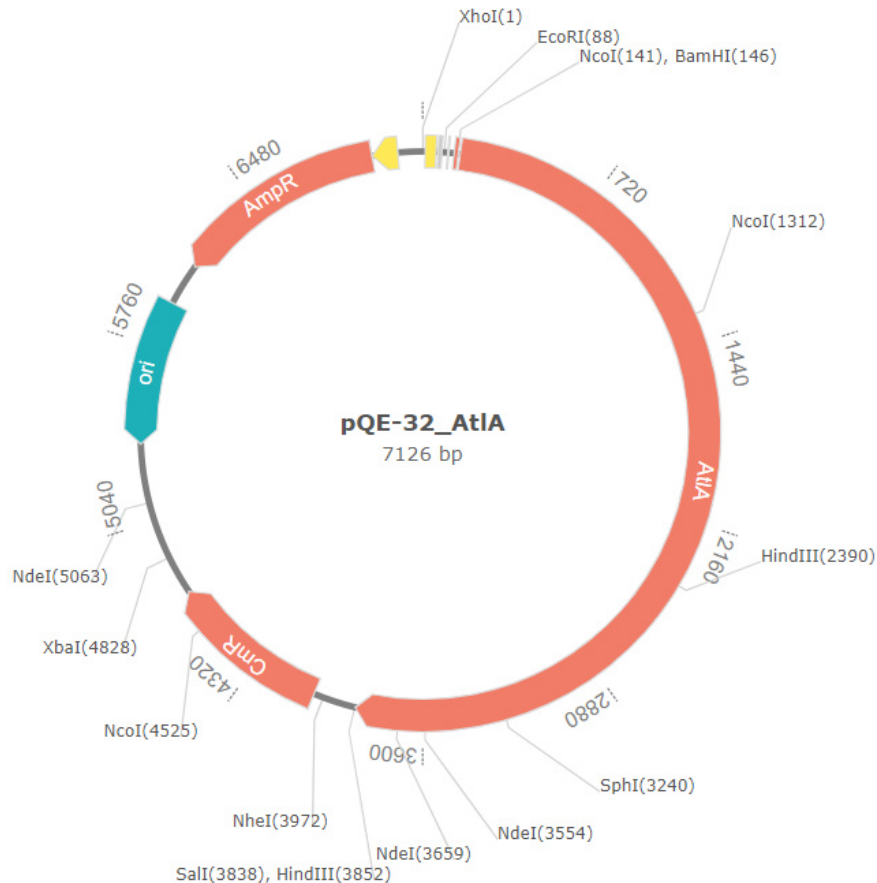


Abbildung 19 Vektorkarte von pQE-32\_AltA, modifiziert nach Schrötter (2018).

Agarose für 2 h mit Rotation (Magnetrührer) bei 4 °C inkubiert. Währenddessen wurde eine Polypropylen-Säule von Qiagen mit 2 mL Lysis-Puffer M1 bzw. M2 äquilibriert, bevor die Proteine hinzugefügt wurden. Nacheinander wurde die Säule mit 5 mL Waschpuffer M1, 5 mL Waschpuffer M2 und 8 x 0,2 mL Elutionspuffer befüllt. Die Chemikalie DDM wurde den Puffern nur bei membrangebundenen Proteinen zugefügt. Alle Fraktionen, sowie der Durchfluss, wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Elutions-Fraktionen wurden mit 80 µL 100 % (v/v) Glycerin vermischt und bei -20 °C gelagert.

### 2.5.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Protein Assay

Die Proteinkonzentration der Proteinaufreinigung wurde nach Bradford (1979) bestimmt. Sie beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 in sauren Lösungen durch die Komplexbildung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen. Es wurde das Bradford Protein Assay Kit von Bio-Rad Laboratories nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden 10 µL Probe oder BSA Standard (0,125 – 2 mg/mL) mit 90 µL H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> ver-

dünnt und mit 3 mL Bradford-Reagenz gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei RT für 10 min und die Messung der OD<sub>595</sub>. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichgerade ermittelt.

### 2.5.1.2 Dialyse der Proteine

Anschließend an die Proteinaufreinigung wurden die Elutions-Fraktionen mit dem exprimierten Protein von den Pufferbestandteilen durch Dialyse befreit. Dazu wurden die entsprechenden Fraktionen in eine Dialyse-Kassette (Slide-A-Lyzer® Cassette G2, 10.000 MWCO) von Thermo Fischer pipettiert und über Nacht bei 4 °C in 400 mL Dialyse-Puffer, mit zwei Pufferwechseln nach jeweils 2 h, inkubiert. Die dialysierten Proteine wurden wiederum aus der Kassette entnommen und bei -20 °C gelagert.

### 2.5.2 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine diskontinuierlich nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das eingesetzte SDS maskiert dabei die Eigenladung der Proteine und führt zusammen mit der Denaturierung zu deren Linearisierung. Das SDS-Gel wurde nach Tabelle 14 hergestellt.

**Tabelle 14** In dieser Arbeit verwendete Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.

Bestandteil	Trenngel (10 %) (mL)	Sammelgel (4 %) (mL)
Acrylamid (40 %; 37,5:1)	2,5	0,4
R-Puffer	1,67	-
S-Puffer	-	0,48
SDS (20 % (w/v))	0,07	-
H <sub>2</sub> O <sub>MilliQ</sub>	ad 10	ad 4
APS	0,13	0,13
TEMED	0,007	0,003

Währenddessen wurden 10 µL Probe 1:4 mit 4x Laemmli-Puffer, mit 1:20 Volumen β-Mercaptoethanol, gemischt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde das Gel in einer Mini Protean II™ von Bio-Rad Laboratories eingesetzt und mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Die Probe wurde auf das Gel geladen und die Elektrophorese erfolgte bei 100 V - 120 V. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder über Nacht mit InstantBlue™ oder für 30 min bei RT mit Coomassie Brilliant Blue R250 Lösung gefärbt. Bei letzterer Färbemethode wurde das Gel anschließend zweimal 30 min mit Entfärbe-Lösung behandelt und über Nacht in H<sub>2</sub>O<sub>MilliQ</sub> inkubiert.

## 2.5.2.1 Membranprotein-Profil

Der aufgereinigte Membranüberstand wurde unter Vakuum ultrazentrifugiert (225.000 g, 1 h, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet in 0,5 mL DDM-Puffer gelöst und für 30 min bei 4 °C und Rotation (Magnetrührer) auf Eis im Puffer inkubiert. Die Probe wurde dann erneut ultrazentrifugiert (225.000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert und 30 µg Protein wurden in einer 15 %igen SDS-PAGE eingesetzt.

## 2.5.2.2 Profil der Penicillin-bindenden Proteine (Atilano et al., 2010)

Der aufgereinigte Membranüberstand wurde unter Vakuum ultrazentrifugiert (225.000 g, 1 h, 4 °C). Dann wurde das Pellet in 0,1 mL PBS mit 5 µg/mL Bocillin-FL gelöst und 30 min bei RT und Rotation (30 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 50 µL Membranprotein mit 20 µL 2x Laemmli-Puffer gemischt und die Mischung wurde 5 min bei 90 °C denaturiert. Die Probe wurde in einer 7,5 %igen SDS-PAGE eingesetzt.

## 2.5.2.3 Alcian-Blue SDS-PAGE

Die Alcian-Blue SDS-PAGE wurde angewandt, um die WTA der verschiedenen Stämme zu visualisieren und zu vergleichen. Dazu wurden 1 µL der aufgereinigten WTA mit 9 µL H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub> sowie mit 2 µL 5x Alcian-Blue Probenpuffer gemischt. Es wurde ein großen 20 %iges Acrylamidgel (Tab. 15) ohne SDS gegossen und in einer Vertical Gel Electrophoresis Systems Model V161 von Bethesda Research Laboratories mit Alcian-Blue Laufpuffer eingesetzt. Anschließend wurde die Probe auf das Gel geladen und bei 4 °C für 18 h und 40 mA aufgetrennt.

**Tabelle 15** In dieser Arbeit verwendete Zusammensetzung der Gele für die Alcian-Blue SDS-PAGE.

Bestandteil	Trenngel (20 %) (mL)	Sammelgel (6 %) (mL)
Acrylamid (40 %; 37,5:1)	15	0,9
R-Puffer	5	0,24
H <sub>2</sub> O <sub>MiliQ</sub>	ad 30	ad 6
APS	0,4	0,4
TEMED	0,02	0,005

Am nächsten Tag wurde das Gel für 2 h mit Alcian Blue Färbelösung und zweimal 30 min mit Alcian-Blue Entfärbelösung behandelt. Über Nacht wurde das Gel mit H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub> entfärbt. Anschließend wurde zur besseren Sichtbarkeit eine Silberfärbung durchgeführt.

## 2.5.2.4 Phos-Tag SDS-PAGE

Zur Untersuchung der Autophosphorylierungsaktivität der Kinase VraS, sowie der Übertragung von Phosphatgruppen auf den Responseregulator VraR wurde eine Phos-Tag SDS-PAGE verwendet. Zudem wurde die allgemeine Eigenschaft der Phosphorylierung des Response-Regulators VraR analysiert. Der Unterschied zu einer normalen SDS-PAGE liegt in den Phos-Tag Molekülen, welche phosphorylierte Proteine stärker binden und so deren Migration durch das Gel verlangsamen. Dadurch können phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Proteine aufgetrennt werden (Kinoshita et al., 2006).

Der Versuch erfolgte nach Gajdiss et al., (2017). Zuerst wurden 1 µg Kinase mit 1 µg Regulator, 2 µL 5x Phosphorylierungs-Puffer A und 1 µL Triton X-100 (85 mM) in 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub> gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 1 µL ATP (10 mM) gestartet und bei RT für 30 min inkubiert. Es wurde ebenfalls eine Negativkontrolle ohne ATP, sowie die Reaktion der Kinase und des Regulators einzeln angesetzt. Als nächstes wurde die Reaktion mit 5 µL 4x Laemmli Probenpuffer gestoppt und ohne Denaturierung auf ein 12,5 %iges Gel (Tab. 16) geladen.

**Tabelle 16 In dieser Arbeit verwendete Zusammensetzung der Gele für die Phos-Tag SDS-PAGE.**

Bestandteil	Trenngel (12,5 %) (mL)	Sammelgel (4 %) (mL)
Acrylamid (40 %; 37,5:1)	2,5	0,4
R-Puffer	1,33	-
S-Puffer	-	0,48
MnCl <sub>2</sub> (10 mM)	0,08	-
Phos-Tag (5 mM)	0,08	-
H <sub>2</sub> O <sub>Milliq</sub>	ad 8	ad 4
APS	0,13	0,13
TEMED	0,007	0,003

Bei einem konstanten Stromfluss von 30 mA wurden die Proteine aufgetrennt. Abschließend erfolgte eine Silberfärbung der Proteine.

Zur Untersuchung der Phosphorylierung des Regulators VraR wurde ein Protokoll von Tajbakhsh und Golemi-Kotra (2019) verwendet. Hier wurden 10 µM Regulator mit 2 µL 10x Phosphorylierungs-Puffer B mit Lithium-Kalium-Acetylphosphat in 20 µL H<sub>2</sub>O<sub>PCR</sub> gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Eine Negativkontrolle mit Phosphorylierungs-Puffer B ohne Lithium-Kalium-Acetylphosphat wurde ebenfalls angesetzt. Die Reaktion wurde mit 5 µL 4x Laemmli Probenpuffer gestoppt und wie oben ohne Denaturierung auf ein 12,5 %iges Gel (Tab. 16) geladen.



### 2.5.2.5 Silberfärbung der SDS-Gele

Proteine in Phos-Tag- und WTA in Alcian-Blue-Gelen wurden mit Silberfärbung mittels Pierce™ Silver Stain Kit von Thermo Scientific nach Herstellerangaben angefärbt. Die Färbung mit Silberionen ist im Gegensatz zu anderen Methoden sensitiver und schneller. Dabei lagern sich die Silberionen an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine an und werden mithilfe von alkalischem Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert. Die Proteinbanden färben sich daraufhin schwarz.

### 2.5.2.6 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion wurden 100 µL AtIA ohne Denaturierung in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit InstantBlue™ für 1 h gefärbt. Banden korrespondierend zu den Pro-AtIA (138 kDa), PP-AM (87 kDa) und GL (53 kDa) Proteineinheiten wurden ausgeschnitten und über Nacht separat in 0,5 mL Extraktionspuffer bei RT und Rotation (30 rpm) inkubiert. Die Banden wurden dabei vorher zerkleinert, um eine bessere Immersion im Puffer und eine höhere Diffusion durch die größere Oberfläche zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und 30 µL Probe wurden in ein Zymogramm mit *M. luteus* Zellen eingesetzt.

### 2.5.2.7 Zymographische Analyse der Autolysin-Extrakte

Für die zymographische Analyse der aufgereinigten Autolysine nach Berscheid (2013) wurden diese in eine SDS-PAGE mit hitze-inaktivierten *S. aureus* NCTC8325 oder *M. luteus* ATCC4698 Zellen eingesetzt. Dafür wurde eine 50 mL MH- oder TSB-Übernachtskultur geerntet (6.000 g, 10 min, RT) und mit 5 mL H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub> gewaschen. Die Zellen wurden dann in 1 mL H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub> resuspendiert und für 15 min bei 80 °C pasteurisiert. Schließlich wurden 1 mL Aliquots mit jeweils OD<sub>600</sub> 70 hergestellt und bei -20 °C gelagert. Das SDS-Gel wurde nach obigem Rezept (Tab. 14) hergestellt, wobei 1 mL tote Zellen dem Trenngel hinzugefügt wurden. Die Autolysine wurden nicht denaturiert, sondern nur mit 4x Laemmli-Puffer ohne β-Mercaptoethanol gemischt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mehrfach mit H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub> gewaschen und über Nacht bei 37 °C in Zymogramm-Puffer inkubiert. Für einen größeren Kontrast der Banden wurde das Gel anschließend mit Zymogramm-Färbelösung für 5 min bei RT inkubiert und mehrfach mit H<sub>2</sub>O<sub>MiliQ</sub> gewaschen.

### 2.5.2.8 In vitro Proteolyse-Assay (Berscheid 2013)

Es wurde ein Ansatz von 90  $\mu\text{L}$  aus 5x Proteolyse-Puffer, 5 mM Kreatinphosphat, 0,05 U/mL Kreatin-Phosphokinase, 6  $\mu\text{M}$  ClpP, 3  $\mu\text{M}$  ClpX, 3  $\mu\text{M}$  AtIA und 5 mM ATP zusammen pipettiert. Der Ansatz wurde einmal mit ClpX aus *S. aureus* NCTC8325 und einmal mit ClpX aus *S. aureus* VC40 durchgeführt. Beide Proteine wurden von Dr. Anne Berscheid bereitgestellt. Des Weiteren wurde eine Probe ohne ATP als Negativkontrolle angesetzt. Alle Proben wurden bei 37 °C inkubiert und zu den Zeitpunkten 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h und 4 h wurde die Reaktion von 15  $\mu\text{L}$  des Ansatzes mit 5  $\mu\text{L}$  4x NuPAGE Stopp-Puffer inklusive 0,1 M DTT beendet. Anschließend wurden die Proben in einer 12 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Ebenfalls wurde ein Zymogramm zur Kontrolle der lytischen Banden durchgeführt. Die Bandenintensitäten der AtIA-Fragmente, sowie von ClpP und ClpX wurden durch das Programm GelAnalyzer bestimmt. Für die Berechnung wurden alle Banden einer Probe auf die Intensität der jeweiligen ClpP Bande standardisiert und in Prozent ausgedrückt. Anschließend wurden die Banden der AtIA-Fragmente auf die Intensität der jeweiligen Bande aus der gleichen Probe zum Zeitpunkt 0 h bezogen.

## 2.6 Analytische Methoden

### 2.6.1 Massenspektrometrie von VraR(M54T)

Für die Analyse der Phosphorylierung von VraR(M54T) wurde die entsprechende Bande aus einem 12,5 %igen Phos-Tag SDS-Gel ohne Denaturierung ausgeschnitten. Die Probenvorbereitung und Messung der posttranslationalen Modifikation wurde von Dr. Mark Sylvester an der Universität Bonn durch LC-MS auf einem Ion Trap Bruker HCT Ultra durchgeführt.

### 2.6.2 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) der WTA

Die aufgereinigten Wandteichonsäuren wurden nacheinander einmal in 0,5 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{MilliQ}}$  und zweimal in 0,2 mL  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9 %) lyophilisiert. Danach wurde die Probe in 0,55 mL  $\text{D}_2\text{O}$  (100 %) gelöst und zweimal zentrifugiert (6.500 g, 1 min, RT). Es wurden jeweils 0,5 mL Überstand abgenommen und schließlich in ein NMR-Röhrchen pipettiert. Die NMR-Messung wurde von Dr. Senada Nozinovic im Institut für Anorganische Chemie der Universität Bonn durchgeführt. Es wurde ein 1D  $^1\text{H}$ -NMR bei einer

Temperatur von 298 K mit 256 Scans auf einer Bruker Avance III HD 700 MHz durchgeführt. Dafür wurde ein He-Cryo QCI Probenkopf mit z-Gradienten verwendet.

### 2.6.3 Analyse des Peptidoglykans mittels UPLC

Die UPLC-Analyse der Zellwand wurde von Dr. Ute Bertsche an der Universität Tübingen durchgeführt. Hierzu wurden die aufgereinigten Zellwände in 0,1 mL Verdauungspuffer (12,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 5,5) gelöst und mit Mutanolysin (500 U) für 16 h bei 37 °C und Rotation (30 rpm) verdaut. Das Enzym wurde für 3 min bei 100 °C inaktiviert und die Probe wurde zentrifugiert (10.000 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde abgenommen und mit 50 µL Reduktionslösung (10 mg/mL Na-Borohydrat in 0,5 M Borax; pH 9) für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 µL Phosphorsäure (98 % (v/v)) gestoppt und die Proben auf die UPLC aufgetragen. Für die Trennung der Muropeptide wurden das Laufmittel A (0,1 % (v/v) TFA in 5 % (v/v) Methanol) und Laufmittel B (0,1 % (v/v) TFA in 30 % (v/v) Methanol) in einem linearen Gradienten und einer Flussrate von 0,176 mL/min für 60 min eingesetzt. Die Säulentemperatur lag bei 52 °C, das Probevolumen war 10 µL und die Muropeptide wurden bei 210 nm (DAD) detektiert. Die Quervernetzung des Peptidoglykans wurde anhand der Fläche der Peaks im Chromatogramm basierend auf folgender Formel berechnet (Glauner und Höltje, 1990):

$$\frac{\frac{1}{2} \times \text{Dimere} + \frac{2}{3} \times \text{Trimere} + \frac{3}{4} \times \text{Tetramere} + \frac{9}{10} \times \text{Multimere}}{\text{Summe aller Flächen}}$$

## 2.7 Statistische Methoden

### 2.7.1 Student's *t*-Test

In Versuchen, die quantifizierbare Ergebnisse lieferten, wurde die statistische Signifikanz zwischen den Mittelwerten von Proben anhand eines ungepaarten Student's *t*-Test ermittelt. Für die Berechnung wurde das Programm Prism 5 verwendet. Eine Normalverteilung der Werte innerhalb eines Stammes wurde angenommen. Die zweiseitige *p*-Wert mit einem Konfidenzintervall von 95% wurde in den Abbildungen mit den Abstufungen \* *p* > 0,05, \*\* *p* > 0,005 und \*\*\* *p* > 0,0005 dargestellt.

## 3 Ergebnisse

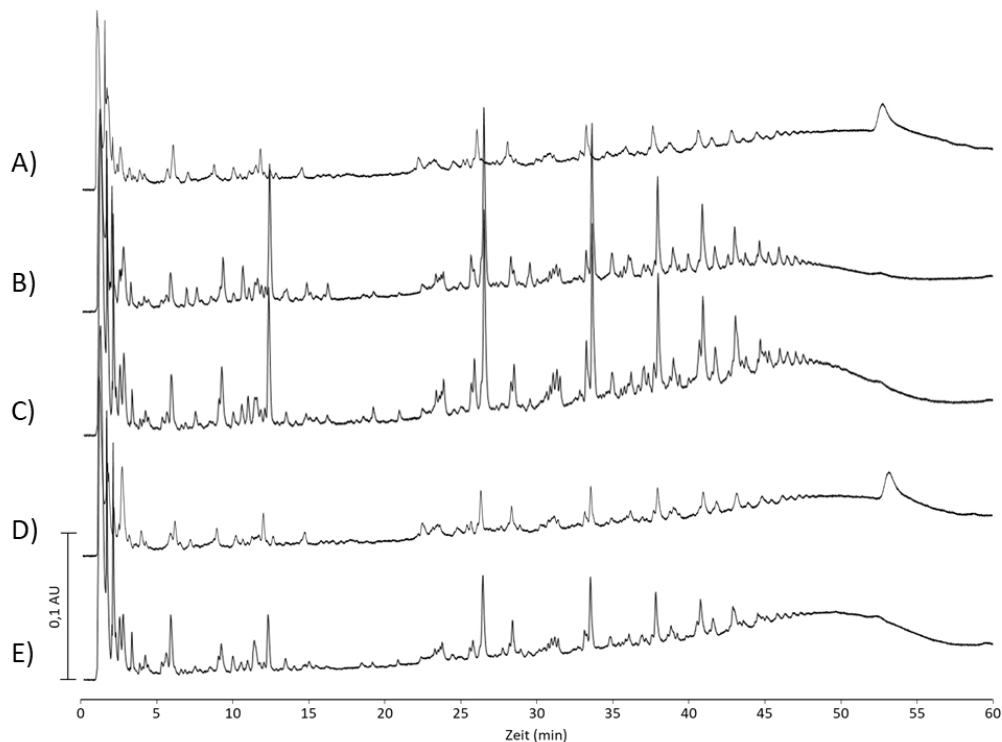
### 3.1 Charakterisierung der Zellwand

Die Zellhülle ist der Wirkort aller Glykopeptid-Antibiotika, darunter auch Vancomycin. Das Antibiotikum bildet nicht-kovalente Wasserstoff-Bindungen mit der D-Alanyl-D-Alanin Gruppe des Lipid II-Pentapeptides (McGuinness et al., 2017). Dadurch wird die Quervernetzung zwischen den Mureinsträngen unterbunden. Eine Verringerung der Vancomycin-Empfindlichkeit ist oftmals mit einer Veränderung der Zellwand verbunden. Dies ist dementsprechend auch ein konstantes Merkmal der meisten VISA-Stämme.

#### 3.1.1 UPLC-Analyse der Quervernetzung des Peptidoglykans

Für die Analyse der Quervernetzung wurde das Peptidoglykan einer Übernachtskultur der Stämme aufgereinigt. Peptidbindungen wurde mit Trypsin verdaut und die Wandteichonsäuren wurden durch HCl vom Peptidoglykan abgespalten. Anschließend wurde es mit Mutanolysin verdaut und durch UPLC aufgetrennt. Die UPLC wurde von Dr. Ute Bertsche an der Universität Tübingen durchgeführt. Relevante Chromatogramme sind in Abbildung 20 zusammengestellt. Das Peptidoglykan der Stämme *S. aureus*  $\Delta mutS$  und *S. aureus* NCTC8325 wurden in einer separaten Aufreinigung isoliert und analysiert, wobei geringere Konzentrationen an PGN gemessen wurden. Allerdings hatte die geringere PGN-Konzentration keine Auswirkung auf die Berechnung der Quervernetzung. Interessanterweise ist bei der Probe *S. aureus* VC40 der sogenannte Höcker („hump“), kennzeichnend für die oligomere Disaccharidpeptid-Fraktion, zwischen Minute 45 bis 50 wenig ausgeprägt. Dies ist vor allem offensichtlich, wenn die Chromatogramme der Stämme auf den Peak „11b“ von *S. aureus* VC40 bei ca. 26 Minuten standardisiert werden. Der Höcker entsteht durch stark quervernetztes, oligomerisches Muropeptid, welches auf PBP4-Aktivität zurückzuführen ist (Leski und Tomasz, 2005; Hamilton et al., 2017). In Tabelle 17 sind die Quervernetzung und der Anteil an Monomeren und Dimeren aufgelistet. Der VISA-Stamm *S. aureus* VC40 hat mit 62,89 % die geringste Quervernetzung aller Stämme und unterscheidet sich signifikant von seinen verwandten Stämmen, *S. aureus* RN4220 $\Delta mutS$  ( $p < 0,005$ ) und *S. aureus* VC40R ( $p < 0,0005$ ). Zudem besitzt der Stamm auch den größten Anteil an Monomeren ( $p < 0,05$ ) und Dimeren ( $p < 0,005$ ) aller Stämme, was ebenfalls statistisch signifikant ist (bezogen auf

## Ergebnisse



**Abbildung 20** Peptidoglykan-Profil von *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (A), *S. aureus* VC40 (B), *S. aureus* VC40R (C), *S. aureus* NCTC8325 (D) und *S. aureus* VraS(VC40) (E) aufgetrennt in der UPLC.

den Elternstamm). Einen leicht erhöhten Anteil an Monomeren zeigt auch der Kontrollstamm *S. aureus* NCTC8325. Ansonsten gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Quervernetzung zwischen verwandten Stämmen, weder *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS und *S. aureus* VC40R, noch *S. aureus* NCTC8325 und *S. aureus* VraS(VC40). In einem früheren Versuch von Reipert et al., (2003) wurde die Quervernetzung des VISA-Stammes SA137/93A bestimmt. Hier zeigte sich eine Quervernetzung von 65,9 % mit 17,1 % Monomeren und 17,2 % Dimeren, jedoch wurde eine ältere Methode verwendet. Zusammen mit den Daten zur Zellwanddicke von Berscheid et al., (2013) ergeben sich für die VISA, besonders *S. aureus* VC40, die typischen Merkmale einer verdickten Zellwand mit niedriger Quervernetzung.

**Tabelle 17** Analyse des Peptidoglykans durch UPLC und Auswertung der Quervernetzung verschiedener *S. aureus* Stämme. Es ist jeweils der Mittelwert von drei Aufreinigungen dargestellt. Die statistische Signifikanz (p-Wert) basiert auf dem Vergleich mit dem jeweiligen Elternstamm (\* p<0,05; \*\* p<0,005).

Stamm	Quervernetzung (%)	Monomere (%)	Dimere (%)	Rest (%)
RN4220 $\Delta$ mutS	71,39	10,25	14,73	75,02
VC40	62,89 (**)	14,26 (*)	21,69 (**)	64,05
VC40R	69,50	9,39	17,95	72,66
NCTC8325	69,83	11,17	16,44	72,39
VraS(VC40)	72,1	8,91	15,15	75,94

## 3.1.2 Nachweis der PBP4-Aktivität

PBP4 ist eines von vier Penicillin-bindenden-Proteinen in *S. aureus*. Es besitzt keine Transglykosylase-Domäne und ist circa halb so groß wie die bi-funktionellen PBPs. Im Vergleich ist es ebenfalls weniger exprimiert und hat eine Transpeptidase-Aktivität, welche essenziell für die Quervernetzung der Zellwand ist (Sauvage et al., 2008; da Costa et al., 2018). Eine Abwesenheit von PBP4 in *S. aureus* VC40 würde dementsprechend die niedrige Quervernetzung erklären. Zur Analyse wurde die Zellmembran der Stämme aufgereinigt und mit Bocillin-FL inkubiert. Bocillin-FL ist ein fluoreszierendes Penicillin-Derivat, welches von PBPs gebunden wird (Zhao et al., 1999). Die markierten Proteine wurden dann in einer SDS-PAGE getrennt und unter UV-Licht analysiert (Abb. 21). Hierbei war der Laborstamm *S. aureus* NCTC8325 die Positivkontrolle mit allen vier funktionsfähigen PBPs und *S. aureus* 137/93A die Negativkontrolle für PBP4. Reipert et al., (2003) konnte für diesen Stamm in einem Western-Blot mit biotinyliertem Ampicillin kein PBP4 nachweisen, obwohl das *pbp4*-Gen keine Mutation aufweist. Zur Identifizierung der PBP4-Bande diente aufgereinigtes PBP4, bereitgestellt von Mike Gajdiss. In der Abbildung ist zu sehen, dass der Stamm *S. aureus* VC40 PBP4 in der Zellmembran besitzt. Setzt man die Intensität der PBP2-Bande mit der PBP4-Bande in Bezug, haben *S. aureus* NCTC8325 und *S. aureus* VC40 eine vergleichbare Konzentration von 8 zu 6,5 %.

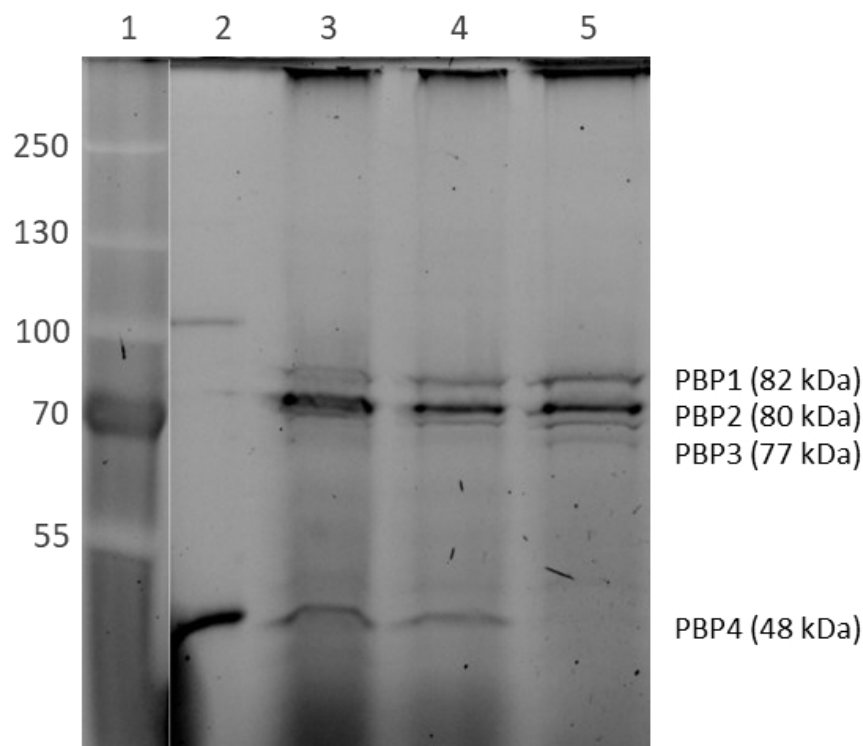


Abbildung 21 Nachweis der Penicillin-bindenden-Proteine in *S. aureus* mittels Bocillin-FL in einer 7,5 %-igen SDS-PAGE. 1) Marker (kDa) #26619; 2) Aufgereinigtes PBP4 (Positivkontrolle); 3) *S. aureus* NCTC8325 (Positivkontrolle); 4) *S. aureus* VC40; 5) *S. aureus* 137/93A (Negativkontrolle).

### 3.1.3 Quantifizierung der Bindungskapazität der Zellwand für Vancomycin

Die Bindekapazität der Zellwand für Vancomycin hängt von dem Gehalt an freien D-Ala-D-Ala-Enden im PGN ab. Die Anzahl dieser freien Gruppen ist das Produkt aus der Dicke der Zellwand und dem Grad an Quervernetzung. Demnach sollte *S. aureus* VC40 den größten Anteil an freien D-Ala-D-Ala-Enden der Stämme besitzen, gefolgt von *S. aureus* VC40R, *S. aureus* 137/93A, *S. aureus* VraS(VC40), *S. aureus* NCTC8325 und *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS in dieser Reihenfolge. Zur Überprüfung der Bindekapazität wurden die Stämme bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 mit 30  $\mu$ g/mL Vancomycin inkubiert. Der Kulturüberstand wurde in zeitlichen Abständen mithilfe von *Micrococcus luteus* auf den Vancomycin-Gehalt getestet. Zur Berechnung wurde eine logarithmische Standardkurve mit 10 definierten Vancomycin-Konzentrationen (1 – 30  $\mu$ g/mL) eingesetzt. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (Abb 22A und 22B) dargestellt. Im zeitlichen Verlauf über 4 Stunden sieht man, dass der Stamm

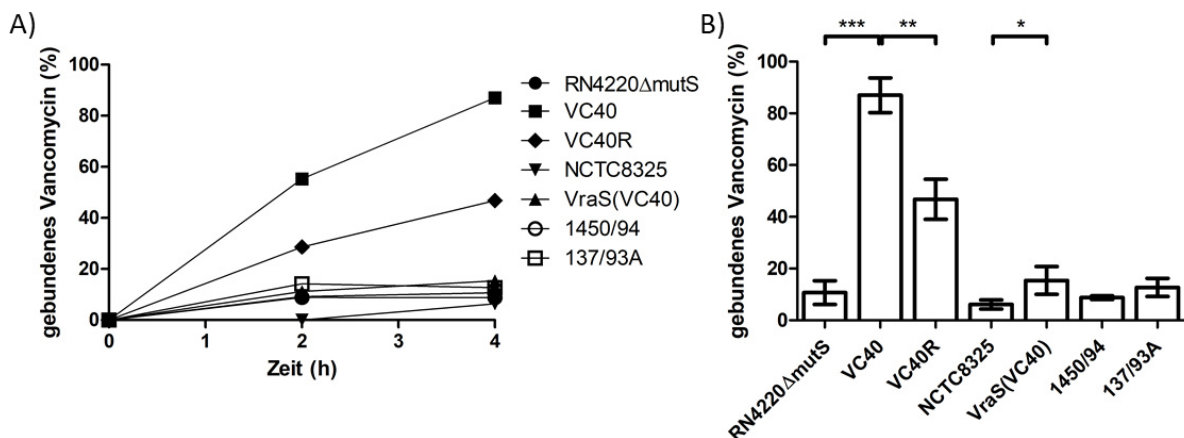


Abbildung 22 Prozentualer Anteil an gebundenem Vancomycin der verschiedenen *S. aureus* Stämme basierend auf dem verbliebenen Antibiotikum im Überstand. Zur Berechnung wurde die ermittelte Vancomycinkonzentration zum Zeitpunkt 0 h auf 100 % gesetzt. Die Konzentration wurde anhand der Hemmhöfe auf einer Agarplatte mit *M. luteus* mithilfe einer Vancomycin-Standardreihe berechnet. A) Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Vancomycin in die Zellwand. B) Gebundenes Vancomycin in den jeweiligen Stämmen zum Zeitpunkt 4 Stunden basierend auf drei biologischen Replikaten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

*S. aureus* VC40 87 % des hinzugefügten Vancomycins bindet. Der Stamm *S. aureus* VC40R bindet 46 % des Vancomycins. Im Gegensatz dazu binden die restlichen Stämme nur zwischen 6 – 15 % des Antibiotikums. In dem Balkendiagramm ist der Zeitpunkt von 4 Stunden festgehalten und die Standardabweichung wurde eingefügt. Diese wurde von dem zeitlichen Verlauf zur besseren Übersicht entfernt. Der Stamm *S. aureus* NCTC8325 bindet am wenigsten Vancomycin und ist der einzige Vertreter, der nach 2 h bis zu 100 % Antibiotikum im Überstand aufwies. Neben dem Stamm *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R bindet auch der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) signifikant mehr Vancomycin

im Vergleich zum Elternstamm. Im Gegensatz dazu bindet der Stamm *S. aureus* 137/93A nicht signifikant mehr Vancomycin als der Vergleichsstamm *S. aureus* 1450/94. Alle Stämme zeigten innerhalb der ersten 2 Stunden ein ähnliches Wachstum. Nach 4 Stunden besaß nur der Stamm *S. aureus* VC40 weiteres Wachstum, welches jedoch nicht über die  $OD_{600}$  der anderen Stämme hinausging, vor allem wegen der geringeren Verdopplungszeit dieses Stammes. Da 30 µg/mL Vancomycin über der MHK aller Stämme außer *S. aureus* VC40 lag, hatte nur dieser nach 24 Stunden stationäres Wachstum erreicht.

### 3.2 Charakterisierung der Zellmembran

Daptomycin ist ein zyklisches Lipopeptid, das Aktivität gegen Gram-positive Bakterien zeigt, inklusive MRSA und Vancomycin-resistenter Enterokokken. Es verhindert die Zellwandsynthese durch Umordnung der Lipiddomänen in der Zellmembran, was zu einer Veränderung der Membranfluidität führt, wodurch membran-assoziierte Enzyme schneller von der Membran gelöst werden. Außerdem kann durch austretende Protonen eine graduelle Membran-Depolarisation stattfinden (Müller et al., 2016; Miller et al., 2016). Daneben bildet Daptomycin mit Lipid II und Phosphatidylglycerol einen dreiteiligen Komplex, wodurch die Zellwand-Synthese gestört wird (Grein et al., 2020). Der häufigste Resistenzmechanismus ist die Veränderung der Oberflächenladung, wodurch die Affinität des Antibiotikums zur Zellhülle gesenkt wird. Interessanterweise gibt es zwischen Daptomycin und Vancomycin eine Kreuzresistenz in vielen resistenten Stämmen, so auch in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) (Berscheid 2013). Die Membran ist ein zentraler Bestandteil für den Export von Proteinen, beispielsweise Autolysinen und Penicillin-bindende-Proteinen. Ebenso spielt die Zellmembran eine wichtige Rolle in der Synthese von Zellbestandteilen wie Peptidoglykan, Wandteichonsäuren und der Polysaccharid-Kapsel. Die Zellmembran ist ebenfalls für die Interaktion mit Umweltfaktoren durch Zweikomponentensysteme zuständig. TCS bestehen aus einer membranständigen Histidin-Kinase mit einer Sensor-Domäne, die über die Phosphorylierung eines Regulators die Genexpression kontrolliert.

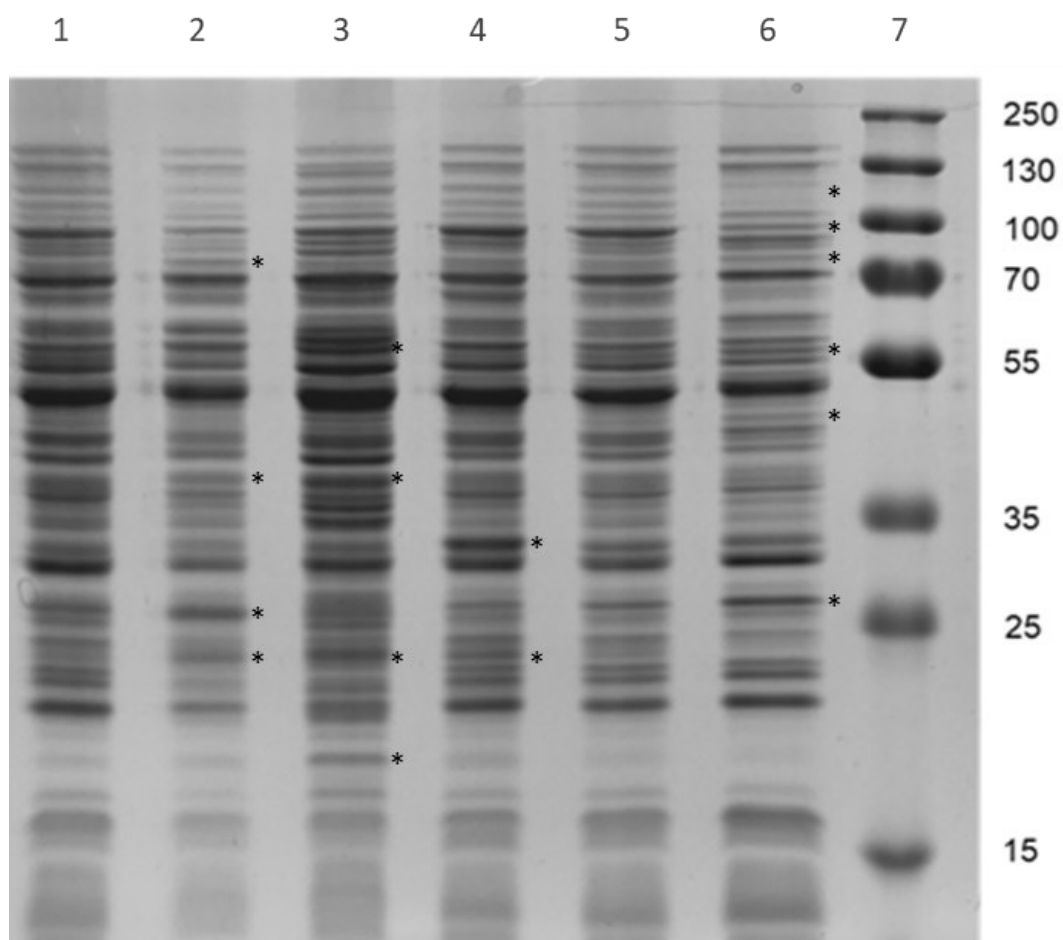
#### 3.2.1 Analyse des Membranprotein-Profiles

Das Membranprotein-Profil von *S. aureus* VC40 unterschied sich in der Arbeit von Berscheid (2013) stark von den Kontrollstämmen. Aus diesem Grund sollte hier das Profil mit den Stämmen *S. aureus* VC40R und *S. aureus* ClpX verglichen werden. *S. aureus* VC40R ist aus dem Stamm *S. aureus* VC40 entstanden und hat einen weiteren Aminosäureaustausch in VraR(M54T), sowie eine geringere Vanco-



## Ergebnisse

mycin-MHK. Für den Stamm *S. aureus* ClpX wurde die *clpX*-Mutation aus *S. aureus* VC40 in den Hintergrund von *S. aureus* NCTC8325 eingebracht. Das ClpXP-System dient dem ATP-abhängigen Abbau von Proteinen in *S. aureus* und könnte so zu einer Veränderung im Membranprotein-Profil beitragen. Es wurden die Zellmembranen der Stämme durch Ultrazentrifugation aufgereinigt. Der Proteinabbau wurde mit einem Protease Inhibitor verhindert. Die Membran wurde in DDM-Puffer inkubiert, um membranständige Proteine zu lösen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration gemessen und 30 µg Protein wurden in einer 15 %-igen SDS-PAGE eingesetzt. In der folgenden Abbildung 23 sind die Profile der Stämme zu sehen. Im Membranprotein-Profil können nur Aussagen über die generelle Komposition und Konzentration der Membranproteine getroffen werden. Einzelnen Banden kann



**Abbildung 23** Profil der aufgereinigten Membranproteine verschiedener *S. aureus* Stämme in einer 15-%igen SDS-PAGE. Abweichungen der VISA-Stämme bzw. der *S. aureus* ClpX(VC40) Mutante von der Kontrolle sind markiert (\*). 1) *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS; 2) *S. aureus* VC40; 3) *S. aureus* VC40R; 4) *S. aureus* VraS(VC40); 5) *S. aureus* NCTC8325; 6) *S. aureus* ClpX(VC40); 7) Marker (kDa) #26619.

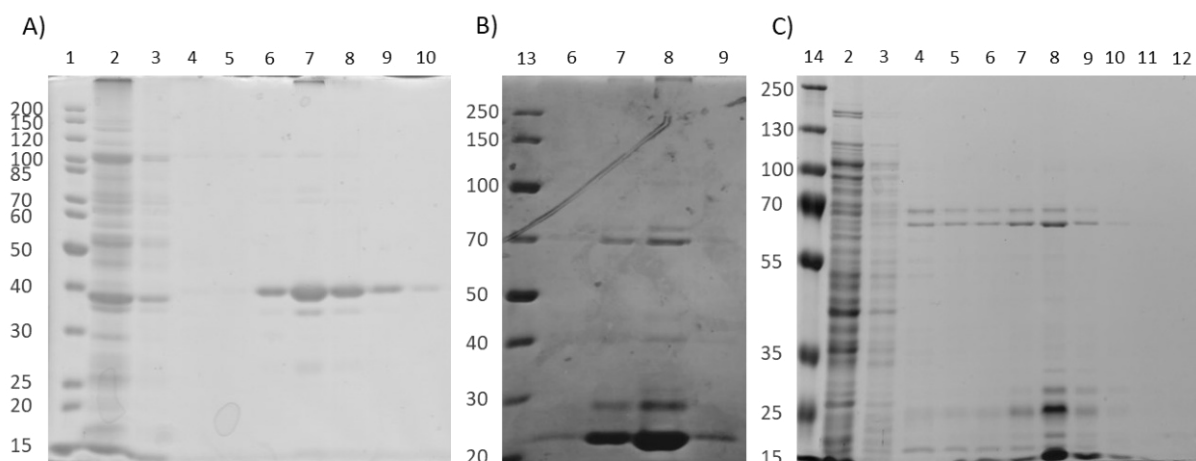
ohne weitere Analysen kein spezifisches Protein zugeordnet werden. In diesem Fall konnte ein stark geändertes Membranprotein-Profil für *S. aureus* VC40 nicht bestätigt werden. Jedoch sind einzelne, markierte Banden für die jeweiligen Stämme distinkt oder zwischen den VISA und der ClpX-Mutante

## Ergebnisse

vergleichbar. So ist die markierte Bande unter 25 kDa den drei Stämmen *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) gemeinsam. Diese Bande ist in den restlichen Stämmen nicht vorhanden.

### 3.2.2 Untersuchung des Zweikomponentensystems VraSR

Die Komponenten VraS und VraR des regulatorischen VraSR-TCS wurden durch heterologe, rekombinante Expression aus *E. coli* Stämmen über einen eingefügten C-terminalen His-Tag aufgereinigt. VraS als Membranprotein wurde zusätzlich durch Ultrazentrifugation und den Einsatz von DDM isoliert. Das ebenfalls vorhandene Plasmid pREP4groESL diente zur konstitutiven Expression der Chaperone GroESL, die eine korrekten Faltung der Proteine begünstigen. In der folgenden Abbildung (Abb. 24) sind die einzelnen Fraktionen (Durchfluss, Wasch-Fraktionen und Elutions-Fraktionen) der verschiedenen Proteine dargestellt. Alle Proteine konnten erfolgreich aufgereinigt werden, wobei das VraR aus dem Wildtyp *S. aureus* NCTC8325 und das VraR(M54T) einige Verunreinigungen bei ca. 70 kDa aufwiesen. Für das Protein VraR sind nur die relevanten Elutions-Fraktionen dargestellt. Die im nachfolgenden verwendeten Proteine VraS(VC40), sowie Walk und WalR wurde von Dr. Anne Berscheid beziehungsweise Mike Gajdiss bereitgestellt.

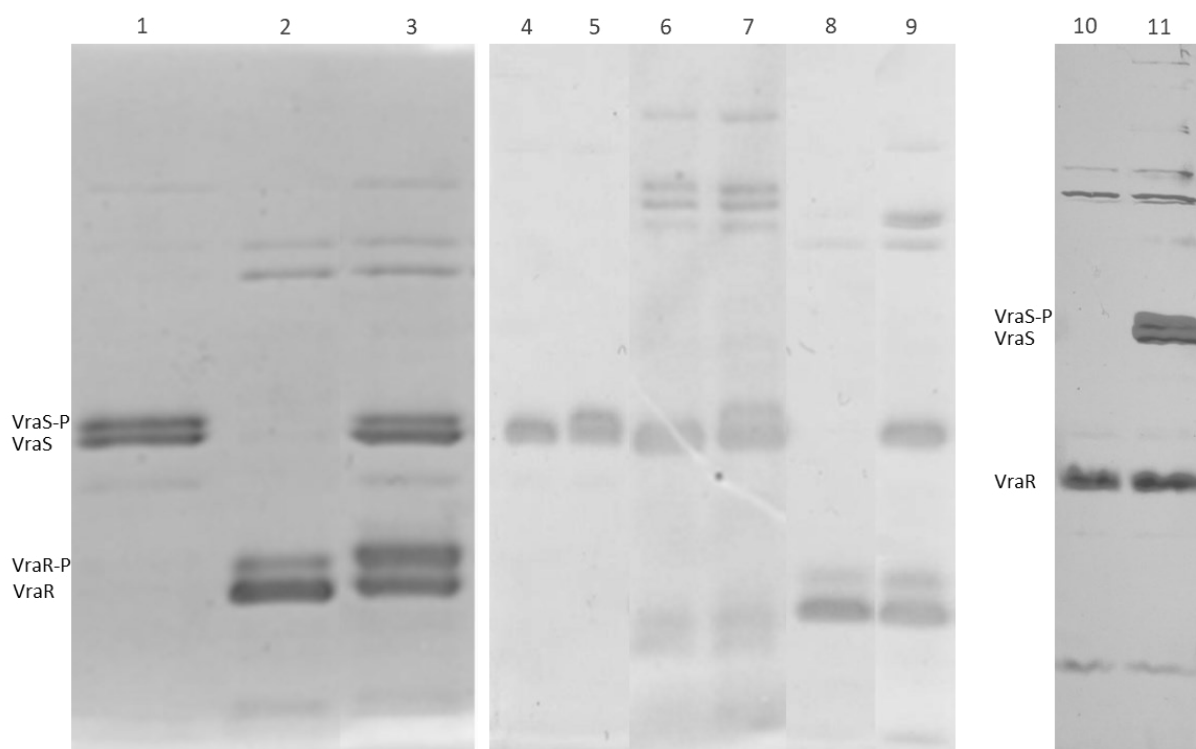


**Abbildung 24** SDS-PAGE der einzelnen Fraktionen der Proteinaufreinigung von A) VraS (40 kDa), B) VraR (23,5 kDa) und C) VraR(M54T) (23,5 kDa). 1) Marker (kDa) #26614; 2) Durchfluss; 3) Wasch-Fraktion I; 4) Wasch-Fraktion II; 5) Elutions-Fraktion I; 6) Elutions-Fraktion II; 7) Elutions-Fraktion III; 8) Elutions-Fraktion IV; 9) Elutions-Fraktion V; 10) Elutions-Fraktion VI; 11) Elutions-Fraktion VII; 12) Elutions-Fraktion VIII; 13) Marker (kDa) #26630; 14) Marker (kDa) #26619.

Nachfolgend wurden die Proteine dialysiert und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bestimmt. Die Analyse der Autophosphorylierung, sowie die Übertragung der Phosphorylierung wurde mithilfe einer Phos-Tag SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 25). Hierbei binden die in dem SDS-PAGE Gel eingesetzten Phos-Tag Moleküle phosphorylierte Proteine und verlangsamen damit deren Migration

## Ergebnisse

im Gel (Kinoshita et al., 2006). In der Abbildung ist zu sehen, dass sowohl VraS als auch VraS(VC40) autophosphoryliert in der Gegenwart von ATP. Dabei sind circa 47 % von VraS und 40 % von VraS(VC40) phosphoryliert basierend auf der Bandenintensität. Insgesamt ist die Autophosphorylierung von VraS(VC40) geringer und unbeständiger als die von VraS aus *S. aureus* NCTC8325. VraS führt zu einer Phosphorylierung von VraR von bis zu 50 % (23 % ohne VraS), was einer Steigerung des Anteils von phosphoryliertem VraR von 112 % entspricht. Das mutierte VraS(VC40) führt nur zu einer Steigerung von phosphoryliertem VraR von 55 % (18,6 % VraR alleine, zu 28,9 % VraR mit VraS(VC40)). Der Response-Regulator aus *S. aureus* VC40R VraR(M54T) wird nicht phosphoryliert, weder von VraS noch von VraS(VC40).

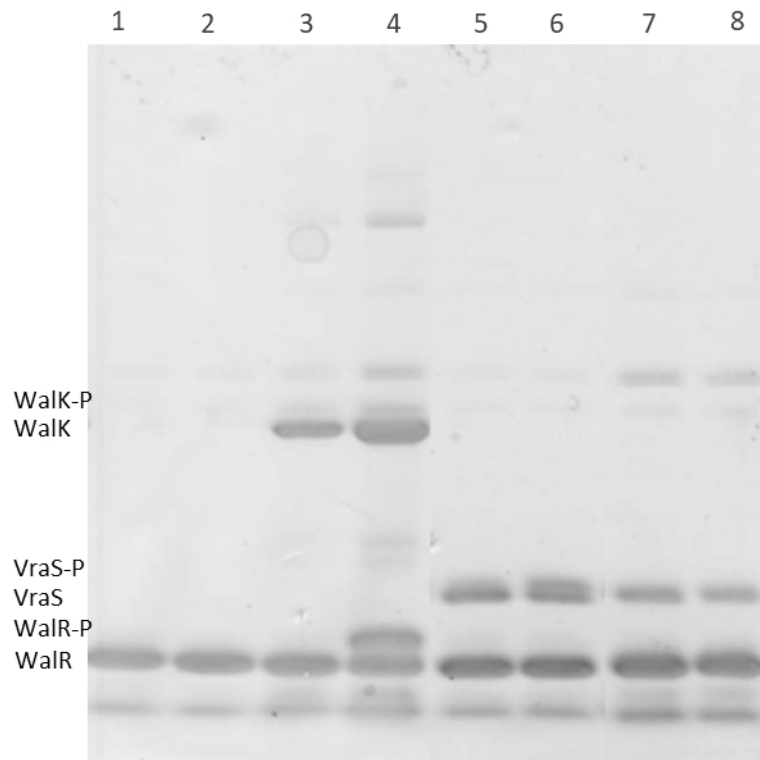


**Abbildung 25** Phos-Tag SDS-PAGE der dialysierten Proteine zur Untersuchung der Phosphorylierung von VraS, VraR und VraR(M54T). Dargestellt sind drei separate Gele, wobei nicht relevante Lanes weggelassen wurden. 1) VraS; 2) VraR; 3) VraS + VraR; 4) VraS ohne ATP; 5) VraS; 6) VraS(VC40) ohne ATP; 7) VraS(VC40); 8) VraR; 9) VraS(VC40) + VraR; 10) VraR(M54T); 11) VraS + VraR(M54T).

Ein anderes TCS, WalRK, ist ebenfalls in die Zellwandbiosynthese involviert und in VISA-Stämmen häufig von Mutationen betroffen. In diesem Fall besteht eine Mutation in Walk(I544M) in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R, die in vitro zu einer Inaktivierung der Autophosphorylierung führt (Kienemund, 2016). WalR lässt sich hingegen auch durch andere Histidin-Kinasen phosphorylieren, wie beispielsweise PrkC in *Bacillus subtilis* und PknB in *Staphylococcus aureus*. Diese Kinase phosphoryliert den Regulator an der Aminosäure T101 und nicht wie Walk an der Aminosäure D53 (Hardt et al., 2017). Ebenfalls sind auch andere Faktoren, wie SpdC, in die Regulation von WalRK involviert (Poupel et al.,

## Ergebnisse

2018). In der folgenden Abbildung (Abb. 26) wurde überprüft, ob auch eine Phosphorylierung durch VraS beziehungsweise VraS(VC40) möglich ist. Eine Autophosphorylierung von WalR ist nicht zu beobachten. Die Positivkontrolle mit WalK und WalR zeigt eine eindeutige phosphorylierte WalR-Bande. Diese Bande fehlt in den anderen Ansätzen. WalR wird dementsprechend nicht durch VraS oder VraS(VC40) phosphoryliert.



**Abbildung 26** Phos-Tag SDS-PAGE der dialysierten Proteine zur Untersuchung der Phosphorylierung von WalR durch WalK, VraS und VraS(VC40). 1) WalR; 2) WalR + ATP; 3) WalR + WalK; 4) WalR + WalK + ATP; 5) WalR + VraS; 6) WalR + VraS + ATP; 7) WalR + VraS(VC40); 8) WalR + VraS(VC40) + ATP.

### 3.2.2.1 Analyse der Phosphorylierung von VraR

Nachdem weder eine Autophosphorylierung, noch eine Phosphorylierung basierend auf einer der Histidin-Kinasen VraS, beziehungsweise VraS(VC40), für den mutierten Regulator gezeigt werden konnte, wurde dieser auf seine generelle Möglichkeit zur Phosphorylierung getestet. Hierzu wurde VraR(M54T) mit dem Phosphat-Donor Lithium-Kalium-Acetylphosphat für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Acetylphosphat ist ein hoch-energetischer Phosphat-Donor, welcher bekannt dafür ist, Response-Regulatoren zu phosphorylieren, unter anderem auch VraR (Tajbakhsh und Golemi-Kotra, 2019). Im Gel zeigt sich diese Eigenschaft an VraR aus *S. aureus* NCTC8325 in Reihe 4 (Abb. 27). Hier führt der Phosphat-Donor zu einer Steigerung von phosphoryliertem Regulator von 90 % basierend auf der Bandenintensität. Für das mutierte VraR(M54T) aus *S. aureus* VC40 zeigt sich keine Phosphorylierung.

## Ergebnisse

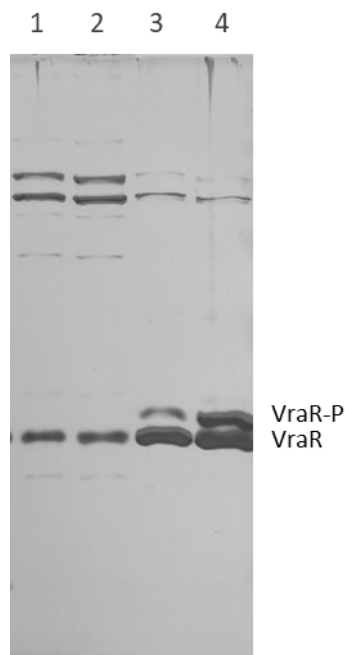


Abbildung 27 Untersuchung der Autophosphorylierung von VraR und VraR(M54T) durch Lithium-Kalium-Acetylphosphat in einer Phos-Tag SDS-PAGE. 1) VraR(M54T); 2) VraR(M54T) + Acetylphosphat; 3) VraR; 4) VraR + Acetylphosphat.

### 3.2.2.2 Untersuchung von aufgereinigtem VraR mittels Massenspektrometrie

Für eine zusätzliche Untersuchung der Modifikationen von VraR(M54T) wurde das Protein mittels Massenspektrometrie analysiert. Hierbei konnte der Aminosäureaustausch in dem aufgereinigten Protein verifiziert werden (Abb. 28). Arginin (R) und Lysin (K) in kurzen Abständen führen zu einer

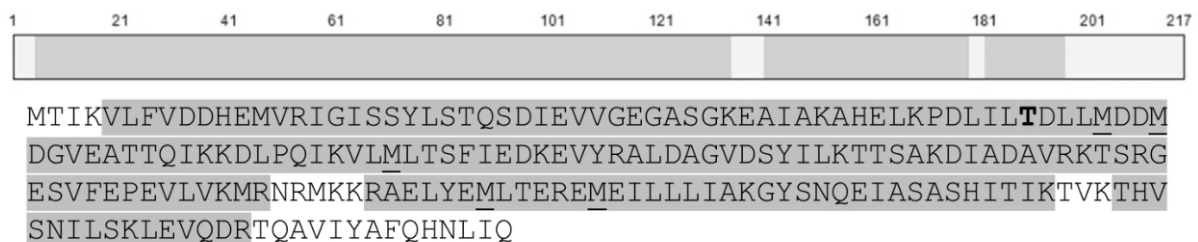


Abbildung 28 Aminosäuresequenz von VraR mit dargestellter Abdeckung in der Massenspektrometrie (grau). Markiert ist der Aminosäureaustausch an Stelle 54 (fett) und die gefundenen Modifikationen, in diesem Fall oxidiertes Methionin (unterstrichen).

schlechten Abdeckung im Massenspektrum, weil dies die Schnittpunkte von Trypsin sind, mit dem das Protein verdaut wurde. Die entstandenen Bruchstücke waren zu klein für eine Analyse. Der N-terminale Teil des Proteins ist potenziell zu hydrophob und konnte während der Analyse nicht von der Säule gelöst werden. In der Massenspektrometrie konnte keine Phosphorylierung in VraR(M54T) gefunden werden. Es wurden jedoch einige oxidierte Aminosäuren (Methionin) als Modifikation gefunden.

### 3.2.3 Überprüfung der Membranfluidität durch Laurdan

Die Membranfluidität ist ein Maß für die Viskosität der Doppellipidschicht und wird durch externe Umwelteinflüsse wie Temperatur oder Osmolarität beeinflusst. Bakterien besitzen jedoch ebenfalls die Fähigkeit, die Lipidkomposition der Membran zu ändern und dadurch die Membranfluidität zu beeinflussen (Bessa et al., 2018). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass WalK die Fluidität der Membran beeinflusst und in vitro die Aktivität von WalK abhängig von der Membranfluidität ist (Türk und Bierbaum, 2012). Zur Untersuchung der Membranfluidität wurde eine Bakterienkultur mit 10  $\mu$ M Laurdan bei 30 °C inkubiert und anschließend geerntet. Die gewaschenen Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 eingestellt und die Fluoreszenz-Emission bei 460 nm und 500 nm bestimmt, zur Berechnung der Generellen Polarisisation (GP). Die berechnete Laurdan GP aller Stämme lag zwischen 0,33 bis 0,37 (Abb. 29). Sowohl zwischen *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R als auch zwischen *S. aureus* 137/93A und *S. aureus* 1450/94 gab es einen signifikanten Unterschied. Diese Abweichungen sind jedoch marginal. Generell zeigt das Ergebnis keinen biologisch relevanten Unterschied in der Membranfluidität für die Stämme.

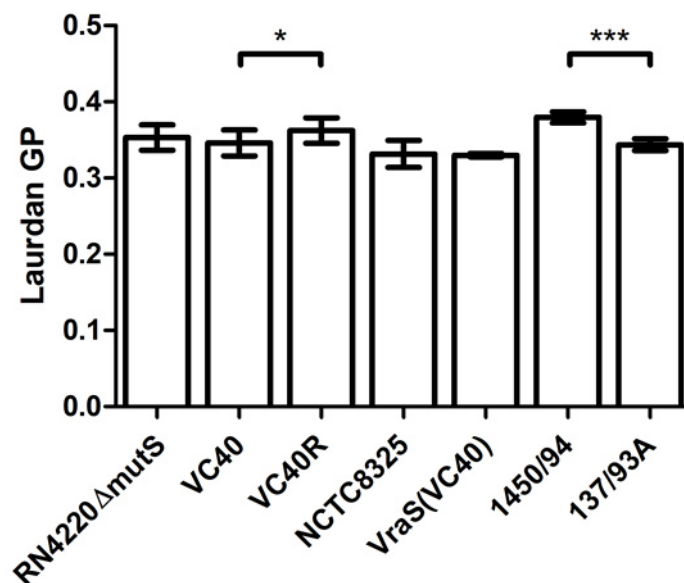


Abbildung 29 Bestimmung der Membranfluidität der *S. aureus* Stämme mithilfe der Generellen Polarisisation von Laurdan. Dargestellt ist der Mittelwert von drei separaten Messungen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

### 3.2.4 Untersuchung der Zellhülle mittels Cytochrom C-Assay

Die relative Ladung der Zellhülle wurde durch die Bindung von Cytochrom C bestimmt. Dafür wurde eine Bakterienkultur auf OD<sub>600</sub> 7 eingestellt und für 10 Minuten mit 0,5 mg/mL Cytochrom C inkubiert.

## Ergebnisse

Nachfolgend wurde die Kultur zentrifugiert und der Überstand bei OD<sub>530</sub> auf nicht-gebundenes Cytochrom C getestet. Die Ergebnisse für die VISA-Stämme und die relevanten Kontrollen sind in Abbildung 30 dargestellt. Für die VISA-Stämme *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) ist eine nicht-signifikante Verringerung des gebundenen Cytochrom C erkennbar. Der Stamm *S. aureus* 137/93A weicht nicht von der Kontrolle *S. aureus* 1450/94 ab. Die einzige signifikante und gleichzeitig drastische Abweichung findet sich bei *S. aureus* VC40. Dieser Stamm bindet nur 5 % des vorhandenen Cytochrom C im Vergleich zu 36 % in der Kontrolle *S. aureus*  $\Delta$ mutS und 31 % in *S. aureus* VC40R. Aufgrund der niedrigen Bindung von Cytochrom C an die Zelloberfläche lässt sich eine positiver-geladene Zelloberfläche für *S. aureus* VC40 folgern. In einigen Stämmen ist eine solche Änderung der Ladung auf MprF zurückzuführen, ein Membranprotein, welches anionische Phosphatidylglycerin in der Zellmembran mit L-Lysyl modifiziert. Der Stamm *S. aureus* VC40 hat eine Mutation in MprF, wodurch es zu dem Basenaustausch H224Y kommt. Zur Untersuchung, ob diese Mutation eine Auswirkung auf die Zelloberflächenladung hat, wurde ein Allelaustausch in *S. aureus* NCTC8325 durchgeführt. Der Stamm *S. aureus* MprF(VC40) bindet mit 39 % etwas mehr Cytochrom C als die Vergleichsstämme. Diese Mutation ist demnach nicht verantwortlich für den Phänotyp in *S. aureus* VC40.

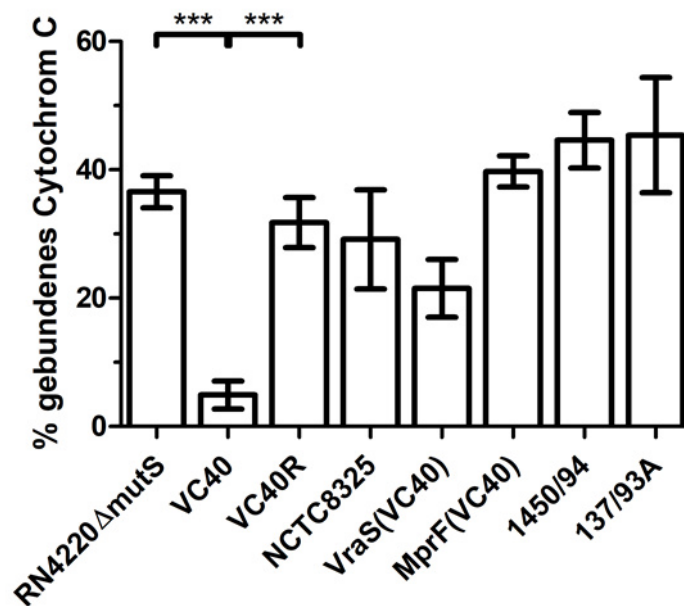


Abbildung 30 Untersuchung der Zelloberflächenladung durch die Bindung von Cytochrom C in den VISA-Stämmen und Kontrollen. Dargestellt ist der Mittelwert von drei biologischen Replikaten (\*\*\*) ( $p < 0,0005$ ).

Neben der Mutation in MprF wurde auch die Auswirkung von einer Überexpression der TCS *walRK* und *vraTSR* auf die Bindung von Cytochrom C untersucht (Abb. 31). Die Expression der Systeme induziert durch Xylose hatte keine signifikante Auswirkung auf die Ladung der Zelloberfläche. Einzig das VraTSR-TCS führt zu einer nicht-signifikanten Reduktion des gebundenen Cytochrom C um 4 %.

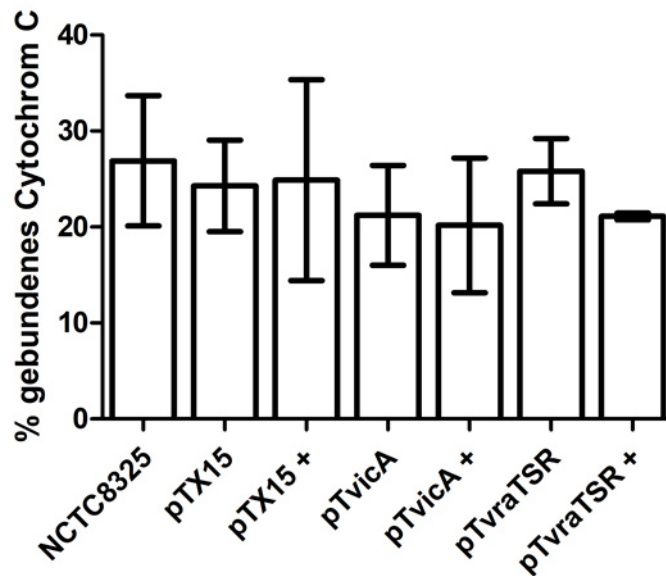


Abbildung 31 Untersuchung der Zelloberflächenladung durch die Bindung von Cytochrom C in den Überexpressionsstämmen für *walRK* (*vicA*) und *vraTSR*, sowie die relevanten Kontrollen (+ = 0,5 % Xylose). Dargestellt ist der Mittelwert von drei biologischen Replikaten.

### 3.3 Charakterisierung des Autolyseverhaltens

Die Autolyse durch bakterielle Hydrolasen besitzt wichtige Funktionen im Zellzyklus von *S. aureus* und ist involviert in die Teilung der Tochterzellen, im Zellwachstum und in der Modifikation von Peptidoglykan. Im Vergleich zu VSSA- ist die Autolyse in VISA-Isolaten oft verringert. Es wird angenommen, dass die reduzierte Autolyse zu einer erhöhten Zellwanddicke beiträgt (Pfeltz und Wilkinson, 2004; Hu et al., 2016). Eine Verringerung der Autolyse kann durch ein verändertes Autolysin-Profil, eine geringere Affinität der Autolysine zum PGN, Mutationen in den Autolysin-Genen, die zu einer Inaktivierung führen, vermehrten Abbau der Autolysine oder einer verringerten Expression der Autolysine erfolgen. Interessanterweise zeigte der Stamm *S. aureus* VC40 eine erhöhte Expression einiger Autolysine im DNA-Microarray, darunter auch von AtIA (Berscheid et al., 2014).

#### 3.3.1 Analyse der Autolyse

Die Autolysine wurden aus einer 100 mL Kultur in der exponentiellen Phase mithilfe von 3 M LiCl aufgereinigt. Danach wurden diese in Lyse-Experimenten mit aufgereinigter Zellwand mit intakten Wandteichonsäuren ohne D-Alanin-Substituierung bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 über 2 h bei 37 °C eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 gezeigt, wobei die Werte von *S. aureus* NCTC8325 aus 32A für 32B übernommen wurden. Der Zeitpunkt von 2 h aus Abbildung 32A ist in Abbildung 32D als Re-



## Ergebnisse

duktion der OD<sub>600</sub> graphisch als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. Von den einzelnen Werten wurde der jeweilige Stamm ohne Autolysin als Negativkontrolle (Reduktion der

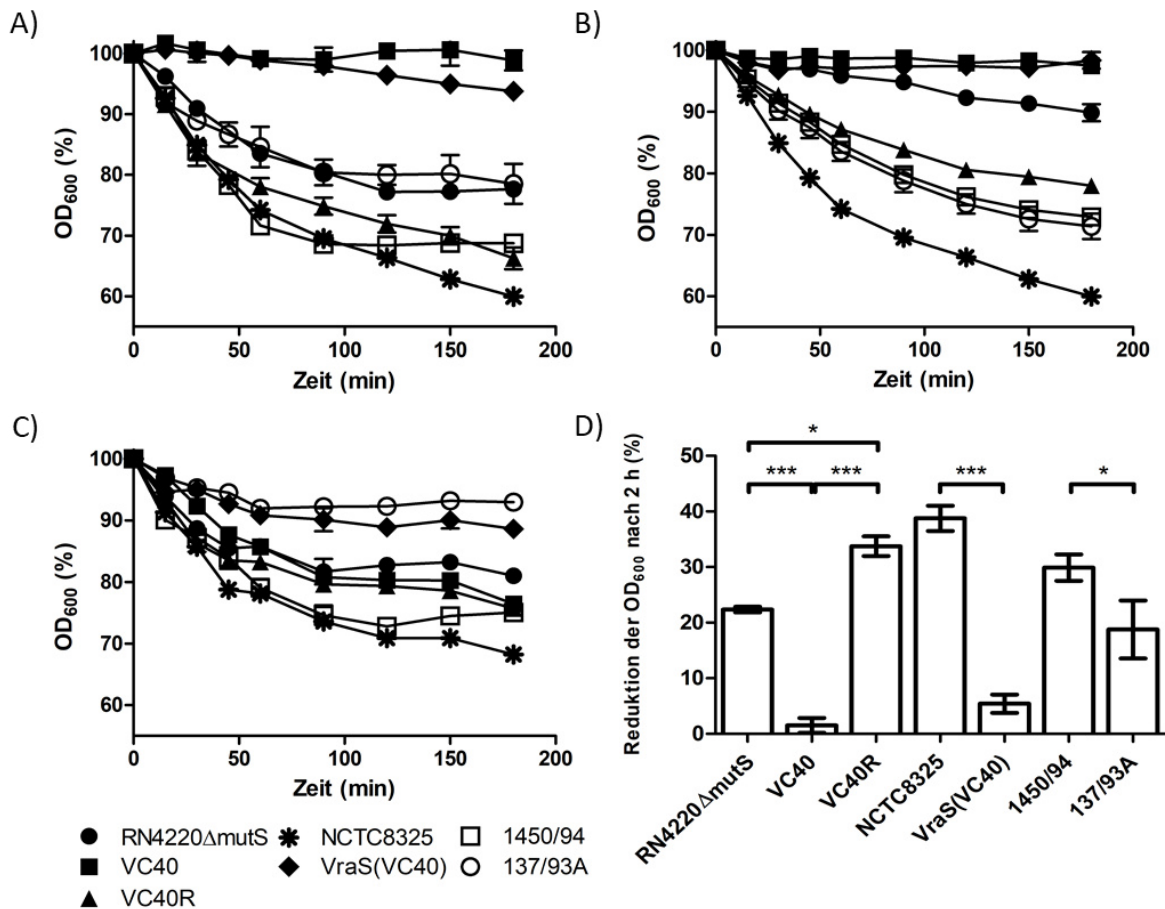


Abbildung 32 Untersuchung des Lyseverhaltens der Stämme *S. aureus* RN4220ΔmutS, *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R, *S. aureus* NCTC8325, *S. aureus* VraS(VC40), *S. aureus* 1450/94 und *S. aureus* 137/93A in Prozent basierend auf der anfänglichen Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>). Alle Zellwände sind aufgrund der Aufreinigungsmethode frei von D-Alanin-Resten an den WTA. A) Aufgereinigte Autolysine gegen die jeweils eigene Zellwand. B) Aufgereinigte Autolysine gegen die Zellwand von *S. aureus* NCTC8325. C) Aufgereinigte Autolysine von *S. aureus* NCTC8325 gegen die Zellwände der anderen Stämme. Standardabweichungen werden in den Liniendiagrammen erst ab einem Wert von 1,3 % angezeigt. D) Reduktion der OD<sub>600</sub> nach 2 h Inkubation der aufgereinigten Autolysine mit der jeweils eigenen Zellwand. Dargestellt ist der Mittelwert von drei biologischen Replikaten (\* p<0,05; \*\*\* p<0,0005).

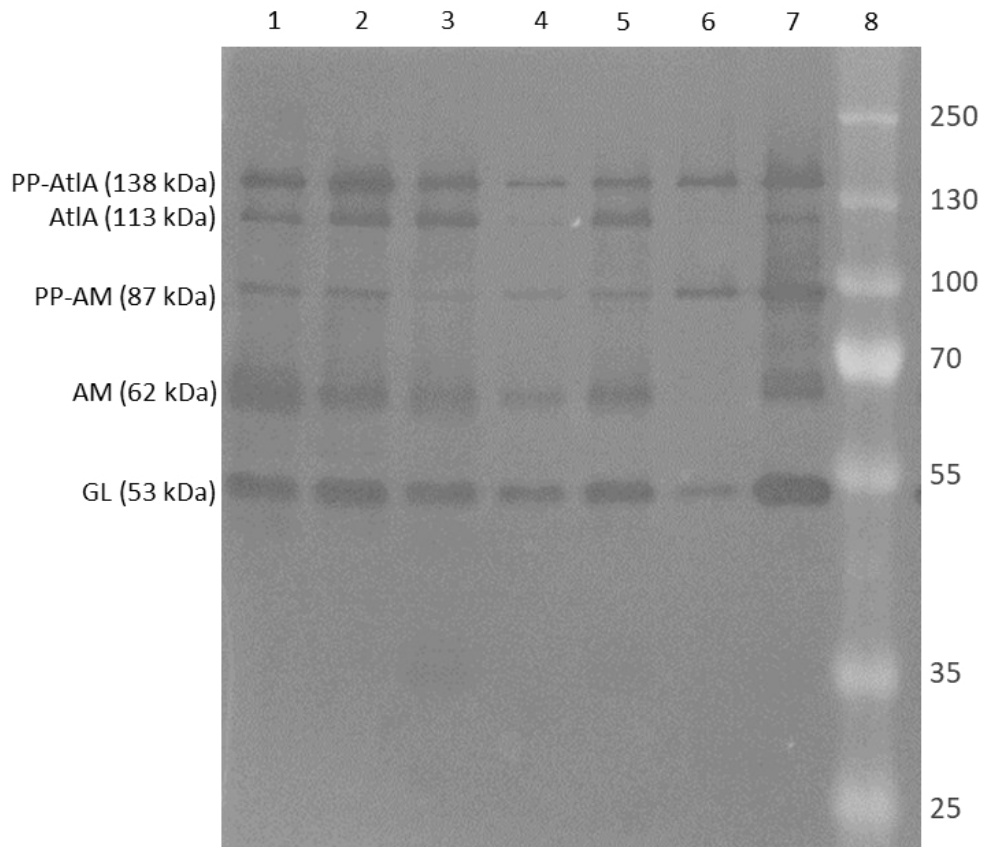
OD<sub>600</sub> ohne Autolysine) abgezogen. Hier fiel vor allem der Stamm *S. aureus* RN4220ΔmutS auf, der auch ohne zugefügte Autolysine eine Reduktion von 20 % erreichte (sonst 5 – 10 %). In dem Diagramm ist zu erkennen, dass die Autolysine der Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) weder die eigene Zellwand (Abb. 32A) noch die Zellwand von *S. aureus* NCTC8325 (Abb. 32B) effektiv lysieren (unter 5 % nach 2 h). Dieser Unterschied zu den Kontrollstämmen ist hoch signifikant. Auch die Lyse von *S. aureus* 137/93A unterschied sich signifikant von *S. aureus* 1450/94 (Abb. 32A). Die Zellwand von *S. aureus* NCTC8325 wird ebenfalls schlecht von den aufgereinigten Hydrolasen aus *S. aureus* RN4220ΔmutS abgebaut (10 % Reduktion nach 2 h), wie in Abbildung 32B zu sehen. Alle anderen Stämme erreichen eine Reduktion der optischen Dichte von mindestens 20 % nach 2 h in beiden Fällen.

Der größte Abbau wird dabei von den Autolysinen von *S. aureus* NCTC8325 erreicht mit ca. 40 % nach 2 h. Insgesamt besitzen die VISA-Stämme eine geringere Lyse als die VSSA-Stämme, ausgenommen der Stamm *S. aureus* VC40R, welcher nach *S. aureus* NCTC8325 die zweithöchste Lyse bei 34 % Reduktion der OD<sub>600</sub> nach 2 h zeigt (Abb. 32D). Um zu klären, ob die reduzierte Lyse an den Autolysinen oder an der Zellwand liegt, wurde das PGN aller Stämme mit den aufgereinigten Autolysinen von *S. aureus* NCTC8325 inkubiert (Abb. 32C). Hier zeigt sich für die meisten Stämme ein ähnliches Bild wie bei den eigenen Autolysinen. Jedoch steigt die Reduktion der Optischen Dichte von *S. aureus* VC40 von 1,2 % (eigene Autolysine Abb. 32D) auf 24 % (*S. aureus* NCTC8325 Autolysine Abb. 32C) nach 2 h. Auch der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) lysiert stärker mit einer Reduktion von 12 % nach 2 h (Abb. 32C). Interessanterweise wird der klinische VISA-Stamm *S. aureus* 137/93A weniger stark lysiert (Abb. 32C), mit 7 % Reduktion der OD nach 2 h im Vergleich zu 22 % bei den eigenen Autolysinen (Abb. 32D).

### 3.3.1.1 Untersuchung des aufgereinigten AtIA mittels Zymographie

Die Lyse-Experimente legen nahe, dass neben der dickeren Zellwand auch die exprimierten PGN-Hydrolasen einen Einfluss auf die Reduktion der OD haben. Deswegen wurden die aufgereinigten Autolysine in einer SDS-PAGE mit *M. luteus* im Trenngel eingesetzt. Durch den Indikatorstamm können die aufgetrennten, aktiven Fraktionen von AtIA detektiert werden. Ein SDS-Gel ist exemplarisch in Abbildung 33 dargestellt. Die verschiedenen lytischen Bestandteile des Hauptautolysins AtIA sind zu erkennen, inklusive AtIA mit Propeptid, AtIA ohne Propeptid, Amidase (AM) mit Propeptid, Amidase ohne Propeptid und die Glucosaminidase (GL). Die Banden von *S. aureus* VraS(VC40) und *S. aureus* VC40 sind generell schwächer als die der anderen Stämme, jedoch ist der Vergleich basierend auf der eingesetzten Zellmasse (OD<sub>600</sub>) während der LiCl-Aufreinigung ungenau. Das Verhältnis der Bandenintensität innerhalb der einzelnen Stämme gibt jedoch Aufschluss über die Konzentration der einzelnen Fraktionen. So hat beispielsweise der Stamm *S. aureus* VC40R im Vergleich zu einer starken GL-Bande nur eine schwache AtIA-Bande. Am auffälligsten ist jedoch der Stamm *S. aureus* VC40. Dieser Stamm scheint weder eine AtIA- noch eine AM-Bande zu besitzen. Der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) hat nur eine sehr schwache AtIA-Bande. Alle aufgereinigten Autolysine wurden auch in einer SDS-PAGE mit *S. aureus* NCTC8325 Zellen im Trenngel eingesetzt. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild, jedoch ohne die GL-Bande, da in *S. aureus* die Aktivität der Glucosaminidase von der vorherigen Hydrolyse des PGN durch die Amidase abhängt. Ebenfalls wurden intrazelluläre, zytoplasmatische Autolysin-Fraktionen aufgereinigt und in einer SDS-PAGE mit *M. luteus* im Trenngel eingesetzt. Diese Aufreinigung hat schlechter funktioniert, ergab aber ein vergleichbares Bild.

## Ergebnisse



**Abbildung 33** Zymogramm der aufgereinigten Autolysine (AtIA) der unterschiedlichen *S. aureus* Stämme mit *M. luteus* als Indikator im Trenngel (PP = Propeptid; AM = Amidase; GL = Glucosaminidase). 1) *S. aureus* 137/93A; 2) *S. aureus* 1450/94; 3) *S. aureus* NCTC8325; 4) *S. aureus* VraS(VC40); 5) *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS; 6) *S. aureus* VC40; 7) *S. aureus* VC40R; 8) Marker (kDa) #26619.

Zur Untersuchung der Verteilung der einzelnen Bestandteile von AtIA wurde die Bandenintensität mehrerer SDS-Gele mithilfe des Programms GelAnalyzer quantifiziert. Dazu wurde die Fläche jedes Peaks einer Probe addiert und die einzelnen Banden im prozentualen Verhältnis dazu ausgedrückt. Das Verhältnis der Bestandteile mit Propeptid zu Bestandteilen ohne Propeptid ist in folgendem Diagramm gezeigt (Abb. 34). Es ist deutlich zu sehen, dass *S. aureus* VC40 nur einen geringen Anteil an AtIA, AM und GL (18 %) besitzt im Vergleich zu allen anderen Stämmen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant zu dem Elternstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (73 %) und dem verwandten Stamm *S. aureus* VC40R (58 %). Insgesamt haben die meisten anderen Stämme im Durchschnitt einen Anteil AtIA, AM und GL von ca. 65 %. Der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) hat den zweitniedrigsten Anteil von Bestandteilen ohne Propeptid mit 44 %, jedoch ist dieser Anteil nicht statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle. Der Stamm *S. aureus* VC40 scheint dementsprechend inhibiert zu sein, in der Abspaltung des Propeptides, jedoch nicht in der Abspaltung der Glucosaminidase (vergleiche Abb. 33).

## Ergebnisse

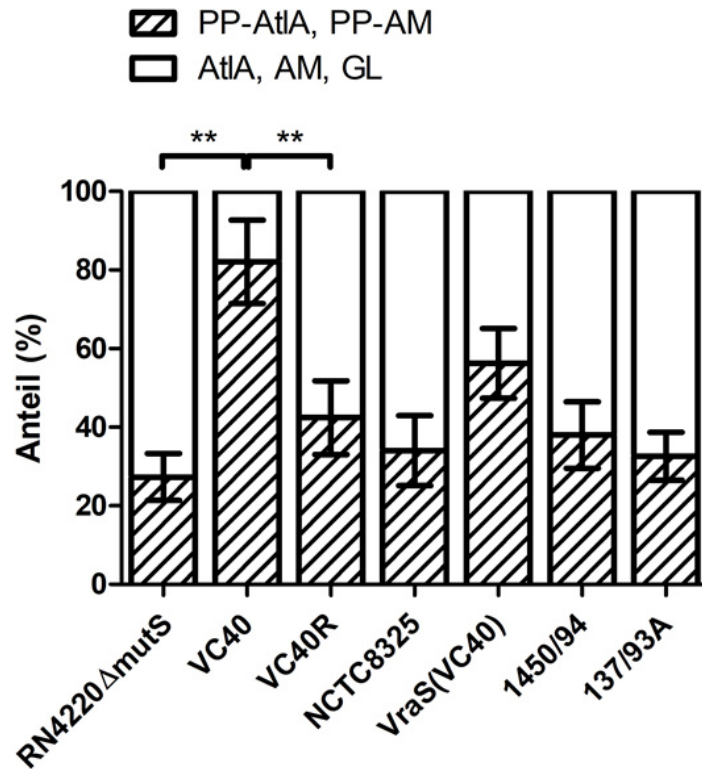


Abbildung 34 Graphische Darstellung der prozentualen Anteile von AtIA-Untereinheiten mit Propeptid und ohne Propeptid der verschiedenen *S. aureus* Stämme im Zymogramm basierend auf der Bandenintensität. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Zymogrammen mit zwei Autolysin-Aufreinigungen (\*\*  $p < 0,005$ ).

Zur Analyse, ob die ClpX(S30R)-Mutation in *S. aureus* VC40 eine Auswirkung auf das Autolysin-Profil hat, wurden die Autolysine der Austauschmutanten *S. aureus* ClpX mit LiCl isoliert und in einem Zymogramm mit *M. luteus* Zellen im Trenngel eingesetzt. Wie beschrieben dient das ClpXP-System dem ATP-abhängigen Abbau von Proteinen in *S. aureus* und könnte so auch das Autolysin-Profil beeinflussen. In der Abbildung 35 ist kein Unterschied zwischen der ClpX-Mutante und der Kontrolle *S. aureus* NCTC8325 zu erkennen. Sowohl die AtIA- als auch die AM-Bande sind vorhanden.

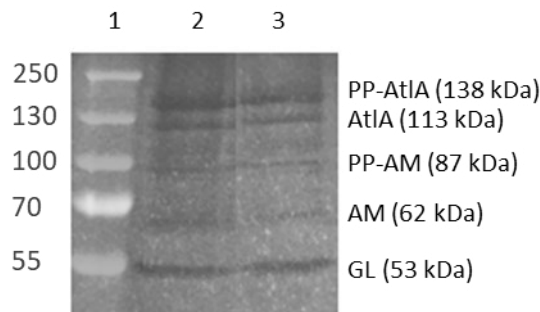


Abbildung 35 Zymogramm der aufgereinigten Autolysine (AtIA) von *S. aureus* NCTC8325 und der Mutanten *S. aureus* ClpX(VC40) mit *M. luteus* als Indikator im Trenngel (PP = Propeptid; AM = Amidase; GL = Glucosaminidase). 1) Marker (kDa) #26619; 2) *S. aureus* NCTC8325; 3) *S. aureus* ClpX(VC40).

### 3.3.2 Weiterführende Untersuchung der extrazellulären Autolysine

Um ein genaueres Bild der extrazellulären Autolysine zu erlangen, wurden 2 mL der Kulturen aus der exponentiellen oder stationären Phase geerntet (beides eingestellt auf eine OD<sub>600</sub> von 1). Zum Testen der Autolysinaktivität wurde *M. luteus* zugegeben und auf eine OD<sub>600</sub> 0,5 eingestellt. Die Reduktion der OD<sub>600</sub> bei 37 °C wurde über 1 Stunde gemessen und der Endpunkt ist in Abbildung 36 dargestellt.

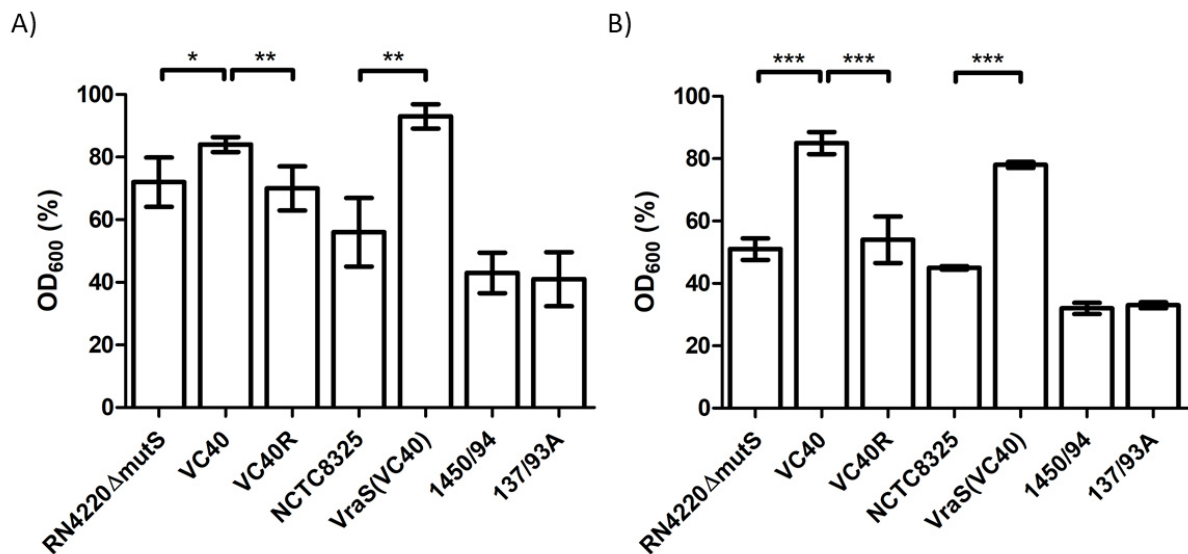


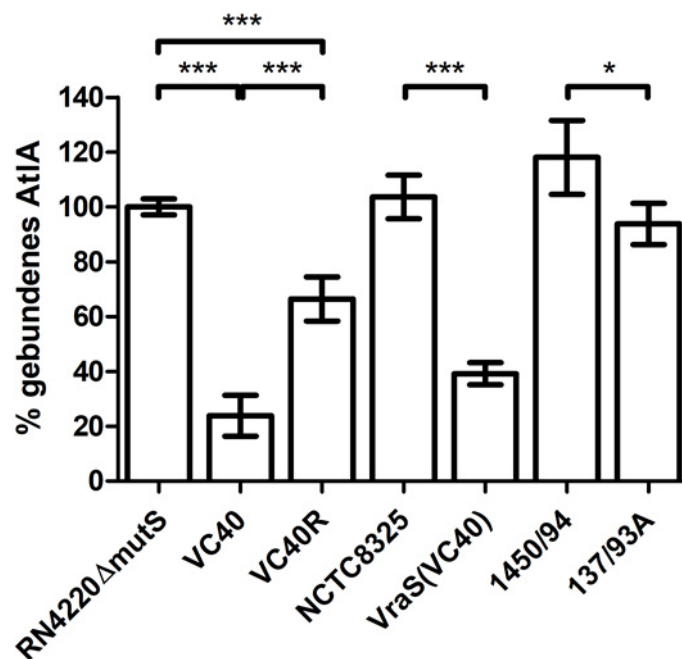
Abbildung 36 Untersuchung des Lyseverhalten von extrazellulären Autolysinen aus dem Überstand von *S. aureus* Stämmen auf tote *M. luteus* Zellen in Prozent nach 1 h Inkubation, basierend auf der anfänglichen Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>). A) Autolysine aus der exponentiellen Phase (Zellen der exponentiellen Phase OD<sub>600</sub> 1) B) Autolysine aus der stationären Phase (Zellen der stationären Phase OD<sub>600</sub> 1). Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten (\* p<0,05; \*\* p<0,005; \*\*\* p<0,0005).

Im Gegensatz zum obigen Experiment (Abb. 32) wurde der Überstand verwendet und keine Aufreinigung mit LiCl. Statt *S. aureus* wurde mit *M. luteus* ein sensibler Indikatororganismus eingesetzt. Die Reduktion der OD<sub>600</sub> ohne Autolysin betrug im Mittel 2 %. Anders als in Abbildung 32 (OD<sub>600</sub> 0,5 +/- 0,2) entsprach jede *S. aureus* Probe einer OD<sub>600</sub> von exakt 1 und musste nicht nachträglich eingestellt werden. Durch diese Änderungen konnten Messungenauigkeiten vermieden werden. In der Abbildung ist zu sehen, dass die Autolysine der beiden VISA-Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) auch mit dieser Methode eine signifikant geringere Zellwandhydrolyse von *M. luteus* zeigen. Das ist besonders für die Autolysine aus der stationären Phase der Fall. Generell ist die Reduktion der OD<sub>600</sub> größer für die Proben aus der stationären Phase, obwohl AtIA, als Hauptautolysin für die Trennung der Tochterzellen zuständig, eher in der exponentiellen Phase aktiv sein müsste. Des Weiteren gibt es

keinen großen Unterschied zwischen *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* und *S. aureus* VC40R oder *S. aureus* 137/93A und *S. aureus* 1450/94, weder in der exponentiellen noch in der stationären Phase.

### 3.3.3 Überprüfung der Bindekapazität der Zellwand für AtIA

In vorherigen Experimenten wurde gezeigt, dass die Autolyse der Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* *VraS*(VC40) gestört ist, ebenso wie die Lyse eines sensitiven Indikatorstammes durch extrazelluläre Autolysine der beiden Stämme. Zudem weisen die Autolysin-Profile Unterschiede zu



**Abbildung 37** Untersuchung der Bindung von AtIA an die Zellwand der verschiedenen *S. aureus* Stämme, basierend auf der Lyse von *M. luteus* nach 1 h Inkubation mit dem jeweiligen AtIA-Überstand. Zur Berechnung wurde eine Positivkontrolle von aufgereinigtem AtIA ohne vorherige Inkubation mit *S. aureus* Zellen verwendet. Der Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* (62 %) wurde auf 100 % festgesetzt. Alle Zellwände der *S. aureus* Stämme sind aufgrund der Aufreinigungsmethode frei von D-Alanin-Resten an den WTA. Dargestellt ist der prozentuale Mittelwert aus drei biologischen und zwei technischen Replikaten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

den anderen Stämmen auf. Deswegen wurde zusätzlich die Bindekapazität des PGN für AtIA getestet. Hierfür wurde PGN inklusive WTA ohne D-Alanin-Substitution auf eine  $OD_{600}$  von 0,3 eingestellt. Zu diesen Ansätzen wurde 1,6  $\mu$ g aufgereinigtes AtIA pipettiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden tote *M. luteus* Zellen mit dem Überstand auf eine  $OD_{600}$  von 0,5 eingestellt und die Lyse wurde über eine Zeit von 1 h gemessen. Basierend auf einer AtIA Probe in Puffer ohne *S. aureus* Zellen konnte der Anteil an gebundenem und nicht gebundenem AtIA berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Dabei wurde der Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* auf 100

## Ergebnisse

% gesetzt und die restlichen Stämme in Relation wiedergegeben. In Wirklichkeit hat der Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS 62 % des eingesetzten AtIA gebunden. Alle VISA-Stämme haben im Vergleich zu den VSSA-Stämmen signifikant weniger AtIA aus dem Überstand adsorbiert. Die geringste Bindungsaffinität für AtIA hat dabei der Stamm *S. aureus* VC40 mit 23 %, gefolgt von *S. aureus* VraS(VC40) (39 %) und *S. aureus* VC40R (66 %). Damit lag *S. aureus* VC40R mittig zwischen dem Elternstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS und dem VISA-Stamm *S. aureus* VC40. Mit 25 % Unterschied im gebundenen AtIA zwischen *S. aureus* 137/93A (93 %) und *S. aureus* 1450/94 (118 %) fiel die Abweichung dieser beiden Stämme am geringsten aus. Anschließend wurde untersucht, ob das Glykosylierungsmuster

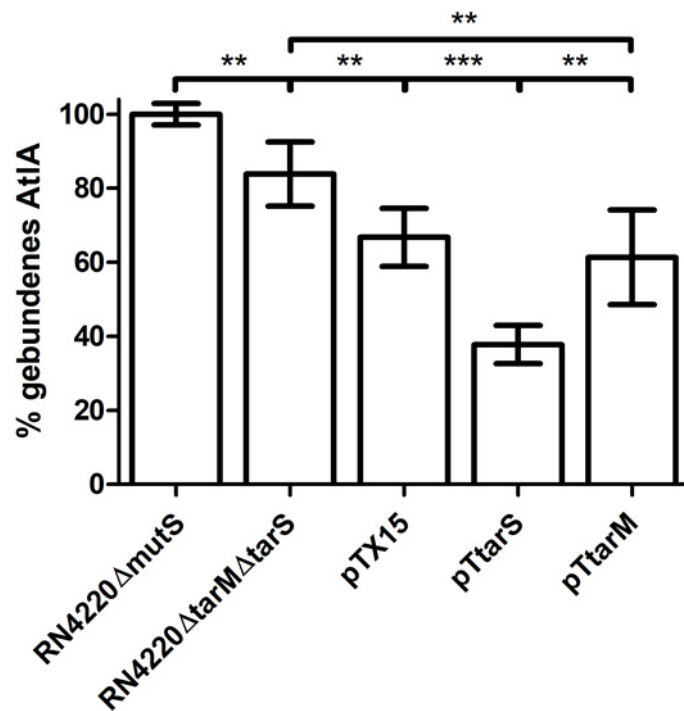


Abbildung 38 Untersuchung der Bindung von AtIA an die Zellwand der verschiedenen *S. aureus* Expressionsstämme für die Glykosylierung der WTA mit 0,5 % Xylose, basierend auf der Lyse von *M. luteus* nach 1 h Inkubation mit dem jeweiligen AtIA-Überstand. Zur Berechnung wurde eine Positivkontrolle von aufgereinigtem AtIA ohne *S. aureus* Zellen verwendet. Der Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (62 %) wurde auf 100 % festgesetzt. Alle Zellwände der *S. aureus* Stämme sind aufgrund der Aufreinigungsmethode frei von D-Alanin-Resten an den WTA. Dargestellt ist der prozentuale Mittelwert aus drei biologischen und zwei technischen Replikaten (\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

der WTA einen Einfluss auf die Bindung von AtIA an die Zellwand hat. Die Gene *tarM* und *tarS* kodieren für Glykosyltransferasen, die WTA mit  $\alpha$ -GlcNAc bzw.  $\beta$ -GlcNAc bestücken (Winstel et al., 2014). Mithilfe des pTX15 Vektors wurden Expressionsstämme für diese beiden Zuckervarianten an den WTA erzeugt, ausgehend von einem Stamm, in dem beide Gene deletiert waren. Abbildung 38 zeigt, dass die Expression der  $\beta$ -Variante in *S. aureus* pTtarS zu einer Reduktion an gebundenem AtIA führt. Diese Reduktion ist signifikant geringer als für den Leervektor und die  $\alpha$ -Variante. Allerdings zeigten sowohl der Leervektor *S. aureus* pTX15 im Vergleich zum Elternstamm, als auch der Elternstamm *S. aureus*  $\Delta$ tarM $\Delta$ tarS im Vergleich zu der *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS Kontrolle eine signifikant geringere



## Ergebnisse

Bindungsaffinität für AtIA an die Zellwand. Die Expression von  $\alpha$ -GlcNAc an den WTA in *S. aureus* pTtarM führt zu keiner signifikanten Veränderung in der Bindung von AtIA im Vergleich zum Leervektor *S. aureus* pTX15.

### 3.3.4 Triton X-100 induzierte Autolyse

Nachfolgend wurde auch die Autolyse der Stämme mit induzierbarer Glykosylierung der WTA durch Triton X-100 getestet. Triton X-100 ist ein nichtionisches Detergens, welches zu einer unkontrollierten Autolyse führt (Raychaudhuri und Chatterjee, 1985; Komatsuzawa et al., 1994). Für das Experiment wurden die *S. aureus* Stämme mit und ohne Xylose bei einer  $OD_{600}$  von 1 geerntet und anschließend mit Autolysin-Puffer II mit 0,05 % Triton X-100 auf eine  $OD_{600}$  von 0,7 eingestellt. Die Autolyse wurde anhand der optischen Dichte alle 15 min für 2 h gemessen. In folgender Abbildung (Abb. 39) ist der zeitliche Verlauf und die Reduktion der  $OD_{600}$  nach 2 h aufgezeigt. Es ist zu sehen,

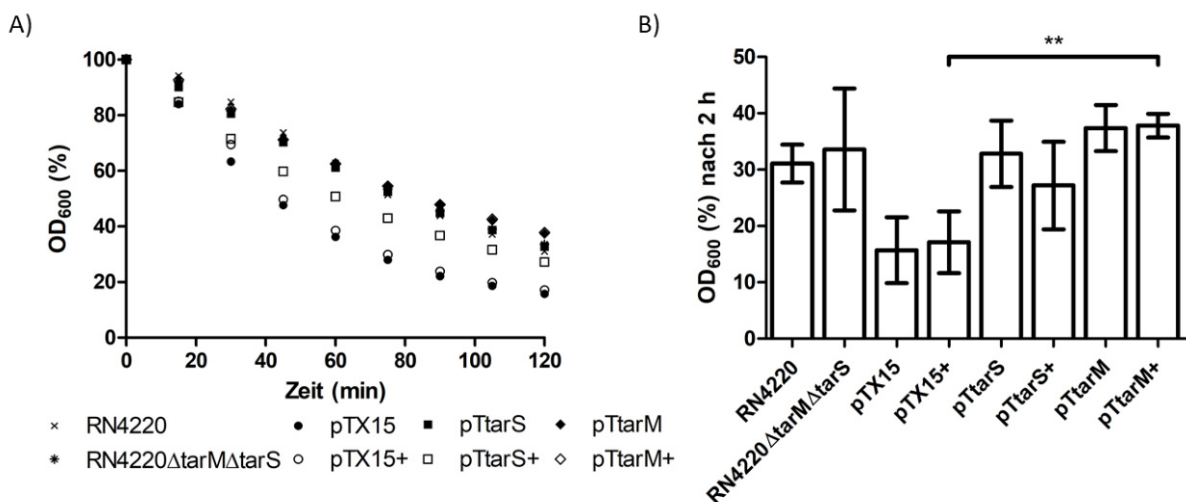


Abbildung 39 Triton X-100 induzierte Autolyse der *S. aureus* Expressionsstämme für die Glykosylierung der WTA (+ = 0,5 % Xylose). A) Zeitlicher Verlauf innerhalb von 2 h, basierend auf der anfänglichen Optischen Dichte ( $OD_{600}$ ). B) Reduktion der  $OD_{600}$  nach 2 h Inkubation der Zellen mit Triton X-100. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten (\*\*  $p < 0,005$ ).

dass die Anwesenheit von Xylose keinen Einfluss auf die Autolyse hat. Im zeitlichen Verlauf sind die Standardabweichungen für eine bessere Übersicht nicht dargestellt, jedoch gibt es hier ebenfalls zu keinem Zeitpunkt eine statistisch bemerkenswerte Abweichung aufgrund der Zugabe von Xylose. Der Leervektor in *S. aureus* pTX15 zeigt mit circa 85 % die höchste Reduktion der  $OD_{600}$  nach 2 h. Die anderen beiden Expressionsstämme sind im gleichen Bereich wie die Kontrollen. Einzig der Unterschied zwischen den Stämmen *S. aureus* pTX15 und *S. aureus* pTtarM ist statistisch signifikant, kann jedoch nicht auf die Expression von *tarM* zurückgeführt werden.



## Ergebnisse

Ebenfalls wurde die Triton X-100 induzierte Autolyse der Austauschmutanten *S. aureus* ClpX(VC40) analysiert (Abb. 40). Hier ist kein Unterschied zu dem Elternstamm *S. aureus* NCTC8325 zu erkennen. Dies deckt sich mit den vorherigen Ergebnissen, in denen *S. aureus* ClpX(VC40) ein vergleichbares Autolysin-Profil im Zymogramm aufwies, wie *S. aureus* NCTC8325.

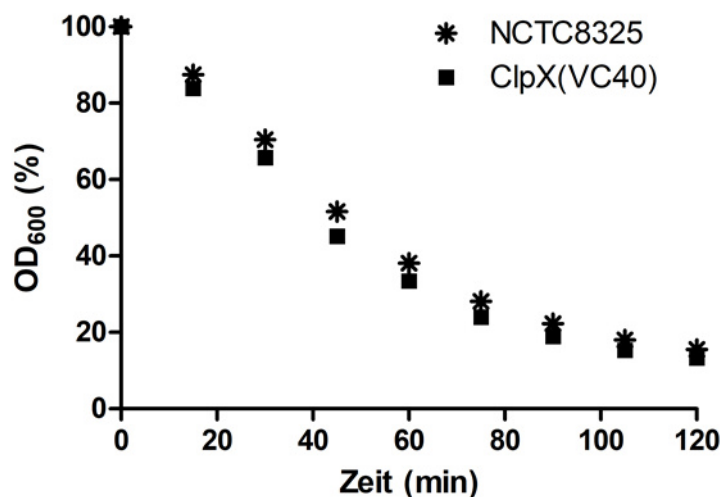


Abbildung 40 Triton X-100 induzierte Autolyse der *S. aureus* ClpX(VC40) Mutanten über die Zeit von 2 h, basierend auf der anfänglichen Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>).

### 3.3.5 Untersuchung der Prozessierung von AtIA

AtIA ist das Hauptautolysin in *S. aureus* und unterteilt in eine Amidase- und eine Glucosaminidase-Untereinheit mit jeweils einigen Repeat-Domänen und einer katalytischen Domäne (Abb. 41). Die dargestellte Einteilung des Proteins wurde in allen Staphylokokken-Spezies gefunden. Beide Untereinheiten nehmen eine wichtige Rolle in der Trennung der Tochterzellen nach der Zellteilung ein. Die posttranslationale, proteolytische Spaltung des Enzyms ist wenig erforscht und die verantwortliche Protease unbekannt (Götz et al., 2014).

In vorangegangenen Versuchen konnte das Gen für AtIA ohne Signalpeptid über den Vektor pQE-32 in den Überexpressionstamm *E. coli* M15 eingebracht werden. Das Protein wurde über einen N-terminalen His-Tag aufgereinigt. Dabei zeigten sich mehrere Banden für die Aufreinigung in der SDS-PAGE, welche ebenfalls lytisches Potential in einem Zymogramm aufwiesen (Schrötter, 2018). Bei der Aufreinigung von Proteinen mit Nickel-NTA-Agarose bilden diese durch den Polyhistidin-Tag einen Chelatkomplex mit den Nickel-Ionen. Es sollte in diesem Fall nur das AtIA mit Propeptid aufgereinigt

## Ergebnisse

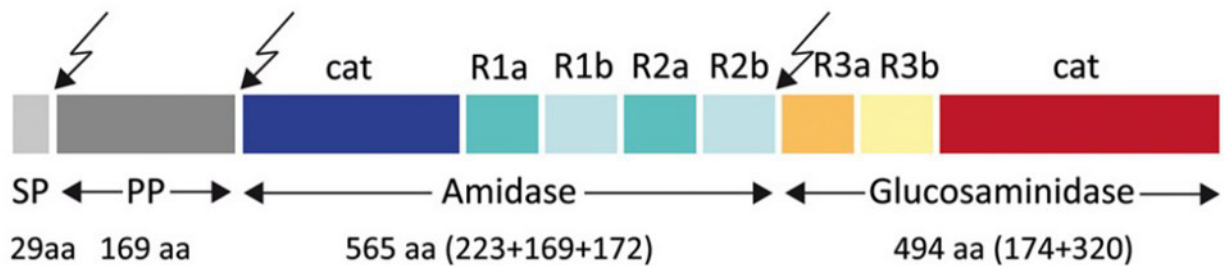


Abbildung 41 Struktur der Domänen von AtIA mit posttranslationalen Spaltungsstellen (Pfeile), entnommen aus Büttner et al., (2014) (SP = Signalpeptid; PP = Propeptid; cat = katalytische Domäne; R = Repeat Domäne; aa = Aminosäure).

werden, da es keine weiteren Histidin-reichen Regionen innerhalb des Proteins gibt. Würde das PP-AtIA innerhalb von *E. coli* proteolytisch gespalten, dann würde auch das PP-AM aufgereinigt werden. Die Amidase-Untereinheit ohne Propeptid oder die Glucosaminidase-Untereinheit können jedoch nicht über ein N-terminales His-Tag aufgereinigt werden (vergleiche Abb. 42B). In dieser Arbeit wurde aufgereinigtes dialysiertes AtIA in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend einzelne Banden, korrespondierend zu dem PP-AtIA- (138 kDa), PP-AM- (87 kDa) und GL-Fragment (53 kDa),

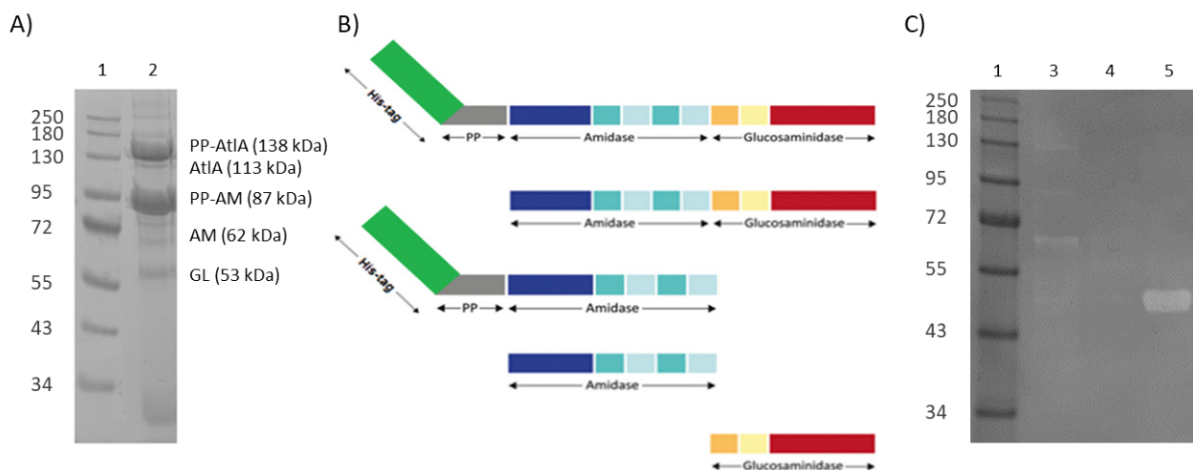


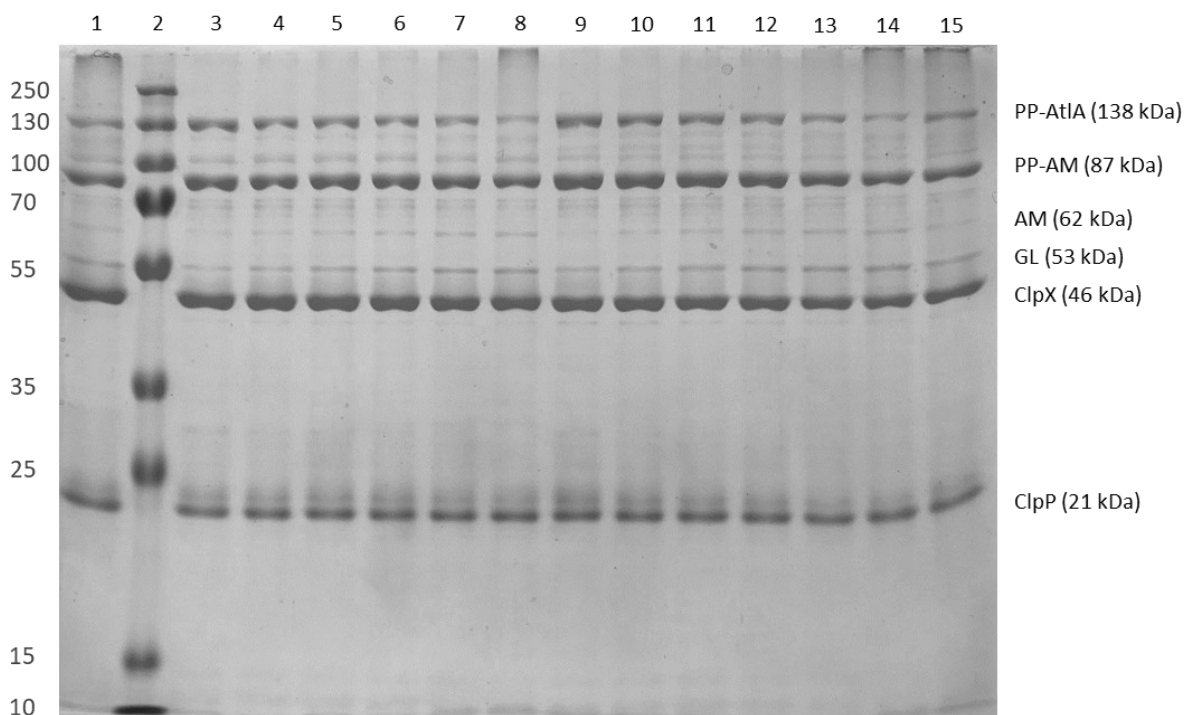
Abbildung 42 A) SDS-PAGE des aufgereinigten und dialysierten AtIA-Proteins ohne Signalpeptide. Es wurden die Banden von PP-AtIA, PP-AM und GL ausgeschnitten (PP = Propeptid; AM = Amidase; GL = Glucosaminidase). B) Schematische Darstellung der verschiedenen möglichen Abbauprodukte von AtIA modifiziert nach Büttner et al., (2014) (Reihenfolge von oben nach unten: PP-AtIA mit His-Tag; AtIA; PP-AM mit His-Tag; AM; GL). C) Zymogramm der ausgeschnittenen Banden aus der SDS-PAGE (Abb. 42A) mit *M. luteus* als Indikator im Trenngel. 1) Marker (kDa) #P7719; 2) AtIA-Dialysat; 3) ausgeschnittene PP-AtIA-Bande; 4) ausgeschnittene PP-AM-Bande; 5) ausgeschnittene GL-Bande.

ausgeschnitten (Abb. 42A). Diese Banden wurden über Nacht in Extraktionspuffer mit 0,1 mM EDTA und 0,1 % SDS inkubiert. Der Überstand mit den extrahierten Proteinen wurde in einem Zymogramm mit *M. luteus* Zellen eingesetzt (Abb. 42C). Es ist zu sehen, dass die isolierte GL-Bande auch im Zymogramm nur diese Bande zeigt. Die isolierte PP-AtIA Bande zeigt im Zymogramm Banden auf der Höhe von PP-AtIA, PP-AM, AM und GL, wobei die Banden für PP-AtIA und AM am stärksten sind. Die isolierte PP-AM-Bande wiederum zeigte nur sehr schwache Banden im Zymogramm auf der Höhe von PP-AM und AM. Dies bestätigt, dass es zu einer Spaltung des Proteins nach der Proteinextraktion aus

## Ergebnisse

dem Gel gekommen sein muss. Bei dieser Spaltung war kein weiteres proteolytisch aktives Enzym anwesend.

Da das ClpXP-System dem ATP-abhängigen Abbau von Proteinen in *S. aureus* dient und *S. aureus* VC40 in *clpX* eine Mutation aufweist, wurde der Abbau von AtIA (WT) durch ClpXP in einem Proteolyse-Assay in vitro untersucht. Dazu wurde das ClpXP-System zusammen mit AtIA, Kreatinphosphat und Kreatinphosphokinase, sowie ATP bei 37 °C inkubiert. Proben wurden zu bestimmten Zeiten entnommen und die Reaktion mit NuPAGE Stopp-Puffer angehalten. Anschließend wurden die



**Abbildung 43** In vitro Proteolyse-Assay zum Abbau von PP-AtIA und weiteren AtIA-Fragmenten durch ClpXP mit ClpX(SA NCTC8325) und ClpX(SA VC40) über 4 Stunden (PP = Propeptid; AM = Amidase; GL = Glucosaminidase). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne ATP. 1) ClpX(VC40) Negativkontrolle; 2) Marker (kDa) #26619; 3) ClpX(NCTC8325) 0 h; 4) ClpX(NCTC8325) 0,25 h; 5) ClpX(NCTC8325) 0,5 h; 6) ClpX(NCTC8325) 1 h; 7) ClpX(NCTC8325) 2 h; 8) ClpX(NCTC8325) 4 h; 9) ClpX(VC40) 0 h; 10) ClpX(VC40) 0,25 h; 11) ClpX(VC40) 0,5 h; 12) ClpX(VC40) 1 h; 13) ClpX(VC40) 2 h; 14) ClpX(VC40) 4 h; 15) ClpX(VC40) Negativkontrolle.

Proteine auf einer 12 %-igen SDS-PAGE getrennt und die Banden wurden mit dem GelAnalyzer analysiert. Für die Berechnung der Proteolyse wurden die Banden einer Spalte zuerst auf die jeweilige Intensität von ClpP bezogen. Danach wurde die Intensität in Prozent in Bezug zu der jeweiligen Kontrolle bei 0 h gesetzt. Ein Proteolyse-Assay ist exemplarisch in Abbildung 43 dargestellt. Die lytischen Banden wurden durch ein Zymogramm mit *M. luteus* kontrolliert. In der nächsten Abbildung (Abb. 44) sind die Ergebnisse aller Assay dargestellt, wobei für die einzelnen AtIA-Fragmente immer die Kontrolle ohne ATP mit der Probe nach 4 h verglichen wurde. Insgesamt zeigte sich, dass AtIA durch ClpXP abgebaut wird, signifikant ist dies jedoch für keine der beiden Varianten von ClpX. Ein geringer

## Ergebnisse

Abbau von PP-AM ist ebenfalls zu erkennen. Zum Abbau von GL kann keine gesicherte Aussage getroffen werden. Interessanterweise steigt in beiden ClpX-Ansätzen die Bandenintensität der Amidase-Untereinheit stark an. Abschließend ist jedoch festzustellen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Bandenintensitäten der AtIA-Fragmente nach 4 h Inkubation mit ClpX(NCTC8325) und ClpX(VC40) gibt. Der Versuch bestätigt die vorherigen Ergebnisse, wonach die *S. aureus* ClpX-Mutante ein ähnliches Autolysin-Profil aufwies wie der Elternstamm *S. aureus* NCTC8325.

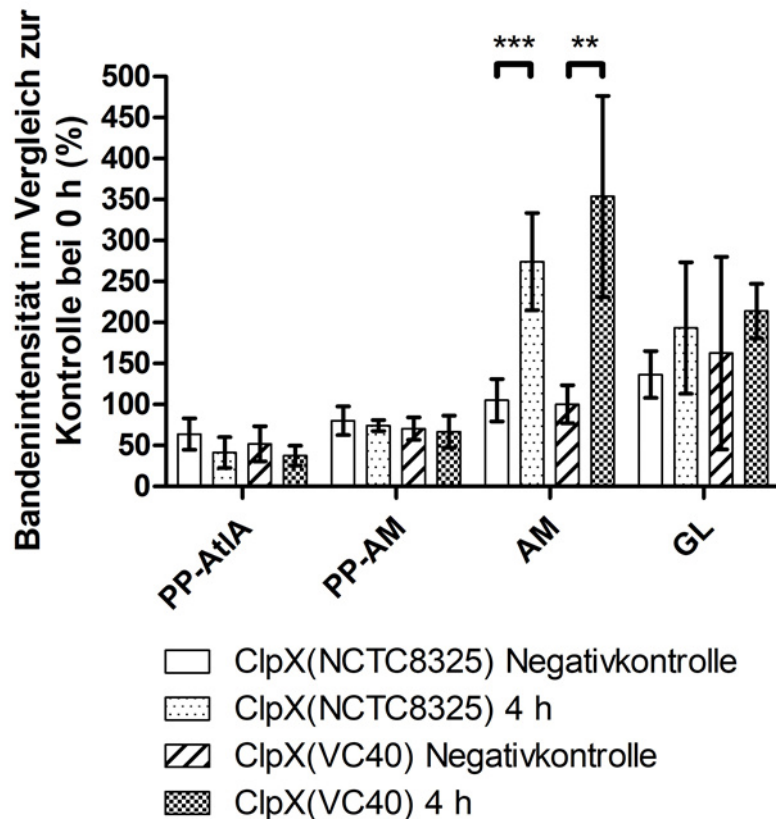


Abbildung 44 Vergleich der Proteolyse verschiedener AtIA-Fragmente durch aufgereinigtes ClpP und zugehöriges ClpX aus *S. aureus* NCTC8325 und *S. aureus* VC40 (PP = Propeptid; AM = Amidase; GL = Glucosaminidase). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne ATP. Die Intensität der Banden einer Probe wurde mit dem Programm GelAnalyzer bestimmt und jeweils zuerst auf die jeweilige ClpP Bande bezogen und anschließend auf die entsprechende Bande der Kontrolle zum Zeitpunkt 0 h. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei separaten Assays (\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

### 3.4 Charakterisierung der Wandteichonsäuren

Wandteichonsäuren lenken die Quervernetzung der Zellwand durch PBPs und den Zellwandabbau durch Autolysine. In Abwesenheit der WTA-Biosynthese wird die Lokalisierung von PBP4 und AtIA an der Teilungssepte gehemmt und es kommt zu einer Verteilung der Enzyme innerhalb der gesamten Zelloberfläche (Atilano et al., 2010; Schlag et al., 2010). Dieses Zellwandpolymer ist dementsprechend wichtig für den korrekten Aufbau der Zellwand und die Zellteilung zwischen Tochterzellen. Sowohl die

Quervernetzung der Zellwand als auch die Autolyse sind zwei Charakteristika, die in VISA-Stämmen häufig verändert sind. Allgemein haben VISA-Stämme eine geringere Quervernetzung mit mehr freien D-Ala-D-Ala-Enden und eine geringere Autolyse, die zu einer dickeren Zellwand führt (Hu et al., 2016). Beides zusammen resultiert in einer vermehrten Bindung von Vancomycin an die äußere Zellwand, sodass die letale Wirkung des Antibiotikums an der Teilungssepte gehemmt wird. Die Rolle der Wandteichonsäuren in der Vancomycin-Empfindlichkeit ist wenig erforscht und wurde deshalb für die Labor- und klinischen VISA-Stämme in dieser Arbeit näher betrachtet.

### 3.4.1 Quantifizierung der WTA mittels Phosphat-Test

Für die Bestimmung des Phosphat-Gehaltes wurden die aufgereinigten und lyophilisierten Zellwände der Stämme mit Perchlorsäure bei 180 °C behandelt. Dadurch wurde das Phosphat freigesetzt. Anschließend wurde die Farbintensität eines Phosphomolybdat-Komplexes durch die Reduktion mit Ascorbinsäure bei OD<sub>797</sub> gemessen (Chen et al., 1956). Das freigesetzte Phosphat aus den Zellwänden ist Teil der Ribitol-Kette der Wandteichonsäuren. Anhand einer Eichkurve, basierend auf KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, wurde der Phosphat-Gehalt der Probe bestimmt und auf das Trockengewicht (TG) bezogen. Die Ergebnisse für den Phosphat-Gehalt sind in Abbildung 45 dargestellt. Die Werte sind prozentual auf den

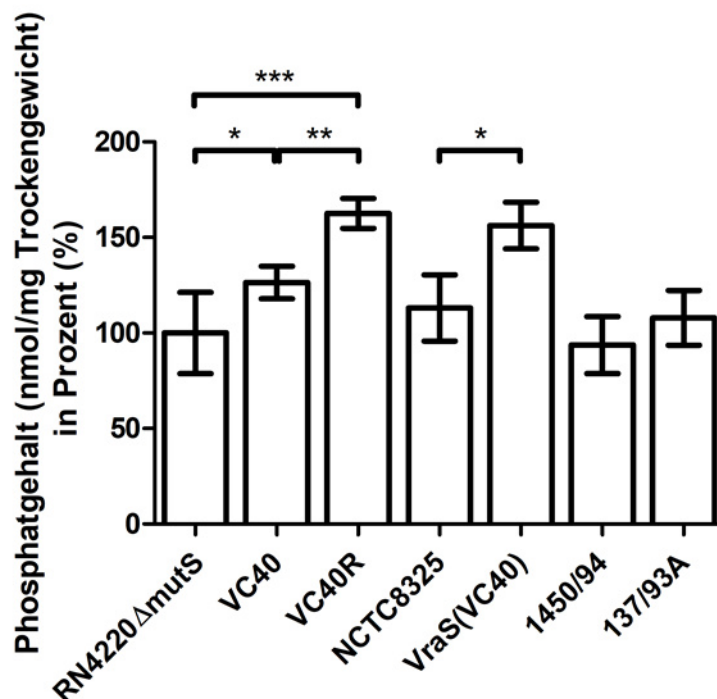


Abbildung 45 Phosphat-Gehalt der aufgereinigten Zellwände von verschiedenen *S. aureus* Stämme in nmol Phosphat pro mg Trockengewicht. Der Stamm *S. aureus* RN4220ΔmutS (453 nmol/mg TG) wurde auf 100 % festgesetzt. Dargestellt ist der prozentuale Mittelwert aus fünf biologischen Replikaten (\* p<0,05; \*\* p<0,005; \*\*\* p<0,0005).

## Ergebnisse

Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS bezogen, der auf 100 % festgesetzt wurde. *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS hat 453 nmol Phosphat pro mg TG. Alle VISA-Stämme weisen einen höheren Phosphat-Gehalt und damit einen höheren WTA-Gehalt als die Kontrollstämme auf. Der höhere Gehalt an Phosphat ist für die Laborstämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40), statistisch signifikant. Den größten Phosphat-Gehalt mit 162 % erreichte der Stamm *S. aureus* VC40R.

Eine Bestimmung der Verteilung der WTA innerhalb der Zellwand in den verschiedenen Stämmen durch Fluoreszenzmikroskopie und dem fluoreszierenden Molekül Concanavalin A-FITC, basierend auf Schlag et al., (2010), war nicht erfolgreich.

### 3.4.2 Analyse der WTA-Substitution mit D-Alanin

Der D-Alanin-Gehalt wurde einerseits von isolierten und lyophilisierten Zellwänden und andererseits von ganzen Zellen bestimmt. Ersterer zeigt den D-Alanin-Gehalt der Wandteichonsäuren an und letzterer den D-Alanin-Gehalt von Wand- und Lipoteichonsäuren zusammen. Dazu wurde die Basen-labilen D-Alanin-Ester mit Tris-HCL Puffer (pH 8,5) gespalten und das freigesetzte D-Ala in einen gekoppelten enzymatischen Test eingesetzt. Die Reaktion baute auf der Umsetzung von Pyruvat zu L-Lactat durch eine Lactat-Dehydrogenase unter Verbrauch von NADH auf. Gemessen wurde im Anschluss die

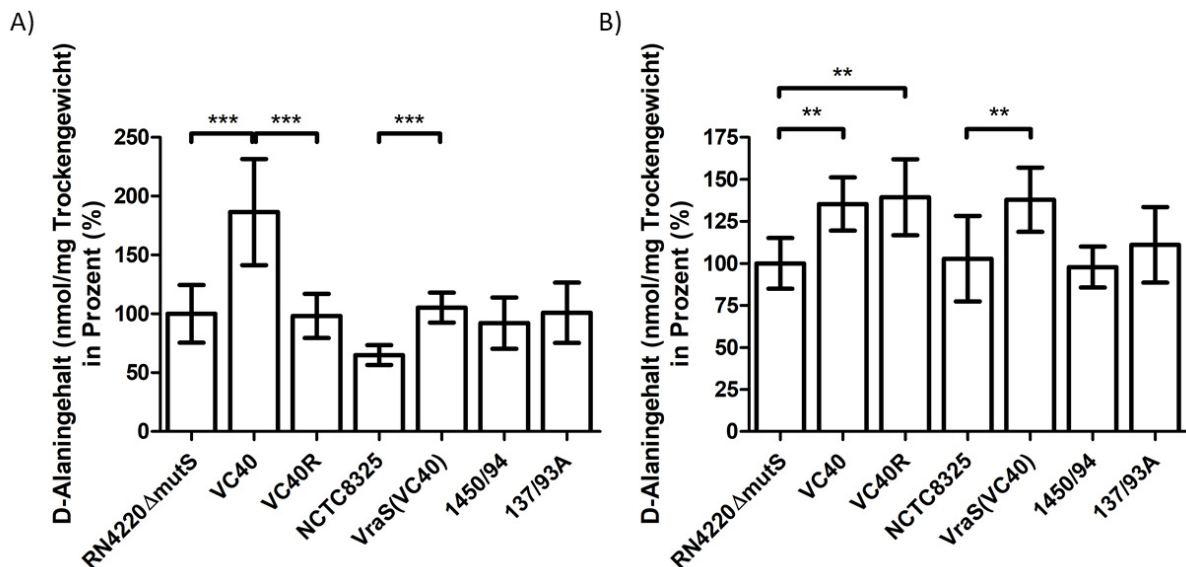


Abbildung 46 (A) D-Alanin-Gehalt der aufgereinigten Zellwände von verschiedenen *S. aureus* Stämmen in nmol D-Alanin pro mg Trockengewicht. Der Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (157 nmol/mg TG) wurde auf 100 % festgesetzt. (B) D-Alanin-Gehalt ganzer Zellen der verschiedenen *S. aureus* Stämme in nmol D-Alanin pro mg Trockengewicht. Der Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (112 nmol/mg TG) wurde auf 100 % festgesetzt. Dargestellt ist der prozentuale Mittelwert aus vier biologischen Replikaten (\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

## Ergebnisse

Verschiebung der Absorption bei OD<sub>366</sub> durch die Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup>. Hierbei war der Gehalt von NAD<sup>+</sup> äquivalent zum Gehalt an D-Alanin. Der D-Alanin-Gehalt der zwei Bestimmungen ist in Abbildung 46 gezeigt. In Teil A ist der D-Alanin-Gehalt der Zellwände dargestellt. Die Werte sind prozentual auf den Stamm *S. aureus* RN4220Δ*mutS* mit 157 nmol D-Alanin pro mg Trockengewicht bezogen, der auf 100 % festgesetzt wurde. Der Stamm *S. aureus* VC40 besitzt mit 186 % am meisten D-Alanin von allen Stämmen. Im Gegensatz dazu liegt der Stamm *S. aureus* VC40R mit 98 % auf dem gleichen Niveau wie die Kontrolle. Neben *S. aureus* VC40 enthalten die Zellwände von *S. aureus* VraS(VC40) ebenfalls signifikant mehr D-Alanin als die Kontrolle. In Teil B ist der D-Alanin-Gehalt der ganzen Zellen dargestellt. Hier ist ebenfalls der Gehalt von *S. aureus* RN4220Δ*mutS* (112 nmol D-Alanin pro mg Trockengewicht) auf 100 % festgesetzt worden. Die VISA-Stämme haben auch innerhalb der ganzen Zellen einen höheren Gehalt an D-Alanin. Für die Stämme *S. aureus* VC40 mit 135 %, *S. aureus* VC40R mit 139 % und *S. aureus* VraS(VC40) mit 137 % ist dieser Unterschied statistisch signifikant. Der Vergleich der beiden Diagramme zeigt, dass *S. aureus* VC40R eine höhere D-Alanylierung der LTA, jedoch nicht der WTA, besitzt im Vergleich zur Kontrolle *S. aureus* RN4220Δ*mutS*. Insgesamt ist der D-Alanin-Gehalt in nmol pro mg Trockengewicht für die ganzen Zellen niedriger als für die isolierten Zellwände, was an dem niedrigeren Verhältnis zum Gewicht liegt.

Anschließend wurde die Substitution der Wandteichonsäuren aus den isolierten Zellwänden mit D-Alanin, basierend auf dem Phosphat- und D-Alanin-Gehalt pro mg Trockengewicht, berechnet. Die

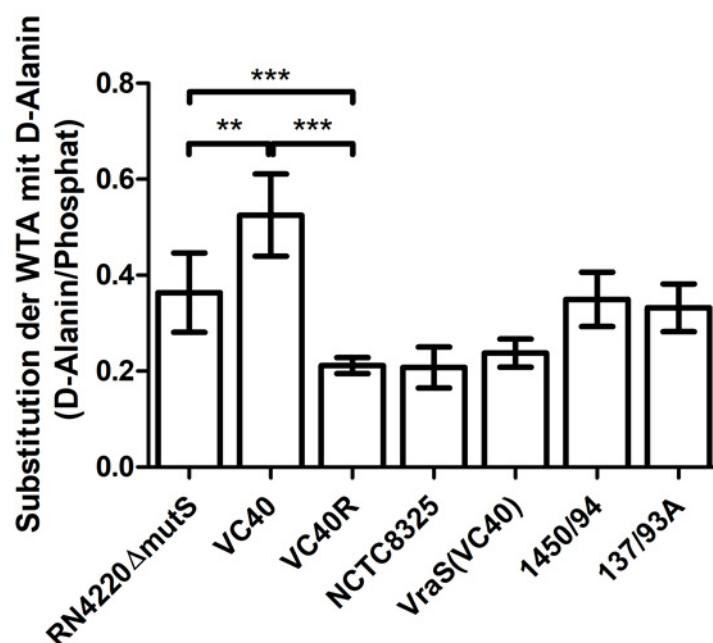


Abbildung 47 Berechnete Modifikation der Wandteichonsäuren mit D-Alanin der verschiedenen *S. aureus* Stämme anhand des Phosphat- und D-Alanin-Gehaltes. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier biologischen Replikaten (\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

Werte sind in Abbildung 47 dargestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Substituierung der WTA mit D-Alanin ist bei *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R im Vergleich zur Kontrolle *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS zu beobachten. Dabei weist *S. aureus* VC40 mit 0,52 D-Ala pro Phosphat den höchsten Wert auf und *S. aureus* VC40R mit 0,21 D-Ala pro Phosphat einen der niedrigsten Werte. Dies ist damit zu erklären, dass der Stamm *S. aureus* VC40R den gleichen Gehalt an D-Alanin besitzt wie die Kontrolle *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS, im Vergleich jedoch den höchsten Phosphat-Gehalt. Ansonsten liegen die weiteren VISA- und VSSA-Paare gleichauf.

### 3.4.3 Analyse der WTA-Substitution mit D-Glucosamin

Für die Bestimmung des D-Glucosamin-Gehalts wurden die aufgereinigten WTA in 4 M HCl für 2 h bei 100 °C hydrolysiert. Danach wurden die Proben neutralisiert und in das D-Glucosamin Assay Kit von Megazyme eingesetzt. In mehreren enzymatischen Reaktionen wurde schließlich Glukose-6-Phosphat oxidiert zu Gluconat-6-Phosphat unter der Reduktion von NADP<sup>+</sup>. Ähnlich wie im D-Alanin Assay wurde die Absorption von NADPH bei 340 nm gemessen als Stellvertreter für die Menge an D-Glucosamin. Der D-Glucosamin-Gehalt der Stämme ist in Abbildung 48A prozentual dargestellt und auf *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (0,05 mg D-Glucosamin pro mg Trockengewicht) bezogen. Hierbei haben alle Stämme einen höheren Gehalt an D-Glucosamin im Vergleich zu *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS. Den höchsten Gehalt weist *S. aureus* VC40 mit 234 % auf. Die Stämme *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) haben mit 203 % bzw. 215 % ebenfalls signifikant mehr D-Glucosamin an den WTA als die Kontrollstämme. Zwischen den klinischen Stämmen *S. aureus* 137/93A und *S. aureus* 1450/94 gibt es nur einen geringen Unterschied. In Abbildung 48B ist die Substitution der WTA mit D-Glucosamin, basierend auf dem Phosphat- und D-Glucosamin-Gehalt, dargestellt. Hier wurde der Gehalt der beiden Substanzen jedoch von neuen WTA-Aufreinigungen ohne Lyophilisation gemessen, basierend auf dem eingesetzten Volumen (anstelle von TG). Auch hier zeigt der Stamm *S. aureus* VC40 die höchste Substitutionsrate mit 0,18 D-Glucosamin pro Phosphat. Der Stamm *S. aureus* VC40R fällt wiederum wegen dem hohen Phosphat-Gehalt auf eine geringere Substitution von 0,1 D-Glucosamin pro Phosphat zurück. Diese liegt zwar über der Rate der Kontrolle *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (0,07), jedoch gleichauf mit dem Laborstamm *S. aureus* NCTC8325. Ein signifikanter Unterschied liegt auch bei *S. aureus* VraS(VC40) mit 0,14 Zucker pro Phosphat im Vergleich zur Kontrolle *S. aureus* NCTC8325 (0,1) vor.



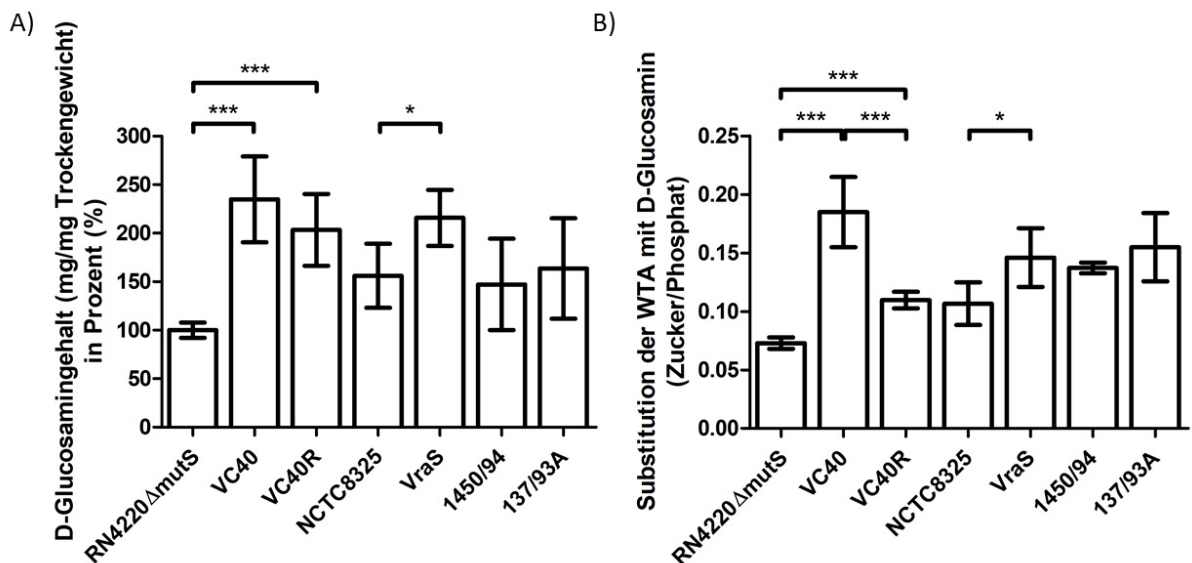


Abbildung 48 (A) D-Glucosamin-Gehalt der aufgereinigten Wandteichonsäuren von verschiedenen *S. aureus* Stämmen in mg D-Glucosamin pro mg Trockengewicht. Der Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (0,05 mg/mg TG) wurde auf 100 % festgesetzt. (B) Berechnete Modifikation der Wandteichonsäuren mit D-Glucosamin der verschiedenen *S. aureus* Stämme anhand des Phosphat- und D-Glucosamin-Gehaltes. Dargestellt ist der (prozentuale) Mittelwert aus drei biologischen Replikaten (\* p<0,05; \*\*\* p<0,0005).

### 3.4.3.1 Analyse der Glykosylierung der WTA in den *tarM/S*-Überexpressionsstämmen

Die Glykosylierung der Wandteichonsäuren erfolgt durch TarS und TarM. Dabei kann D-Glucosamin in zwei Konformationen an das Ribitol gebunden sein, einmal als  $\alpha$ -GlcNAc und einmal als  $\beta$ -GlcNAc. TarM ist für die  $\alpha$ -Glykosylierung und TarS für die  $\beta$ -Glykosylierung zuständig (Xia et al., 2010b). Um den Einfluss dieser beiden Glykosylierungsmuster einzeln zu testen, wurde ein Deletionsstamm für *tarM* und *tarS*, *S. aureus* RN4220 $\Delta$ tarM $\Delta$ tarS, mit den Überexpressionsplasmiden pTtarS und pTtarM transformiert. Die so entstandenen Stämme *S. aureus* pTtarM und *S. aureus* pTtarS wurden auf die induzierbare Expression der beiden Glykosyltransferasen getestet. In Abbildung 49 sind der Phosphat-Gehalt und der D-Glucosamin-Gehalt dargestellt. Da im Kontrollstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ tarM $\Delta$ tarS nur die Glykosylierung der WTA deletiert wurde, jedoch nicht die WTA-Biosynthese, besitzt der Stamm 1088 nmol Phosphat pro mg Trockengewicht. Dieser Wert ist auf 100 % gesetzt und die weiteren Stämme sind prozentual dazu dargestellt. Der Stamm *S. aureus* pTtarM besitzt eine ähnlich große Menge an WTA wie die Kontrolle. Interessanterweise hat der Stamm *S. aureus* pTtarS einen höheren Phosphat-Gehalt und bildet dementsprechend eine größere Menge an WTA. Es gibt keinen signifikanten Unterschied in den Stämmen basierend auf der Zugabe von 0,5 % Xylose und der darauffolgenden Expression der Glykosyltransferasen. In Abbildung 49B ist die Analyse des D-Glucosamin-Gehaltes dargestellt. Hier zeigt sich für beide Stämme eine deutliche Zunahme von D-

## Ergebnisse

Glucosamin durch die Zugabe von 0,5 % Xylose. Jedoch ist auch bei der Probe *S. aureus* pTtarM ohne Xylose eine geringe Menge an D-Glucosamin detektiert worden.

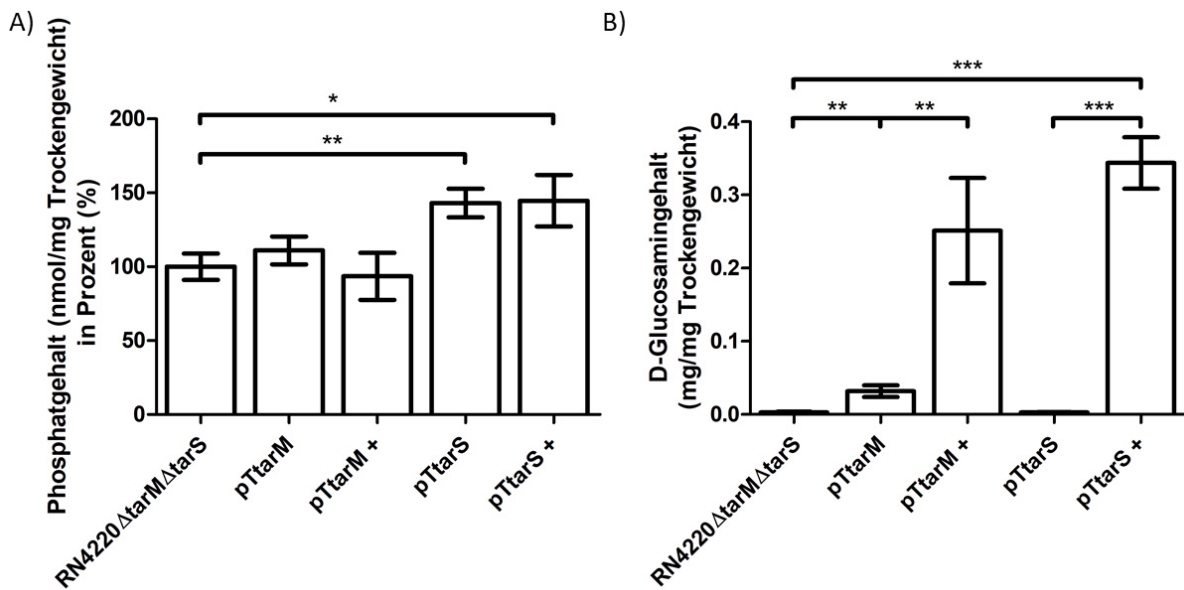


Abbildung 49 (A) Phosphat-Gehalt von aufgereinigten Wandteichonsäuren der *S. aureus* Expressionstämmen für die Glykosylierung der WTA in nmol Phosphat pro mg Trockengewicht (+ = 0,5 % Xylose). Der Stamm *S. aureus* RN4220ΔtarMΔtarS (1088 nmol/mg TG) wurde auf 100 % festgesetzt. (B) D-Glucosamin-Gehalt von aufgereinigten Wandteichonsäuren der *S. aureus* Expressionstämmen für die Glykosylierung der WTA in mg D-Glucosamin pro mg Trockengewicht (+ = mit 0,5 % Xylose). Dargestellt ist der (prozentuale) Mittelwert aus drei biologischen Replikaten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ).

### 3.4.3.2 Untersuchung der Phagentypisierung

Wandteichonsäuren stellen ebenfalls eine bedeutende Struktur für die Adsorption von Bakteriophagen dar. Aus diesem Grund wurde eine Phagentypisierung mit dem Internationalen Phagensatz (Marples und van Leeuwen, 1987) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um 23 Siphoviridae, die zur Typisierung von klinischen *Staphylococcus aureus* Varianten verwendet werden. Siphoviridae bevorzugen zur Adsorption vor allem die  $\alpha$ -GlcNAc-Struktur an den WTA (Xia et al., 2011). Daneben wurden auch 3 Myoviridae und 3 Podoviridae eingesetzt. Myoviridae erkennen das Ribitol-Rückgrat der Wandteichonsäuren und Podoviridae adsorbieren nur an WTA mit  $\beta$ -Glykosylierung (Xia et al., 2011; Li et al., 2015). Das Lyseverhalten der verschiedenen *S. aureus* Stämme ist in Tabelle 18 festgehalten. Generell werden alle Stämme durch die drei Myoviridae erkannt, wodurch belegt ist, dass die WTA der Stämme für Viren zugänglich sind. Die Lyse durch Podoviridae zeigt an, dass die WTA mit  $\beta$ -GlcNAc bestückt ist. Dies ist für alle Stämme, außer *S. aureus* RN4220ΔmutS und *S. aureus* VC40R, der Fall. Interessanterweise wird der mit beiden Stämmen verwandte VISA *S. aureus* VC40 auch

## Ergebnisse

**Tabelle 18 Phagentypisierung verschiedener *S. aureus* Stämme mit dem Internationalen Phagensatz (100x RTD), sowie jeweils drei ausgewählten Myoviridae und Podoviridae. Phagenreaktionen wurden vereinfacht dargestellt (+ = Plaques; L = mindestens semikonfluente Lyse).**

Stamm/ Phage	Siphoviridae																			Myoviridae			Podoviridae						
	29	52	52A	79	80	3A	3C	55	71	6	42E	47	53	54	75	77	83A	84	85	94	96	81	95	K	SK311	812	P68	44	66
RN4220 $\Delta$ mutS	+	L	L	+	L	+	+	+	+	L	+	L	L	L	L	L				L	L	L	L	L	L	L			
VC40																								L	L	L	L	L	L
VC40R		L										L	L	L						+				L	L	L			
NCTC8325	+									+		L	+	L	+	+	+	+					+	L	+	+	L	L	L
VraS(VC40)	+	+								+		L	+	L	+			+	+				+	L	+	+	L	L	L
137/93A														L	+									+	L	L	L	L	L
1450/94	+													L	+	L		L	L					+	+	L	L	L	L

von Podoviridae infiziert. Hier scheint eine verändertes Glykosylierungsmuster der WTA vorhanden zu sein. Dies ist ebenfalls im Hinblick auf die Siphoviridae erkennbar. Der Stamm *S. aureus* VC40 zeigt bei keinem der 13 Phagen eine Lyse, ganz im Gegensatz zum Kontrollstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS, der durch fast alle Siphoviridae lysiert wird. Bemerkenswerterweise ist der revertierte VISA-Stamm *S. aureus* VC40R wieder durch fünf Siphoviridae lysierbar. Auch die klinischen Stämme *S. aureus* 137/93A und *S. aureus* 1450/94 weisen einige Unterschiede im Lyseverhalten bei Siphoviridae auf. Der VISA-Stamm ist hier ebenfalls weniger anfällig. Die Stämme *S. aureus* NCTC8325 und *S. aureus* VraS(VC40) zeigen kaum Abweichungen in der Phagentypisierung.

Die Phagentypisierung wurde auch für die Überexpressionsstämme durchgeführt. In Tabelle 19 ist das Lyseverhalten der Stämme mit induzierbarer Expression der jeweiligen TCS dargestellt. Zwischen den einzelnen Stämmen zeigt sich jedoch keine größere Abweichung. Es gibt nur eine Änderung, die mit der Zugabe von Xylose verbunden ist und nicht in der Kontrolle mit dem Leervektor, *S. aureus* pTX15, auftritt, nämlich Phage 54 in den Stämmen *S. aureus* pTvraSR und *S. aureus* pTvraTSR. Von den Myoviridae und Podoviridae wurde nur eine Auswahl getestet, die stets eine Veränderung in den obigen Stämmen im Vergleich zur Kontrolle *S. aureus* NCTC8325 zeigten (Tab. 18).

# Ergebnisse

**Tabelle 19 Phagentypisierung verschiedener *S. aureus* Überexpressionsstämme mit dem Internationalen Phagensatz (100x RTD), sowie jeweils einem ausgewählten Myoviridae und Podoviridae (+ = 0,5 % Xylose). Phagenreaktionen wurden vereinfacht dargestellt (+ = Plaques; L = mindestens semikonfluente Lyse; n.d. = nicht bestimmt).**

Stamm/ Phage	Siphoviridae																			Myoviridae			Podoviridae						
	29	52	52A	79	80	3A	3C	55	71	6	42E	47	53	54	75	77	83A	84	85	94	96	81	95	K	SK311	812	P68	44	66
NCTC8325	+									+	L		+	L	+	+	+	+					+	L	+	+	L	L	L
pTX15	+										L		+	L	L		L	L					L	L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	L
pTX15 +					+						L		+	L	L		L	L					L	L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	L
pTvicA	+										L		+	L	L		L	L					L	L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	L
pTvicA +	+				+						L		+	L	+		+	+					L	L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	L
pTvraSR										+	L		+	L	L		L	L					L	L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	L
pTvraSR +											L			L	+		+	+					L	L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	L
pTvraTSR										+	L		+	L	L		L	L					L	L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	L
pTvraTSR +											L			L	+		+	+					L	L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	L

Ebenso wie die Expressionsstämme für TCS wurden auch die Stämme mit induzierbarer Expression der Glykosylierung der Wandteichonsäuren durch Phagentypisierung getestet. Wie in Tabelle 20 zu sehen, ist auch hier der Unterschied zwischen der Kontrolle *S. aureus* RN4420 $\Delta$ tarS $\Delta$ tarM und den Stämmen *S. aureus* pTtarM und *S. aureus* pTtarS gering. Ein Effekt der Expression durch Xylose lässt sich nur für die Podoviridae feststellen, da hier *S. aureus* pTtarS  $\beta$ -glykosylierte WTA ausbildet und dadurch von  $\Phi$ P68,  $\Phi$ 44 und  $\Phi$ 66 lysiert wird.

**Tabelle 20 Phagentypisierung verschiedener *S. aureus* Überexpressionsstämme für die Glykosylierung der Wandteichonsäuren mit dem Internationalen Phagensatz (100x RTD), sowie jeweils drei ausgewählten Myoviridae und Podoviridae (+ = 0,5 % Xylose). Phagenreaktionen wurden vereinfacht dargestellt (+ = Plaques; L = mindestens semikonfluente Lyse).**

Stamm/ Phage	Siphoviridae																			Myoviridae			Podoviridae					
	29	52	52A	79	80	3A	3C	55	71	6	42E	47	53	54	75	77	83A	84	85	94	96	81	95	K	SK311	812	P68	44
RN4420 $\Delta$ tarS $\Delta$ tarM						+	L			+	+	L		+	+					+		+	L	L	L			
pTtarM						+	L			L	+	L		L	+					L		+	L	L	L			
pTtarM +						+	L			L	+	L		L	+								L	L	L			
pTtarS						+	L			+	+	L		L	+					+		+	L	L	L			
pTtarS +						+	L			+	+	L		L	+					+		+	L	L	L	L	L	L

### 3.4.3.3 Untersuchung der Adsorption von Phagen an ganze Zellen

Die Phagentypisierung hat gezeigt, dass der Stamm *S. aureus* VC40 resistent gegen Siphoviridae ist. Um zu testen, ob die Bakteriophagen tatsächlich nicht mehr an den Stamm adsorbieren, wurde ein

## Ergebnisse

Assay zur Phagen-Adsorptionseffizienz durchgeführt. Dazu wurden die Stämme mit einer definierten Menge an Phagen für 15 min bei 37 °C inkubiert, abzentrifugiert, und anschließend wurde der Überstand auf eine Nährstoff-Agarplatte, die mit *S. aureus* RN4220 bzw. *S. aureus* NCTC8325 inokuliert war, in verschiedenen Verdünnungen aufgetropft. Als Positivkontrolle diente ein Phagenansatz ohne *S. aureus* Zellen. Das Ergebnis ist in Tabelle 21 festgehalten. Lysiert ein Stamm bei der gleichen Verdünnungsstufe wie die Positivkontrolle, dann wurden keine Phagen adsorbiert. Erfolgt stattdessen

**Tabelle 21 Phagenadsorption an die Zellwand verschiedener *S. aureus* Stämme mit drei Siphoviridae (Φ71, Φ53, Φ54), einem Myoviridae (ΦK) und einem Podoviridae (Φ66). Dargestellt ist die letzte Verdünnungsstufe des Überstandes, mit der eine Lyse von *S. aureus* RN4220 bzw. *S. aureus* NCTC8325 zu beobachten war. Als Positivkontrolle diente Puffer mit dem gleichen Volumen an Phagen.**

Stamm/Phage	71	53	54	K	66
Pos. Kontrolle	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>
RN4220Δ <i>mutS</i>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>3</sup>
VC40	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>0</sup>
VC40R	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>3</sup>

eine Lyse nur in einer niedrigeren Verdünnungsstufe, dann hat der Stamm Phagen adsorbiert. Für den Phagen 71 zeigten alle Stämme eine Lyse auf der gleichen Verdünnungsstufe wie die Positivkontrolle. Der Phage lysiert in der Phagentypisierung keinen der beiden VISA-Stämme und zeigt nur wenig Plaque-Bildung in *S. aureus* RN4220Δ*mutS*. Phage 53 und 54 gehören ebenfalls zu den Siphoviridae und zeigen in der Phagenadsorption ein ähnliches Bild. Jedoch liegt *S. aureus* VC40 bei der Adsorption auf dem gleichen Level wie die Positivkontrolle und die beiden anderen Stämme jeweils eine Verdünnungsstufe darunter. Im Unterschied dazu lysiert Phage 53 den Stamm *S. aureus* VC40R in der Phagentypisierung nicht (Tab. 18). Da die Phagen 53 und 54 nur einen Unterschied um eine Verdünnungsstufe zwischen Positivkontrolle und *S. aureus* RN4220Δ*mutS* beziehungsweise *S. aureus* VC40R aufweisen, obwohl es in der Phagentypisierung eine konfluente Lyse gab, ist die Aussagekraft reduziert. Für Phage K zeigt sich eine starke Adsorption an alle drei Stämme, eine Bestätigung der Typisierung (Tab. 18). Der Podovirus Φ66 adsorbiert nur an dem Stamm *S. aureus* VC40, ebenfalls im Einklang mit den vorherigen Experimenten.

### 3.4.3.4 Nachweis des WTA-Glykosylierungsmuster durch NMR-Spektroskopie

Für den Stamm *S. aureus* VC40 wurde eine stark erhöhte Substitution der WTA mit D-GlcNAc festgestellt, sowie eine Aufhebung der Phagentypisierung durch Siphoviridae und stattdessen eine Sensitivität gegenüber Podoviridae. Die Vermutung liegt nahe, dass das Glykosylierungsmuster dieses Stammes von seinem Elternstamm abweicht. Zuerst wurde versucht, die Art der Glykosylierung biochemisch zu

## Ergebnisse

bestimmen. Dazu wurde einerseits Concanavalin A-FITC, welches nur an die  $\alpha$ -GlcNAc der WTA bindet, und andererseits  $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase, welches die  $\beta$ -GlcNAc der WTA abspaltet, ausprobiert, basierend auf Protokollen von Anderson et al., (1978) mit einer Fluoreszenzmessung im Tecan Reader Infinite M Plex und von Natheson et al., (1966) mittels einer Analyse durch das D-Glucosamine Assay Kit. Jedoch war keiner der beiden Versuche erfolgreich. Aus diesem Grund wurden die Wandteichonsäuren der Stämme unter spezielleren Bedingungen aufgereinigt. Dazu wurde eine Übernachtskultur geerntet und die Zellen in 2 M NaCl bei 100 °C aufgeschlossen. Das Lysat wurde

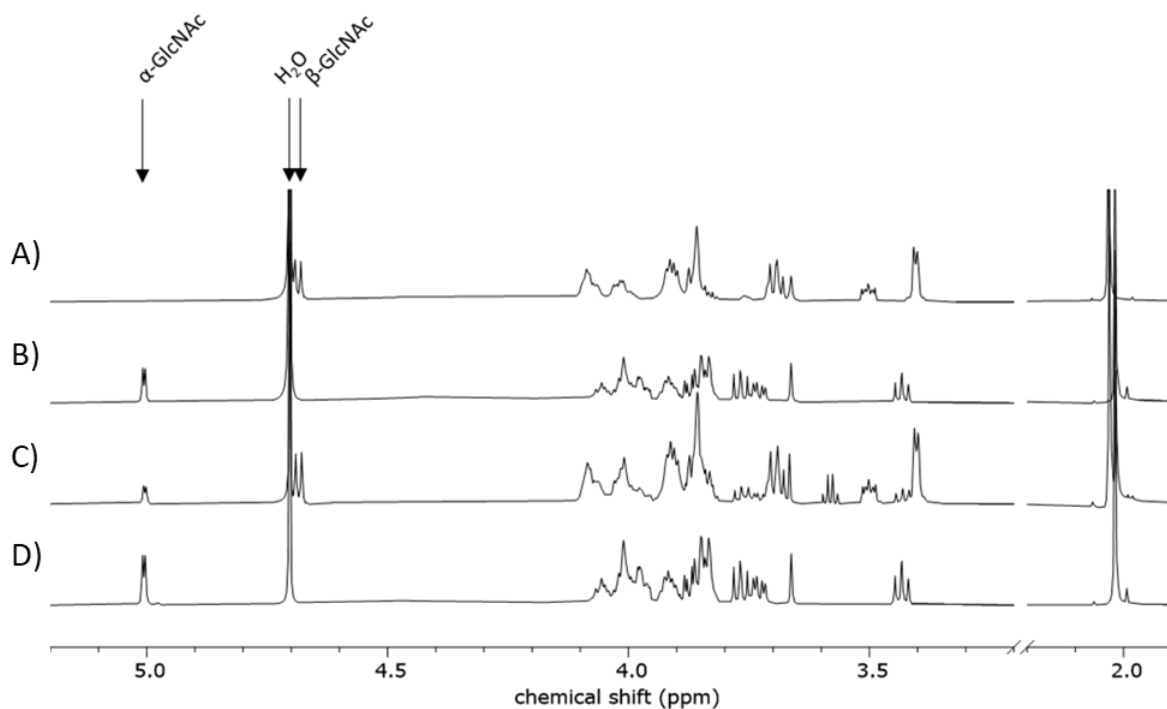


Abbildung 50 Wandteichonsäure-Profil der Stämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ tarM $\Delta$ tarS pTtarS (A), *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (B), *S. aureus* VC40 (C) und *S. aureus* VC40R (D) aufgetrennt im NMR. Die Peaks für das Glykosylierungsmuster und der Wasser-Peak sind markiert.

mehrfach gewaschen und mit SDS und Trypsin von Proteinen befreit. Anschließend wurden die WTA mit Ethanol präzipitiert und mehrfach gefriergetrocknet. Die WTA wurden in D<sub>2</sub>O gelöst und durch eine H-NMR-Spektroskopie analysiert. Ein repräsentatives NMR-Spektrum der Stämme ist in Abbildung 50 dargestellt, wobei für alle Stämme zwei separate Aufreinigungen analysiert wurden. Markiert ist der Wasser-Peak bei 4,7 ppm, sowie der Peak für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glykosylierung bei 5 ppm beziehungsweise 4,68 ppm. Der Stamm *S. aureus* pTtarS (A) dient als Positivkontrolle für die  $\beta$ -Glykosylierung, da dieser Stamm nur *tarS* auf einem induzierbaren Plasmid besitzt. Anhand des Spektrums ist erkennbar, dass die drei Stämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (B), *S. aureus* VC40 (C) und *S. aureus* VC40R (D) alle eine  $\alpha$ -Glykosylierung der WTA zeigen. Zusätzlich hat der Stamm *S. aureus* VC40 ebenfalls  $\beta$ -glykosylierte

## Ergebnisse

Wandteichonsäuren. Vergleicht man die Fläche unter den Peaks, dann besitzt *S. aureus* VC40 dreimal so viel  $\beta$ - wie  $\alpha$ -GlcNAc an den WTA.

Die Ausbildung von  $\beta$ -glykosylierten WTA ist eine Reaktion der Zellen auf Umweltstress. Es konnte gezeigt werden, dass beispielsweise Salzstress zu einem bevorzugten Einbau von  $\beta$ -GlcNAc führte (Mistretta et al., 2019). Zur Überprüfung wurden die WTA aus *S. aureus* VC40R unter Salzstress mit 4 % NaCl aufgereinigt und im H-NMR analysiert. Die Abbildung 51 zeigt klar zwei Peaks, jeweils einen für  $\alpha$ - und einen für  $\beta$ -GlcNAc. Damit ist belegt, dass Salzstress in *S. aureus* VC40R tatsächlich zur Ausbildung von  $\beta$ -glykosylierten WTA führt.

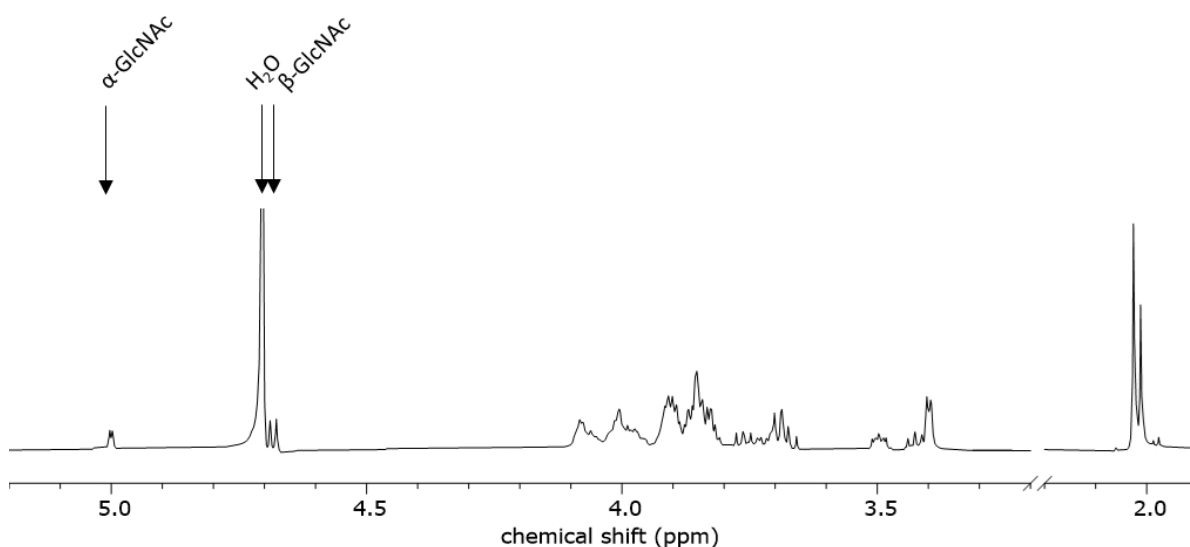


Abbildung 51 Wandteichonsäure-Profil des Stammes *S. aureus* VC40R inkubiert unter Salzstress (4 % NaCl), aufgetrennt im NMR. Die Peaks für das Glykosylierungsmuster und der Wasser-Peak sind markiert.

### 3.4.4 Untersuchung des Glycerol-Gehaltes

Mithilfe des Glycerol- und Phosphat-Gehaltes wurde die Kettenlänge der Wandteichonsäuren aller Stämme berechnet, da jede einzelne Wandteichonsäure aus *S. aureus* über zwei Glycerol-Phosphat-Reste an der Ankerstruktur mit dem Peptidoglykan verbunden ist (Winstel et al., 2014). Dazu wurden die WTA isoliert und die Konzentration an Phosphat und Glycerol basierend auf dem Volumen der Probe gemessen. Der Glycerol-Gehalt wurde mithilfe des Triglyceride Colorimetric Assay Kits von Cayman Chemical bestimmt. Dieser basiert auf der enzymatischen Umsetzung von Glycerol zu Dihydroxyaceton-Phosphat unter Abgabe von Wasserstoffperoxid. Durch  $H_2O_2$  erfolgt dann die Redoxreaktion eines Farbstoffs, der bei einer Wellenlänge von 530-550 gemessen wurde. In Abbildung 52A ist die Kettenlänge der WTA aller Stämme dargestellt. *S. aureus* VC40 besitzt mit 74 Phosphaten

## Ergebnisse

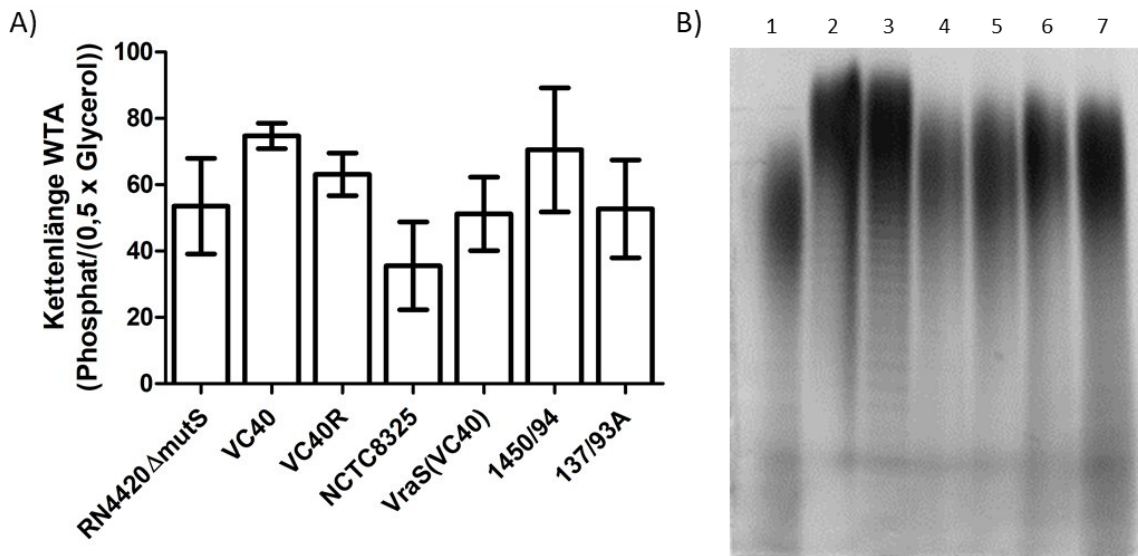


Abbildung 52 A) Berechnete Kettenlänge der Wandteichonsäuren für die verschiedenen *S. aureus* Stämme basierend auf dem Phosphat- und Glycerol-Gehalt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten. B) Native SDS-PAGE der isolierten Wandteichonsäuren, detektiert mit Alcian-Blau und Silberfärbung. 1) *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS; 2) *S. aureus* VC40; 3) *S. aureus* VC40R; 4) *S. aureus* VraS(VC40); 5) *S. aureus* NCTC8325; 6) *S. aureus* 137/93A; 7) *S. aureus* 1450/94.

die längsten Ketten, die jedoch innerhalb der hohen Standardabweichung von *S. aureus* 1450/94 mit 70 Phosphaten liegt. Die Kontrolle *S. aureus* NCTC8325 hat mit 35 Phosphaten die kürzesten Ketten. Aufgrund der großen Standardabweichungen ist kein Unterschied zwischen VSSA- und VISA-Paaren statistisch signifikant. Aus diesem Grund wurden die isolierten WTA auch über die Alcian-Blau SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung angeschaut (Abb. 52B). Alcian-Blau ist ein kationischer Farbstoff, ein Kupfer-Phthalocyanin, welches durch elektrostatische Interaktionen an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Polymerrückgrats der WTA bindet (Carvalho et al., 2012). Der unklar definierte „Schmier“ im Gel signalisiert glykosylierte WTA. Einzelne Banden wie in Spalte 2 und 3 zeigen absteigend eine Kettenlänge von  $n + 1$ . Die stark verkürzten WTA von *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS in Spalte 1 sind möglicherweise auf die *agr*-Mutation zurückzuführen (Meredith et al., 2008), welche in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R kuriert ist. Auch in diesem Bild zeigt sich, dass *S. aureus* VC40 die längsten WTA-Ketten besitzt. Insgesamt gibt es weder zwischen *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R, noch zwischen *S. aureus* NCTC8325 und *S. aureus* VraS(VC40) oder zwischen *S. aureus* 137/93A und *S. aureus* 1450/94 große Unterschiede.

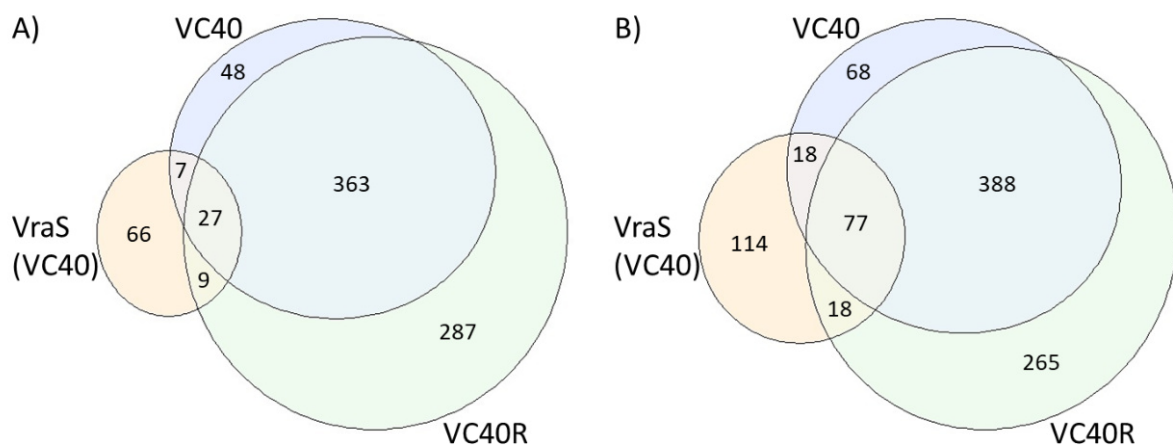
### 3.5 Charakterisierung der Transkription

Die Expression und Gen-Regulation der Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40), sowie der Kontrollstämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS und *S. aureus* NCTC8325, wurden mittels Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierungen (RNA-seq) in Triplikaten analysiert. Die



## Ergebnisse

Analyse der isolierten Gesamt-RNA wurde von der Firma Genewiz in Leipzig durchgeführt. In Abbildung 53 sind die hoch- beziehungsweise runterregulierten Gene der drei VISA-Stämme dargestellt. Als Toleranzgrenze wurde eine Expression  $\geq 2$  für hochregulierte Gene und  $\leq 0,5$  für runterregulierte Gene gewählt. Beide Abbildungen ähneln sich. Einerseits ist zu erkennen, dass es zwischen *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R in beiden Fällen eine große Überschneidung gibt. Beide Stämme haben 49 % der hochregulierten und 46 % der runterregulierten Gene gemeinsam. Des Weiteren ist zu erkennen, dass *S. aureus* VraS(VC40) im Vergleich weniger hoch- beziehungsweise runterregulierte Gene aufweist, als die anderen beiden Stämme. Die größte Veränderung der Genexpression ist bei *S. aureus* VC40R zu finden.



**Abbildung 53** Proportionales Venn-Diagramm der hochregulierten (A) und runterregulierten (B) Gene der Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) basierend auf den RNA-seq Daten (hochreguliert  $\geq 2$ ; runterreguliert  $\leq 0,5$ ). Die Expression der Gene bezieht sich auf den Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS. Für den Stamm *S. aureus* VraS(VC40) wurden alle Gene abgezogen, die im Vergleich zu *S. aureus* NCTC8325, dem Elternstamm, keine veränderte Expression aufwiesen.

*S. aureus* VC40 hat insgesamt 79 Mutationen in 75 verschiedenen Genen akkumuliert. Von diesen Mutationen führten 31 zu einem Aminosäureaustausch, 2 zu einem Abbruch der Translation durch ein Stopcodon, 12 zu einer Insertion einer Base innerhalb eines Gens und 8 zu einer Deletion einer Base innerhalb eines Gens. Dabei sind die essenziellen Gene *walk*, *lexA*, *lysP*, *ssaA*, *glmM*, *dnak*, *prsA* und SAOUHSC\_01866 von nichtsynonymen Mutationen betroffen, basierend auf einer entsprechenden Liste von Chaudhuri et al., (2009). Die Expressionsrate dieser Gene und die jeweiligen Mutationen sind in Tabelle 44 im Anhang dargestellt. Da Mutationen einen positiven oder negativen Einfluss auf die Aktivität des Proteins haben können und Gene einem komplexen Netzwerk an Regulatoren unterliegen, ist es nicht verwunderlich, dass es auch für diese Gene zu einer Über- und Unterexpression in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R kommen kann. Interessanterweise gibt es zwei Gene, SAOUHSC\_01298 und *lytD*, mit zwei beziehungsweise einer Insertion, welche eine hohe Überexpression in den Stämmen aufweisen. Da eine Leserasterverschiebung mit hoher Wahrscheinlichkeit zu

## Ergebnisse

unbrauchbaren Proteinen führt, ist eine Überexpression für den Organismus Ressourcenverschwendung. Das hypothetische Protein SAOUHSC\_01298 ist klein und enthält nur 40 Aminosäuren. Es ist keine Funktion des Proteins bekannt und es wurde nur für *S. aureus* NCTC8325 beschrieben. SAOUHSC\_01298 hat zwei Insertionen und wird in *S. aureus* VC40R 268-fach überexprimiert gegenüber 1,71-fach in *S. aureus* VC40. Damit gehört es für den Stamm zu den Proteinen mit der größten Veränderung in der Expression. Ebenfalls auffällig ist die Expression von *lytD* in *S. aureus* VC40 (6,38) und *S. aureus* VC40R (5,12). Die Insertion führt zu einer Veränderung von circa 90 % des Proteins, zudem kommt es zu einem Stopcodon nach 39 Aminosäuren. LytD ist eine potenzielle N-Acetylglucosaminidase und schneidet Glykanstränge. Zudem ist das Protein involviert in die Proteinsekretion (Chan et al., 2016).

### 3.5.1 Expression des *VraSR*-Regulon

Anhand von DNA-Microarray-Daten der Vancomycin-induzierten Gene einer Kontrolle und einer *S. aureus vraSR*-Deletionsmutante konnte Kuroda et al., (2003) das Regulon des *VraSR*-TCS identifizieren. Die Expressionsraten der Stämme für die Gene des Regulons sind in der folgenden Tabelle 22 aufgelistet, wobei diese absteigend, nach der Expression in *S. aureus* VC40, angeordnet sind. Eine Tabelle, die zusätzlich auch die hypothetischen Gene enthält, ist im Anhang zu finden (Tab. 45). Ein Großteil der Gene ist in allen drei Stämmen hochreguliert. Vor allem *S. aureus VraS*(VC40) zeigt, dass die beiden Mutationen in *vraS* aus *S. aureus* VC40 zu einer erhöhten Aktivität des Proteins und dementsprechend einer höheren Expression des Regulons führen. Viele der Gene des Regulons sind direkt oder indirekt involviert in die Zellwandbiosynthese, wie *sgtB*, *fntA*, *pbp2*, *lytU*, die Synthese von Zellwandpolymeren, wie *ltaS*, *tagA*, *lcpC* oder die Gen- und posttranslationale Regulation, wie *relP*, *ctpA*, *spsA*, *htrA1*, *vraTSR* und *prsA*. Oftmals ist keine genaue Funktion der Gene bekannt. Einige sind jedoch mit Glykopeptid-Resistenz assoziiert, wie *cwrA*, *drp35*, *tcaA* und *tcaB* (Murakami et al., 1999; Maki et al., 2004; Balibar et al., 2010). Mit *relP* und *prsA* sind in diesem Regulon ebenfalls zwei Gene mit Mutationen in *S. aureus* VC40. So ist das PrsA Protein, wichtig für die extrazelluläre Faltung vieler sekretierter Proteine, aufgrund eines Stopcodons nur 51 statt 321 Aminosäuren groß.

**Tabelle 22** RNA-seq Expressionsraten für annotierte Gene (ohne hypothetische Gene) unter der Kontrolle von *VraSR* (Kuroda et al., 2003) der Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus VraS*(VC40). Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* bzw. *S. aureus* NCTC8325 und ist absteigend geordnet, basierend auf der Expression in *S. aureus* VC40 (#NV = nicht vorhanden; schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>cwrA</i>	SAOUHSC_02872	13,79	7,52	18,88
<i>sgtB</i>	SAOUHSC_02012	6,05	5,69	2,57
<i>lytU</i>	SAOUHSC_00174	4,72	2,83	2,00

## Ergebnisse

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>recU</i>	SAOUHSC_01466	3,89	1,15	2,66
<i>opuD1</i>	SAOUHSC_01346	3,80	1,68	0,89
<i>fmtA</i>	SAOUHSC_00998	3,79	5,85	1,85
<i>relP</i>	SAOUHSC_02811	3,39	3,87	1,34
<i>ctpA</i>	SAOUHSC_01427	3,17	4,00	1,03
<i>tcaA</i>	SAOUHSC_02635	2,92	2,17	2,79
<i>pbp2</i>	SAOUHSC_01467	2,75	0,70	3,12
<i>spsA</i>	SAOUHSC_00902	2,50	3,80	2,11
<i>ltaS</i>	SAOUHSC_00728	2,23	2,37	1,02
<i>tagA</i>	SAOUHSC_00640	1,83	2,53	0,48
<i>vraR</i>	SAOUHSC_02098	1,63	1,53	2,30
<i>vraU</i>	SAOUHSC_02101	1,43	1,12	3,09
<i>murZ</i>	SAOUHSC_02365	1,43	1,31	1,34
<i>proP</i>	SAOUHSC_00556	1,27	1,76	0,60
<i>prsA</i>	SAOUHSC_01972	1,26	1,37	3,80
<i>vraS</i>	SAOUHSC_02099	1,25	1,07	2,60
<i>vraT</i>	SAOUHSC_02100	1,12	0,91	2,80
<i>htrA1</i>	SAOUHSC_01838	0,91	0,73	2,21
<i>crr</i>	SAOUHSC_01430	0,85	0,89	2,98
<i>rumA</i>	SAOUHSC_02113	0,78	0,53	5,13
<i>drp35</i>	SAOUHSC_03023	0,71	1,07	1,46
<i>cysJ</i>	SAOUHSC_02947	0,64	0,68	0,89
<i>dinP</i>	SAOUHSC_02111	0,50	0,42	0,88
<i>lcpC</i>	SAOUHSC_02583	0,40	0,26	3,75
<i>copA</i>	SAOUHSC_02873	0,34	0,29	1,55
<i>tcaB</i>	SAOUHSC_02632	#NV	#NV	#NV

In Tabelle 23 ist der Anteil der hoch- beziehungsweise runterregulierten Gene im Regulon gezeigt. Der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) hat 55 % der Gene im Regulon hochreguliert und nur 3 % runterreguliert. In den beiden anderen Stämmen sind jeweils 10 % der Gene runterreguliert und 41 % in *S. aureus* VC40 und 34 % in *S. aureus* VC40R hochreguliert. Da das Regulon normalerweise nur durch Zellwand-Antibiotika hochreguliert wird und für die Proben der RNA-Isolation kein Vancomycin hinzugefügt wurde, sind die hier dargestellten Werte ein Hinweis auf die allgemeine höhere Aktivität des VraSR-TCS. Ein Vergleich der Expressionsraten des Regulons zwischen *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R zeigt, dass *S. aureus* VC40R eine geringere Expression von drei runterregulierten Genen aufweist.

**Tabelle 23** Berechneter prozentualer Anteil an annotierten Genen (ohne hypothetische Gene) die innerhalb des VraSR-TCS (Kuroda et al., 2003) hoch- bzw. runterreguliert sind für die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40).

Stamm	VC40 (%)	VC40R (%)	VraS(VC40) (%)
TCS Gene hochreguliert	41	34	55
TCS Gene runterreguliert	10	10	3
TCS Gene nicht beeinflusst	49	56	42

## 3.5.1.1 Validierung der *vraS*-Expression durch qRT-PCR

Zur Bestätigung der Expressionsraten aus der RNA-seq wurde für die Stämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS*, *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R eine qRT-PCR der Gene *vraS* und *sgtB* basierend auf dem

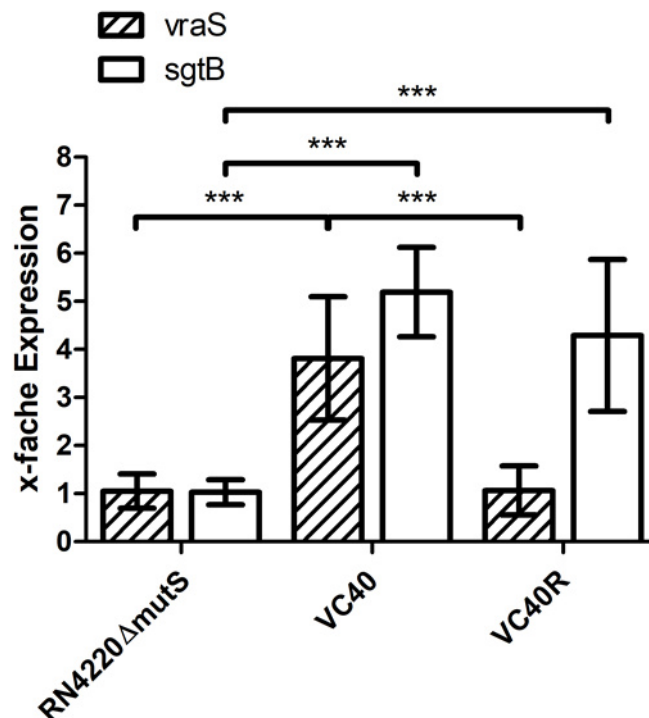


Abbildung 54 qRT-PCR Ergebnisse der x-fachen Expression ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ) für *vraS* und *sgtB* aus *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS*, *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Die Expression der Gene wurde jeweils auf die Expression von *gyrB* der gleichen Probe standardisiert ( $\Delta ct$ ) und dann auf die Expression des Gens aus *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* bezogen ( $\Delta\Delta ct$ ). Dargestellt ist der Mittelwert aus vier biologischen und zwei technischen Replikaten (\*\*\*)  $p < 0,0005$ .

Housekeeping-Gen *gyrB* durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 54 dargestellt. Für den Stamm *S. aureus* VC40 hat *vraS* eine 3,8-fach und *sgtB* eine 5,2-fach höhere Expression im Vergleich zur Kontrolle, beides statistisch signifikant. Der Stamm *S. aureus* VC40R hingegen hat nur eine erhöhte Expression von *sgtB* (4,2). Dies verifiziert die RNA-seq Ergebnisse. Für *S. aureus* VC40 ist die Diskrepanz für *vraS* zwischen RNA-seq und qRT-PCR ebenfalls in den Ergebnissen von Berscheid (2013) im Microarray und der qRT-PCR vorhanden.

## 3.5.2 Expression des WalRK-Regulon

Delaune et al., (2012) stellten eine konstitutiv aktive Form von WalR in *S. aureus* her, durch einen phosphomimetischen Aminosäureaustausch (D55E). Dieser Stamm diente der Aufklärung des Regulons von WalRK durch DNA-Microarray-Analyse. In Tabelle 24 sind die Expressionsraten der Stämme

## Ergebnisse

für dieses Regulon aufgelistet. Zudem ist im Anhang eine Tabelle, inklusive der hypothetischen Gene, zu finden (Tab. 46). Innerhalb des Regulons befinden sich viele Gene, die mit Virulenz assoziiert sind, wie *fnbAB*, *spa*, *icaR*, *emp*, *lyrA*, *coa*, *hla*, *splB*, *splE*, *splF*, *lukH*, *lukG* und *selX*, ebenso wie Gene involviert in die Autolyse (*sceD*, *ssaA*, *isaA*, *lytM*, *atIA* und *sle1*) und Regulation (*walRK*, *saeSR*, *hrcA*, *sarS*, *sarT*, *sarX*). Dabei werden Gene der Virulenz und der Autolyse von dem TCS größtenteils positiv reguliert. In *S. aureus* VC40 wird ein überwiegender Teil der Virulenz-Gene runterreguliert und viele der Autolysine hochreguliert. So sind die am höchsten exprimierten Gene, *sceD* und *ssaA*, zwei Autolysine. Für die Revertante *S. aureus* VC40R ergibt sich ein ähnliches Bild. Der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) hingegen zeigt hochregulierte Virulenz-Gene. Interessanterweise hat dieser Stamm eine starke Expression von *vraX* (216,65). Das *vraX* Gen kodiert für ein Protein, welches das Komplementsystem der klassischen Immunantwort hemmt und mit Zellwand-Antibiotika, wie Vancomycin, assoziiert ist (Yan et al., 2017).

**Tabelle 24** RNA-seq Expressionsraten für annotierte Gene (ohne hypothetische Gene) unter der Kontrolle von WalRK (Delaune et al., 2012) der Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40). Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* bzw. *S. aureus* NCTC8325 und ist absteigend geordnet, basierend auf der Expression in *S. aureus* VC40 (#NV = nicht vorhanden; schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>sceD</i>	SAOUHSC_02333	366,63	293,24	1,57
<i>ssaA</i>	SAOUHSC_02571	42,84	13,20	1,14
<i>sarT</i>	SAOUHSC_02799	23,91	59,85	0,90
<i>isaA</i>	SAOUHSC_02887	16,98	11,69	0,91
<i>cwrA</i>	SAOUHSC_02872	13,79	7,52	18,88
<i>vraX</i>	SAOUHSC_00561	12,60	3,49	216,65
<i>sarS</i>	SAOUHSC_00070	5,82	16,94	0,55
<i>fnbA</i>	SAOUHSC_02803	5,04	0,88	1,52
<i>lytM</i>	SAOUHSC_00248	4,41	1,11	3,09
<i>lyrA</i>	SAOUHSC_02611	4,25	3,67	0,88
<i>fmtA</i>	SAOUHSC_00998	3,79	5,85	1,85
<i>ddh</i>	SAOUHSC_02830	2,73	3,95	1,32
<i>ohr</i>	SAOUHSC_00831	2,44	2,01	0,69
<i>atIA</i>	SAOUHSC_00994	2,31	0,66	1,23
<i>scc</i>	SAOUHSC_01115	2,14	0,50	2,96
<i>opuD2</i>	SAOUHSC_02444	2,03	1,20	1,51
<i>efb</i>	SAOUHSC_01114	1,99	0,40	3,27
<i>mepR</i>	SAOUHSC_00314	1,88	3,32	0,73
<i>selX</i>	SAOUHSC_00354	1,84	3,22	1,11
<i>splC</i>	SAOUHSC_01939	1,69	0,63	1,87
<i>fmtB</i>	SAOUHSC_02404	1,63	1,61	1,59
<i>prmA</i>	SAOUHSC_01681	1,63	1,31	1,26
<i>flr</i>	SAOUHSC_01112	1,63	2,58	1,27
<i>potA</i>	SAOUHSC_01046	1,63	1,60	0,93
<i>hlgA</i>	SAOUHSC_02708	1,59	3,23	1,16
<i>bmrU</i>	SAOUHSC_00736	1,58	1,63	1,22
<i>hrcA</i>	SAOUHSC_01685	1,52	2,45	0,57
<i>secDF</i>	SAOUHSC_01746	1,46	1,11	1,21

## Ergebnisse

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>splE</i>	SAOUHSC_01936	1,40	0,89	1,49
<i>grpE</i>	SAOUHSC_01684	1,39	1,97	0,62
<i>nptA</i>	SAOUHSC_00060	1,38	0,34	1,11
<i>ebpS</i>	SAOUHSC_01501	1,31	1,12	1,35
<i>sdrH</i>	SAOUHSC_02257	1,29	1,01	0,77
<i>proP</i>	SAOUHSC_00556	1,27	1,76	0,60
<i>prsA</i>	SAOUHSC_01972	1,26	1,37	3,80
<i>fnbB</i>	SAOUHSC_02802	1,26	0,43	1,35
<i>saeS</i>	SAOUHSC_00714	1,25	2,49	1,42
<i>sle1</i>	SAOUHSC_00427	1,25	0,75	0,53
<i>splB</i>	SAOUHSC_01941	1,23	0,48	#NV
<i>splF</i>	SAOUHSC_01935	1,22	1,47	0,91
<i>dprA</i>	SAOUHSC_01221	1,20	0,94	1,49
<i>mtlD</i>	SAOUHSC_02403	1,18	1,51	1,12
<i>icaR</i>	SAOUHSC_03001	1,12	3,21	1,37
<i>crtO</i>	SAOUHSC_02882	1,10	1,07	0,56
<i>saeR</i>	SAOUHSC_00715	1,04	2,23	1,43
<i>coa</i>	SAOUHSC_00192	1,01	0,57	1,43
<i>crtP</i>	SAOUHSC_02881	0,97	0,48	0,97
<i>sasG</i>	SAOUHSC_02798	0,97	0,47	2,10
<i>dnal</i>	SAOUHSC_01682	0,97	0,32	1,66
<i>emp</i>	SAOUHSC_00816	0,96	1,34	1,71
<i>vicR (walR; yycF)</i>	SAOUHSC_00020	0,93	0,84	0,88
<i>hlgC</i>	SAOUHSC_02709	0,84	0,94	2,00
<i>splD</i>	SAOUHSC_01938	0,74	0,24	1,27
<i>saeQ</i>	SAOUHSC_00716	0,74	1,67	1,53
<i>vicK (walk; yycG)</i>	SAOUHSC_00021	0,70	0,32	1,25
<i>splA</i>	SAOUHSC_01942	0,63	0,55	1,39
<i>ausA</i>	SAOUHSC_00144	0,60	0,31	1,93
<i>radA</i>	SAOUHSC_00507	0,60	0,52	1,82
<i>glpQ</i>	SAOUHSC_00897	0,57	0,52	0,74
<i>ecb</i>	SAOUHSC_01110	0,57	0,09	1,90
<i>hlgB</i>	SAOUHSC_02710	0,56	0,57	1,64
<i>hxA</i>	SAOUHSC_00553	0,56	0,64	1,00
<i>dinP</i>	SAOUHSC_02111	0,50	0,42	0,88
<i>sbi</i>	SAOUHSC_02706	0,50	0,15	1,40
<i>pyrE</i>	SAOUHSC_01172	0,43	1,12	2,56
<i>clpB</i>	SAOUHSC_00912	0,39	0,97	0,47
<i>carB (pyrAB)</i>	SAOUHSC_01170	0,38	0,49	4,71
<i>pyrF</i>	SAOUHSC_01171	0,37	0,57	4,13
<i>saeP</i>	SAOUHSC_00717	0,36	0,14	3,91
<i>gehB</i>	SAOUHSC_00300	0,33	0,12	1,20
<i>carA (pyrAA)</i>	SAOUHSC_01169	0,30	0,39	5,34
<i>clpC</i>	SAOUHSC_00505	0,29	0,27	1,12
<i>hla</i>	SAOUHSC_01121	0,29	0,17	2,25
<i>pyrC</i>	SAOUHSC_01168	0,24	0,56	6,52
<i>mcsA</i>	SAOUHSC_00503	0,19	0,24	0,72
<i>set (ssl11)</i>	SAOUHSC_00399	0,18	0,29	2,45
<i>pyrB</i>	SAOUHSC_01166	0,16	0,85	5,72

## Ergebnisse

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>alsS (budB)</i>	SAOUHSC_02468	0,14	0,24	0,12
<i>sdrD</i>	SAOUHSC_00545	0,13	0,22	0,20
<i>lukG</i>	SAOUHSC_02241	0,10	0,15	2,78
<i>lukH</i>	SAOUHSC_02243	0,08	0,11	2,42
<i>sarX</i>	SAOUHSC_00674	0,07	0,09	0,25
<i>spa</i>	SAOUHSC_00069	0,03	0,09	0,40
<i>pflA</i>	SAOUHSC_00188	0,02	0,03	0,80
<i>ilvA1</i>	SAOUHSC_01451	0,01	0,02	0,46
<i>sasD</i>	SAOUHSC_00094	0,01	0,04	0,52
<i>scn</i>	SAOUHSC_02167	#NV	#NV	0,72
<i>vwb</i>	SAOUHSC_00814	#NV	#NV	#NV
<i>chp</i>	SAOUHSC_02169	#NV	#NV	#NV

Die Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R haben eine Mutation in *walk*, die zu einer starken Reduktion der Autophosphorylierung der Histidin-Kinase führt (Kienemund, 2016). In beiden Stämmen ist das TCS eher runterreguliert, wobei es keine starke Tendenz gibt (Tab. 25). Zudem gibt es auch andere regulatorische Systeme, die Gene aus diesem Regulon beeinflussen. So sind beispielsweise 28 der 91 Gene auch durch *VraSR* oder *GraSR* reguliert, beides TCS, die bei Zellwandschäden aktiviert werden. In *S. aureus* *VraS(VC40)* ist das TCS eher hochreguliert, wobei der Großteil der Gene nicht beeinflusst ist. Im Gegensatz zu Tabelle 23 für *VraSR*, werden Gene durch *WalkR* sowohl positiv als auch negativ reguliert. Dementsprechend bedeutet ein hochreguliertes TCS, dass positiv regulierte Gene hochreguliert und negativ regulierte Gene runterreguliert sind. Werden nur solche Gene als Grundlage verwendet, welche eine Consensus-Sequenz für *WalR* (5'-TGTWAH-N5-TGTWAH-3') besitzen (*sceD*, *ssaA*, *lytM*, *isaA*, *atIA*, *ebpS*, *sdrD*, SAOUHSC\_00671, SAOUHSC\_00773, SAOUHSC\_02576, SAOUHSC\_02883), basierend auf Dubrac et al., (2008), dann ist das TCS in *S. aureus* VC40 (82 % hochreguliert) und *S. aureus* VC40R (64 % hochreguliert) hochreguliert und in *S. aureus* *VraS(VC40)* (18 % hochreguliert) unverändert (vgl. Tab. 49).

**Tabelle 25** Berechneter prozentualer Anteil an annotierten Genen (ohne hypothetische Gene) die innerhalb des *WalR*-Regulon (Delaune et al., 2012) für eine Hoch- bzw. Runterregulierung des TCS sprechen, für die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* *VraS(VC40)*.

Stamm	VC40 (%)	VC40R (%)	VraS(VC40) (%)
TCS hochreguliert	18	23	23
TCS runterreguliert	26	33	4
TCS nicht beeinflusst	56	44	73

### 3.5.3 Expression der Gene involviert in die Autolyse

Die Autolyse in Bakterien ist ein komplexes System, welches genau abgestimmt ist auf die äußeren Bedingungen und die Wachstumsphase des Bakteriums. In *S. aureus* wird die Autolyse neben dem

## Ergebnisse

WalRK-TCS auch durch das Zweikomponenten-System ArlSR reguliert (Fournier und Hooper, 2000). In den Stämmen ist die Expression von *arlSR* nicht verändert. Die RNA-seq-Daten zeigen, dass sowohl in *S. aureus* VC40 als auch *S. aureus* VC40R fast alle Autolysine hochreguliert sind (Tab. 26). Einige davon demonstrieren eine starke Expression im Vergleich zur Kontrolle *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS*. So ist *lytU* und *lytM* 4-fach, *lytD* 6-fach, *isaA* 16-fach, *ssaA* 42-fach und *sceD* sogar 366-fach überexprimiert in *S. aureus* VC40. Interessanterweise ist das Hauptautolysin von *Staphylococcus aureus*, *atlA*, in *S. aureus* VC40 nur 2,3-fach hochreguliert, nicht jedoch in *S. aureus* VC40R. Der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) zeigt nur für zwei Autolysine eine erhöhte Expression, *lytU* (2-fach) und *lytM* (3-fach).

**Tabelle 26** RNA-seq Expressionsraten für Gene involviert in die Autolyse für die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40). Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* bzw. *S. aureus* NCTC8325 und ist nach gene locus tag geordnet (schwarz = hochreguliert).

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>lytU</i>	SAOUHSC_00174	4,72	2,83	2,00
<i>lytM</i>	SAOUHSC_00248	4,41	1,11	3,09
<i>sle1</i>	SAOUHSC_00427	1,25	0,75	0,53
Hypo. Protein	SAOUHSC_00671	8,32	4,35	1,57
Hypo. Protein	SAOUHSC_00773	3,45	3,35	1,08
<i>atlA</i>	SAOUHSC_00994	2,31	0,66	1,23
<i>lytN</i>	SAOUHSC_01219	2,97	8,51	0,87
<i>lytH</i>	SAOUHSC_01739	1,72	1,59	0,96
<i>lytD (sagB)</i>	SAOUHSC_01895	6,38	5,12	0,69
<i>sceD</i>	SAOUHSC_02333	366,63	293,24	1,57
<i>ssaA</i>	SAOUHSC_02571	42,84	13,20	1,14
<i>sagA</i>	SAOUHSC_02580	0,67	1,56	1,32
<i>ssaA2</i>	SAOUHSC_02883	9,61	4,19	0,72
<i>isaA</i>	SAOUHSC_02887	16,98	11,69	0,91
<i>scaH</i>	SAOUHSC_02979	0,76	0,83	1,50

### 3.5.4 Expression der Gene involviert in die WTA-Biosynthese

Die WTA-Biosynthese ist in der Einleitung erklärt. Zuerst synthetisieren TagO, TagA und MnaA den Anker aus C55P mit N-Acetylglucosamin und N-Acetylmannosamin. Durch TagD, TagB und TarF werden die Glycerol-Phosphat-Einheiten angehängen. Darauf folgt die Synthese der Ribitol-Phosphat-Einheiten durch TarI, TarJ und TarL. Schließlich werden die Ribitol-Phosphat-Einheiten durch TarM und TarS mit N-Acetylglucosamin dekoriert. Die fertige WTA wird dann durch TagG und TagH über die Membran transportiert und von LcpA, LcpB und LcpC am Peptidoglykan befestigt. Anschließend erfolgt die D-Alanylierung der WTA durch DltA, DltB, DltC und DltD. TagX ist eine putative Glykosyltransferase im selben Gencluster wie die anderen *tag*-Gene. Die Gene *tarI'*, *tarJ'* und *tarL'* besitzen eine hohe Similarität zu den entsprechenden Genen ohne Apostroph im Namen (Xia et al., 2010a; Winstel et al.,



## Ergebnisse

2013). Auffällig ist zum einen der große Unterschied in der Expression des *dltABCD*-Operons zwischen *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Damit bestätigt die Expressionsrate dieser Gene die berechnete D-Alanylierung der WTA. Interessanterweise ist in beiden Stämmen jeweils ein Gen (*mnaA*), welches am Anfang der WTA Anker-Synthese tätig ist, und ein Gen (*lcpC*), welches die WTA am Ende an das PGN befestigt, runterreguliert. Beide Gene sind in *S. aureus* VraS(VC40) wiederum hochreguliert. Wichtig für das Glykosylierungsmuster der WTA sind die Gene *tarM* ( $\alpha$ -Glykosylierung) und *tarS* ( $\beta$ -Glykosylierung). In allen drei Stämmen hat *tarS* eine unveränderte Expression, obwohl das NMR-Spektrum von *S. aureus* VC40 vermehrt  $\beta$ -glykosylierte WTA zeigte und auch *S. aureus* VraS(VC40) in der Phagentypisierung von Podoviridae lysiert wurde, welche nur  $\beta$ -glykosylierte WTA erkennen. Im Gegensatz dazu ist *tarM* in *S. aureus* VC40R hochreguliert, in *S. aureus* VC40 unverändert und in *S. aureus* VraS(VC40) runterreguliert. Es ist also möglich, dass für *S. aureus* VC40R, die Expression von *tarM* maßgeblich für das Glykosylierungsmuster verantwortlich ist. Zuvor konnte in einem Microarray eine erhöhte Expression von *tarS* und eine geringere Expression von *tarM* in *S. aureus* VC40 nachgewiesen werden (Berscheid, 2013).

**Tabelle 27 RNA-seq Expressionsraten für Gene involviert in die Wandteichonsäure-Biosynthese für die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40). Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS bzw. *S. aureus* NCTC8325 und ist nach gene locus tag geordnet (#NV = nicht vorhanden; schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).**

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>tarI'</i>	SAOUHSC_00220	0,25	0,23	0,80
<i>tarJ'</i>	SAOUHSC_00221	0,24	0,19	0,91
<i>tarL'</i>	SAOUHSC_00222	0,31	0,39	0,87
<i>tarF</i>	SAOUHSC_00223	2,43	1,22	1,15
<i>tarI</i>	SAOUHSC_00225	#NV	#NV	#NV
<i>tarJ</i>	SAOUHSC_00226	1,36	0,91	1,43
<i>tarL</i>	SAOUHSC_00227	1,14	0,57	1,43
<i>tarS</i>	SAOUHSC_00228	1,29	1,10	1,05
<i>tagA</i>	SAOUHSC_00640	1,83	2,53	0,48
<i>tagH</i>	SAOUHSC_00641	0,97	1,62	0,66
<i>tagG</i>	SAOUHSC_00642	0,97	1,62	0,74
<i>tagB</i>	SAOUHSC_00643	0,69	1,01	1,07
<i>tagX</i>	SAOUHSC_00644	1,01	1,73	1,02
<i>tagD</i>	SAOUHSC_00645	1,52	2,51	0,76
<i>tagO</i>	SAOUHSC_00762	1,12	1,21	0,93
<i>dltA</i>	SAOUHSC_00869	3,10	0,34	1,05
<i>dltB</i>	SAOUHSC_00870	2,54	0,31	1,08
<i>dltC</i>	SAOUHSC_00871	2,44	0,28	1,11
<i>dltD</i>	SAOUHSC_00872	2,69	0,32	0,98
<i>tarM</i>	SAOUHSC_00973	1,18	4,97	0,13
<i>cpsA (lcpB)</i>	SAOUHSC_00997	1,38	1,20	1,49
<i>msrR (lcpA)</i>	SAOUHSC_01361	1,52	2,40	1,05
<i>mnaA</i>	SAOUHSC_02352	0,48	0,23	2,18
<i>lcpC</i>	SAOUHSC_02583	0,40	0,26	3,75

### 3.5.5 Expression der Gene involviert in die Zellwand-Biosynthese

Innerhalb der Zellwand-Biosynthese wird der UDP-MurNAc-Pentapeptid-Präkursor durch GlmS, GlmM, GlmU, MurA (MurZ), MurB, MurC, MurD, MurE und MurF hergestellt. Danach katalysiert MraY die Bildung von Lipid I durch den Präkursor und C<sub>55</sub>-P. Es folgt die Synthese von Lipid II durch MurG und die Modifizierung mit Glycin durch FemX, FemA und FemB. MurT und GatD amidieren das Lipid II, welches durch FtsW und RodA über die Membran transportiert wird. Mithilfe der Penicillin-bindenden-Proteine PBP1, PBP2, PBP3 und PBP4, sowie anderer Enzyme, wie SgtB, wird Lipid II durch Transglykosylase- und Transpeptidase-Reaktionen in das PGN eingebaut. Der Lipidcarrier wird durch UppP recycelt (Vollmer et al., 2008a; Pinho et al., 2013; Caveney et al., 2018). Viele der Gene der Zellwand-Biosynthese sind hoch- oder runterreguliert in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R, im Vergleich zum Elternstamm *S. aureus* RN4220Δ*mutS* (Tab. 28). Beispielsweise sind die Gene *glmS* und *glmU* runterreguliert. Zusammen mit *glmM*, welches in beiden Stämmen mutiert und weder hoch- noch runterreguliert ist, kodieren diese Gene für Proteine, die Fruktose-6-Phosphat zu UDP-GlcNAc umbauen. Daneben sind auch Gene für die Ausbildung der Interpeptidbrücke in beiden Stämmen runterreguliert. Stärker exprimiert sind hingegen Gene für das Recyclen des Lipidcarriers (*uppP*), Gene beteiligt an dem Transfer über die Membran (*ftsW*) und viele Transglykosylasen (*pbp2*, *pbp3* *pbp4*, *sgtB*), vor allem in *S. aureus* VC40. Obwohl *pbp4* in *S. aureus* VC40 hochreguliert ist, zeigt der Stamm eine geringe Quervernetzung des Peptidoglykan. Generell sind in *S. aureus* VC40R mehr Gene runterreguliert. *S. aureus* VraS(VC40) zeigt wenig Differenz in der Expression von Zellwand-Biosynthese-Genen im Vergleich zum Elternstamm *S. aureus* NCTC8325.

**Tabelle 28** RNA-seq Expressionsraten für Gene involviert in die Zellwand-Biosynthese für die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40). Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220Δ*mutS* bzw. *S. aureus* NCTC8325 und ist nach gene locus tag geordnet (schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>glmU</i>	SAOUHSC_00471	0,2	0,1	1,77
<i>pbp4</i>	SAOUHSC_00646	2,39	1,46	0,97
<i>uppP</i>	SAOUHSC_00691	3,14	3,55	1,23
<i>murB</i>	SAOUHSC_00752	0,76	0,49	1,26
<i>murE</i>	SAOUHSC_00954	1,12	0,88	0,81
<i>ftsW</i>	SAOUHSC_01063	2,19	3,19	0,78
<i>pbp1</i>	SAOUHSC_01145	0,93	0,95	0,87
<i>mraY</i>	SAOUHSC_01146	0,63	0,46	0,79
<i>murD</i>	SAOUHSC_01147	0,57	0,31	1,08
<i>femA</i>	SAOUHSC_01373	0,38	0,34	0,71
<i>femB</i>	SAOUHSC_01374	0,45	0,41	0,95
<i>murG</i>	SAOUHSC_01424	1,05	0,57	1,29
<i>pbp2</i>	SAOUHSC_01467	2,75	0,70	3,12
<i>pbp3</i>	SAOUHSC_01652	0,63	0,42	1,39
<i>murC</i>	SAOUHSC_01856	2,32	3,56	0,82

## Ergebnisse

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>sgtB</i>	SAOUHSC_02012	6,05	5,69	2,57
<i>gatD</i>	SAOUHSC_02106	2,15	2,80	0,93
<i>murT</i>	SAOUHSC_02107	1,93	2,32	0,89
<i>murF</i>	SAOUHSC_02317	0,50	0,47	1,31
<i>rodA</i>	SAOUHSC_02319	1,12	1,26	0,77
<i>murA</i>	SAOUHSC_02337	0,98	0,54	1,35
<i>murZ</i>	SAOUHSC_02365	1,43	1,31	1,34
<i>glmS</i>	SAOUHSC_02399	0,27	0,22	4,62
<i>glmM</i>	SAOUHSC_02405	1,48	1,95	0,78
<i>femX</i>	SAOUHSC_02527	0,71	0,69	0,95

### 3.5.6 Expression der Gene involviert in die Virulenz

Virulenzfaktoren sind strukturelle Eigenschaften und produzierte Moleküle, die die Pathogenität und Infektiosität eines Bakteriums bestimmen. Dazu gehört unter anderem die Adhäsion an Zellen, die Immunevasion, die Toxin-Bildung, die Invasion von Zellen, die Persistenz und die Resistenz gegen Antibiotika (Bhakdi et al 2009). In der folgenden Tabelle 29 ist eine Auswahl an Virulenz-Genen und deren Regulatoren aufgelistet. Dabei zeigt sich, dass in *S. aureus* VC40R, viele Bindeproteine für Zellstoffe, wie Fibrinogen und Fibronectin, runterreguliert sind. Im Unterschied dazu sind in *S. aureus* VC40 einige Bindeproteine hochreguliert, wie *clfA*, *scc* und *fnbA*. Das Protein A (*spa*), welches an die Fc-Region von Immunglobulinen bindet und so die Immunantwort hemmt, ist in allen drei Stämmen runterreguliert, am stärksten in *S. aureus* VC40. Ebenfalls runterreguliert in allen Stämmen sind Gene der Biofilm-Produktion (*icaADBC*). In *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R ist auch die Expression von fast allen Genen der Kapsel-Produktion (*capABCDEFGHIJKLMNO*) gehemmt. Die Kapsel-Biosynthese ist in *S. aureus* stark abhängig von der Wachstumsphase und wird posttranskriptionell reguliert, selbst bei einer konstitutiven Expression des *cap*-Operons (Keinhörster et al., 2019b). Das Gen *lyrA*, verantwortlich für eine erhöhte Lysostaphin-Resistenz und ein negativer Regulator für Gene des WalRK-Regulons (Gründling et al., 2006a; Poupel et al., 2018), ist in beiden Stämmen hochreguliert. Beide Stämme zeigten in vorherigen Experimenten auch eine geringere Lyse durch Lysostaphin (Berscheid, 2013). Neben dem Abbau von Proteinen sind einige Proteasen auch an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt. In *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R sind einige Proteasen hochreguliert (*spsA*, *spsB*, *ctpA*), andere wiederum runterreguliert (*sspC*, *sspB*, *sspA*, *aur*). Die Expression von Genen der Staphyloxanthin-Biosynthese ist hauptsächlich nur in *S. aureus* VC40R runterreguliert. In der Analyse des Carotinoid-Gehaltes zeigen beide Stämme, *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R, einen geringeren Gehalt als der Elternstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* (Abb. 56). Viele Toxine, vor allem Enterotoxine, sind hingegen in beiden Stämmen hochreguliert. Vor allem die Phenol-löslichen Moduline (*psmB1*, *psmB2*) haben eine Expressionsrate von über 10 in *S. aureus* VC40 im

## Ergebnisse

Vergleich zum WT. Des Weiteren sind Gene, welche in das Typ VII Sekretionssystem involviert sind (*esxABCD*, *esaABE*, *essABC*), in allen Stämmen stark runterreguliert. Neben den Virulenz-Genen sind auch die Expressionsraten der acht relevanten Regulatoren aufgezeigt. Der accessory gene regulator (*agr*) ist verantwortlich für das Quorum-sensing und hemmt den *rot*-Repressor. Dieser Repressor ist für die Hemmung von Toxinen und Proteasen zuständig. SigB ist ein Sigma Faktor und hemmt die *agr*-Aktivität (Thoendel et al., 2011). Das Zweikomponentensystem ArIRS ist involviert in die Regulation der Autolyse, der Protease-Expression und der Adhäsion. Es hemmt *agr* und aktiviert *mgrA* (Fournier und Hooper, 2000; Crosby et al., 2020). Der globaler Regulator MgrA ist zuständig für Gene der Kapsel-Biosynthese, Efflux-Pumpen und die Regulation einer Vielzahl von anderen Regulator-Genen, beispielsweise *sarA* (Ballal et al., 2009; Crosby et al., 2020). SarA ist ein Regulator für Exoproteine und hemmt die Expression von *spa* (Novick, 2013). SaeSR ist wichtig für die Regulierung von Exoproteinen, wie Toxinen, und ein Teil der regulatorischen Aktivität wird möglicherweise durch Agr und WalRK beeinflusst (Liu et al., 2016b; Rapun-Araiz et al., 2020). Das SrrAB-TCS reagiert auf den externen Sauerstoffgehalt und induziert die Biofilm-Formation (Jenul und Horswill, 2019). In *S. aureus* VraS(VC40) sind alle vier *agr*-Gene runterreguliert, alle anderen Regulatoren sind unverändert exprimiert im Vergleich zum Wildtyp *S. aureus* NCTC8325. Dagegen sind in *S. aureus* VC40 der staphylococcal accessory regulator (*sarA*) und *rot* hochreguliert und *srrB* runterreguliert. Zusätzlich zu diesen Genen ist in *S. aureus* VC40R auch das *saeSR*-TCS hochreguliert.

**Tabelle 29** RNA-seq Expressionsraten für Gene involviert in die Virulenz für die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40). Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* bzw. *S. aureus* NCTC8325 und ist nach Funktion geordnet (#NV = nicht vorhanden; schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>chp</i>	Bindeprotein (chemotaxis inhibiting protein)	SAOUHSC_02169	#NV	#NV	#NV
<i>clfA</i>	Bindeprotein (clumping factor)	SAOUHSC_00812	5,6	0,99	1,75
<i>clfB</i>	Bindeprotein (clumping factor)	SAOUHSC_02963	0,64	0,28	1,7
<i>ebpS</i>	Bindeprotein (elastin binding protein)	SAOUHSC_01501	1,31	1,12	1,35
<i>ecb</i>	Bindeprotein (fibrinogen binding protein)	SAOUHSC_01110	0,57	0,09	1,90
<i>efb</i>	Bindeprotein (fibrinogen binding protein)	SAOUHSC_01114	1,99	0,40	3,27
<i>scc</i>	Bindeprotein (fibrinogen binding protein)	SAOUHSC_01115	2,14	0,50	2,96
Hypo. Protein	Bindeprotein (fibrinogen binding protein)	SAOUHSC_01175	1,68	1,94	0,92
Hypo. Protein	Bindeprotein (fibronectin binding protein)	SAOUHSC_01175	1,68	1,94	0,92
<i>fnbB</i>	Bindeprotein (fibronectin binding protein)	SAOUHSC_02802	1,26	0,43	1,35
<i>fnbA</i>	Bindeprotein (fibronectin binding protein)	SAOUHSC_02803	5,04	0,88	1,52

## Ergebnisse

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>sbi</i>	Bindeprotein (immunoglobulin binding protein)	SAOUHSC_02706	0,50	0,15	1,40
<i>emp</i>	Bindeprotein (matrix binding protein)	SAOUHSC_00816	0,96	1,34	1,71
<i>scn</i>	Bindeprotein (staphylococcal complement inhibitor)	SAOUHSC_02167	#NV	#NV	#NV
<i>spa</i>	Bindeprotein (staphylococcal protein A)	SAOUHSC_00069	0,03	0,09	0,40
<i>icaR</i>	Biofilm	SAOUHSC_03001	1,12	3,21	1,37
<i>icaA</i>	Biofilm	SAOUHSC_03002	0,01	0,01	0,03
<i>icaD</i>	Biofilm	SAOUHSC_03003	0,02	0,02	0,06
<i>icaB</i>	Biofilm	SAOUHSC_03004	0,12	0,17	0,13
<i>icaC</i>	Biofilm	SAOUHSC_03005	0,33	0,51	0,19
<i>hysA</i>	Hydrolase (Hyaluronidase)	SAOUHSC_02463	0,25	0,25	1,04
<i>gehB</i>	Hydrolase (Lipase)	SAOUHSC_00300	0,33	0,12	1,20
<i>gehA</i>	Hydrolase (Lipase)	SAOUHSC_03006	1,90	2,93	1,60
<i>sak</i>	Hydrolase (Staphylokinase)	SAOUHSC_02171	#NV	#NV	#NV
<i>capA</i>	Kapsel	SAOUHSC_00114	0,27	0,12	0,50
<i>capB</i>	Kapsel	SAOUHSC_00115	0,27	0,21	0,75
<i>capC</i>	Kapsel	SAOUHSC_00116	0,21	0,17	0,94
<i>capD</i>	Kapsel	SAOUHSC_00117	0,13	0,05	1,00
<i>capE</i>	Kapsel	SAOUHSC_00118	0,21	0,11	1,02
<i>capF</i>	Kapsel	SAOUHSC_00119	0,20	0,20	1,14
<i>capG</i>	Kapsel	SAOUHSC_00120	0,17	0,06	1,09
<i>capH</i>	Kapsel	SAOUHSC_00121	0,23	0,18	1,06
<i>capI</i>	Kapsel	SAOUHSC_00122	0,51	0,50	0,85
<i>capJ</i>	Kapsel	SAOUHSC_00123	0,37	0,42	0,80
<i>capK</i>	Kapsel	SAOUHSC_00124	0,38	0,50	0,69
<i>capL</i>	Kapsel	SAOUHSC_00125	0,43	0,45	0,89
<i>capM</i>	Kapsel	SAOUHSC_00126	0,34	0,23	1,13
<i>capN</i>	Kapsel	SAOUHSC_00127	0,34	0,26	0,96
<i>capO</i>	Kapsel	SAOUHSC_00128	0,40	0,33	1,05
<i>capP</i>	Kapsel	SAOUHSC_00129	0,94	0,98	0,91
<i>cap1C</i>	Kapsel	SAOUHSC_02998	1,72	2,02	0,68
<i>cap1B</i>	Kapsel	SAOUHSC_02999	0,87	0,86	0,68
<i>cap1A</i>	Kapsel	SAOUHSC_03000	1,65	2,95	0,27
<i>coa</i>	Koagulase	SAOUHSC_00192	1,01	0,57	1,43
<i>vwb</i>	Koagulase	SAOUHSC_00814	#NV	#NV	#NV
<i>lyrA</i>	Lysostaphin-Resistenzprotein	SAOUHSC_02611	4,25	3,67	0,88
<i>sdrc</i>	MSCRAMM	SAOUHSC_00544	0,10	0,23	0,10
<i>sdrd</i>	MSCRAMM	SAOUHSC_00545	0,13	0,22	0,20
<i>sdrH</i>	MSCRAMM	SAOUHSC_02257	1,29	1,01	0,77
<i>spsA</i>	Protease	SAOUHSC_00902	2,50	3,80	2,11
<i>spsB</i>	Protease	SAOUHSC_00903	3,39	4,93	1,51
<i>sspC</i>	Protease	SAOUHSC_00986	0,27	0,28	1,46
<i>sspB</i>	Protease	SAOUHSC_00987	0,16	0,16	1,70
<i>sspA</i>	Protease	SAOUHSC_00988	0,09	0,03	1,87
<i>ctpA</i>	Protease	SAOUHSC_01427	3,17	4,00	1,03
<i>htrA1</i>	Protease	SAOUHSC_01838	0,91	0,73	2,21
<i>spIF</i>	Protease	SAOUHSC_01935	1,22	1,47	0,91
<i>spIE</i>	Protease	SAOUHSC_01936	1,40	0,89	1,49

## Ergebnisse

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>spID</i>	Protease	SAOUHSC_01938	0,74	0,24	1,27
<i>spIC</i>	Protease	SAOUHSC_01939	1,69	0,63	1,87
<i>spIB</i>	Protease	SAOUHSC_01941	1,23	0,48	#NV
<i>spIA</i>	Protease	SAOUHSC_01942	0,63	0,55	1,39
<i>aur</i>	Protease	SAOUHSC_02971	0,03	0,03	0,61
<i>aldH</i>	Staphyloxanthin-Biosynthese	SAOUHSC_02142	0,79	0,49	1,67
<i>crtN</i>	Staphyloxanthin-Biosynthese	SAOUHSC_02877	0,69	0,50	1,09
<i>crtM</i>	Staphyloxanthin-Biosynthese	SAOUHSC_02879	0,45	0,24	1,14
<i>crtQ</i>	Staphyloxanthin-Biosynthese	SAOUHSC_02880	0,80	0,26	1,31
<i>crtP</i>	Staphyloxanthin-Biosynthese	SAOUHSC_02881	0,97	0,48	0,97
<i>crtO</i>	Staphyloxanthin-Biosynthese	SAOUHSC_02882	1,10	1,07	0,56
<i>selX</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00354	1,84	3,22	1,11
<i>ssl1</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00383	1,09	1,7	0,66
<i>ssl2</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00384	1,26	2,03	0,75
<i>ssl3</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00386	1,48	2,08	1,84
<i>ssl4</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00389	1,70	1,97	0,84
<i>ssl5</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00390	2,15	4,4	0,94
<i>ssl6</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00391	2,11	4,83	1,12
<i>ssl7</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00392	4,16	5,95	0,67
<i>ssl8</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00393	1,41	2,31	0,8
<i>ssl9</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00394	2,39	3,84	0,83
<i>ssl9</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00394	2,39	3,84	0,83
<i>ssl10</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00395	1,73	3,44	0,71
<i>ssl11</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_00399	0,18	0,29	2,45
Hypo. Prot.	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_01705	1,47	2,66	0,59
<i>epiD</i>	Toxin (Enterotoxin)	SAOUHSC_01950	0,46	0,37	1,85
<i>eta</i>	Toxin (Exfoliativtoxin)	SAOUHSC_01133	0,77	0,71	1,26
<i>ssl12</i>	Toxin (Exotoxin)	SAOUHSC_01124	1,6	1,89	1,67
<i>ssl13</i>	Toxin (Exotoxin)	SAOUHSC_01125	1,76	2,22	0,93
<i>ssl14</i>	Toxin (Exotoxin)	SAOUHSC_01127	2,69	2,85	1,18
<i>hla</i>	Toxin (Hemolysin)	SAOUHSC_01121	0,29	0,17	2,25
<i>hIb1</i>	Toxin (Hemolysin)	SAOUHSC_02163	#NV	#NV	#NV
<i>hIb2</i>	Toxin (Hemolysin)	SAOUHSC_02240	#NV	#NV	#NV
<i>hId</i>	Toxin (Hemolysin)	SAOUHSC_02260	3,98	0,44	0,01
<i>hIgA</i>	Toxin (Hemolysin)	SAOUHSC_02708	1,59	3,23	1,16
<i>hIgC</i>	Toxin (Hemolysin)	SAOUHSC_02709	0,84	0,94	2,00
<i>hIgB</i>	Toxin (Hemolysin)	SAOUHSC_02710	0,56	0,57	1,64
<i>lukD</i>	Toxin (Leukozidin)	SAOUHSC_01954	0,96	1,01	1,30
<i>lukE</i>	Toxin (Leukozidin)	SAOUHSC_01955	1,64	1,09	1,52
<i>lukG</i>	Toxin (Leukozidin)	SAOUHSC_02241	0,10	0,15	2,78
<i>lukH</i>	Toxin (Leukozidin)	SAOUHSC_02243	0,08	0,11	2,42
<i>psmβ1</i>	Toxin (Phenol soluble modulín)	SAOUHSC_01135	11,75	2,95	0,04
<i>psmβ2</i>	Toxin (Phenol soluble modulín)	SAOUHSC_01136	13,56	5,06	0,06
<i>esxA</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00257	0,11	0,19	0,10
<i>esxA</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00258	0,11	0,18	0,16
<i>essA</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00259	0,12	0,18	0,18
<i>esAB</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00260	0,10	0,12	0,48
<i>essB</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00261	0,05	0,06	0,30
<i>essC</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00262	0,05	0,03	0,47
<i>esxC</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00264	0,08	0,04	0,62

## Ergebnisse

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>esxB</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00265	0,05	0,04	0,50
<i>esaE</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00266	0,06	0,04	0,60
<i>esxD</i>	Typ VII Sekretionssystem	SAOUHSC_00267	0,07	0,04	0,53
<i>codY</i>	Virulenz-Regulation (global transcriptional regulator)	SAOUHSC_01228	0,77	0,60	1,60
<i>agrB</i>	Virulenz-Regulation (accessory gene regulator)	SAOUHSC_02261	1,32	0,77	0,07
<i>agrD</i>	Virulenz-Regulation (accessory gene regulator)	SAOUHSC_02262	1,11	0,69	0,10
<i>agrC</i>	Virulenz-Regulation (accessory gene regulator)	SAOUHSC_02264	1,12	0,72	0,15
<i>agrA</i>	Virulenz-Regulation (accessory gene regulator)	SAOUHSC_02265	1,14	0,94	0,27
<i>arlS</i>	Virulenz-Regulation (autolysis related locus sensor kinase)	SAOUHSC_01419	0,92	1,19	0,80
<i>arlR</i>	Virulenz-Regulation (autolysis related locus regulator)	SAOUHSC_01420	0,82	1,05	0,60
<i>mgrA</i>	Virulenz-Regulation (multiple gene regulator)	SAOUHSC_00694	0,69	0,78	0,74
<i>rot</i>	Virulenz-Regulation (repressor of toxins)	SAOUHSC_01879	3,99	4,13	1,78
<i>sigB</i>	Virulenz-Regulation (Sigma-Faktor B)	SAOUHSC_02298	1,18	1,7	0,53
<i>sarA</i>	Virulenz-Regulation (staphylococcal accessory regulator)	SAOUHSC_00620	3,34	3,69	0,68
<i>srrB</i>	Virulenz-Regulation (Staphylococcal respiratory response sensor kinase)	SAOUHSC_01585	0,40	0,18	1,41
<i>srrA</i>	Virulenz-Regulation (Staphylococcal respiratory response regulator)	SAOUHSC_01586	0,88	0,85	0,96
<i>saeS</i>	Virulenz-Regulation ( <i>Staphylococcus aureus</i> exoprotein sensor kinase)	SAOUHSC_00714	1,25	2,49	1,42
<i>saeR</i>	Virulenz-Regulation ( <i>Staphylococcus aureus</i> exoprotein regulator)	SAOUHSC_00715	1,04	2,23	1,43

### 3.5.7 Expression weiterer Gene

Zusätzlich zu den Genen für Virulenz, Zellwand-Biosynthese, WTA-Biosynthese, Autolyse und dem Regulon von VraSR und WalRK befinden sich im Anhang zwei Tabellen mit stark hoch- (>5-fach) bzw. runterregulierten (<0,2-fach) Genen (Tab. 47, 48). Zu erkennen ist, dass in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R viele Gene im Zusammenhang mit Eisentransport (*sirA*, *fhuC*, *sstA*, *sstB*, *sstC*, *htsA*, *feoA*) hochreguliert sind. Auch der eisenhaltige Elektronenüberträger Ferredoxin (*fer*) ist stark überexprimiert. Ebenfalls hochreguliert in diesen beiden Stämmen sind einige transkriptionelle Regulatoren (*sarS*, *sarY*, *sarT*, *mgqR*, *arcR*), sowie Gene der Betain-Biosynthese (*betA*, *betB*, *cudT*). In *S. aureus* VC40R sind auch Gene der Purin-Biosynthese (*purA*, *purE*, *purK*, *purC*, *purS*, *purD*, *purB*) stark hochreguliert. Dagegen sind in *S. aureus* VraS(VC40) Gene für den ABC-Transporter *opp*, sowie Gene der

Pyrimidine-Biosynthese (*pyrP*, *pyrB*, *pyrC*, *carA*) hochreguliert. Genau diese Gene haben in *S. aureus* VC40 eine sehr geringe Expression. Eine niedrige Expression im Vergleich zum Wildtyp haben in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R ebenfalls Gene involviert in den Kohlehydrat-Metabolismus (*deoB*, *deoC2*, *pflB*, *pflA*, *ldh1*, *rbsD*, *rbsU*, *prs*, *fruB*, *gapA*, *pgk*, *tpiA*, *pgm*, *goxA*, *goxB*, *pdhB*, *pdhC*, *sdhA*, *sucC*, *sucD*, *tkt*, *citB*, *ackA*, *lacA*, *lgo*), in der Aminosäure-Biosynthese (*argJ*, *argC*, *argD*, *metC*, *metN1*, *metN2*, *metP1*, *gltB*, *cysE*, *argG*, *hom*, *trpC*, *trpF*, *dapA*, *dapB*, *ilvB*, *ilvH*, *ilvC*, *ilvA1*, *ald1*, *gcvPA*, *leuA*, *leuB*, *leuC*, *leuS*, *glyA*, *tcyC*, *hisA*, *hisZ*), in der Nitrat-Atmung (*narJ*, *narH*, *narG*, *nasF*, *nasE*, *nasD*, *nirR*, *narK*) und der ATP-Synthese (*atpA*, *atpB*, *atpD*, *atpE*, *atpF*, *atpH*). Der Stamm *S. aureus* VC40R hat ebenfalls einige ribosomale Proteine (*rplM*, *rpsK*, *rpsE*, *rplP*, *rpsS*, *rplB*, *rplW*, *rplD*) runterreguliert. Insgesamt hat der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) nur wenige Gene stark runterreguliert (<0,2), die noch nicht näher erwähnt wurden, unter anderem ein Holin-ähnliches Protein (*cidA*), *lacA* aus dem Kohlehydrat-Metabolismus, *gltB* aus der Aminosäure-Biosynthese und die Azoreduktase *azoR*.

### 3.5.8 Unterschiede in der Gen-Expression zwischen *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R

Der Stamm *S. aureus* VC40R stammt von *S. aureus* VC40 ab und hat 15 weitere Mutationen im Genom. Davon führen 7 zu keiner Veränderung in der Aminosäuresequenz von Proteinen. Unter den restlichen 8 Mutationen mit einem Aminosäureaustausch ist die Mutation M54T in VraR für den Phänotyp am relevantesten. Die Tabelle 30 vergleicht die Expressionsraten der beiden Stämme miteinander. Insgesamt sind 86,2 % aller Gene der beiden Stämme gleich exprimiert, also entweder beide hochreguliert, beide runterreguliert oder beide unverändert. Von den 13,8 % der Gene, die einen Unterschied zwischen den Stämmen aufweisen, sind ein Großteil (95 %) nur geringfügig anders. Einer der Stämme hat demnach eine veränderte Expression, positiv oder negativ, und der andere Stamm entsprechend keine Veränderung zum Wildtyp *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS. Nur insgesamt 17 von 2156 analysierten Genen sind in dem einen Stamm hochreguliert und in dem anderen Stamm runterreguliert. Die Gene mit veränderter Expression der Stufe 2 aus Tabelle 30 sind in Tabelle 31 aufgeschlüsselt. *S. aureus* VC40 hat das *dltABCD*-Operon hochreguliert. Dieses Operon ist verantwortlich für die D-Alanylierung von WTA und LTA (Neuhaus und Baddiley, 2003). Die Expressionsraten bestätigen damit die Experimente zur D-Alanin-Bestimmung und Substitution der WTA. Des Weiteren sind die Gene für zwei Virulenzfaktoren, das delta-Hämolysin *hld* und den Fibrinogen-Bindefaktor *scc* in *S. aureus* VC40 hochreguliert, im Kontrast zu *S. aureus* VC40R. Genauso zeigen zwei Teile der 5S ribosomalen RNA *rrfB* und *rrfE* eine gegensätzliche Expression in den Stämmen.



## Ergebnisse

**Tabelle 30** Analyse der RNA-seq Expressionsraten von *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Gleiche Expression liegt vor, wenn ein Gen in beiden Stämmen entweder hochreguliert ( $x > 2$ ), runterreguliert ( $x < 0,5$ ) oder gleich reguliert ( $0,5 < x < 2$ ) ist. Eine veränderte Expression der Stufe 1 liegt vor, wenn ein Gen in einem Stamm hochreguliert ( $x > 2$ ) oder runterreguliert ( $x < 0,5$ ) und in dem anderen gleich reguliert ( $0,5 < x < 2$ ) ist. Eine veränderte Expression der Stufe 2 liegt vor, wenn ein Gen in einem Stamm hochreguliert ( $x > 2$ ) und in dem anderen Stamm runterreguliert ( $x < 0,5$ ) ist. Die Expression bezieht sich auf den Elternstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mut5.

	Gleiche Expression	Veränderte Expression		
		Insgesamt	Stufe 1	Stufe 2
Gene	2156	346	329	17
Prozent (%)	86,2	13,8	13,1	0,7

Interessanterweise ist in *S. aureus* VC40 auch das *mprF*-Gen hochreguliert. Hier liegt ein H224Y Aminosäureaustausch im Protein vor. Das Protein überträgt Lysyl-Gruppen auf das membrangebundene Phosphatidylglycerol, welches einen Hauptfaktor für die Reduktion der negativen Ladung der Membran darstellt (Peschel et al., 2001). Im Cytochrom C-Assay hatte die Austauschmutante für dieses Gen, *S. aureus* MprF(VC40), keine geringere negative Ladung der Zelloberfläche (Abb. 30). Im Gegensatz zur Revertante *S. aureus* VC40R, sind in *S. aureus* VC40 viele Gene mit Verbindung zum Purin-Metabolismus (*purQMNH*D) runterreguliert. Ebenfalls runterreguliert ist das Gen *folD*, welches für ein Protein zur Synthese von 10-Formyl-Tetrahydrofolat kodiert. Dieses Molekül ist ein Kofaktor und wird von *purN* und *purH* in der Purin-Biosynthese verwendet (Gélinas et al., 2020). Obwohl die Expression von Genen des Purin-Metabolismus auch in anderen VISA verändert war, besteht wohl keine Verbindung zur Vancomycin-Empfindlichkeit (Fox et al., 2007).

**Tabelle 31** RNA-seq Expressionsraten für Gene mit entgegengesetzter Expression (Stufe 2) in den Stämmen *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Die Expression bezieht sich auf den Elternstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mut5 und ist nach gene locus tag geordnet (schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R
Hypo. Protein	SAOUHSC_00555	0,43	5,22
Hypo. Protein	SAOUHSC_00867	3,46	0,32
<i>dltA</i>	SAOUHSC_00869	3,10	0,34
<i>dltB</i>	SAOUHSC_00870	2,54	0,31
<i>dltC</i>	SAOUHSC_00871	2,44	0,28
<i>dltD</i>	SAOUHSC_00872	2,69	0,32
<i>folD</i>	SAOUHSC_01007	0,29	5,08
<i>purQ</i>	SAOUHSC_01012	0,48	3,09
<i>purM</i>	SAOUHSC_01015	0,27	2,04
<i>purN</i>	SAOUHSC_01016	0,26	2,36
<i>purH</i>	SAOUHSC_01017	0,28	2,97
<i>purD</i>	SAOUHSC_01018	0,43	8,58
<i>scc</i>	SAOUHSC_01115	2,14	0,50
<i>mprF</i>	SAOUHSC_01359	3,10	0,49
<i>hld</i>	SAOUHSC_02260	3,98	0,44
<i>rrfB</i>	SAOUHSC_R00012	4,95	0,27
<i>rrfE</i>	SAOUHSC_R00014	3,72	0,25

### 3.6 Charakterisierung der Virulenz

Die abgeschwächte Virulenz ist ein weiteres phänotypisches Merkmal, welches in VISA-Stämmen verändert ist. Einerseits haben VISA-Stämme oftmals eine geringere bakterielle Fitness und sind im Wachstum eingeschränkt (Howden et al., 2014), jedoch konnte in einem *Galleria mellonella* Insektenmodel mit VISA- und VSSA-Stämmen die abgeschwächte Virulenz nicht allein dadurch erklärt werden (Peleg et al., 2009). Bei einem Vergleich von VISA-Stämmen und den zugehörigen VSSA-Stämmen in einem Mausmodel konnte eine geringe Infektiosität und eine schnellere Beseitigung von VISA-Stämmen aus dem Blut gezeigt werden (Majcherczyk et al., 2008). Diese abgeschwächte Virulenz der VISA-Stämme gegenüber den Elternstämmen erfolgt durch eine veränderte Expression von Virulenz-Genen, wie *hla*, *agr*, *spa*, *sbi* und *clfB*, und begünstigt eine persistierende Infektion im Gegensatz zu einer akuten Infektion (Cameron et al., 2017; Jin et al., 2020). Interessanterweise ist der VSSA-Stamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* *agr* negativ, der daraus hervorgegangene VISA-Stamm *S. aureus* VC40 ist jedoch *agr* positiv. Der Stamm hat eine Insertion in *agrA*, wodurch dieses Gen repariert wird (Berscheid, 2013).

#### 3.6.1 Analyse der Biofilmbildung

Für die Untersuchung der Biofilmbildung wurden 0,2 mL einer Übernachtskultur in ein Well einer 96-Well-Platte mit flachem Boden gefüllt und eine weitere Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Kultur aus der Platte entfernt und mehrmals mit PBS gewaschen, bevor der Biofilm mit Ethanol fixiert und mit Kristallviolett angefärbt wurde. Anschließend wurde die OD<sub>570</sub> der Platte bestimmt und der Grad der Biofilmbildung berechnet. *S. aureus* RN4220 diente dabei als Positivkontrolle und *S. carnosus* als Negativkontrolle. Ein Bild der Platte ist im Anhang zu finden (Abb. 64). Die Grenzwerte der verschiedenen Biofilm-Kategorien basieren auf der Standardabweichung ( $\sigma$ ) der Negativkontrolle. In Abbildung 55 ist zu sehen, dass neben der Positivkontrolle auch die Stämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* und *S. aureus* NCTC8325 starke Biofilmbildner sind. Die Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* 137/93A produzieren hingegen keinen Biofilm. Damit unterscheiden sich diese Stämme signifikant von den Vergleichsstämmen. Ein schwacher Biofilm wird von den Stämmen *S. aureus* VC40R, *S. aureus* VraS(VC40) und *S. aureus* 1450/94 gebildet. Der größte Kontrast in der Biofilmbildung ist zwischen *S. aureus* NCTC8325 und *S. aureus* VraS(VC40) zu erkennen.

## Ergebnisse

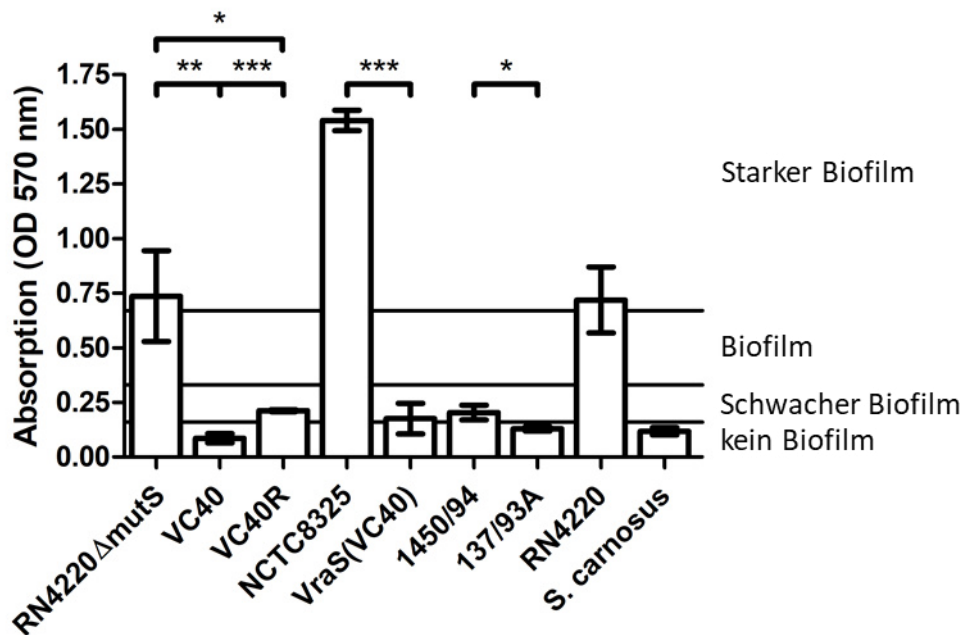


Abbildung 55 Übersicht über die Biofilmproduktion verschiedener *S. aureus* Stämme anhand der Absorption von Kristallviolett bei 570 nm in einer 96-Well-Platte. Die Abstufungen in der Biofilmproduktion basieren auf der Standardabweichung ( $\sigma$ ) der Negativkontrolle (kein Biofilm  $OD < OD_{\sigma}$ ; schwacher Biofilm  $OD_{\sigma} < OD < 2 \times OD_{\sigma}$ ; Biofilm  $2 \times OD_{\sigma} < OD < 4 \times OD_{\sigma}$ ; starker Biofilm  $4 \times OD_{\sigma} < OD$ ;  $OD_{\sigma} = 3 \times \sigma + OD_{neg.}$ ). *S. aureus* RN4220 diente als Positivkontrolle und *S. carnosus* diente als Negativkontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

### 3.6.2 Nachweis der Hämolyse-Aktivität

Der accessory gene regulator (*agr*) ist ein transkriptioneller Regulator in *S. aureus*, der die Expression von Virulenz-Genen kontrolliert und als Quorum-sensing System fungiert. Es regelt zudem das Hämolyse-Verhalten von *S. aureus* durch die positive Regulierung der *hla*-, *hly*- und *hld*-Gene. Zuerst wird von AgrD ein autoinducing peptide (AIP) synthetisiert und durch AgrB und SpsB aus der Zelle transportiert. Ab einem gewissen Schwellenwert an AIP wird die membrangebundene Histidin-Kinase AgrC aktiviert, wodurch diese den Regulator AgrA phosphoryliert. AgrA bindet an einen Promotor und führt zu der Transkription von RNAIII. Dieses Transkript ist ein posttranskriptioneller Effektor und beeinflusst mRNA-Stabilität und Translation einiger Virulenz-Gene und hemmt den transkriptionellen repressor of toxins (*rot*) Regulator (Thoendel et al., 2011).

Für die Untersuchung der Hämolyse wurde der Stamm *S. aureus* RN4220 horizontal auf einer Columbia-Blutagarplatte ausgestrichen. Dieser Stamm produziert nur  $\beta$ -Hämolsin. Die anderen Stämme wurden vertikal zu *S. aureus* RN4220 ausplattiert. Die drei Hämolsine aus Staphylokokken konnten aufgrund von ihrer Interaktion identifiziert werden, da  $\beta$ -Hämolsin die Lyse von  $\delta$ -Hämolsin verstärkt und von  $\alpha$ -Hämolsin hemmt. Außerdem zeigt die Produktion von  $\delta$ -Hämolsin auch eine Aktivität des *agr*-Operons an. Die Platte mit den Stämmen ist im Anhang zu sehen (Abb. 65). Aufgrund des

## Ergebnisse

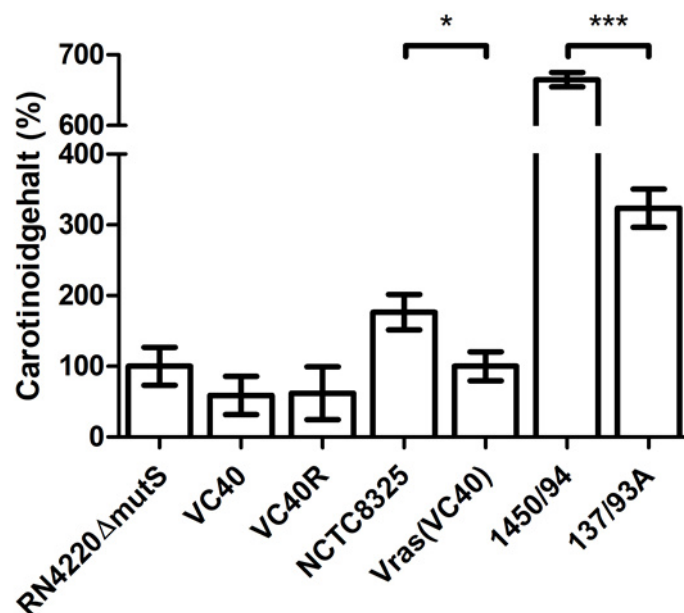
reduzierten Wachstums der beiden VISA-Stämme wurde die Platte zwei Tage inkubiert. Es zeigt sich, dass *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* nur  $\beta$ -Hämolysin bildet, da dieser Stamm *agr* negativ ist (Tab. 32). Die Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R sind beide *agr* positiv und produzieren  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Hämolysin. Hierbei ist zu beachten, dass *S. aureus* VC40R eine geringere  $\beta$ -Hämololyse als die anderen Stämme hat.

**Tabelle 32** Analyse der *agr*-Funktion durch das Hämololyse-Verhalten auf Columbia-Blutagar mit dem Indikatorstamm *S. aureus* RN4220. Die Hämololyse basiert auf der Expression von  $\delta$ -Hämolysin, welches unter der Kontrolle von *agr* steht.

Stamm	<i>agrA</i> -Gen	Hämolysin	Agr-Funktion
RN4220 $\Delta$ <i>mutS</i>	-	$\beta$	-
VC40	+	$\alpha$ , $\beta$ , $\delta$	+
VC40R	+	$\alpha$ , ( $\beta$ ), $\delta$	+

### 3.6.3 Quantifizierung des Carotinoid-Gehalts

Staphyloxanthin ist ein orange-gelbes Carotinoid, das innerhalb von *S. aureus* als biologisches Antioxidans gegen oxidativen Stress wirkt und vor der menschlichen, angeborenen Immunantwort schützt (Clauditz et al., 2006). Für die Messung des Carotinoid-Gehalts wurde eine Übernachtkultur



**Abbildung 56** Unterschiede im Carotinoid-Gehalt der verschiedenen *S. aureus* Stämme. *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* ( $OD_{462}$  0,005) wurde auf 100 % gesetzt und alle anderen Stämme in Relation dazu abgebildet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei biologischen Replikaten (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ).

geerntet und die Tetraterpene wurden durch Methanol aus den Zellen isoliert. Danach wurde die Absorption bei 462 nm, dem Absorptionsmaximum von Staphyloxanthin, gemessen. Das Ergebnis ist

in vorangegangener Abbildung 56 dargestellt, wobei die Absorption von *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (OD<sub>462</sub> 0,005) auf 100 % gesetzt wurde und alle anderen Stämme dazu in Relation gesetzt wurden. Es ist zu sehen, dass alle VISA-Stämme einen geringeren Anteil an Staphyloxanthin aufweisen als die jeweiligen Kontrollstämme. Für die Stämme *S. aureus* VraS(VC40) mit 100 % und *S. aureus* 137/93A mit 323 % ist dieser Unterschied statistisch signifikant. Die beiden klinischen Stämme *S. aureus* 1450/94 (664 %) und *S. aureus* 137/93A besitzen den größten Anteil an Carotinoiden.

### 3.7 Charakterisierung der Antibiotika-Empfindlichkeit

Im Jahr 2006 hat die CLSI die Abstufungen der MHK für Vancomycin angepasst. Dementsprechend wird ein *S. aureus* Stamm mit einer MHK für Vancomycin von 4 – 8 µg/mL als VISA klassifiziert. Unterhalb dieses Limits sind Staphylokokken als VSSA eingeteilt. Oberhalb einer MHK von 8 µg/mL Vancomycin werden *S. aureus* Stämme als VRSA betrachtet (McGuinness et al., 2017). Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind folgendermaßen eingeteilt in VSSA (*S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS, *S. aureus* NCTC8325, *S. aureus* 1450/94), VISA (*S. aureus* VC40R, *S. aureus* VraS(VC40), *S. aureus* 137/93A) und VRSA (*S. aureus* VC40). Da nur Stämme mit *vanA*-Gen in die VRSA-Gruppe eingeteilt werden und keiner der Stämme dieses Gen besitzt, wird *S. aureus* VC40 als VISA betrachtet. Die Bestimmung der Vancomycin-MHK in einer 96-Well-Polystyren-Mikrotiterplatte wurde nach EUCAST- und CLSI-Richtlinien durchgeführt.

#### 3.7.1 Untersuchung der Synergie zwischen Vancomycin und Tunikamycin

Wie in der Einleitung beschrieben, hemmt Vancomycin die Zellwandbiosynthese durch Bindung der D-Ala-D-Ala-Enden der Peptidseitenketten, sodass eine Quervernetzung der Mureinstränge verhindert wird (Howden et al., 2010). Aufgrund einer möglichen Verbindung zwischen den Wandteichonsäuren in der Zellwand und der Vancomycin-Empfindlichkeit wurde eine Schachbrett-MHK mit zwei Antibiotika, Vancomycin und Tunikamycin, durchgeführt. Tunikamycin in subinhibitorischen Konzentrationen hemmt TarO. Dieses Protein ist der essenzielle, erste Schritt in der WTA-Biosynthese. In höheren Konzentrationen inhibiert Tunikamycin auch das Enzym MraY, welches in der Peptidoglykan-Biosynthese involviert ist (Pasquina et al., 2013). Genaugenommen ist Tunikamycin eine Mischung aus hauptsächlich vier Homologen, die sich in der Länge der Fettsäure unterscheiden. Es wurde eine Charge bestehend aus 8,57 % Tunikamycin A, 29,91 % Tunikamycin B, 47,91 % Tunikamycin

## Ergebnisse

C und 12,18 % Tunikamycin D verwendet. In Abbildung 57 ist das Ergebnis der MHK dargestellt. Hierbei sind pro Stamm 8 Konzentrationen an Tunikamycin (0 – 32 µg/mL) aufgelistet und jeder Balken stellt die jeweilige Vancomycin-MHK dar. Es ist zu sehen, dass die Tunikamycin-Konzentration für die Stämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS und *S. aureus* 137/93A keine Auswirkung auf die Vancomycin-MHK hat. Die drei anderen VISA-Stämme zeigen mit steigender Tunikamycin-Konzentration eine höhere Vancomycin-Empfindlichkeit. So sank die Vancomycin-MHK von *S. aureus* VC40 von 32 µg/mL bei 0 µg/mL Tunikamycin auf 16 µg/mL (0,5 µg/mL Tunikamycin), 2 µg/mL (1 µg/mL Tunikamycin) und schließlich <0,25 µg/mL (4 µg/mL Tunikamycin). Die Vancomycin-MHK von <0,25 µg/mL bedeutet, dass nur in der Positivkontrolle ohne Antibiotikum Wachstum zu beobachten war. Alle Labor-VISA-Stämme fallen mit der Zugabe von 1 µg/mL Tunikamycin in die VSSA-Kategorie (2 µg/mL Vancomycin-MHK). Die Tunikamycin-MHK der Stämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (>64 µg/mL), *S. aureus* VC40 (16 µg/mL), *S. aureus* VC40R (4 µg/mL), *S. aureus* VraS(VC40) (0,5 µg/mL), *S. aureus* 137/93A (>64 µg/mL) wurde ebenfalls bestimmt. Hierbei fällt auf, dass der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) eine höhere Konzentration an Tunikamycin in Kombination mit Vancomycin toleriert, insgesamt aber die Vancomycin-MHK abnimmt.

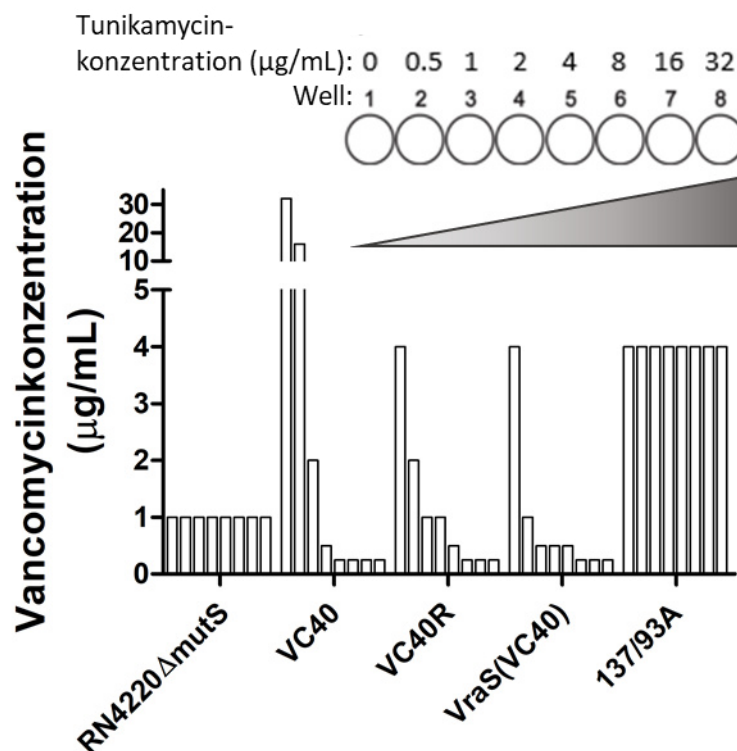


Abbildung 57 Darstellung der Vancomycin-MHK für die Stämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS, *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R, *S. aureus* VraS(VC40) und *S. aureus* 137/93A in MH-Medium unter verschiedenen Tunikamycin-Konzentrationen (µg/mL).

Anhand der Schachbrett-MHK kann man die Synergie zwischen den Antibiotika mithilfe des fraktionellen Hemmkonzentrations-Index (FIC-Index) bestimmen. Der Index wird nach einer Formel

## Ergebnisse

berechnet, in der jeweils die einzelnen MHKs der Antibiotika, sowie die Kombination der Antibiotika einbezogen werden. Für die getesteten Stämme ist der FIC-Index in folgender Tabelle aufgelistet

**Tabelle 33** Fraktionaler Hemmkonzentrations-Index (FIC-Index) für Vancomycin und Tunikamycin zur Untersuchung von Synergie (FIC Index  $\leq 0,5$ ) gegen *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS, *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R, *S. aureus* VraS(VC40) und *S. aureus* 137/93A.

Stamm	FIC-Index
RN4220 $\Delta$ mutS	2
VC40	0,125
VC40R	0,5
VraS(VC40)	0,75
137/93A	2

(Tab. 33). Es zeigt sich für die VISA-Stämme *S. aureus* VC40 (0,125 FIC-Index) und *S. aureus* VC40R (0,5 FIC-Index) ein Synergismus der beiden Antibiotika. Für *S. aureus* VraS(VC40) mit einem FIC-Index von 0,75 ist ein additiver Effekt zu beobachten. Bei den beiden anderen Stämmen hat die Antibiotika-Kombination keinen Einfluss.

### 3.7.2 Untersuchung der Kongorot-MHK

Es konnte von Suzuki et al., (2012) gezeigt werden, dass *S. aureus* Zellen vor Azo-Farbstoffen, wie Kongorot, durch Wandteichonsäuren geschützt werden. Die Deletion von *tarO*, dem ersten Enzym in der WTA-Biosynthese, führte zu einer Abnahme der MHK von  $>1024 \mu\text{g/mL}$  auf  $2 - 4 \mu\text{g/mL}$ . Kongorot inhibiert dabei die LTA-Synthase LtaS. Die Inhibition der LTA-Synthese ist dabei nur in WTA-negativen Stämmen letal, da in *S. aureus* mindestens ein Zellwandpolymer, entweder WTA oder LTA, zum Überleben nötig ist (Vickery et al., 2018). Die Tabelle 34 zeigt, dass fast alle Stämme die maximale

**Tabelle 34** MHK verschiedener *S. aureus* Stämme gegen Kongorot ( $\mu\text{g/mL}$ ) in BHI- und MH-Medium nach 48 h.

Stamm	BHI	MH
RN4220 $\Delta$ mutS	$>1024$	$>1024$
VC40	256	128
VC40R	$>1024$	$>1024$
NCTC8325	$>1024$	$>1024$
VraS(VC40)	$>1024$	$>1024$
1450/94	$>1024$	$>1024$
137/93	$>1024$	$>1024$

## Ergebnisse

MHK von >1024 µg/mL erreichen. Ausgenommen ist davon der Stamm *S. aureus* VC40, der nur eine Kongorot-MHK von 256 µg/mL in BHI-Medium erreicht. Für diesen Stamm kann es demnach zu einer Veränderung der WTA gekommen sein, sodass diese das Bakterium weniger vor Kongorot schützen. Des Weiteren wurde die Kongorot-MHK auch von den Überexpressions-Stämmen für die WTA-Glykosylierung getestet, *S. aureus* RN4220 $\Delta$ tarM $\Delta$ tarS, *S. aureus* pTX15, *S. aureus* pTtarM und *S. aureus* pTtarS. Für alle diese Stämme lag die Kongorot-MHK bei >1024 µg/mL in BHI- und MH-Medium, mit und ohne 0,5 % Xylose.

### 3.7.3 Untersuchung der Vancomycin-MHK der Überexpressionsstämme

Die Labor-VISA-Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) weisen eine Überexpression des *vraSR*-TCS auf und der klinische VISA *S. aureus* 137/93A besitzt eine erhöhte Expression des *walRK*-TCS aufgrund eines IS256-Elementes in der Promotorregion. Der Einfluss einer Überexpression dieser zwei TCS auf die Vancomycin-MHK wurde mithilfe des pTX15 Vektors in dem *S. aureus* NCTC8325 Stamm weiter untersucht. Dazu wurden beide Systeme in den Vektor eingebracht und die MHK unter Zugabe von 0,5 % Xylose in MH- und BHI-Medium bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 35 dargestellt. Der Kontrollstamm *S. aureus* NCTC8325, sowie der Stamm mit dem Leervektor *S. aureus* pTX15 haben eine Vancomycin-MHK von 2 µg/mL in BHI. Der Stamm für die Überexpression des *vraSR*-Zweikomponentensystems *S. aureus* pTvraSR, sowie der Stamm der zusätzlich noch das akzessorische *vraT* in pTX15 besitzt, *S. aureus* pTvraTSR, besitzen die gleiche Vancomycin-MHK wie die Kontrollen, unabhängig von der Zugabe von Xylose. Einzig der Stamm *S. aureus* pTvicA, mit dem Vektor für die Überexpression von *walRK*, zeigt unter Zugabe von Xylose eine leicht höhere Vancomycin MHK von 2 – 4 µg/mL in BHI-Medium. In MH-Medium ergibt sich ein ähnliches Bild.

**Tabelle 35** MHK verschiedener *S. aureus* Überexpressionsstämme für die *vraSR*-, *vraTSR*- und *walRK*-TCS gegen Vancomycin (µg/mL) in BHI- und MH-Medium nach 48 h (+ = mit 0,5 % Xylose).

Stamm	BHI	MH
NCTC8325	2	1-2
pTX15	2	1-2
pTX15 +	2	1-2
pTvicA	2	1-2
pTvicA +	2-4	2
pTvraSR	2	1-2
pTvraSR +	2	1-2
pTvraTSR	2	1-2
pTvraTSR +	2	1-2



## Ergebnisse

Zusätzlich zu der MHK in einer 96-Well-Polystyren-Mikrotiterplatte wurde von den Stämmen *S. aureus* pTX15, *S. aureus* pTvicA und *S. aureus* pTvraTSR auch die Vancomycin-Empfindlichkeit auf einer Gradientenplatte getestet. In der Gradientenplatte steigt die Vancomycin-Konzentration (6 µg/mL) von links nach rechts an, sodass Stämme, die weiter nach rechts wachsen, eine geringere Vancomycin-Empfindlichkeit haben. Dabei können nur Stämme auf einer Gradientenplatte miteinander verglichen werden. In Abbildung 58 ist die Gradientenplatte dargestellt. Der Stamm *S. aureus* pTvicA wächst bei höheren Konzentrationen als die anderen Stämme und bestätigt damit seine geringere Vancomycin-Empfindlichkeit aufgrund der Überexpression von *walRK*.

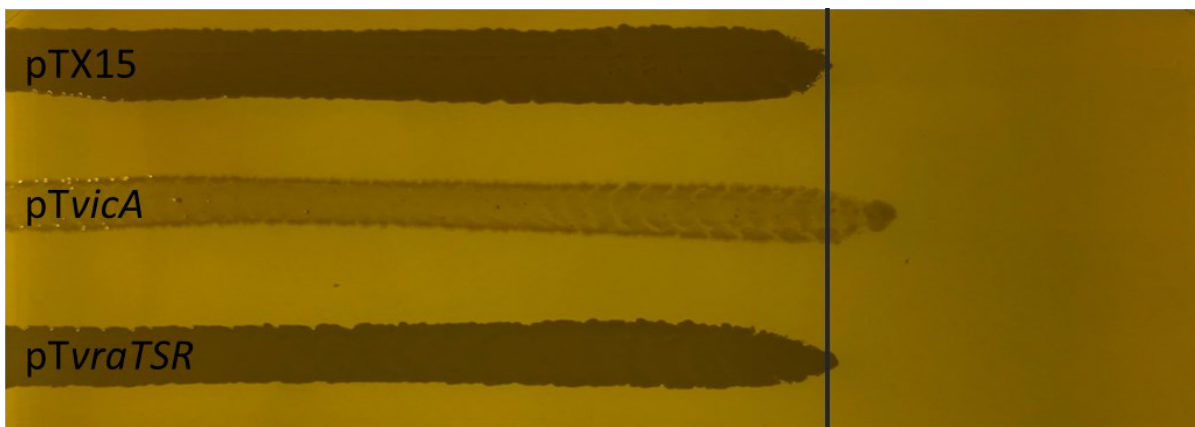


Abbildung 58 Gradienten-MHK für Vancomycin (6 µg/mL) der *S. aureus* Überexpressionsstämme in BHI-Medium mit Tetrazyklin (25 µg/mL) und Xylose (0,5 %). Das Wachstum der Kontrolle *S. aureus* pTX15 ist mit einem Balken markiert.

Da das Glykosylierungsmuster beziehungsweise die Glykosylierung der Wandteichonsäuren sich signifikant zwischen VISA und VSSA unterscheidet, wurde die Vancomycin-MHK auch für die dafür relevanten Überexpressionsstämme getestet. Der Kontrollstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ tarM $\Delta$ tarS besitzt nur Wandteichonsäuren ohne Glykosylierung. Dementsprechend verfügt der Stamm *S. aureus* pTtarM nur über  $\alpha$ -GlcNAc und der Stamm *S. aureus* pTtarS nur über  $\beta$ -GlcNAc an den WTA. Die Ergebnisse sind in Tabelle 36 aufgelistet. Insgesamt gibt es einen leichten Anstieg der Vancomycin-MHK auf 2 µg/mL in BHI-Medium. Dieser ist jedoch unabhängig von der Expression durch Zugabe von 0,5 % Xylose und auch in der Negativkontrolle mit Leervektor *S. aureus* pTX15 vorhanden.

Tabelle 36 MHK verschiedener *S. aureus* Überexpressionsstämme für die Glykosylierung der Wandteichonsäuren gegen Vancomycin (µg/mL) in BHI- und MH-Medium nach 48 h (+ = mit 0,5 % Xylose).

Stamm	BHI	MH
RN4220 $\Delta$ tarM $\Delta$ tarS	1	0,5
pTX15	2	0,5-1
pTX15 +	2	0,5-1
pTtarM	2	0,5-1
pTtarM +	2	0,5-1
pTtarS	2	0,5-1
pTtarS +	2	0,5-1

### 3.7.4 Untersuchung der Vancomycin-MHK der Mutanten mit einem Allel-Austausch

Neben den Überexpressionsstämmen wurden auch Stämme mit einem Allel-Austausch basierend auf den Mutationen in *S. aureus* VC40 durch eine Vancomycin-MHK untersucht. Die verschiedenen Allel-Austausche in *S. aureus* NCTC8325 wurden mithilfe des pMAD-Vektors durchgeführt. Insgesamt wurden 17 Mutationen (vgl. Tab. 42 und 44), die zu einem veränderten Protein führen, aus *S. aureus* VC40 ausgesucht und für 11 Mutationen konnte der Austausch erfolgreich durchgeführt werden. Die Vancomycin-MHK dieser Stämme ist in Tabelle 37 dargestellt. Für keinen Stamm konnte eine Erhöhung der Vancomycin-MHK von zwei Verdünnungsstufen gezeigt werden. Demnach ist der mögliche Einfluss dieser einzelnen Mutation auf die Vancomycin-Empfindlichkeit gering. Nur drei Stämme *S. aureus* *VraG*(VC40), *S. aureus* *AraC*(VC40) und *S. aureus* *LexA*(VC40) konnten sowohl in BHI- als auch in MH-Medium teilweise eine Vancomycin-MHK von 4 bzw. 2 µg/mL vorweisen.

**Tabelle 37** MHK verschiedener *S. aureus* Austauschmutanten gegen Vancomycin (µg/mL) in BHI- und MH-Medium nach 48 h.

Stamm	BHI	MH
NCTC8325	2	1-2
ModA(VC40)	2	1
RelP(VC40)	2	1-2
LacE(VC40)	2	1
MraZ(VC40)	2	1
VraG(VC40)	2-4	1-2
AraC(VC40)	2-4	1-2
NsaR(VC40)	2-4	1
LexA(VC40)	2-4	1-2
RecD(VC40)	2-4	1
ClpX(VC40)	2	1
MprF(VC40)	2	1

Von zwei dieser Stämme, *S. aureus* *MprF*(VC40) und *S. aureus* *ClpX*(VC40), wurde ebenfalls eine Bestimmung der Vancomycin-Empfindlichkeit mittels Gradientenplatte durchgeführt (Abb. 59). Beide bleiben im Wachstum hinter der Kontrolle *S. aureus* NCTC8325 und der Positivkontrolle *S. aureus* *VraS*(VC40) zurück.

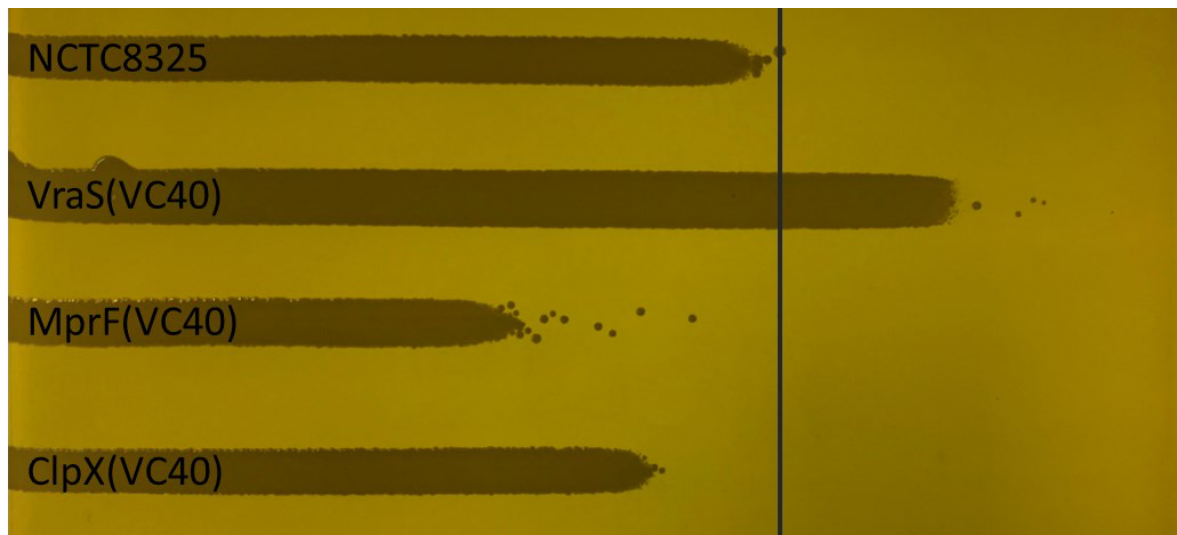


Abbildung 59 Gradienten-MHK für Vancomycin (6 µg/mL) der *S. aureus* Austauschmutanten in BHI-Medium. Das Wachstum der Kontrolle *S. aureus* NCTC8325 ist mit einem Balken markiert.

Ebenfalls wurden beide Stämme auf die Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin getestet. VISA-Stämme haben oft eine Kreuzresistenz gegen Daptomycin (Cafiso et al., 2012). In der Tat ist der Stamm *S. aureus* VC40 Daptomycin resistent mit einer MHK von 4 µg/mL (Berscheid, 2013). Ebenfalls ist eine Resistenz gegen Daptomycin oftmals mit Mutationen in *mprF* assoziiert (Mishra et al., 2009). Wie in Tabelle 38 abzulesen, ist für *S. aureus* ClpX(VC40) und *S. aureus* MprF(VC40) allerdings keine niedrigere Daptomycin-Empfindlichkeit festzustellen.

Tabelle 38 MHK verschiedener *S. aureus* Austauschmutanten gegen Daptomycin (µg/mL) in BHI- und MH-Medium nach 48 h.

Stamm	BHI	MH
NCTC8325	0,5	0,25
ClpX(VC40)	0,5	0,25
MprF(VC40)	0,5	0,25

### 3.7.5 Untersuchung des Einflusses von Salzstress auf die Vancomycin-MHK

Innerhalb der Untersuchung zum Glykosylierungsmuster der Wandteichonsäuren der verschiedenen Stämme konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* VC40 sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -GlcNAc an den WTA besitzt, die verwandten Stämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* und *S. aureus* VC40R jedoch nur über  $\alpha$ -GlcNAc verfügen. Die Analyse der Überexpressionsstämme für die jeweiligen Zucker *S. aureus* pTtarS und *S. aureus* pTtarM zeigten keine Auswirkung auf die Vancomycin-MHK (Tab. 36). In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob die erhöhte Expression von *tarM* bzw. die Kombination von  $\alpha$ - als

## Ergebnisse

auch  $\beta$ -Glykosylierung in den Stämmen einen Effekt auf die Vancomycin-MHK zeigt. Dazu wurde die MHK unter Salzstress-Bedingungen mit 4 % NaCl durchgeführt. Mistretta et al., (2019) konnten zeigen, dass Salzstress zu einem bevorzugten Einbau von  $\beta$ -GlcNAc in WTA führte, in Stämmen, die beide Gene besaßen. Dies konnte in dieser Arbeit durch eine NMR-Analyse der WTA aus *S. aureus* VC40R inkubiert in Medium mit 4 % NaCl bestätigt werden. Die Vancomycin-MHK der Stämme sind in Tabelle 39 für BHI- und MH-Medium mit und ohne Salz aufgezeigt. In der Tat verringerte sich die Vancomycin-Empfindlichkeit von *S. aureus* VC40R mit der Zugabe von Salz dramatisch. Die MHK des Stammes steigt in beiden Medien um drei Stufen von 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in BHI und von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in MH. Damit erreicht der *S. aureus* VC40R in MH-Medium die gleiche Vancomycin-MHK wie der VISA-Stamm *S. aureus* VC40. Alle anderen Stämme zeigen keine Veränderung in der MHK in Bezug zum Salzstress.

**Tabelle 39** MHK verschiedener *S. aureus* Stämme gegen Vancomycin ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in BHI- und MH-Medium unter Salzstress (4 % NaCl) nach 48 h (n.d. = nicht bestimmt).

Stamm	BHI	BHI + 4 % NaCl	MH	MH + 4 % NaCl
RN4220 $\Delta$ mutS	2	2	1	1
VC40	64	64	16	16
VC40R	4	32	2	16
NCTC8325	2	n.d.	1-2	n.d.
VraS(VC40)	4	4	4	4

# 4 Diskussion

*Staphylococcus aureus* ist ein ubiquitär verbreitetes Bakterium, das viele Säugetiere und andere Tierklassen besiedelt und als fakultativ pathogener Erreger zu opportunistischen Infektionen führt (Gatermann und Miksits, 2009). Laut einer Studie an nicht-hospitalisierten Erwachsenen aus Deutschland, sind 40 % der Probanden mit *S. aureus* kolonialisiert, davon 0,7 % mit MRSA (Becker et al., 2017). Erfreulicherweise sinkt die Zahl der nosokomial erfassten MRSA-Infektionen seit einigen Jahren. Nach dem nationalen Surveillance-Netzwerk ARS (Antibiotika-Resistenz-Surveillance) des Robert Koch-Instituts lag *S. aureus* 2019 mit 284,447 Nachweisen in Proben von stationären Patienten (insgesamt 8,7 %) auf Platz 2 der Erregerliste, hinter *Escherichia coli*. Methicillin-resistente *S. aureus* machten 10 % von dieser Menge aus (24,2 % in 2009). Als Behandlung von MRSA ist die Therapie mit Glykopeptid-Antibiotika, vor allem Vancomycin, Standard (Fille et al., 2009). Vancomycin inhibiert die Zellwand-Biosynthese durch eine irreversible Bindung an D-Alanyl-D-Alanin des Pentapeptides von Lipid II. Seit der Entdeckung der ersten *S. aureus* Stämme mit reduzierter Vancomycin-Empfindlichkeit in den 90er Jahren hat deren Anzahl aufgrund des gestiegenen Einsatzes von Vancomycin zugenommen. Aktuell haben sich aus ökonomischen Gründen viele große Pharmafirmen aus der Antibiotika-Entwicklung zurückgezogen, wodurch das Problem resistenter Stämme in Zukunft weiter zunehmen wird. Aufgrund der heterogenen Entwicklung der VISA-Stämme ist es wichtig die verschiedenen, *vanA*-unabhängigen Mechanismen, die zu einer reduzierten Vancomycin-Empfindlichkeit führen, zu erforschen. In dieser Arbeit sollten der VISA-Laborstamm *S. aureus* VC40 (MHK 64 µg/mL) und einige verwandte Stämme, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) (beide MHK 4 µg/mL), sowie ein klinischer VISA-Stamm *S. aureus* 137/93A (MHK 8 µg/mL) charakterisiert werden. Hierbei lag der Fokus auf der Zellwand und speziell auf dem Zellwand-Polymer der Wandteichonsäuren.

## 4.1 Die bakterielle Zellhülle von *Staphylococcus aureus* als zentraler Faktor in der verringerten Vancomycin-Empfindlichkeit der VISA-Stämme

Das zentrale und wichtigste Merkmal von *S. aureus* Stämmen im Zusammenhang mit der Reduktion der Vancomycin-Empfindlichkeit stellt die Zellwand dar. Eine erhöhte Zellwanddicke ist den meisten beschriebenen VISA gemein (Hanaki et al., 1998a; Komatsuzawa et al., 2002; Cui et al., 2003; Reipert et al., 2003; Sieradzki und Tomasz, 2003; Howden et al., 2006; Mishra et al., 2009; Cui et al., 2010;

## Diskussion

---

Gardete et al., 2012; Berscheid et al., 2014; Baek et al., 2017; Kuroda et al., 2019; Zhu et al., 2021). Dabei korreliert die Zellwanddicke mit der Vancomycin-MHK (Cui et al., 2000; Cui et al., 2003). Auch bei den hier charakterisierten Stämmen *S. aureus* VC40 (62,36 nm, WT 16,97 nm), *S. aureus* VC40R (55,03 nm), *S. aureus* VraS(VC40) (38,25 nm, WT 16,71 nm) und *S. aureus* 137/93A (35,6 nm) konnte mittels Transmissionselektronenmikroskopie ein größerer Zellwanddurchmesser bestätigt werden (Berscheid et al., 2014; Berscheid, 2013; Reipert et al., 2003).

Neben der Zellwanddicke ist auch der Gehalt an freien D-Ala-D-Ala-Resten von Lipid II und Peptidoglykan-Pentapeptiden in der Zellwand ausschlaggebend für die Vancomycin-Empfindlichkeit. Dementsprechend zeigen viele VISA-Stämme eine geringere Quervernetzung des Peptidoglykans und damit mehr freie D-Ala-D-Ala-Enden, die Zielstruktur von Vancomycin (Sieradzki und Tomasz, 1997; Hanaki et al., 1998b; Komatsuzawa et al., 2002; Sieradzki und Tomasz, 2003; Reipert et al., 2003). Eine reduzierte Quervernetzung führt dabei auch zu einer höheren Elastizität der Zellwand (Loskill et al., 2014). Normalerweise besitzen *S. aureus* Stämme eine Quervernetzung von 80 – 90 % (Howden et al., 2010; Hiramatsu et al., 2014). Mittels einer UPLC-Analyse des PGN konnte für *S. aureus* VC40 eine stark verringerte Quervernetzung festgestellt werden. Für die beiden anderen VISA-Stämme *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) wurde hingegen kein signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Kontrollstämmen *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS und *S. aureus* NCTC8325 entdeckt. Reipert et al., (2003) konnten zeigen, dass auch der klinische VISA *S. aureus* 137/93A eine geringe Quervernetzung des PGN aufweist (65,9 %). In dieser Arbeit lag der Aufreinigung und Analyse jedoch eine andere Methode zugrunde, weswegen die Werte nicht direkt vergleichbar sind. Die Kombination aus erhöhter Zellwanddicke und geringer Quervernetzung führt zu einer erhöhten Adsorption von Vancomycin an die Zellwand. Dies wurde in einem Vancomycin Bindungs-Assay für die Stämme belegt. *S. aureus* VC40 absorbierte die höchste Konzentration an Vancomycin aus dem Medium, gefolgt von *S. aureus* VC40R. Die Stämme *S. aureus* VraS(VC40) und *S. aureus* 137/93A banden nur geringfügig mehr Vancomycin als die Kontrollstämmen, wobei der Unterschied zwischen *S. aureus* 137/93A und *S. aureus* 1450/94 nicht signifikant war. Daher scheint der Zellwanddurchmesser einen größeren Einfluss auf die Bindekapazität zu haben als die Quervernetzung. Insgesamt führt die Bindung von Vancomycin an nicht-letale Zielstrukturen, also solche außerhalb der Teilungssepte, zu einer geringeren Diffusion des Antibiotikums innerhalb der Zellwand, auch „Clogging-Effekt“ genannt (Cui et al., 2000; Cui et al., 2006a; Pereira et al., 2007).

Die ausgeprägte Quervernetzung der Mureinstränge in *Staphylococcus aureus* wird durch die Hydrolyse des endständigen D-Ala des Pentapeptides und eine nachfolgende Verknüpfung mit der Glycin-Peptidbrücke eines weiteren Pentapeptides durch PBP4 ermöglicht (Maya-Martinez et al., 2018). Dabei kooperiert PBP4 stark mit PBP2 (Leski und Tomasz, 2005). Die geringe Quervernetzung des Stammes *S. aureus* 137/93A kann durch die Abwesenheit von PBP4 in der Zellwand erklärt werden,

welche jedoch nicht auf einer Mutation innerhalb des Gens oder des Promotors beruht (Reipert et al., 2003). Mehrere andere klinische VISA-Stämme weisen ebenfalls eine reduzierte oder nicht detektierbare Aktivität von PBP4 auf, ohne dass eine Mutation im Gen oder den angrenzenden Regionen nachweisbar sind (Finan et al., 2001; Sieradzki und Tomasz, 2003). Eine Plasmid-induzierte Expression von PBP4 führt in einigen VISA-Isolaten zu einer höheren Vancomycin-Empfindlichkeit (Finan et al., 2001). Der genaue Mechanismus hinter der verringerten Aktivität von PBP4 in diesen Stämmen ist nicht geklärt. In *S. aureus* VC40 waren *pbp4* und dessen Promotor ebenfalls intakt. Dazu war PBP4 auch in der Zellmembran mittels Bocillin-FL nachweisbar. Interessanterweise zeigte sowohl ein Microarray (Berscheid, 2013) als auch die RNA-seq für diesen Stamm eine hochregulierte Expression von PBP4, die in den anderen VISA-Stämmen nicht vorhanden war. In der UPLC-Analyse für *S. aureus* VC40 war hingegen nach dem Verdau mit Mutanolysin keine oligomere Disaccharidpeptid-Fraktion („hump“), die charakteristisch für PBP4-Aktivität ist (Hamilton et al., 2017), zu erkennen. Komatsuzawa et al., (2002) konnten bei dem VISA-Laborstamm *S. aureus* COL-VR1 (MHK 16 µg/mL) ebenfalls eine geringe Quervernetzung des PGN mit vorhandenem PBP4 in der Membran-Fraktion nachweisen. Anscheinend wurde die Aktivität von PBP4 in *S. aureus* VC40 posttranslational reduziert und folgte nicht dem gleichen Muster, wie die oben besprochenen klinischen VISA-Isolate.

Neben der Aktivität des Enzyms PBP4 ist die Quervernetzung auch abhängig von den Substraten im Peptidoglykan. So führen Mutationen in den Genen *femA* und *femB*, verantwortlich für die Synthese der letzten vier Glycine in der Pentaglycinbrücke, oft zu einer Reduktion der Quervernetzung und folglich zu einer Schwächung der Zellintegrität (Stranden et al., 1997; Monteiro et al., 2019). Dabei erfolgt die Quervernetzung durch PBP4 exklusiv mit der Pentaglycin-Querbrücke, anders als bei PBP2, welches auch kürzere Glycinbrücken mit der Peptidseitenkette innerhalb des PGN bildet (Srisuknimit et al., 2017). Ebenfalls wurden *femAB*-Mutanten mit einem pseudomultizellulären Phänotyp, mit dickerer Zellwand und anomalen Septen, beschrieben (Henze et al., 1993; Sharif et al., 2009). Einen Phänotyp mit dicker Zellwand zeigt auch *S. aureus* VC40 im Transmissionselektronenmikroskop, jedoch ohne anomale Septen (Berscheid et al., 2014). Im Fall von *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R waren *femA* und *femB* runterreguliert im Microarray (Berscheid, 2013) und der RNA-seq. Entsprechend könnte zu mindestens die geringere Quervernetzung von *S. aureus* VC40 zum Teil auf kürzere Glycin-Querbrücken an der Peptidseitenkette zurückgehen.

Der VISA-Stamm *S. aureus* Mu50 produziert eine erhöhte Konzentration von Glutamin-nicht-amidierten Muropeptid in seinem Peptidoglykan (Hanaki et al., 1998b), basierend auf einem möglichen Glutamin-Mangel (Cui et al., 2000). Anscheinend führt die erhöhte Synthese des Peptidoglykan durch eine größere Aktivität von GlmS, welches Fruktose-6-Phosphat in Glucosamin-6-Phosphat umwandelt, unter Verwendung von Glutamin als Ammonium-Quelle, zu diesem Mangel. Cui et al., (2000) konnten des Weiteren zeigen, dass nicht-amidiertes PGN in *S. aureus* Mu50 ein schlechtes Substrat für

## Diskussion

---

Transpeptidasen darstellt. Dadurch ergibt sich auch eine geringere Quervernetzung. Eine erhöhte Expression von *glmS* konnte auf der Transkriptom-Ebene für *S. aureus* VraS(VC40) festgestellt werden, nicht jedoch für *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Im Gegenteil schienen die beiden VISA-Stämme das Gen nur reduziert zu exprimieren. Ebenfalls ist die Affinität von nicht-amidiertem Muropeptid zu Vancomycin geringer als von amidiertem Muropeptid (Hanaki et al., 1998b; Cui et al., 2000). Eine solche Verschiebung von amidierten Monomeren zu nicht-amidierten Monomeren im PGN traf auf die hier untersuchten VISA-Stämme wahrscheinlich nicht zu. Die UPLC-Analyse des Peptidoglykans ergab keinen Hinweis darauf, wobei die Qualität der Spektren unzureichend für eine genaue quantitative Aussage war und keine Massenspektrometrie der Fragmente durchgeführt wurde. Zudem erfolgt die Amidierung des Pentapeptides von Lipid II innerhalb der Zelle an der Zellwand mittels MurT und GatD (Münch et al., 2012; Figueiredo et al., 2012). Die Gene waren in der RNA-seq-Analyse in *S. aureus* VC40 (*gatD*) und in *S. aureus* VC40R (*murT* und *gatD*) hochreguliert. Für keines der beiden Gene war dies der Fall in *S. aureus* VraS(VC40).

Neben der Amidierung des Peptidoglykans, ist die Aktivität der PBPs auch von der Funktion von PrsA abhängig. PrsA ist ein posttranslationaler Chaperon-ähnlicher Faktor, welcher die korrekte Faltung von Proteinen unterstützt und mit der Verringerung der Glykopeptid-Empfindlichkeit assoziiert ist (Mwangi et al., 2007; Jouselin et al., 2012). Das *prsA*-Gen liegt dabei innerhalb des *vraSR*-Regulons in *S. aureus*, scheint aber auch durch das WalRK-TCS reguliert zu werden (McAleese et al., 2006; Delaune et al., 2012). In *S. aureus* VC40 weist *prsA* eine Leserahmenverschiebung auf, die zu einem Verlust von 85 % des Proteins führt (Berscheid, 2013). Es konnte von Hyyryläinen et al., (2010) gezeigt werden, dass eine *prsA* Null-Mutation in *Bacillus subtilis* zu instabilen PBP1, PBP2, PBP3 und PBP4 führt, wodurch auch die Quervernetzung des Peptidoglykans verringert wurde. Ein solcher Effekt der *prsA*-Mutation in *S. aureus* VC40 ist ebenfalls möglich. Allerdings wies *S. aureus* VC40R die gleiche Mutation auf und besaß eine ähnliche Quervernetzung zu *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS*. Die morphologischen Veränderungen einer geringen *prsA*-Expression können mittels hoher Magnesium-Konzentration oder der Aktivierung von Biosynthese-Genen für die D-Alanylierung von Teichonsäuren rückgängig gemacht werden (Hyyryläinen et al., 2000; Hyyryläinen et al., 2010). Wahrscheinlich haben die Wandteichonsäuren ebenso einen Einfluss auf die Aktivität von PBP4 (Atilano et al., 2010) und damit auf die Quervernetzung des PGN. Die Rolle der Wandteichonsäuren bei der Vancomycin-Empfindlichkeit wird in einem späteren Abschnitt genauer erläutert.

Zu der Zellhülle, welche das Bakterium nach außen abgrenzt, gehört neben der Zellwand auch die Zellmembran. In Bezug zur Vancomycin-Empfindlichkeit von *S. aureus* ist die Zellmembran insoweit interessant, als dort zum einen die Biosynthese der Zellwand und der Wandteichonsäuren stattfindet und zum anderen membrangebundene Teile vieler Zweikomponentensysteme, wie VraS, GraS, Walk, lokalisiert sind. Genauso sind Lipoteichonsäuren, ein weiteres Makromolekül der Zellhülle, in der



## Diskussion

---

Zellmembran verankert. Des Weiteren kann die Ladung der Zellmembran einen Einfluss auf die Vancomycin-Empfindlichkeit haben (Rajagopal und Walker, 2017).

Eine Ladungsverschiebung hin zu einer weniger negativ geladenen Zelloberfläche kann zu einer elektrischen Abstoßung des positiv geladenen Glykopeptides führen. Dieser Effekt wurde für einige VISA gezeigt (Cui et al., 2010; Cafiso et al., 2012; Kuroda et al., 2019). In diesem Zusammenhang treten in VISA-Stämmen oftmals Mutationen in *mprF* auf (Nishi et al., 2004; Mishra et al., 2009; Berscheid 2013; Chen et al., 2015). Solche Mutationen sind auch für kreuzresistente Stämme mit verringerter Daptomycin-Empfindlichkeit beschrieben (Mishra et al., 2009; Yang et al., 2009; Rubio et al., 2011; Peleg et al., 2012; Bertsche et al., 2013; Bayer et al., 2016; Chen et al., 2018; Ernst et al., 2018; Sabat et al., 2018). Das *mprF*-Gen kodiert für ein Enzym, welches den Transfer von Lysyl-Gruppen von L-lysyl-tRNA auf membrangebundenes Phosphatidylglycerol katalysiert, wodurch positiv geladenes Lysyl-Phosphatidylglycerol entsteht (Ernst et al., 2009). Es steht zudem unter der Kontrolle des VISA-assoziierten GraSR-TCS in *S. aureus* (Li et al., 2007; Ernst und Peschel, 2011). Oftmals ist die Expression von *mprF* in VISA-Stämmen im Vergleich zu den VSSA-Vergleichsstämmen erhöht (Cafiso et al., 2012). Rubio et al., (2011) konnten zudem zeigen, dass der Abbau von MprF durch eine Antisense-RNA zu einer Resensibilisierung eines Daptomycin-resistenten *S. aureus* führt. In dieser Arbeit wurde die Ladung der Zelloberfläche durch die Bindung von Cytochrom C gemessen (Peschel et al., 1999). Hierbei konnte belegt werden, dass der H224Y-Aminosäureaustausch in MprF nicht verantwortlich für die Reduzierung der negativen Ladung der Zelloberfläche von *S. aureus* VC40 war. Zum einen zeigte die Bindung von Cytochrom C an die Oberfläche von *S. aureus* VC40R, einem Stamm, der ebenfalls die Mutation in *mprF* aufwies, keinen signifikanten Unterschied zum Kontrollstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS*. Zum anderen konnte auch für die Austauschmutante *S. aureus* MprF(VC40) keine geringere negative Ladung festgestellt werden. Zudem wies diese Mutante keine Veränderung der MHK für die relevanten Antibiotika Vancomycin und Daptomycin auf. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass die Ladungsänderung der Zelloberfläche in *S. aureus* VC40 auf anderen Zellwandpolymeren, wie beispielsweise den Wandteichonsäuren, beruhte. Auch für andere *S. aureus* Stämme mit Mutationen in *mprF* konnte gezeigt werden, dass diese nicht zwangsläufig ausschlaggebend für die Reduktion der Vancomycin-Empfindlichkeit sind oder zu einer Veränderung der Oberflächenladung führen (Mishra et al., 2013; Ernst et al., 2018). Allerdings könnte die Mutation in *mprF* einen Einfluss auf die Expression von *vraSR* haben, wie es für den Stamm *S. aureus* CGK5mut mit einem L431F Aminosäureaustausch im MprF der Fall ist (Chen et al., 2018).

Im Allgemeinen zeigen VISA-Stämme oftmals eine Kreuzresistenz gegenüber Daptomycin und vice versa (Holmes et al., 2015). Dies liegt vor allem an der meist weniger negativ geladenen Zelloberfläche, wodurch die Affinität sowohl von Daptomycin als auch von Vancomycin zur Zellwand sinkt (Cafiso et al., 2012). Andererseits hindert eine dicke Zellwand ebenfalls die Diffusion von Daptomycin zur

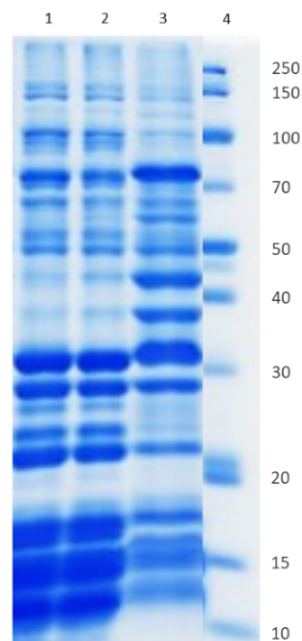
## Diskussion

---

Membran (Cui et al., 2006b). Daptomycin kann im Gegensatz zu Vancomycin nicht mit den freien D-Ala-D-Ala-Gruppen der Zellwand interagieren. Nach einer Theorie führt es an der Membran zu einer Umordnung der Lipiddomänen und einer graduellen Membran-Depolarisation durch austretende Protonen (Miller et al., 2016; Müller et al., 2016). Ebenfalls wurde gezeigt, dass Daptomycin mit Lipid II und Phosphatidylglycerol interagiert (Grein et al., 2020). Auch die hier beschriebenen VISA-Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) zeigen eine geringere Daptomycin-Empfindlichkeit (Berscheid, 2013). Hierbei spielte jedoch nur für *S. aureus* VC40 die Ladung der Zellhülle eine Rolle, da bei den anderen beiden Stämmen kein signifikanter Unterschied in der Bindung von Cytochrom C im Vergleich zu den Kontrollstämmen *S. aureus* RN4200 $\Delta$ mutS und *S. aureus* NCTC8325 bestand. Neben der Ladung der Zelloberfläche ist die Membranfluidität bedeutsam für die Daptomycin-Empfindlichkeit (Miller et al., 2016). *Staphylococcus aureus* kann die Fettsäure-Komposition der Membran als Antwort auf äußere Umwelteinflüsse und Antibiotika ändern. Durch den Wechsel der Fettsäuren verändert sich auch die Membranfluidität. So führen mehr gesättigte Fettsäuren und weniger verzweigte Fettsäuren zu einer geringeren Membranfluidität (Gonçalves und de Carvalho, 2016). Eine solche Veränderung wurde für einige Daptomycin-resistente *S. aureus* Stämme nachgewiesen (Mishra et al., 2006; Gonçalves und de Carvalho, 2016; Boudjemaa et al., 2018). Interessanterweise sind neben Daptomycin-resistenten Stämmen mit einer geringeren Membranfluidität auch solche mit einer höheren Membranfluidität beschrieben (Jones et al., 2008). Dies deutet darauf hin, dass eine optimale Membranfluidität für die volle Aktivität von Daptomycin wichtig ist (Miller et al., 2016). Entsprechend fanden Gonçalves und de Carvalho (2016), dass lebende, aber nicht kultivierbare, *S. aureus* Zellen, nach einer Behandlung mit Vancomycin für 6 Stunden eine geringere Membranfluidität aufweisen, nach 24 Stunden jedoch eine höhere. Es wird ebenfalls spekuliert, dass Fluktuationen in der Membranfluidität die Aktivität von WalRK und damit die Autolyse beeinflussen (Türck und Bierbaum, 2012). Die Membranfluidität wurde in dieser Arbeit mithilfe des Fluorophors Laurdan bestimmt. Dieses Molekül verändert die Wellenlänge seiner Fluoreszenzemission nach dem Gehalt an Wassermolekülen zwischen den Lipidgruppen in der Membran (Parasassi und Gratton, 1995; Müller et al., 2016). Für keinen der VISA-Stämme konnte eine veränderte Membranfluidität festgestellt werden. Dass eine verringerte Daptomycin- bzw. Vancomycin-Empfindlichkeit nicht zwangsläufig mit einer Veränderung der Membranfluidität einhergeht, konnten Camargo et al., (2008) ebenfalls zeigen. Die Membran ist zudem bedeutsam für die Verankerung von Membran-assoziierten Proteinen und den Export von Proteinen in die Zellwand und die Umwelt (Schneewind und Missiakas, 2012). Wie in Abbildung 60 dargestellt konnte Berscheid (2013) eine Veränderung des Membranprotein-Profiles für *S. aureus* VC40 und eine damit einhergehende Änderung der Sekretion, der Prozessierung oder dem Umsatz von Proteinen feststellen. Des Weiteren konnte sie zeigen, dass dieser Unterschied nicht auf der Mutation in *prsA* beruht. In *S. aureus* VC40 führt eine Leserahmenverschiebung zu einem früh-

## Diskussion

zeitigen Stopp-Codon und einem Verlust von 85 % des Proteins. Neben PrsA sind außerdem zwei weitere Enzyme, welche in der Prozessierung oder Sekretion anderer Proteine involviert sind, von



**Abbildung 60** Profil der aufgereinigten Membranproteine verschiedener *S. aureus* Stämme in einer SDS-PAGE. 1) *S. aureus* NCTC8325; 2) *S. aureus* RN4220ΔmutS; 3) *S. aureus* VC40; 4) Marker (kDa) #26619. Die Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus Berscheid (2013).

Mutationen in *S. aureus* VC40 betreffen, ClpX und SagB (Berscheid, 2013). ClpX ist eine ATPase, die bestimmte Proteinstrukturen erkennt, als Chaperon fungiert, tertiäre Proteinstrukturen entfaltet und zusammen mit ClpP für den Abbau von Proteinen zuständig ist (Baker und Sauer, 2012). SagB ist eine N-Acetyl-Glucosaminidase, von der angenommen wird, dass sie die Länge der Glykanstränge kontrolliert (Do et al., 2020). Die Deletion von *sagB* führt zu einer übermäßigen Verlängerung der Glykanstränge, einer Versteifung der Zelloberfläche und einer gestörten Sekretion von Proteinen, sowie einer anormalen Ausscheidung von zytoplasmatischen Proteinen (Chan et al., 2016; Wheeler et al., 2015). Im Fall von *S. aureus* VC40 veränderte eine Leserahmenverschiebung in *sagB* 90 % des Proteins. Keine der drei Mutationen trug einzeln, weder in Berscheid (2013) noch in dieser Arbeit, zu einer Veränderung der Vancomycin-Empfindlichkeit bei. Jedoch konnte das Membranprotein-Profil der Stämme in dieser Arbeit nicht reproduziert werden (siehe Abb. 23). Die Unterschiede waren dabei weniger offensichtlich. Die Mutation in *clpX* führte allerdings auch hier zu einigen veränderten Banden im SDS-Gel im Vergleich zum Wildtyp *S. aureus* NCTC8325. Diese veränderten Proteine teilten sich die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* ClpX(VC40) jedoch nur bedingt. Aus diesem Grund könnte die Veränderung des membran-assoziierten Proteoms in *S. aureus* VC40 maßgeblicher mit der Insertion in *sagB* zusammenhängen (Chan et al., 2016). Diese Hypothese hätte theoretisch auch durch den Vergleich des Protein-Profiles von *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R bestärkt werden

können, wäre ein genauso prägnanter Unterschied wie bei Berscheid (2013) zu erkennen gewesen, da beide Stämme die gleiche *sagB*-Mutation besitzen. Der Unterschied zwischen dem hier gezeigten Protein-Profil und dem aus Berscheid (2013) könnte durch die leicht veränderte Aufreinigungsmethode entstanden sein, da auch die Kontrollstämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* und *S. aureus* NCTC8325 wenig Ähnlichkeit aufwiesen. Besonders deutlich wurde dies durch die 3 prominenten Banden um 15 kDa (Abb. 60), die in Abbildung 23 fehlten.

Zusammengefasst stellt die verdickte Zellwand mit der geringen Quervernetzung einen Hauptgrund für die verringerte Vancomycin-Empfindlichkeit in *S. aureus* VC40 dar. In *S. aureus* VC40 kommt es bei Antibiotika-Zugabe einerseits zu einem „Clogging-Effekt“ an der Zellwand, wodurch das Vancomycin die letale Zielstruktur an der Teilungssepte nicht erreicht, und andererseits möglicherweise ebenfalls zu einer Abstoßung des positiven Glykopeptides durch eine weniger negativ geladene Zelloberfläche. Die genaue Grundlage für die geringe Quervernetzung ist hingegen nicht bekannt, da weder die Expression noch die Anwesenheit von PBP4 an der Zellmembran gestört sind. Im Gegensatz dazu scheint der direkte Einfluss der Mutationen in *prsA*, *sagB*, *clpX* und *mprF* auf die Vancomycin-Empfindlichkeit gering. Womöglich besitzen Wandteichonsäuren eine größere Wirkung auf die relevanten VISA-Charakteristika, wie Zellwand-Quervernetzung, Ladung der Zelloberfläche und auch Autolyse.

## 4.2 Untersuchung der reduzierten Autolyse in VISA-Stämmen

Neben dem Zellwandaufbau ist auch der Abbau der Zellwand entscheidend für den Lebenszyklus der Zelle, die Vermehrung durch Zellteilung und die Dicke der Zellwand. In VISA ist dieser Abbau der Zellwand, auch Autolyse genannt, in den meisten Fällen reduziert (Sieradzki und Tomasz, 1997; Sieradzki und Tomasz, 2003; Koehl et al., 2004; Howden et al., 2006; Utaida et al., 2006; Cafiso et al., 2012; Gardete et al., 2012; Berscheid et al., 2014; Peng et al., 2018; Zhu et al., 2021). Es wird auch angenommen, dass die Bindung von Vancomycin an die Zellwand die Aktivität von Autolysinen in VISA-Stämmen blockiert (Sieradzki und Tomasz, 2006). Dadurch kann eine reduzierte Autolyse in der Anwesenheit von Vancomycin erklärt werden, nicht jedoch eine verringerte Autolyse von VISA-Stämmen in Abwesenheit von Vancomycin (Howden et al., 2006; Howden et al., 2010; Berscheid, 2013). Wie oben angemerkt führt eine verdickte Zellwand mit niedriger Quervernetzung in *S. aureus* zu einer niedrigeren Vancomycin-Empfindlichkeit. Gleichzeitig reduziert sich durch die geringe Quervernetzung

## Diskussion

---

auch die Stabilität der Zellwand, wie von Loskill et al., (2014) beschrieben. Um der geringeren Konzentration an Interpeptidbrücken entgegenzuwirken, muss das Bakterium die Autolyse reduzieren. Dabei kann die Reduktion der Autolyse durch Mutationen in Autolysin-Genen, eine geringere Expression von Autolysinen, einen posttranslationalen proteolytischen Abbau der Autolysine, einen reduzierten Export der Autolysine oder eine geringere Affinität der Autolysine zum Peptidoglykan erfolgen.

Von den hier beschriebenen VISA-Stämmen zeigten *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) eine stark reduzierte Autolyse. Eine solche war für *S. aureus* VC40R nicht und für den klinischen VISA-Stamm *S. aureus* 137/93A nur eingeschränkt zu erkennen. Interessant war dabei, dass die aus dem Zellpellet aufgereinigten Autolysine von *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) die Zellwand von *S. aureus* NCTC8325 ebenfalls nur geringfügig hydrolysierten. Hingegen wurde von allen Stämmen die Zellwand von *S. aureus* 137/93A durch die aufgereinigten Autolysine des Wildtyps *S. aureus* NCTC325 am schlechtesten hydrolysiert. Die Zellwände aller Lyse-Experimente waren dabei aufgrund der vorherigen Aufreinigung frei von LTA. Insgesamt deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die reduzierte Autolyse von *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) auf den Autolysinen basierte und die Autolyse von *S. aureus* 137/93A stärker mit der Zellwand zusammenhing. Diese Annahme konnte sowohl durch das Zymogramm, als auch durch die Aufreinigung der extrazellulären Autolysine bestätigt werden. Die aufgereinigten extrazellulären Autolysine zeigten auf die OD bezogen für *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase nur eine geringe Aktivität gegen *Micrococcus luteus*. Im Zymogramm war die AtIA-Bande der beiden VISA-Stämme und die Bande der Amidase-Untereinheit aus *S. aureus* VC40 deutlich reduziert, beziehungsweise nicht vorhanden. Dies ließ eine veränderte posttranslationale Prozessierung von AtIA vermuten, die möglicherweise mit dem VraSR-Zweikomponentensystem zusammenhing. Erstaunlicherweise konnte die Abwesenheit der Amidase-Bande für *S. aureus* VC40 in der Arbeit von Berscheid (2013) nicht gezeigt werden. Die Revertante *S. aureus* VC40R und der klinische VISA-Stamm *S. aureus* 137/93A hingegen besaßen ein ausgeprägtes Autolysin-Profil mit allen AtIA-Fragmenten im Zymogramm, vergleichbar mit dem Wildtyp *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS, beziehungsweise *S. aureus* 1450/94.

Paradoxerweise zeigten sowohl Microarray und qRT-PCR Daten (Berscheid, 2013; Berscheid et al., 2014), als auch die RNA-seq eine verstärkte Expression vieler Autolysine, wie AtIA, ScaD, LytM, IsaA, SsaA, LytU und SagB, in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R im Vergleich zu dem Elternstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS. Im direkten Vergleich zwischen den beiden verwandten VISA waren die Autolysine in *S. aureus* VC40R überwiegend runterreguliert. Eine solche Überexpression der Autolysine war in *S. aureus* VraS(VC40), bis auf LytM, nicht zu erkennen. Interessanterweise ist das Autolysin LytM auch Teil des VraSR-Regulons (Gardete et al., 2012). Für den VISA-Phänotyp mit reduzierter Autolyse wäre eine reduzierte Expression der Autolysine verständlicher. So konnten Koehl et al., (2004) einige VISA-

## Diskussion

---

Stämme mit reduzierter Transkription von *AtIA*, dem Hauptautolysin in *S. aureus*, identifizieren, die im Zymogramm ein verändertes Autolysin-Profil aufweisen und eine reduzierte Autolyse zeigen. Die reduzierte Autolyse lag in diesem Fall vollkommen an dem Autolysin-Profil, da isolierte Autolysine aus dem Wildtyp die VISA-Zellwände komplett verdauten. Allerdings hängt die Autolyse im Allgemeinen nicht allein von der Expression der Autolysine ab. Für den VISA-Laborstamm *S. aureus* VP32 konnte eine erhöhte Expression von Hydrolase-Genen, wie *atIA*, *lytM* und *sceD* festgestellt werden, allerdings zeigt der Stamm im Zymogramm ein unverändertes Bandenmuster (Mongodin et al., 2003; Pieper et al., 2006). Der Einfluss auf die tatsächliche Autolyse in diesem Stamm wurde nie untersucht. Ähnlich konnten Renzoni et al., (2006) den VISA-Stamm *S. aureus* 14-4 isolieren, der zwar eine Expression von *atIA* wie der Wildtyp und prägnantere Banden im Zymogramm aufweist, aber gleichzeitig eine stark reduzierte Autolyse besitzt. Dieser Effekt wurde mit posttranskriptioneller Regulation durch extrazelluläre Proteasen oder dem Autolysin-Export in Verbindung gebracht. Daneben konnte auch für zwei klinische *Staphylococcus haemolyticus* Stämme mit reduzierter Vancomycin-Empfindlichkeit eine stark erhöhte Expression von *atl* bei gleichzeitig reduzierter Autolyse festgestellt werden (Kim et al., 2012). Wootton et al., (2005) konnten für 19 von 20 GISA- und hGISA-Stämmen eine reduzierte Expression von *AtIA* und eine dementsprechend reduzierte Autolyse feststellen. Jedoch zeigte ein klinischer GISA-Stamm im Vergleich zum korrespondierenden empfindlichen Stamm eine erhöhte Expression von *atIA* bei gleichzeitiger reduzierter Autolyse. Der Grund für die erhöhte Expression konnte nicht gefunden werden, aber auch hier muss eine Regulation auf posttranslationaler Ebene für *AtIA* erfolgen.

Interessanterweise ist die lytische Transglycosylase *SceD* ein potenzieller Biomarker zur Identifizierung von VISA-Stämmen (Drummelsmith et al., 2007). Das Gen *sceD* besaß die höchste Überexpression in den Stämmen *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R im Vergleich zum Elternstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS*. Nur die Austauschmutante *S. aureus* *VraS*(VC40) zeigte eine unveränderte Expression von *sceD*. Als Biomarker würde *SceD* also eher für klinische *S. aureus* Stämme Anwendung finden, und nicht für Austauschmutanten, die im Labor hergestellt wurden. Daneben besaßen beide Stämme, *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R, Mutationen in den Genen für *sagB* und *ssaA*. Wie oben beschrieben ist *SagB* eine N-Acetyl-Glucosaminidase, welche die Länge der Glykanstränge kontrolliert (Do et al., 2020) und durch eine Leserahmenverschiebung funktionsunfähig ist. Das sekretorische Antigen A von *Staphylococcus aureus* (*SsaA*) besitzt eine potenzielle D-Alanyl-Glycyl-Endopeptidase-Aktivität und ist essenziell in *S. aureus* (Chaudhuri et al., 2009; Delaune et al., 2011). In diesem Fall befindet sich ein G128S Aminosäureaustausch in der CHAP-Domäne von *SsaA* in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R mit unbekannter Auswirkung auf das Protein (Berscheid, 2013). Generell ist *ssaA* in VISA-Stämmen selten von Mutationen betroffen und nur im Hinblick auf die Eigenschaft als WalRK-reguliertes Autolysin relevant. Zufälligerweise existiert jedoch ein VISA-Stamm, *S. aureus* V036-V64 (Vancomycin

## Diskussion

---

MHK 64 µg/mL), der neben Mutationen in *rpoB*, *walk* und *vraT* auch eine Mutation in dem mit *ssaA* stark verwandten Autolysin *ssaA2* aufweist, welche zu einem Aminosäureaustausch (G128A) an der gleichen Stelle führt (Kim und Lee, 2020). Die Expression von *ssaA*(VC40) durch ein pEPSA5 Plasmid in *S. aureus* NCTC8325 führte allerdings nicht zu einer Veränderung der Vancomycin-MHK (Berscheid, 2013). Sowohl SsaA als auch die Glycyl-Glycyl Endopeptidase LytM können das Wachstum von *S. aureus* mit verminderter WalRK-Aktivität wiederherstellen und führen zur Lockerung der Quervernetzung des Peptidoglykan (Delaune et al., 2011). Die komplette LytM-Peptidase ist dabei in vitro inaktiv und muss erst in hydrolytisch aktive Untereinheiten gespalten werden (Singh et al., 2010). Theoretisch kann die Überexpression von *lytM* und *ssaA* dementsprechend auch zu einer höheren Plastizität beitragen, wobei die Anzahl an Vancomycin-bindenden freien D-Ala-D-Ala-Resten im PGN nicht verändert wird. WalRK ist das einzige essenzielle Zweikomponentensystem in *S. aureus* und zuständig für die positive Regulation von Autolysinen, unter anderem AtIA, LytM, SsaA, SceD, IsaA, Sle1, und einigen Virulenz-Genen (Dubrac und Msadek, 2004; Dubrac et al., 2007; Delaune et al., 2012). So führt eine konstitutiv-aktive Form von WalR im *S. aureus* HG001 Hintergrund zu einer signifikant schnelleren Autolyse im Vergleich zum Wildtyp (Delaune et al., 2012). WalRK ist ebenfalls stark mit der Ausbildung des VISA-Phänotyps verbunden. Viele VISA-Stämme weisen Mutationen in der Histidin-Kinase oder dem Response-Regulator des TCS, ebenso wie in den akzessorischen Genen des Operons *yycHI*, auf (Jansen et al., 2007; Mwangi et al., 2007; Shoji et al., 2011; Gardete et al., 2012; Hafer et al., 2012; Matsuo et al., 2013; Vidaillac et al., 2013; Berscheid et al., 2014; Cameron et al., 2016; Wang et al., 2017; Peng et al., 2018; Kuroda et al., 2019; Kim und Lee, 2020; Zhu et al., 2021). YycHI bilden mit Walk einen Membrankomplex und wirken aktivierend auf Walk in *Staphylococcus aureus* (Cameron et al., 2016; Gajdiss et al., 2020). Es wird angenommen, dass in den überwiegenden Fällen die Mutationen in *walk* zu einer verringerten Aktivität des TCS führen. Dementsprechend verringert sich die Expression von Autolysinen und dadurch wie oben beschrieben die Vancomycin-Empfindlichkeit. Es wäre interessant zu erforschen, ob auch für *walRK* VISA-Mutanten die Expression von *sceD* ebenfalls als Biomarker dienen könnte. Zumindest in Zhu et al., (2021) besitzt der VISA-Stamm *S. aureus* NMK1 (Vancomycin MHK 4 µg/mL) mit einem Walk(I237T) Aminosäureaustausch und einer reduzierten Autolyse und Expression von Autolysinen gleichzeitig auch ein hochreguliertes *sceD*. Die VISA-Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R haben einen I544M-Aminosäureaustausch in der konservierten HATPase\_c Domäne von Walk (Berscheid, 2013; Berscheid et al., 2014). Die Daten der RNA-seq im Hinblick auf die Autolysine würden vermuten lassen, dass die Mutation zu einem aktiveren TCS führte. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Histidin-Kinase Walk(I544M) in vitro eine drastische Reduktion der Autophosphorylierungsaktivität aufweist. Womöglich kommt es zu einer Behinderung der ATP-Bindestelle, wodurch nicht einmal 10 % Phosphorylierung der Kinase erreicht werden konnten (Kienemund, 2016). Die isolierte Einführung der Walk-Mutation in den Wildtyp *S. aureus* NCTC8325

## Diskussion

---

durch einen Allel-Austausch gestaltet sich aufgrund der Essentialität von WalRK schwierig, auch während einer Überexpression von *ssaA*. Einerseits deuteten die RNA-seq Daten des WalRK-Regulons (vgl. Tab. 24 und 25) insgesamt zwar darauf hin, dass das System eher runterreguliert war. Andererseits waren die relevanten Gene mit identifiziertem Bindemotiv für WalR (Dubrac et al., 2008) in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R hochreguliert. Vor allem der Vergleich von *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R, beide Stämme mit Mutation, mit *S. aureus* VraS(VC40) zeigte dies. Neben WalK besitzt *S. aureus* mit PknB eine weitere Kinase, die zu einer Phosphorylierung des Regulators WalR fähig ist und die Expression von *lytM*, *altA*, *ssaA* und *isaA* positiv reguliert (Donat et al., 2009; Hardt et al., 2017). PknB war hochreguliert in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Dementsprechend könnte hier ein Grund für die hohe Expression von Autolysinen liegen. Im Fall von *S. aureus* VC40 könnte die Mutation in *walK* entsprechend nur eine geringe Auswirkung auf die Vancomycin-Empfindlichkeit besitzen, da die Reduktion der Expression von Autolysinen umgangen wurde und die Aktivität der Autolysine potenziell in einem späteren Schritt posttranslational reduziert wurde. Im Gegensatz dazu führt die Insertion von IS256 in die Promotorregion von *walRK* zu der verstärkten Expression des TCS in *S. aureus* 137/93A. Der Stamm *S. aureus* pTvicA mit einer induzierbaren Überexpression von *walRK* zeigt ebenfalls eine geringere Vancomycin-Empfindlichkeit, die jedoch nur auf einer Vancomycin-Gradientenplatte und nicht über eine MHK in einer 96-Well Platte nachgewiesen werden konnte (Jansen et al., 2007). In der Literatur sind VISA mit erhöhter Aktivität von WalRK selten. Kuroda et al., (2019) identifizierten den klinischen VISA-Stamm *S. aureus* KG-18 (Vancomycin MHK 8 µg/mL) mit einem IS256-Element an der gleichen Stelle wie *S. aureus* 137/93A und einem dementsprechend hochreguliertem *walRK*-TCS. In diesem Fall besitzt der Stamm eine dicke Zellwand und eine Überexpression von *mprF* und *dltABCD*, was zu einer geringeren negativen Ladung der Zelloberfläche führt. Die Autolyse ist reduziert durch die verminderte Sekretion von AtIA. Sowohl die verminderte Autolysin-Sekretion als auch die nicht veränderte Expression von AtIA, obwohl das regulierende WalRK-TCS eine erhöhte Aktivität aufweist, wurden nicht erklärt. Neben Fällen einer erhöhten Expression von *walRK* durch das Insertionselement IS256 sind auch Stämme mit einer geringeren Expression von *walRK* aufgrund einer Insertion von IS256 in die vorgeschaltete nicht-translatierte Region bekannt (McEvoy et al., 2013). Für *S. aureus* 137/93A führte ein hochreguliertes *walRK* jedoch nicht zu einer erhöhten Autolyse. Hier schien möglicherweise die veränderte Zellwand-Biosynthese wichtiger für die Vancomycin-Empfindlichkeit zu sein als die Expression von *walRK*.

Für die Zellteilung sind vor allem AtIA, das Hauptautolysin in *S. aureus*, und Sle1 verantwortlich (Kajimura et al., 2005; Zoll et al., 2012). Interessanterweise war Sle1 eines der wenigen Autolysine mit einer vergleichbaren Expression in den VISA-Laborstämmen und den zugehörigen Kontrollstämmen. Im Gegensatz zu anderen Autolysinen, wie LytM, sind AtIA und Sle1 an der Teilungssepte lokalisiert, abhängig von den Wandteichonsäuren und Lipoteichonsäuren in der Zellwand. LTA und WTA können



in essenziellen Funktionen füreinander kompensieren, sodass beide Zellwand-Polymere nicht gleichzeitig deletiert werden können (Oku et al., 2009). Ein WTA-negativer *S. aureus* Stamm mit einer *tagO*-Deletion zeigt eine AtIA- beziehungsweise Sle1-Verteilung über die gesamte Zellwand (Schlag et al., 2010; Frankel und Schneewind, 2012). Auf Wandteichonsäuren wird in einem späteren Abschnitt genauer eingegangen. Im Gegensatz dazu führt die Reduktion der LTA in der Zellwand von *S. aureus* zu einer stark reduzierten Aktivität der Autolysine, da die LTA als Rezeptor der Repeat-Domänen der Amidase-Untereinheit von AtI fungieren (Fedtke et al., 2007; Zoll et al., 2012). Die Aktivität der Autolyse ist auch von der D-Alanylierung der LTA abhängig, da *S. aureus* Stämme mit D-Alanin-freier LTA eine inhibierte Lyse aufweisen (Fischer et al., 1981). In *S. aureus* läuft die Synthese des LTA-Rückgrats an der Teilungssepte in Koordination mit der Zellteilung vonstatten (Reichmann et al., 2014). Demnach könnte eine Reduktion der LTA-Konzentration, sowie eine Reduktion der D-Alanylierung, beziehungsweise eine vermehrte Glykosylierung der LTA, da beide Moleküle um die gleiche Bindestelle an den LTA konkurrieren, an der veränderten Autolyse in den VISA beteiligt sein. Im Microarray und der RNA-seq waren die LTA-Polymerase *ItaS*, sowie Gene für die Glykosylierung der LTA (*yfhO*, *gtaA*), in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R hochreguliert (Berscheid, 2013; Kho und Meredith, 2018b). Allerdings war *pgcA*, verantwortlich für die Synthese des UDP-Glukose Präkursors, welcher von WTA und LTA verwendet wird (Schneewind und Missiakas, 2019), runterreguliert. Vorläufige Versuche von aufgereinigten LTA aus den VISA-Stämmen, mittels hydrophober Interaktionschromatographie (Octyl-Sepharose Säule; 1-Propanol-Gradienten (15 – 80 %)), zeigen für *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* *VraS*(VC40) eine geringere Konzentration an Phosphat, gemessen als Marker für die LTA-Konzentration, verglichen mit den Kontrollen (Knopp, 2019). Jedoch erwies sich die Aufreinigung der LTA als komplex und in den Ergebnissen unbeständig, wodurch die Aussagekraft reduziert wurde. In einem eigenen Vorversuch mit nicht-aufbereiteten LTA, konnte ebenfalls eine geringere Phosphat-Konzentration mit vermehrter Glykosylierung für die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* *VraS*(VC40) und *S. aureus* 137/93A beobachtet werden. Da der Fokus der Arbeit aber nicht auf den LTA lag, wurde dies nicht weiterverfolgt (siehe Ausblick).

Das Hauptautolysin AtIA in *S. aureus* ist ein bifunktionelles Protein und spaltet sich in zwei Hydrolasen, eine N-terminale N-Acetyl-Muramoyl-L-Alanin-Amidase und eine C-terminale Endo- $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase (Büttner et al., 2014). Es ist hauptsächlich an der Zellteilung beteiligt (Biswas et al., 2006). Dabei muss das Peptidoglykan von der Amidase vorverdaut werden, damit die Glucosaminidase an die Zielstruktur gelangen kann (Götz et al., 2014). Jedoch haben die beiden Hydrolasen im nicht-prozessierten Zustand ebenfalls eine hydrolytische Aktivität, da beide in exakt der richtigen katalytischen Reihenfolge zueinanderstehen (Nega et al., 2020). Im Allgemeinen erfolgt die proteolytische Spaltung des sekretierten Pro-Enzyms erst an der Teilungssepte (Baba und Schneewind, 1998). Die nicht vorhandene Amidase-Bande von *S. aureus* VC40 aus dem Zymogramm konnte dem-

## Diskussion

---

entsprechend auch zu einer verringerten Glucosaminidase-Aktivität führen, zumal die AtIA-Bande ebenfalls stark reduziert war. Es wurde wie oben beschrieben festgestellt, dass die reduzierte Autolyse von *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) wahrscheinlich auf einer veränderten posttranslationalen Prozessierung der Autolysine, vor allem AtIA, basierte. Zu der extrazellulären Prozessierung von AtIA ist nichts genaues bekannt (Schlag et al., 2010; Götz et al., 2014; Grilo et al., 2014; MyCarthy et al., 2016). Es wurden bisher einige TCS und globale Regulatoren in Zusammenhang mit der Autolyse in *S. aureus* gebracht. So haben MsaABCR, SarA, LytSR, MgrA und ArlRS einen negativen Einfluss und Agr und CidABC einen positiven Einfluss auf die Autolyse (Bayles, 2000; Fournier und Hooper, 2000; Ingavale et al., 2003; Rice et al., 2003; Sahukhal et al., 2015).

CidABC sind Holin-Moleküle, die die Autolysine aus der Zelle transportieren (Rice et al., 2003). Dieser Prozess wird durch die Anti-Holin-Moleküle LrgAB, welche durch LytSR kontrolliert werden und in der späten exponentiellen Wachstumsphase die höchste Expression haben, inhibiert. Daneben hemmt Agr den Repressor Rot, welcher wiederum positiv auf die *lrgAB*-Expression wirkt (Bayles, 2000). In *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R waren die Autolyse-fördernden Gene *cidAB* runterreguliert. Interessanterweise war im Gegensatz dazu das Autolyse-hemmende Anti-Holin *lrgAB* in *S. aureus* VraS(VC40) stark hochreguliert. Demnach könnte die geringe Autolyse in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) mit diesen beiden Systemen zusammenhängen. Jedoch würde dies nicht das veränderte AtIA-Profil im Zymogramm der beiden Stämme erklären. Die zum Wildtyp *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* vergleichbare Autolyse von dem Stamm *S. aureus* VC40R könnte auf der geringeren Expression beider Systeme *cidAB* und *lrgB* basieren.

Neben der Translokation von Autolysinen haben auch extrazelluläre Proteasen einen Einfluss auf die Autolyse, meist durch eine Inaktivierung der Autolysine. Die Proteasen werden vor allem durch das ArlRS-TCS kontrolliert (Fournier und Hooper, 2000). Für AtIA und LytM konnte in einer Studie kein negativer Effekt der Proteasen auf den Abbau der Enzyme festgestellt werden (Memmi et al., 2012). In der gleichen Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die negative Regulation der Autolyse durch ArlRS nur in MSSA- aber nicht in MRSA-Stämmen stattfindet, unabhängig von *mecA*. MgrA und SarA sind globale Regulatoren, die durch die Kontrolle von ArlRS und LytSR die Autolyse negativ beeinflussen (Ingavale et al., 2003). Es wird spekuliert, dass AtIA von Ssp- oder Spl-Proteasen prozessiert wird, kontrolliert durch das *msaABCR*-Operon, welches ebenfalls mit einer Verringerung der Vancomycin-Empfindlichkeit assoziiert ist (Samanta und Elasri, 2014; Sahukhal et al., 2015; Bibek et al., 2019). In *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R war *msaB* stark runterreguliert und *msaC* hochreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit des *msaABCR*-Operons zu einer vermehrten Prozessierung von AtIA führt und damit die Autolyse ansteigt (Sahukhal et al., 2015). Das *atIA*-Gen liegt im Genom von *S. aureus* nur 5 kb vom *ssp*-Operon entfernt und SspA spaltet das verwandte AtIE Autolysin aus *S. epidermidis* (Chen et al., 2013). Rice et al., (2001) bemerkten, dass SspA nicht für die

## Diskussion

---

Reifung von AtIA notwendig ist, es aber wohl die Glucosaminidase-Aktivität kontrolliert. Die Serin-Protease *sspA*, sowie die Cystein-Proteasen *sspB* und *sspC* und die Metalloprotease *aur* waren runterreguliert in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Seltsamerweise zeigen die Microarray-Ergebnisse von Berscheid (2013) ein konträres Bild, sodass damals die meisten Proteasen hochreguliert waren. Insgesamt lag die Übereinstimmung der Microarray- und RNA-seq-Daten mit den Grenzen 2 und 0,5 bei 80 % mit 1,7 % konträr exprimierten Genen. Die Protease SspB ist als Adapter-Protein ebenfalls involviert in den Proteinabbau durch ClpXP (Baker und Sauer, 2012).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des intrazellulären proteolytischen Komplexes von ClpP und ClpX auf AtIA untersucht, vor allem mit Hinblick auf den Aminosäureaustausch S30R in ClpX von *S. aureus* VC40. ClpP ist eine ATP-abhängige Protease und bildet durch zwei Heptamer-Ringe eine proteolytische Kammer, mit der aktiven Seite nach innen gerichtet. Mithilfe von ClpC oder ClpX zersetzt die proteolytische Kammer kleine, ungefaltete Proteine. ClpX ist eine ATPase, die bestimmte Proteinstrukturen erkennt, tertiäre Proteinstrukturen entfaltet und als Hexamer-Ring mit ClpP assoziiert (Baker und Sauer, 2012). Es lokalisiert außerdem an der Teilungssepte und kontrolliert eine Reihe von Proteinen der Zellwand-Biosynthese (Jensen et al., 2019). Die Mutation aus *S. aureus* VC40 befand sich in der N-terminalen-Domäne von ClpX mit dem Zink-Motiv, welches markierte Substrate erkennt. Jedoch behält ClpX seine ATPase-Aktivität und die Fähigkeit des Proteinabbaus einiger nativer Proteine mit ClpP auch ohne diese N-terminale Domäne (Singh et al., 2001). Im Fall von *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R war *clpX* hochreguliert und *clpC* runterreguliert. Sowohl für ClpP als auch ClpX sind einige Mutationen in VISA-Stämmen beschrieben (Shoji et al., 2011; Baek et al., 2015; Hu et al., 2016). Eine Deletion in *clpP* beeinflusst die Expression vieler regulatorischer Gene wie *agr*, *sigB*, *sarT*, *mgrA*, *sarZ*, *sarR*, *arlRS* und *walRK* (Shoji et al., 2011; Frees et al., 2012). Daneben sind Proteine wie Sle1, FtsZ, FemAB, TarS, Pbp2 und SsaA Substrate von ClpXP (Feng et al., 2013; Frees et al., 2014). AtIA soll dagegen ein Substrat von ClpCP sein (Graham et al., 2013). Allerdings konnten Baek et al., (2016) in einem Zymogramm zeigen, dass ClpX einen negativen Einfluss auf das AtIA-Level hat. Interessanterweise führt eine Deletion von *clpP* zu einer Reduktion der AtIA- und Amidase-Bande im Zymogramm. Es wird jedoch angenommen, dass ClpXP die Prozessierung von AtIA nur indirekt durch die Expression der extrazellulären Proteasen beeinflusst (Frees et al., 2003; Baek et al., 2014). Das in vitro Proteolyse-Assay in dieser Arbeit deutete ebenfalls in die gleiche Richtung. Nur der Anteil der Amidase nahm im Assay mit beiden ClpX-Varianten, ClpX(NCTC8325) und ClpX(VC40), signifikant zu. Berscheid (2013) konnte für das Protein Spx, ebenfalls keinen Unterschied in der Proteolyse durch den Wildtyp und das mutierte ClpX feststellen.

Das komplette AtIA-Enzym ohne Signalsequenz aus *S. aureus* NCTC8325 konnte über das Plasmid pQE-32 in *E. coli* M15 exprimiert und über einen N-terminalen His-Tag aufgereinigt werden (Schrötter, 2018). Dabei fiel auf, dass das aufgereinigte Protein in einem Zymogramm auch weitere Banden neben

## Diskussion

---

der PP-AtIA-Bande aufweist. Es handelt sich dabei um Banden korrespondierend zu AtIA, PP-AM, AM und GL (Schrötter, 2018; Axtmann, 2019). Hätte es eine Prozessierung von PP-AtIA durch Proteasen aus *E. coli* gegeben, hätte allerdings nur PP-AM ebenfalls aufgereinigt werden können, da der His-Tag dem Propeptid vorgeschaltet ist. Dementsprechend könnte AtIA auch eine Protease-unabhängige Auto-Prozessierung aufweisen. Diese könnte möglicherweise erst nach Abspaltung des Signalpeptides erfolgen, um eine intrazelluläre Spaltung in die aktiven Hydrolasen AM und GL zu verhindern. Zur Verifizierung der selbstständigen Spaltung wurden mehrere hydrolytisch aktive Banden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, in Puffer resorbiert und erneut in ein Zymogramm eingesetzt. Es zeigte sich, dass die PP-AtIA-Bande tatsächlich kleinere Fragmente korrespondierend zu PP-AM, AM und GL aufwies. Dies ist das erste Mal, dass ein solcher Vorgang für AtIA beschrieben wurde. Eine solche Auto-Prozessierung ist auch von anderen Enzymen bekannt, vor allem Proteasen. FtsH, eine Membran-gebundene ATP-abhängige Protease aus *E. coli* und Aur, eine Metalloprotease aus *S. aureus*, verantwortlich für die Aktivierung von SspA und SspB, sowie die Cystein-Protease ScpA aus *S. aureus* führen eine Auto-Prozessierung durch (Akiyama, 1999; Shaw et al., 2004; Nickerson et al., 2008). Für FtsH ist dieser Prozess ATP-abhängig. Der in der DNA-Reparatur involvierte LexA-Repressor aus *E. coli* kann ebenfalls eine Auto-Prozessierung durchführen. Diese wird allerdings durch eine Co-Protease aktiviert und dient der Regulation von LexA, da es einen Abbau der Fragmente durch ClpXP begünstigt (Neher et al., 2003). Die genauen Mechanismen der Auto-Prozessierung sind wenig erforscht.

Neben einer reduzierten Autolyse zeigten *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R auch eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Lysostaphin. Eine solche Resistenz gegen Lysostaphin ist in verschiedenen VISA ebenfalls beschrieben (Daum et al., 1992; Moreira et al., 1997; Koehl et al., 2004; Wootton et al., 2005; Kim et al., 2012; Berscheid et al., 2014; Kuroda et al., 2019). Lysostaphin ist eine Glycyl-Glycin-Endopeptidase aus *Staphylococcus simulans* und wirkt spezifisch gegen Gram-positive Organismen mit einer Pentaglycin-Brücke zur Quervernetzung des Peptidoglykan (Gonzalez-Delgado et al., 2020). Somit bindet Lysostaphin schwächer an Peptidoglykan, welches eine geringere Quervernetzung aufweist (Gründling et al., 2006b). Stämme mit einer geringeren Lysostaphin-Empfindlichkeit weisen oftmals Mutationen in *femA* oder *femB* auf, da diese Gene in die Quervernetzung involviert sind (Stranden et al., 1997; Nega et al., 2015). Beide dieser Gene waren zwar frei von Mutationen in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R, jedoch waren diese ebenfalls in beiden Stämmen runterreguliert. Ebenfalls assoziiert mit einer geringeren Lysostaphin-Empfindlichkeit sind *sagB* und *lyrA* (auch *spdC* genannt). Eine Deletion von *sagB* in *S. aureus* führt neben einer veränderten Glykan-Kettenlänge und Protein-Sekretion auch zu einer Resistenz gegenüber Lysostaphin (Chan et al., 2016). *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R besitzen ein mutiertes *sagB*, wodurch es nach 39 Aminosäuren zu einem Abbruch der Translation durch ein Stopcodon kommt. Das Lysostaphin-Resistenz-Protein LyrA (SpdC) ist ein negativer Regulator für Gene des WalRK-Regulons und erhöht die Resistenz gegen Lysostaphin

(Gründling et al., 2006a; Poupel et al., 2018). In *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R war das dazugehörige Gen hochreguliert. Schließlich führt auch eine höhere Konzentration von WTA zu einer höheren Lysostaphin-Resistenz (Wu et al., 2019), beziehungsweise bindet eine WTA-freie *S. aureus*  $\Delta tagO$ -Mutante mehr Lysostaphin als der Wildtyp (Gründling und Schneewind 2006). Es scheinen verschiedene Faktoren, unter anderem die geringe Quervernetzung des Peptidoglykan, aber auch die Mutation in *sagB*, sowie ein höherer Gehalt an WTA, zu der geringen Lysostaphin-Empfindlichkeit in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R beizutragen.

Im Ganzen stellt sich die Autolyse in *S. aureus* VC40 als komplex heraus. Zum einen zeigt der Stamm in verschiedenen Lyse-Assays einen reduzierten Zellwandabbau, zum anderen sind aber alle relevanten Autolysine hochreguliert, obwohl das zuständige WalRK-TCS durch eine Mutation an Aktivität zumindest in vitro verloren hat. Allerdings wurden diese Befunde in Abwesenheit von YycH und den, noch unbekanntem, Signalmolekülen gemessen. Anscheinend erfolgt eine veränderte Prozessierung des Hauptautolysins AtIA, wodurch die hydrolytische Aktivität stark eingeschränkt wird. Ebenfalls könnten Wandteichonsäuren und auch Lipoteichonsäuren durch Oberflächenmodifikationen die Autolyse regulatorisch beeinflussen.

### 4.3 Einfluss von Wandteichonsäuren auf die Reduktion der Vancomycin-Empfindlichkeit

Wandteichonsäuren stellen wichtige und reichlich vorhandene Polymere innerhalb der Zellwand dar. Bei den WTA handelt es sich um lange Ribitol-Phosphat-Ketten, die über ein Disaccharid aus N-Acetyl-Glucosamin-1-Phosphat und N-Acetyl-Mannosamin gefolgt von zwei Glycerol-3-Phosphat-Einheiten an der Zellwand verankert sind. Zusätzlich werden die Ribitol-Einheiten mit D-Alanin und N-Acetyl-Glucosamin dekoriert (Sewell und Brown, 2014; Winstel et al., 2014). Interessanterweise besteht eine Verbindung zwischen den WTA und der Methicillin-Resistenz von MRSA. Die Deletion von *tagO*, dem ersten Enzym der WTA-Biosynthese, führt zu einer Resensibilisierung von MRSA zu  $\beta$ -Laktamen (Campbell et al., 2011; Farha et al., 2013). Neben der kompletten Abwesenheit von WTA hat auch das Glykosylierungsmuster von bestehenden WTA einen Einfluss auf die Resensibilisierung. So führt auch eine Deletion von *tarS* ( $\beta$ -GlcNAc) zu einer höheren Empfindlichkeit von MRSA zu  $\beta$ -Laktamen (Brown et al., 2012). Des Weiteren sind WTA zeitliche und räumliche Regulatoren für AtIA und PBP4 und eine Deletion von *tagO* und damit eine WTA-freie Zellwand in *S. aureus* führt zu der freien Verteilung von sowohl PBP4 als auch AtIA über die gesamte Zelloberfläche (Atilano et al., 2010; Schlag et al., 2010).

## Diskussion

---

Beide Proteine, die normalerweise an der Teilungssepte lokalisieren, sind in *tagO*-Mutanten in ihrer regulären Funktion gestört. Schlag et al., (2010) präsentierten eine Exklusions-Strategie, wonach reife WTA die Bindung von AtIA-Fragmenten an die Zellwand behindern, woraufhin die Autolyse-Aktivität auf die Teilungssepte beschränkt blieb. Obwohl die WTA-Biosynthese in der Teilungssepte stattfindet, soll die dortige Polymerisation (innerhalb der Zelle) der noch unreifen WTA-Form die Bindung von AtIA nicht hemmen. Darauf aufbauend spekulieren Biswas et al., (2012), dass WTA Protonen in der Zellwand halten, wodurch ein saures Milieu erzeugt und die pH-abhängige Aktivität von AtIA reduziert wird. In der Teilungssepte hingegen werden Protonen, aufgrund einer geringeren Konzentration von WTA oder der Präsenz von unreifen WTA, nicht zurückgehalten. Andererseits führen kationische Stoffe, wie Pep5, Lysozym oder RNase A, in *Staphylococcus simulans* und *Staphylococcus aureus* zu einer Modulation der Autolysin-Aktivität, potenziell durch eine Veränderung der Bindungs-Affinität zu LTA und möglicherweise WTA in Abhängigkeit von der Ionenstärke (Wecke et al., 1982; Bierbaum und Sahl, 1985; Bierbaum und Sahl, 1987). So könnten die WTA womöglich auch AtIA sequestrieren, wie es Tiwari et al., (2018) beschreiben. Dabei wurde die WTA-Translokation durch TarGH in *S. aureus* mittels Targocil blockiert, wodurch die Autolyse signifikant abnahm, basierend auf einer Retention der Autolysine in der Zelle, wobei weder eine transkriptionelle Repression der Autolysine noch eine Veränderung der Peptidoglykan-Struktur vorlag. Im Fall der PBP4-Lokalisation wird ähnlich argumentiert, sodass reife WTA die Lokalisation verhindern und gleichzeitig unreife WTA an der Teilungssepte eine Bindung nicht beeinträchtigen (Atilano et al., 2010). Dieser Mechanismus ist jedoch weniger gut erforscht. WTA stellen somit eine relevante Verbindung zwischen der Quervernetzung der Zellwand und dem Abbau der Zellwand dar, beides Systeme, die mit dem VISA-Phänotyp zusammenhängen.

Allerdings ist die Rolle der WTA in VISA nur wenig erforscht. Sieradzki und Tomasz (2003) merkten beispielsweise an, dass die reduzierte Autolyse der klinischen VISA-Stämme *S. aureus* JH9 und JH14 auf quantitative oder qualitative Veränderungen der WTA basieren könnte. Auch die in dieser Arbeit durchgeführte Schachbrett-MHK mit einer Kombination aus Vancomycin und Tunikamycin, einem Antibiotikum, welches den ersten Schritt der WTA-Biosynthese hemmt (Pasquina et al., 2013), konnte zwar einen Effekt der WTA auf die Vancomycin-Empfindlichkeit in den Laborstämmen *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) zeigen, jedoch nicht in der Kontrolle *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* und dem klinischen VISA *S. aureus* 137/93A. Eine solche Synergie zwischen Vancomycin und Tunikamycin lag in einer Schachbrett-MHK für MRSA-Stämme ebenfalls nicht vor (Campbell et al., 2012). Anscheinend sind die WTA nur in VISA-Stämmen relevant für die Vancomycin-Empfindlichkeit. In vorläufigen Experimenten zu der Lyse verschiedener Zellwand-Fragmente der VISA-Stämme durch aufgereinigtes AtIA (Abb. 61) konnte auch gezeigt werden, dass für VSSA eine Abspaltung der D-Alanin-

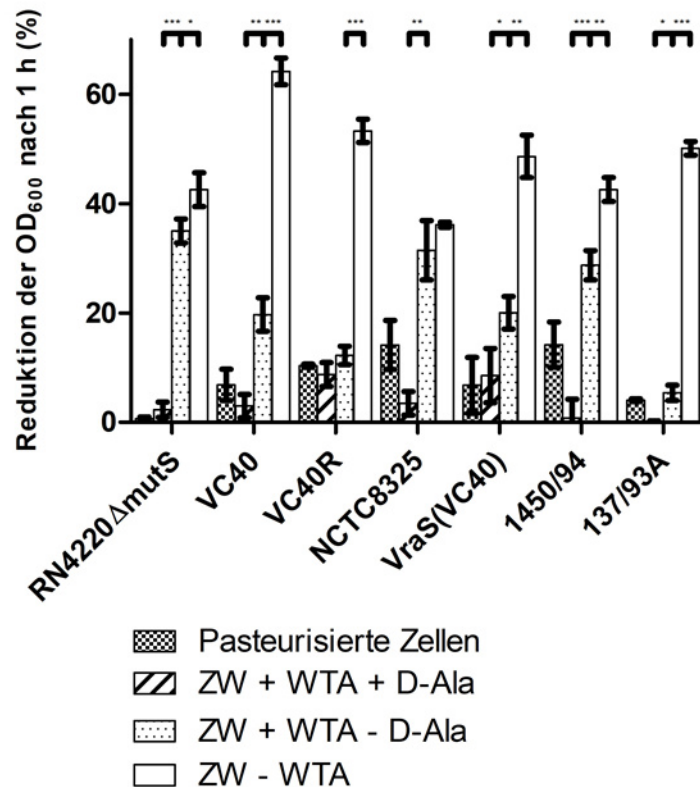


Abbildung 61 Lyse-Test von verschiedenen Zellwand-Fragmenten (pasteurisierte Zellen; Zellwand mit Wandteichonsäuren modifiziert mit D-Alanin; Zellwand mit Wandteichonsäuren ohne D-Alanin; Zellwand ohne Wandteichonsäuren) der Stämme *S. aureus* RN4220ΔmutS, *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R, *S. aureus* NCTC8325, *S. aureus* VraS(VC40), *S. aureus* 1450/94 und *S. aureus* 137/93A mit 2 µg/mL aufgereinigtem AtIA (ohne Signalpeptid) nach 1 Stunde Inkubation. Dargestellt ist der Mittelwert von drei biologischen Replikaten. Die Daten wurden aus Schrötter 2018 entnommen (\* p<0,05; \*\* p<0,005; \*\*\* p<0,0005).

Ester der WTA zu einer verstärkten Lyse führt. Für VISA jedoch kommt es erst nach der kompletten Freisetzung der WTA aus der Zellwand zu einer verstärkten Lyse, die über die der VSSA hinausgeht (Schrötter, 2018). Dieser Effekt ist am größten für *S. aureus* VC40, was womöglich an der geringen Quervernetzung des Peptidoglykans dieses Stammes liegt.

Aus diesen Gründen wurden die Wandteichonsäuren der verwendeten VISA-Stämme in dieser Arbeit genauer untersucht. Insgesamt gab es in keinem der getesteten Parameter signifikante Unterschiede zwischen dem klinischen VISA *S. aureus* 137/93A und der klinischen VSSA-Kontrolle *S. aureus* 1450/94. Auch im Vergleich zu den beiden Kontrollen *S. aureus* RN4220ΔmutS und *S. aureus* NCTC8325 war einzig der Anteil an substituierten D-Glucosamin der WTA in den beiden klinischen Stämmen signifikant erhöht. Demnach schien der Einfluss der WTA auf die Vancomycin-Empfindlichkeit von *S. aureus* 137/93A gering zu sein, zumal auch der Einsatz von Tunikamycin zu keiner Veränderung der Vancomycin-MHK führte. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass alle drei VISA-Laborstämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) einen signifikant höheren Gehalt an Phosphat aufwiesen. Gajdiss et al., (2020) konnten zeigen, dass die Hemmung der Expression der zwei positiven Aktivatoren des WalRK-TCS, YchH und YclI, durch Antisense-RNA zu einem erhöhten WTA-

## Diskussion

---

Gehalt in der Zellwand führt. Demnach könnte die Mutation in *walk* in *S. aureus* VC40 an dem Anstieg der WTA-Konzentration involviert sein. Allerdings erklärt dies nicht den höheren Phosphat-Gehalt in dem Stamm *S. aureus* VraS(VC40), welcher keine Mutation in *walRK* aufwies. Für *S. aureus* VC40 könnte ebenso die geringere Quervernetzung eine Rolle spielen. WTA werden durch Teichonsäure-Ligasen nur an nicht-quervernetztes Peptidoglykan angehängen, wegen einer sterischen Hinderung bei quervernetztem Peptidoglykan (Schaefer et al., 2018). Ein höherer Gehalt an Phosphat kann dabei zwei Ursachen haben, einerseits eine größere Anzahl an WTA und andererseits WTA mit einer höheren Kettenlänge. Insgesamt war die Kettenlänge der WTA in den VISA-Laborstämmen etwas erhöht, wenn auch nicht signifikant. Interessanterweise wird die Kettenlänge durch *agr* beeinflusst. In *S. aureus* wird die Synthese von kurzen WTA-Ketten von *agr* durch die Hemmung der Expression von *tarK* unterdrückt und es entstehen durch TarL synthetisierte längere WTA-Ketten (Meredith et al., 2008; Pereira et al., 2008). In der RNA-seq war TarK in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R runterreguliert. Alle Stämme außer *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* sind *agr*+. Das gilt auch für die Tochterstämmen *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Auch in der Alcian-Blue SDS-PAGE war deutlich zu sehen, dass alle Stämme längere WTA als der Kontrollstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* besaßen. In der Literatur sind sowohl VISA mit einem höheren Phosphat-Gehalt als auch solche mit einem geringeren Phosphat-Gehalt als die jeweiligen Kontrollen beschrieben (Sieradzki und Tomasz, 2003; Koehl et al., 2004). Wahrscheinlich kommt es vor allem auf das Zusammenspiel von Zellwanddicke, Quervernetzung, Autolysin-Regulation und WTA-Gehalt/Modifikation an. Die WTA von allen drei VISA-Laborstämmen war ebenfalls signifikant mehr mit D-Glucosamin modifiziert. Für den hochresistenten Stamm *S. aureus* VC40 war die Modifizierung der WTA mit Zucker am prägnantesten ausgebildet. Dieser Stamm besaß zusätzlich auch eine erhöhte Konzentration von D-Alanin an den WTA.

Auch für die Ladung der Zelloberfläche spielen WTA, beziehungsweise die positiv geladenen D-Alanin-Ester der WTA, eine Rolle. Da die *mprF*-Mutation in *S. aureus* VC40 als Grund für die weniger negativ geladene Zelloberfläche ausgeschlossen werden konnte, zeigte sich nach der Analyse der WTA, dass höchstwahrscheinlich die D-Alanylierung der Wandteichonsäuren dieses Stammes ausschlaggebend war und damit zu einer elektrischen Abstoßung des positiv geladenen Vancomycin führte. Die RNA-seq-Analyse belegte, dass *S. aureus* VC40 alle Gene des für die D-Alanylierung der WTA zuständigen *dltABCD*-Operons, welches von dem GraSR-TCS abhängig ist, hochreguliert hatte. Womöglich sind auch die LTA an der D-Alanylierung der WTA beteiligt. Haas et al., (1984) konnten zeigen, dass ein Transfer von D-Alanin der LTA zu den WTA in *S. aureus* existiert. Ebenso sind die WTA des LTA-freien *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *spa* $\Delta$ *ltaS* nur geringfügig D-alanyliert (Reichmann et al., 2013). Womöglich besitzt der Methicillin-Resistenz-Faktor FmtA auch eine D-Amino-Esterase-Aktivität und hydrolysiert die D-Alanin-Ester der LTA (Rahman et al., 2016). Der Mechanismus, mit dem die LTA als Donor von D-Alanin für die WTA in *S. aureus* dienen, ist jedoch nicht abschließend geklärt (van Dalen et al., 2020). In *S. aureus* ist



## Diskussion

---

FmtA Teil des Zellwandstress-Regulon unter der Kontrolle des VraSR-TCS und war hochreguliert in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Hohe FmtA-Konzentrationen von  $> 0,2 \mu\text{M}$  reduzieren außerdem die Autolyse und fördern die Zellwand-Biosynthese (Qamar und Golemi-Kotra, 2012). Im Gegensatz zu *S. aureus* VC40 waren die *dlt*-Gene in *S. aureus* VC40R runterreguliert, was zu einer geringeren Substituierung der WTA mit D-Alanin führte. Eine direkte Wasserstoff-Bindung von Vancomycin an die WTA ist allerdings unwahrscheinlich, da der D-Alanin-Ester der WTA positiv geladene Amino-Gruppen besitzt, im Gegensatz zu den negativ geladenen Carboxyl-Gruppen der endständigen D-Alanin-Reste des Peptidoglykans (Peschel et al., 2000). Peschel et al., (1999) konnten zeigen, dass ein Stamm mit zusätzlichen *dlt*-Operon-Kopien mehr D-Alanin an den WTA aufweist und positiv geladene antimikrobielle Peptide abstößt. In dem hVISA-Laborstamm *S. aureus* 10\*3d1 mit einer *rpoB*-Mutation kann ebenfalls eine erhöhte Expression des *dlt*-Operons mit gleichzeitig verringerter negativer Ladung der Zelloberfläche festgestellt werden (Cui et al., 2010). Gleichermaßen besitzen auch *S. aureus* Stämme mit reduzierter Daptomycin-Empfindlichkeit, neben einer verdickten Zellwand, oft eine erhöhte Konzentration an WTA mit vermehrter D-Alanylierung, basierend auf einem hochregulierten *dlt*-Operon (Bertsche et al., 2011; Bertsche et al., 2013). Wie beschrieben führt die Abspaltung von D-Alanin der WTA zu einer erhöhten Lyse durch AtIA in VSSA-Stämmen, jedoch nicht in VISA-Stämmen, wo die Zellwand komplett frei von WTA sein muss (Abb. 61). Da eine Protonen-reiche Umgebung die Aktivität der Autolysine einschränkt, sollte eine höhere Konzentration an positiv-geladenen D-Alanin an den WTA im Allgemeinen zu einer insgesamt geringeren Autolyse führen (Biswas et al., 2012). Weil die D-Alanylierung der WTA außerhalb der Zelle erfolgt, liegt hier der nach Schlag et al., (2010) postulierte Unterschied zwischen den reifen WTA der Zellwand und unreifen WTA der Teilungssepte. Der Einfluss der D-Alanylierung ist in der Literatur jedoch umstritten. So führt die Abwesenheit von D-Alanin von den LTA und WTA in *Bacillus subtilis* zu einer erhöhten Autolyse (Wecke et al., 1997). Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die D-Alanin-Ester die Anzahl an potenziellen anionischen Bindungsstellen für Autolysine an den LTA und WTA bestimmen und deswegen eine  $\Delta dltA$ -Mutante mehr Autolysine bindet (Wecke et al., 1997; Neuhaus und Baddiley, 2003). Auch Brown et al., (2012) fanden eine erhöhte Autolyse in einer *S. aureus*  $\Delta dltA$ -Mutante. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung von *S. aureus* mit Epicatechin-Gallat und die dadurch folgende Störung der D-Alanylierung der WTA zu einer dickeren Zellwand und reduzierten Trennung der Tochterzellen (Bernal et al., 2009). Peschel et al., (2000) beschrieben ebenfalls, dass das Fehlen von D-Alanin-Estern an den WTA von *S. aureus* die Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin erhöht und die Autolyse reduziert. Die  $\Delta dltA$ -Mutante kann auch mehr Vancomycin an die Zellwand binden. Daneben ist die D-Alanylierung auch von äußeren Faktoren, wie dem pH, der Temperatur und dem Salzgehalt abhängig (Neuhaus und Baddiley, 2003). Eine hohe Salzkonzentration führt so zu einer reduzierten Expression des *dlt*-Operons und somit zu einem geringeren D-Alanin:Phosphat-Verhältnis der WTA (Heptinstall et al., 1970;

## Diskussion

---

Koprivnjak et al., 2006). Unter Stress wird das D-Alanin eher für die Peptidoglykan-Biosynthese als für die Modifizierung der WTA verwendet. Das konnte ebenfalls bei der Zugabe von sub-inhibitorischen Konzentrationen von Vancomycin zu dem VSSA-Stamm *S. aureus* ATCC6538P gezeigt werden (Singh et al., 2017).

Neben der erhöhten D-Alanylierung der WTA zeigte *S. aureus* VC40 auch eine erhöhte Glykosylierung der WTA. Damit wies *S. aureus* VC40 die größte Modifizierung der WTA aller untersuchten Stämme auf. Die Modifikation von WTA mit D-Glucosamin ist wichtig in Bezug auf die Virulenz von *S. aureus*. So ist die Kolonisation des Nasenvorhofs nur mit glykosylierten WTA möglich, wobei die Konfiguration keine Rolle spielt (Winstel et al., 2015). Die WTA im Allgemeinen und das Glykosylierungsmuster im Speziellen haben auch eine Bedeutung auf die Lyse von *S. aureus* durch Bakteriophagen (Xia et al., 2011). *S. aureus* Mutanten ohne WTA können nicht länger von Bakteriophagen infiziert werden (Weidenmaier et al., 2004; Atilano et al., 2010). Während der WTA-Biosynthese wird die Konfiguration der Glykosylierung durch die Enzyme TarS und TarM kontrolliert. Dabei führt TarM zu einer  $\alpha$ -Glykosylierung ( $\alpha$ -GlcNAc) und TarS zu einer  $\beta$ -Glykosylierung ( $\beta$ -GlcNAc) (Winstel et al., 2014). Beide relevanten Konfigurationen sind in der Position eins und vier (1,4), da keiner der in dieser Arbeit verwendeten Stämme das Gen *tarP*, welches  $\beta$ -1,3-GlcNAc produziert (Gerlach et al., 2018), besaß. Bakteriophagen erkennen bestimmte Glykosylierungsmuster der WTA und brauchen diese zur Bindung an die Zelle. Entsprechend benötigen Phagen der Familie Podoviridae  $\beta$ -GlcNAc, und solche der Familie der Siphoviridae adsorbieren vor allem an  $\alpha$ -GlcNAc, jedoch teilweise wahrscheinlich auch an  $\beta$ -GlcNAc (Xia et al., 2011; Li et al., 2015; Li et al., 2016; Ingmer et al., 2019). Im Gegensatz dazu erkennen Phagen der Familie Myoviridae meist nur das anionische Rückgrat der WTA (Xia et al., 2011; Azam et al., 2018). In der Phagentypisierung waren alle *S. aureus* Stämme empfindlich gegen Myoviridae, wodurch bestätigt wurde, dass die WTA der Stämme für Phagen zugänglich waren. Durch den Verlust aller integrierten Phagen und Aktivität der Restriktionsenzyme, zeigte *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit gegenüber den Phagen des Internationalen Phagensets. Im Kontrast dazu wurde *S. aureus* VC40 nur durch Podoviridae lysiert und zeigte auch im Phagen Adsorptions-Assay keine Anlagerung von Siphoviridae. Somit wies auch die Phagentypisierung auf eine größere Rolle der WTA zur Entstehung des VISA-Phänotyps von *S. aureus* VC40 hin. Insgesamt bestätigte und erweiterte die durchgeführte Phagentypisierung die Ergebnisse von Berscheid (2013). Ein solch starker Kontrast in der Phagentypisierung konnte auch für sieben VISA- und VSSA-Paare von Gustafson et al., (2003) gezeigt werden. Diese ist wohl auf eine Veränderung der Phagen Zellwand-Rezeptoren zurückzuführen und führt zu teilweise nicht-typisierbaren VISA-Varianten.

Zusammengenommen sind Wandteichonsäuren und deren Modifikationen für die Quervernetzung des Peptidoglykans, die Autolyse, die Ladung der Zelloberfläche, die Zugänglichkeit für Bakteriophagen

und die Virulenz von Bedeutung. In *S. aureus* VC40 führt eine höhere Konzentration an D-Alanin der WTA zu einer geringeren negativen Ladung der Zelloberfläche und damit zu einer geringeren Affinität zu positiv geladenen Glykopeptiden. Durch eine erhöhte und modifizierte Glykosylierung der WTA hat der Stamm die Anfälligkeit gegenüber Siphoviridae verloren. Der Unterschied in der WTA-Komposition und -Konzentration von *S. aureus* VC40 gegenüber dem Elternstamm könnte demnach einen Einfluss auf die geringere Quervernetzung und Autolyse haben.

### 4.3.1 Auswirkung von $\beta$ -glykosylierten Wandteichonsäuren auf die Ausprägung des VISA-Phänotyps

Aufgrund der veränderten Phagentypisierung, besonders hinsichtlich der Podoviridae, wurde die Konfiguration der Wandteichonsäuren der verschiedenen Stämme durch eine NMR-Analyse genauer untersucht. Es zeigte sich, dass *S. aureus* VC40 im Gegensatz zum Elternstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS und der Revertanten *S. aureus* VC40R neben den  $\alpha$ -glykosylierten WTA ebenfalls  $\beta$ -glykosylierte WTA besaß. Zudem war der Anteil an  $\beta$ -GlcNAc dreimal so groß wie der Anteil an  $\alpha$ -GlcNAc. Im Microarray von *S. aureus* VC40 war das für die  $\alpha$ -Glykosylierung verantwortliche Gen *tarM* runterreguliert, wobei die RNA-seq dies nicht bestätigte. Allerdings zeigte die RNA-seq, dass *tarM* in der Revertanten *S. aureus* VC40R hochreguliert war. Interessanterweise wies auch *S. aureus* VraS(VC40) eine geringere Expression von *tarM* auf. Howden et al., (2008) konnte ebenfalls zeigen, dass in drei von fünf klinischen hVISA/VISA-Stämmen die Glykosyltransferase *tarM*, für die  $\alpha$ -Glykosylierung der WTA, in einem Microarray runterreguliert ist, im Vergleich zum VSSA-Wildtyp. Die übergeordnete Regulation von *tarM* und *tarS* ist noch nicht abschließend geklärt (Mistretta et al., 2019). In *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung der Poly-Glycerol-Phosphat WTA mit  $\alpha$ -Glukose mittels TagE durch YycGF, das homologe System zu WalRK in *S. aureus*, kontrolliert wird (Howell et al., 2003).

Der  $\beta$ -GlcNAc-Anomer wird bevorzugt auf Kosten des  $\alpha$ -GlcNAc-Anomers exprimiert, wenn *S. aureus* auf Stress-induzierendem Medium mit hohen NaCl-Konzentrationen angezogen wird (Mistretta et al., 2019). So konnte auch gezeigt werden, dass die Gegenwart von 2 M NaCl die Expression von *tarM*, und damit den Einbau von  $\alpha$ -GlcNAc an die WTA, in *S. aureus* reduziert (Price-Whelan et al., 2020). In dieser Arbeit wurde ein Einbau von  $\beta$ -GlcNAc in die WTA durch 4 % NaCl im Medium ebenfalls bestätigt. Aufgrund dessen wurde auch der Einfluss des Glykosylierungsmuster auf die Vancomycin-Empfindlichkeit durch die Anwesenheit von NaCl im Medium getestet. Es stellte sich heraus, dass dadurch die Vancomycin-MHK von *S. aureus* VC40R um 3 Stufen von 4  $\mu$ g/mL auf 32  $\mu$ g/mL in BHI-Medium gesteigert werden konnte. Demnach trugen  $\beta$ -glykosylierte WTA zu einem großen Teil zu der geringen Vancomycin-Empfindlichkeit des VISA-Laborstamm *S. aureus* VC40 bei. Im Gegensatz dazu

zeigten weder der Wildtyp *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* noch der Stamm *S. aureus*  $\Delta$ *tarM* $\Delta$ *tarS* pTtarS mit einer induzierbaren Expression des  $\beta$ -GlcNAc-Anomers eine Veränderung der Vancomycin-MHK. Da nur bei *S. aureus* VC40R eine Veränderung der Vancomycin-MHK eintrat, muss davon ausgegangen werden, dass bestimmte VISA-Charakteristika, wie eine dickere Zellwand, zusätzlich für einen Effekt der  $\beta$ -Glykosylierung bestehen müssten. Es könnte ebenfalls sein, dass es auf die Kombination aus  $\alpha$ -GlcNAc- und  $\beta$ -GlcNAc-Anomeren an den WTA ankommt. Bei *S. aureus* VraS(VC40) konnte, basierend auf der Lyse durch Podoviridae und der reduzierten Expression von *tarM*, erwartet werden, dass dieser Stamm ebenfalls, auch ohne den Zusatz von Salz,  $\beta$ -glykosylierte WTA besaß. Allerdings wurde keine NMR-Analyse der WTA zur Bestätigung durchgeführt. Im Fall von *S. aureus* VraS(VC40) könnte es möglicherweise zu negativen Effekten durch den Salz-Stress gekommen sein, da der Hintergrund des Stammes sich von *S. aureus* VC40R unterscheidet, vor allem hinsichtlich der *walk*-Mutation. So ist zu bedenken, dass osmotischer Stress zu einer komplexen Veränderung der Gen-Expression und -Regulation führt (Bremer und Krämer, 2019). Ein hoher Salzstress ist ebenso verantwortlich für die vermehrte Glykosylierung von LTA, welche unter normalen Bedingungen nur Spuren von D-Glucosamin enthalten (Kho und Meredith, 2018b). LTA besitzen jedoch einen gesonderten Mechanismus, da die Glykosylierung außerhalb der Zelle stattfindet (Rismondo et al., 2018). Ebenso führt eine hohe Salzkonzentration zu einer verminderten Expression des *dlt*-Operons und damit zu weniger D-Alanin an den LTA und WTA (Heptinstall et al., 1970; Fischer und Rösel, 1980; Koprivnjak et al., 2006). Es konnte auch gezeigt werden, dass sich hohe Salzkonzentrationen positiv auf die Autophosphorylierungsaktivität von Walk auswirken (Türck und Bierbaum, 2012).

Der Einfluss der Osmolarität auf die Vancomycin-MHK ist in der Literatur beschrieben. So zeigen 136 klinische MRSA-Stämme in MH-Medium mit 2 % NaCl insgesamt eine schrittweise Verschiebung der Vancomycin-MHK (Jung et al., 2002). Ebenfalls fanden Goldstein et al., (2004) heraus, dass die Vancomycin-MHK von 14 klinischen VISA-Stämmen in BHI-Medium mit 4 % NaCl, um das bis zu Dreifache ansteigt, im Vergleich zu Medium ohne Salz. Alle getesteten MSSA- und MRSA-, aber auch einige VISA-Isolate, wie *S. aureus* Mu50 und *S. aureus* Mu3, zeigen keinen Effekt. Interessanterweise besitzen die bekanntesten VISA-Stämme, *S. aureus* Mu50, *S. aureus* Mu3, *S. aureus* JH9 wie auch weitere VISA-Isolate, die zum klonalen Komplex 5 (CC5) gehören, nur das *tarS*-Gen, wodurch nur  $\beta$ -glykosylierte WTA präsent sind (Winstel et al., 2014). Womöglich zeigt der Zusatz von Salz im Medium deshalb keinen Effekt auf die Vancomycin-MHK. In einer Multicenter-Studie aus China konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Mehrheit der klinischen *S. aureus* Isolate (126 spa-Typen, 17 klonale Komplexe) *tarS*, und nur eine Minderheit beide Glykosyltransferasen besitzt. Keines der Isolate weist jedoch eine geringere Vancomycin-Empfindlichkeit auf (Xiong et al., 2020). Dies könnte genauso ein Hinweis darauf sein, dass neben dem Glykosylierungsmuster der WTA auch weitere VISA-Charakteristika vorhanden

sein müssen. Allerdings weisen klinische MRSA-Stämme öfter *tarS* auf, da nur  $\beta$ -GlcNAc, aber nicht  $\alpha$ -GlcNAc, auch zu einer verringerten Methicillin-Empfindlichkeit führt (Brown et al., 2012).

Wie vorher angedeutet sind WTA räumliche Regulatoren der Autolyse durch AtIA (Schlag et al., 2010). Um den Einfluss der Glykosylierung auf die Autolyse näher zu untersuchen, wurde die Bindekapazität der Zellwand einzelner Stämme für aufgereinigtes AtIA getestet. Hierbei zeigte sich, dass die beiden Stämme mit einer geringen Autolyse, *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40), am wenigsten AtIA an die Zellwand binden konnten. Eine geringere Bindekapazität der Zellwand für AtIA konnte ebenfalls für den Expressionsstamm *S. aureus*  $\Delta tarM\Delta tarS$  pTtarS beobachtet werden, auch wenn dieser Stamm keine geringere Autolyse mit Triton X-100 aufwies. Brown et al., (2012) fanden ebenfalls keinen Unterschied in der Triton X-100 induzierten Autolyse von *S. aureus* Stämmen, basierend auf dem Glykosylierungsmuster der WTA. Demnach könnten  $\beta$ -glykosylierte WTA zu einer geringeren Bindungsaffinität der Zellwand für AtIA führen und so zusammen mit weiteren VISA-Merkmalen, wie einer dicken Zellwand oder einem veränderten Autolysin-Profil, die Autolyse reduzieren. Da die Glykosylierung der WTA innerhalb der Zelle stattfindet, besitzen aber auch die unreifen WTA der Teilungssepte das entsprechende Glykosylierungsmuster.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Modifikation von WTA mit  $\beta$ -GlcNAc zu einem großen Teil zur Verringerung der Vancomycin-Empfindlichkeit in *S. aureus* VC40 beiträgt. Zudem führt der Einbau von  $\beta$ -glykosylierten WTA zu einer geringeren Affinität des Hauptautolysins AtIA zur bakteriellen Zellwand. Zusammen mit den weiteren VISA-Charakteristika und der veränderten Prozessierung von AtIA trägt die Modifikation der WTA zu der geringen Autolyse von *S. aureus* VC40 bei. Damit ist in dieser Arbeit erstmalig die Relevanz der WTA-Glykosylierung in der Ausprägung des VISA-Phänotyps beschrieben worden.

### **4.4 Bedeutung des Zweikomponentensystems VraSR in VISA-Stämmen**

Mit der Ausbildung des VISA-Phänotyps sind vor allem drei Zweikomponentensysteme assoziiert, GraSR, WalRK und VraSR (Hu et al., 2016). Das GraSR-TCS, zusammen mit den ABC-Transportern VraFG und dem Protein GraX, ist zuständig für die Kontrolle der Expression des *dlt*-Operons und *mprF*, und damit maßgeblich involviert in die Ladung der Zelloberfläche (Herbert et al., 2007; Falord et al., 2012). Wie bereits erwähnt reguliert das WalRK-TCS die Expression vieler Autolysine und damit die Zellteilung, das Zellwachstum und den Zellwandumbau (Delaune et al., 2012). Im Gegensatz dazu steuert das

## Diskussion

---

VraSR-TCS die Expression von *pbp2*, *fmtA*, *murZ*, *sgtB* und *tagA* und dadurch die Zellwand-Biosynthese (Kuroda et al., 2003). Vor allem *vraSR* und das akzessorische *vraT* sind in einer Vielzahl von VISA-Stämmen von Mutationen betroffen, welche zu einer verringerten Vancomycin-Empfindlichkeit führen (Mwangi et al., 2007; Cui et al., 2009; Katayama et al., 2009; Kato et al., 2010; Renzoni et al., 2011; Doddangoudar et al., 2012; Gardete et al., 2012; Hafer et al., 2012; Berscheid, 2013; Alexander et al., 2014; Berscheid et al., 2014; Baek et al., 2017; Tan et al., 2017). Allerdings werden einzelne Mutationen in VISA oftmals nicht gesondert auf den Effekt auf die Vancomycin-MHK getestet, wie es für VraS(D242G; L114S) in *S. aureus* VraS(VC40) gemacht wurde.

Die genaue regulatorische Funktion von *vraT* ist nicht eindeutig. So gibt es einerseits eine *S. aureus*  $\Delta$ *vraT*-Deletionsmutante, die eine geringfügige Reduktion der Vancomycin-MHK von 2 auf 1,5 und eine Reduktion der *vraS*- und *vraR*-Expression im Microarray zeigt. VraT scheint also ein Aktivator zu sein und könnte als Membranprotein dabei direkt mit VraS interagieren (McCallum et al., 2011; Boyle-Vavra et al., 2013). Allerdings hatte ein potenziell funktionsloses VraT mit einem Y220C Aminosäureaustausch in *S. aureus* SG-R eine höhere Expression von *vraS* zur Folge und führt zur Bildung eines VISA. Die Komplementierung dieses Stammes mit einem *vraT*-Gen aus dem Wildtyp *S. aureus* USA300 Stamm erzielt eine starke Reduktion der *vraS*-Expression (Gardete et al., 2012). Genauso führt ein mutiertes VraT(L71Stop) Protein in einem LTA-negativen *S. aureus* zu einer geringeren Vancomycin-Empfindlichkeit (Vancomycin-MHK von 4  $\mu$ g/mL auf 4-8  $\mu$ g/mL) (Karinou et al., 2019). Dies deutet auf eine repressive Funktion von VraT hin (Hu et al., 2016). Auch das homologe Protein in *Bacillus subtilis* und *Streptococcus mutans* *liaF* hemmt das homologe LiaSR-System, wodurch die Deletion zu einer konstitutiven Expression des Regulons führt (Jordan et al., 2006; Suntharalingam et al., 2009). In dieser Arbeit zeigte keiner der beiden Überexpressionsstämme *S. aureus* NCTC8325 pTvraTSR und *S. aureus* NCTC8325 pTvraSR eine Veränderung der Vancomycin-Empfindlichkeit in BHI- oder MH-Medium. Aus diesem Grund konnte keine Aussage über die Rolle von VraT als Aktivator oder Repressor gegeben werden.

Die meisten VISA-Stämme zeigen eine erhöhte Aktivität des VraSR-TCS, welches zu einer dickeren Zellwand führt (Kuroda et al., 2003; McAleese et al., 2006; Camargo et al., 2008; Chen et al., 2018; Sabat et al., 2018; Cui et al., 2021). Insgesamt antwortet das *vraSR*-System auf die Störung der Zellwand-Biosynthese, beispielsweise durch entsprechende Antibiotika wie Vancomycin, Teicoplanin, Ceftizoxim, Imipenem, Bacitracin oder D-Cycloserin. Jedoch führt eine Veränderung der Temperatur, des pHs oder der Osmolarität nicht zu einer Induktion des TCS (Kuroda et al., 2003). Auch die VISA-Laborstämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) zeigten ein hochreguliertes VraSR-TCS und -Regulon im Microarray, RNA-seq und qRT-PCR, basierend auf den Aminosäureaustauschen D242G und L114S (Berscheid, 2013). Die Mutationen befanden sich dabei außerhalb der konservierten Bereiche von *vraS*, was eine mögliche Vorhersage der genaueren Funktionsweise beeinträchtigte. Interessanter-

## Diskussion

---

weise deutete der geringe Unterschied im Wachstum zwischen *S. aureus* VraS(VC40) und dem Wildtyp *S. aureus* NCTC8325 darauf hin, dass die Mutationen nur eine geringe Auswirkung auf die Fitness hatten. *S. aureus* VraS(VC40) bestätigt darüber hinaus, dass die Mutationen in *vraS* zu einer verringerten Vancomycin-Empfindlichkeit beitragen (Berscheid et al., 2014). Kato et al., (2010) konnten zeigen, dass eine höhere Glycopeptid-MHK, in diesem Fall Teicoplanin, stark mit Mutationen in *vraTSR* korrelieren. Generell ist eine erhöhte Expression von *vraSR* und dem entsprechenden Regulation nicht essenziell für die Aneignung einer verminderten Vancomycin-Empfindlichkeit, basierend auf Transkriptom-Daten von fünf klinischen VSSA/VISA-Paaren (Howden et al., 2008). Die Genom-Daten von 29 unterschiedlichen VISA-Isolaten aus Passagier-Versuchen mit Vancomycin zeigen genauso, dass Mutationen in *rpoB*, *graS*, *walk* und *walR* wichtiger für die Verringerung der Vancomycin-Empfindlichkeit sind als Mutationen in *graS* und *vraS* (Wang et al., 2017). Ebenso konnte keine weitere *vraSR*-Mutation in 45 VISA-Stämmen, die aus dem hVISA-Stamm *S. aureus* Mu3 (Vancomycin MHK 2 µg/mL) mit VraS(I5N) Aminosäureaustausch nach einer Passage in Vancomycin erzeugt wurden, festgestellt werden (Matsuo et al., 2013). Eine induzierte Überexpression des TCS in *S. aureus* NCTC8325 pTvraSR und *S. aureus* NCTC8325 pTvraTSR führte ebenfalls zu keiner nennenswerten Reduktion der Vancomycin-Empfindlichkeit.

Die Revertante *S. aureus* VC40R besaß im Vergleich zu *S. aureus* VC40 eher eine niedrigere Expression des VraSR-Regulons, wobei vor allem PBP2 stark gehemmt war. Auch die Expression von *lytM* war im Vergleich zu *S. aureus* VC40 stark reduziert. In der qRT-PCR zeigte *S. aureus* VC40R eine mit dem VSSA-Wildtyp *S. aureus* RN4220Δ*mutS* vergleichbare Expression von *vraS*, jedoch eine erhöhte Expression des im VraSR-Regulon enthaltenen Gen *sgtB*. Anscheinend wurden einige Gene im VraSR-Regulon in *S. aureus* VC40 auch unabhängig von VraSR reguliert. Neben den beiden für die Reduktion der Vancomycin-Empfindlichkeit vorteilhaften Mutationen in *vraS* besaß *S. aureus* VC40R eine weitere Mutation in *vraR* die zu einem Aminosäureaustausch VraR(M54T) führte. Damit befand sich die Mutation in direkter Nachbarschaft zur Asparaginsäure an Stelle 55, auf die der Phosphotransfer von VraS aus erfolgt (Belcheva und Golemi-Kotra, 2008; Galbusera et al., 2011). Bereits Gardete et al., (2012) entdeckten zwei verwandte Stämme, einen VISA und eine Revertante, deren Vancomycin-Empfindlichkeit durch mehrere, gegensätzliche Mutationen im *vraTSR*-Operon beeinflusst werden. Der Stamm *S. aureus* SG-R besitzt eine *vraT*-Mutation und eine hochregulierte Expression von *vraSR* und der Stamm *S. aureus* SG-rev eine zusätzliche Leserahmenverschiebung in *vraS*, wodurch die Expression stark reduziert wird. In dieser Arbeit konnte mittels eines Phosphorylierungs-Assays mit Lithium-Kalium-Acetylphosphat und einer Phos-Tag SDS-PAGE festgestellt werden, dass VraR(M54T) in vitro nicht phosphoryliert werden konnte. Auch mittels der korrespondierenden Histidin-Kinase VraS konnte kein phosphorylierter Regulator VraR(M54T) nachgewiesen werden. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Mutation in *vraR* zu einer Hemmung der Phosphorylierung durch VraS

## Diskussion

---

führte und somit auch die Funktion von VraR als Regulator der Genexpression des VraSR-Regulons gestört war. Die Phosphorylierung von VraR führt in der Regel zu einer Konformationsänderung, die die Dimerisierung von zwei VraR-Regulatoren fördert (Leonard et al., 2013). Tajbakhsh und Golemi-Kotra (2019) konnten zeigen, dass ein mutiertes VraR(M13A) Protein eine stark reduzierte Phosphorylierung durch Lithium-Kalium-Acetylphosphat aufweist und die für die DNA-Bindung notwendige Dimerisierung gestört ist. Jedoch bindet unphosphoryliertes VraR an die -50 bis -75 Region vor dem *vra*-Operon und führt zu einer basalen Expression (Belcheva et al., 2009; Tajbakhsh und Golemi-Kotra, 2019). VraR kann neben VraS möglicherweise auch von der Serin/Threonin Kinase Stk1 (PknB) an den Stellen T106, T119, T175 oder T178 phosphoryliert werden, wodurch jedoch die Bindung zur DNA abnimmt (Kalantari et al., 2015; Canova et al., 2014). Stk1 war sowohl in *S. aureus* VC40 als auch in *S. aureus* VC40R hochreguliert.

Ebenso ist der Sigma-Faktor A (RpoD) involviert in die Regulation des *vraSR*-Operons und interagiert möglicherweise direkt mit VraR (Belcheva et al., 2011). Der Microarray von *S. aureus* VC40 belegt eine reduzierte Expression von Sigma A (Berscheid, 2013), die durch das RNA-seq nicht bestätigt werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte die RNA-seq für *S. aureus* VC40R eine höhere Expression von *rpoD*. Zudem zählte *rpoD* zu den Genen mit einer Mutation in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R. Der Aminosäureaustausch befand sich dabei in der hochkonservierten Domäne 2 von RpoD(D201N), die sowohl für die Erkennung der -10 Promotorregion der DNA als auch für die Interaktion mit RNA-Polymerase-Untereinheiten wie RpoB und RpoC verantwortlich ist (Gross et al., 1998; Bates und Quake, 2014). Wegen der Funktion von RpoD auf die Expression von Haushalts-Genen könnte die Mutation relevant für die verringerte Vancomycin- und Daptomycin-Empfindlichkeit sein, da Mutationen in den Untereinheiten *rpoB* und *rpoC* ebenfalls oft in VISA auftreten (Hu et al., 2016). Die Mutation in *rpoD* könnte ebenso die geringe Wachstumsrate von *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R im Vergleich zu den anderen Stämmen erklären (Rong und Helmann, 1994). Für eine weitere Aufklärung der Rolle von RpoD(D201N) in *S. aureus* VC40 wäre eine Austauschmutante erforderlich.

Der Stamm *S. aureus* VC40 hat zwei Mutationen in der Histidin-Kinase eines TCS, welches auf Zellwandschäden reagiert. Diese Mutationen führten zusammen zu einer erhöhten Expression von VraSR-regulierten Genen. Dementsprechend zeigte sich der gleiche Effekt in der Austauschmutante *S. aureus* VraS(VC40) mit dem Hintergrund von *S. aureus* NCTC8325. In vitro deutete die weitere Mutation in *vraR* aus *S. aureus* VC40R auf eine Aufhebung der Phosphorylierung des Proteins hin, wodurch die Expression des Regulons reduziert sein sollte. Dahingehend sind die Ergebnisse der qRT-PCR und des RNA-seq jedoch nicht eindeutig. Insgesamt könnten demzufolge alle Unterschiede zu den Wildtypen *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS* und *S. aureus* NCTC8325, die *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) gemeinsam haben und gegenteilig zu *S. aureus* VC40R sind, mit dem VraSR-TCS zusammenhängen.



Hier ist neben dem bekannten Einfluss auf die Zellwand, vor allem die Autolyse zu erwähnen. Beide Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) zeigten im Gegensatz zu *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS und *S. aureus* VC40R eine stark reduzierte Autolyse, ein verändertes Autolysin-Profil, eine geringere Bindung von aufgereinigtem AtIA an die Zellwand und eine geringere Konzentration von extrazellulären Autolysinen, insbesondere AtIA. Es besteht jedoch kein direkter Einfluss von VraSR auf die Expression der Autolysine. Ebenfalls scheint eine Verbindung zum Glykosylierungsmuster der WTA zu bestehen. Sowohl *S. aureus* VC40 als auch *S. aureus* VraS(VC40) zeigen eine erhöhte Substitution der WTA mit D-Glucosamin. Diese ist in *S. aureus* VC40R ebenfalls erhöht im Vergleich zu *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS, jedoch stark reduziert im Vergleich zu *S. aureus* VC40. Ebenfalls könnte die Konfiguration der D-GlcNAc-Anomere auf das VraSR-TCS zurückgehen, da *S. aureus* VC40R ohne äußeren Stress nur die  $\alpha$ -Variante besitzt, entsprechend dem Wildtyp *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS. *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) hingegen zeigen im NMR beziehungsweise durch die Lyse mit Podoviridae, dass auch  $\beta$ -glykosylierte WTA vorhanden sind. Eine solche Beziehung zwischen VraSR und der Autolyse oder WTA-Glykosylierung war in *S. aureus* bisher nicht bekannt. Bis jetzt hat keine Transkriptom-Analyse jemals gezeigt, dass sich *tarM*, *tarS* oder ein Autolysin, außer *lytU*, innerhalb des *vraSR*-Regulons befinden (Kuroda et al., 2003).

### 4.5 Rolle der Virulenz in den untersuchten VISA-Stämmen

Neben einer dickeren Zellwand mit oftmals geringerer Quervernetzung und einer reduzierten Autolyse gilt eine schwächere Virulenz als drittes charakteristisches Merkmal von VISA (McCallum et al., 2006; Howden et al., 2008; Majcherczyk et al., 2008; Horne et al., 2009; Peleg et al., 2009; Gardete et al., 2012; Cameron et al., 2017; Xu et al., 2018; Tan et al., 2019; Jin et al., 2020; Zhu et al., 2021). Für Stämme mit geringerer Daptomycin-Empfindlichkeit wird ebenfalls eine geringere Virulenz beschrieben (Cameron et al., 2015). Entsprechend zeigt ein Endokarditis-Modell in Ratten eine geringere Infektiosität und Säuberung von VISA-Isolaten (Majcherczyk et al., 2008). In einem Maus-Sepsis-Modell hat ein VISA-Stamm mit einer Leserahmenverschiebung in *stp1* die Fähigkeit zur Bildung von Leberabszessen und Gewebenekrosen verloren (Cameron et al., 2012). Eine schwächere Virulenz von VISA gegenüber den Elternstämmen konnte ebenfalls in einem Invertebraten-Modell mit *Galleria mellonella* bestätigt werden (Peleg et al., 2009). Insgesamt schlussfolgerte eine Meta-Analyse, dass VISA-Stämme nicht mit einer höheren Mortalität assoziiert sind. Allerdings kommt es durch das Scheitern der Vancomycin-Therapie zu einer längeren Infektionsdauer, sowie längeren Krankenhaus-

## Diskussion

---

aufenthalten und Therapien (van Hal und Paterson, 2011). In einem Maus-Model zeigen klinische *S. aureus* Isolate mit hochreguliertem *vraR* eine höhere Überlebensrate in Makrophagen und somit eine höhere Persistenz der Infektion (Dai et al., 2019). Eine Deletion von *vraSR* führt entsprechend zu einer größeren Empfindlichkeit gegen Phagozytose durch Granulozyten (Gao et al., 2019). Dabei ist eine niedrigere Virulenz von VISA mit einer verringerten Fitness und oftmals mit einem reduzierten Wachstum verbunden (Howden et al., 2014). In Abwesenheit von Vancomycin ist die reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit ein selektiver Nachteil von VISAs, wodurch Revertanten mit höherer Wachstumsgeschwindigkeit sich schnell verbreiten. Die Entstehung der Revertanten *S. aureus* VC40R wäre damit zu erklären, wobei die Wachstumsrate des Stammes nur geringfügig höher war im Vergleich zu *S. aureus* VC40. Meist erfolgt die abgeschwächte Virulenz durch eine veränderte Expression von Virulenz-Genen (Cameron et al., 2017; Jin et al., 2020).

In *S. aureus* wird eine Reihe von Virulenz-Genen durch *agr* kontrolliert. Der Regulator verstärkt einerseits die Hämolyse und hemmt andererseits den Toxin-Repressor Rot, durch die Transkription von RNAIII aus dem *agr*-Operon (Thoendel et al., 2011). So produzieren VISA-Isolate in einer Studie 20-fach weniger  $\alpha$ -Toxin im Vergleich zu den VSSA-Elternstämmen, wobei dies entweder von einem Verlust der *agr*-Aktivität aufgrund von Mutationen oder einer veränderten Aktivität von *agr* in Stämmen ohne Mutation begleitet wird (Cameron et al., 2017). *S. aureus* 137/93A besaß eine Mutation in *codY*, der neben einer Rolle im Metabolismus auch als Repressor von *agr* fungiert, sowie die Virulenz auch *agr*-unabhängig beeinflusst (Pohl et al., 2009). So konnte für den Stamm auch eine höhere Kapsel-Biosynthese festgestellt werden, die jedoch keinen Einfluss auf die Vancomycin-Empfindlichkeit hat (Jansen et al., 2013). Interessanterweise waren die Stämme *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R *agr*-positiv im Gegensatz zum Elternstamm *S. aureus* RN4220 $\Delta$ *mutS*. Dementsprechend waren Toxine in den beiden Stämmen eher hochreguliert und Bindeproteine, vor allem *spa*, welches für das wichtige Protein A zur Abwehr von Immunglobulinen kodiert, runterreguliert. Ebenfalls zeigten beide Stämme eine Beta-Hämolyse auf Columbia-Blutagar. Die Expression der Gene des *agr*-Operons war in *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VC40R nicht verändert, jedoch zeigte der Stamm *S. aureus* VraS(VC40) in dem Fall eine starke Reduktion. Paradoxerweise waren in beiden Stämmen der transkriptionelle Regulator *sarA*, sowie das zu *sarA* homologe *rot*, hochreguliert. Möglicherweise führte dies zu einem gewissen Ausgleich des funktionsfähigen *agrA*. Das Agr-System kann potenziell auch durch VraR aus *S. aureus* reguliert werden, durch die Bindung des Regulators an den Promotor des Operons. So konnte ein DNase I Footprinting Assay nachweisen, dass VraR an eine 15-Nukleotid-Sequenz in der Intergen-Region zwischen *agr*-Promotor 2 und -Promotor 3 bindet und die Transkription hemmt (Dai et al., 2017). Auch Taglialegna et al., (2019) fanden, dass VraSR als transkriptioneller Regulator von *agrA* fungiert. Da Vancomycin meist mit einer Induktion des *vraSR*-Operons einhergeht und dieses System in VISA oft von Mutationen betroffen ist, könnte darin ein Grund für die Reduktion der Virulenz in VISA

## Diskussion

---

liegen. Ähnliches gilt für das WalRK-TCS, welches zwar *agr*-unabhängig ist, aber indirekt über SpdC viele Virulenz-Gene reguliert und ebenfalls in vielen VISA von Mutationen betroffen ist.

Des Weiteren waren zwei Gene mit weitgehend unbekannter Funktion, *vraX* und *cwrA*, in allen drei VISA-Laborstämmen dieser Arbeit stark überexprimiert. Entsprechend konnte von McAleese et al., (2006) gezeigt werden, dass *cwrA* und *vraX* mit die höchst exprimierten Gene in verschiedenen klinischen VISA darstellen. Beide Gene sind unter anderem mit Virulenz assoziiert. CwrA wird in *S. aureus* als Antwort auf Zellwandschäden exprimiert, beispielsweise durch Vancomycin. Die Deletion des Gens hat in *S. aureus* SH1000 $\Delta$ *cwrA::erm* jedoch keine Auswirkung auf die Vancomycin-MHK. Allerdings führt die Deletion zu einer erhöhten Expression des *dltABCD*-Operons, sowie der Autolysine *lytM*, *sceD* und *ssaA* (Balibar et al., 2010). Des Weiteren ist CwrA wichtig für die Virulenz in vivo in einem Maus-Sepsis-Model (Balibar et al., 2010). Ebenso ist VraX ein sekretiertes Protein, welches durch verschiedene Zellwand-Antibiotika, wie Bacitracin, D-Cycloserin und Oxacillin hochreguliert wird (Utaida et al., 2003). Es scheint dabei für die Abwehr des Immunsystems durch Bindung an das C1q-Protein und Blockierung des Komplementsystems in Säugetieren wichtig zu sein (Yan et al., 2017). Interessanterweise steht *cwrA* dabei unter der Kontrolle des VraSR-TCS und sowohl *cwrA* als auch *vraX* werden durch das WalRK-TCS positiv reguliert (Kuroda et al., 2003; Delaune et al., 2012).

In dieser Arbeit wurden neben der Expressionsanalyse und der Untersuchung der Hämolyse auch die Biofilmbildung und der Staphyloxanthin-Gehalt als Parameter der Virulenz betrachtet. Staphyloxanthin wirkt gegen oxidativen Stress, beispielsweise durch reaktive Sauerstoffspezies, wie es durch die angeborene Immunantwort von Säugetieren ausgelöst wird. So konnte gezeigt werden, dass eine Deletionsmutante für Staphyloxanthin, *S. aureus* Newman $\Delta$ *crtM*, eine geringere Überlebensrate in humanen Neutrophilen besitzt (Clauditz et al., 2006). Alle VISA in dieser Arbeit wiesen eine geringere Staphyloxanthin-Konzentration als die Vergleichsstämme auf, für *S. aureus* VraS(VC40) und *S. aureus* 137/93A war dies sogar signifikant. *S. aureus* VC40R zeigte in der RNA-seq ebenfalls eine verringerte Expression der relevanten Gene. Nach den obigen Ausführungen zur höheren Immunevasion von VISA-Stämmen wäre eigentlich eine höhere Staphyloxanthin-Konzentration in den Stämmen zu erwarten gewesen. Allerdings konnte für fünf von neun Stämmen mit einer geringeren Daptomycin-Empfindlichkeit ein reduzierter Carotenoid-Gehalt, Staphyloxanthin, festgestellt werden, der zu einer geringeren Fluidität der Membran führt (Mishra et al., 2010; Mishra und Bayer, 2013). In den Stämmen dieser Arbeit gab es keinen relevanten Unterschied in der Membran-Fluidität, jedoch spiegelte sich der Unterschied in der Staphyloxanthin-Konzentration zwischen *S. aureus* 137/93A und *S. aureus* 1450/94 auch in diesen Ergebnissen wider. Der klinische VISA *S. aureus* 137/93A zeigte zwar eine geringere Konzentration an Staphyloxanthin als der VSSA-Vergleichsstamm *S. aureus* 1450/94, aber der Gehalt lag trotzdem weit über dem aller anderen Stämmen in dieser Arbeit.

## Diskussion

---

Die Bildung von Biofilmen durch *S. aureus* ist komplex und kann einerseits PIA-abhängig durch das *icaADBCR*-Operon und andererseits PIA-unabhängig erfolgen (Archer et al., 2011). Eine Regulation erfolgt vor allem durch Agr, SarA und SigB (Paharik und Horswill, 2016). Alle VISA-Laborstämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) zeigten eine starke Reduktion der Biofilmbildung, beziehungsweise einen kompletten Abbruch. Dies ging mit einer reduzierten Expression von *icaADBC*, sowie einer normalen bis erhöhten Expression des Repressors *icaR*, einher. *S. aureus* 137/93A zeigte ebenfalls keine Biofilmbildung. Jedoch war diese im Vergleichsstamm *S. aureus* 1450/94 genauso gering. Die Bildung von Biofilm ist allerdings stark Stamm-spezifisch (Archer et al., 2011). Insgesamt gibt es eine Verbindung zwischen dem VISA-Phänotyp und einer geringen Biofilm-Biosynthese auch in anderen Stämmen mit reduzierter Vancomycin-Empfindlichkeit (Howden et al., 2006; Xu et al., 2018). Bose et al., (2012) fanden heraus, dass das Hauptautolysin von *S. aureus*, AtIA, mit den funktionsfähigen Untereinheiten AM und GL für die Entwicklung von Biofilm nötig ist. In diesem Fall führt die Autolyse zum Austritt von DNA als Biofilm-Matrix-Molekül in der Anfangsphase der Biofilm-Synthese. Da viele VISA in der Autolyse gestört sind, wie es auch für *S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40) der Fall war, könnte dies eine mögliche Verbindung darstellen.

Daneben spielen auch Wandteichonsäuren eine Rolle in der Virulenz und Bildung von Biofilmen. So verliert die *S. aureus* ATCC35556 *dltA::spc* Mutante mit einer weniger positiven Oberflächenladung, aufgrund einer Abwesenheit von D-Alanin an den WTA, die Fähigkeit Polystyrol und Glass zu kolonisieren (Gross et al., 2001). Modifikationen der WTA mit D-Alanin oder der Zellmembran durch MprF halten wie bereits erwähnt kationische antimikrobielle Peptide ab, aber führen des Weiteren auch zu einer höheren Virulenz (Weidenmaier et al., 2005a). Genauso schützen WTA, genauer gesagt die D-Alanin-Ester der WTA, *S. aureus* vor antimikrobiellen Fettsäuren der menschlichen Haut (Kohler et al., 2009; Simanski et al., 2013). Das Fehlen der kompletten WTA in *S. aureus* führt zu einer reduzierten Interaktion mit Endothelzellen und einer eingeschränkten Virulenz in einem Endokarditis Hasen-Model (Weidenmaier et al., 2005b). WTA helfen dem Organismus auch dabei Zellwand-Epitope vor der Opsonisierung durch Antikörper zu verbergen, wobei die  $\beta$ -Glykosylierung der WTA das Komplementsystem durch Bindung von Anti-WTA IgG aktiviert (Lee et al., 2015; Gautam et al., 2016). Insgesamt sind Wandteichonsäuren, insbesondere glykosylierte WTA, essenziell für die nasale Kolonisation (Weidenmaier et al., 2004; Baur et al., 2014; Winstel et al., 2015). Oftmals weisen *S. aureus* Stämme mit einer höheren Pathogenität auch eine höhere Konzentration an WTA auf (Wanner et al., 2017). Eine Veränderung der WTA, wie in *S. aureus* VC40, könnte somit einen großen Einfluss auf die Virulenz haben.

Insgesamt zeigen die VISA-Stämme in dieser Arbeit Anzeichen für eine verringerte Virulenz, wie es auch in der Literatur beschrieben ist. Eine geringere Wachstumsrate, wie sie *S. aureus* VC40 und *S. aureus*

VC40R aufweisen, ergibt ebenso eine geringere Virulenz in einem klinischen Rahmen, da beispielsweise weniger Toxine gebildet werden oder das Quorum-Sensing für die Biofilm-Bildung gestört ist. In dieser Arbeit wurden nur die Transkription von Virulenz-Genen, der Carotinoid-Gehalt und die Biofilmbildung untersucht, aber es wurden keine Experimente zur Evaluation der Virulenz in Tiermodellen durchgeführt. Zudem spielt die Virulenz in klinischen VISA-Stämmen eine größere Rolle für das Überleben der jeweiligen Stämme, als dies für Laborstämme der Fall ist. Da klinische Stämme neben der Vancomycin-Therapie auch dem Immunsystem ausgesetzt sind, entwickeln sich Phänotypen mit einer angepassten Virulenz eher, als in einem Passagerversuch. VISA-Stämme setzen bei der Virulenz zumeist auf Persistenz und weniger auf Angriff gegen den Wirtsorganismus.

### 4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten durch die Charakterisierung der Zellwand, und insbesondere der Wandteichonsäuren, neue Erkenntnisse über die Hintergründe der verringerten Vancomycin-Empfindlichkeit des im Labor generierten VISA-Stammes *S. aureus* VC40 erlangt werden. Der Stamm steht exemplarisch dafür, wie die reduzierte Vancomycin-Empfindlichkeit in VISA durch multiple Veränderungen auf Gen-, Transkriptions-, und Proteinebene erfolgt. Da Vancomycin auch heute noch als Standard-Therapie von MRSA-Infektionen gilt (Fille et al., 2009), ist die Grundlagenforschung zu den Auslösern des VISA-Phänotyps weiterhin wichtig. Dementsprechend kann *S. aureus* VC40 auch künftig einen lohnenden Model-Organismus für weitere Forschung darstellen.

*S. aureus* VC40 weist 79 Mutationen in 75 Genen auf. Davon führen 30 Mutationen zu veränderten Proteinen, deren Gene bereits charakterisiert sind. In 19 Fällen sind nicht-charakterisierte Gene von Mutationen betroffen, die zu einem veränderten Protein führen (Berscheid, 2013). Hier konnten neben den Mutationen in *vraS*, *prsA*, *lytD* und *clpX* (Berscheid, 2013; Axtmann, 2019) auch 10 weitere Mutationen (*modA*, *relP*, *lacE*, *mraZ*, *vraG*, *araC*, *nsaR*, *lexA*, *recD* und *mprF*) durch einen Allel-Austausch in den Hintergrund von *S. aureus* NCTC8325 eingebracht werden, deren Vancomycin-MHK getestet wurde. Diese Stämme könnten weiter charakterisiert werden. Da kleine Unterschiede in der MHK in einer 96-Well-Platte nicht erkannt werden, könnte eine Gradienten-Platte eingesetzt werden. Dies war beispielsweise für den Stamm *S. aureus* pTvicA mit einer Überexpression von *walRK* nötig. Zur Verifizierung der Stämme sollte außerdem eine Genomsequenzierung erfolgen. Genauso könnten weitere Experimente mit *S. aureus* NCTC8325 *lytD::kan* durchgeführt werden (Berscheid, 2013). Hier wäre vor allem der Einfluss der Deletion auf das Membranprotein-Profil und die Resistenz gegenüber Lysostaphin interessant. Des Weiteren könnten die übrigen 16 Mutationen über einen Allel-Austausch in *S. aureus* NCTC8325 eingebracht werden. Hierbei wären vor allem die Aminosäureaustausche in

## Diskussion

---

WalK(I544M), RpoD(D201N), GlmM(A93V) und die Insertion in DnaK interessant. Da das WalRK-System essenziell in *S. aureus* ist, müsste in diesem Fall ein Stamm mit einem induzierbaren Plasmid mit *walRK* oder einer entkoppelten, permanenten Expression von *lytM* und *ssaA* verwendet werden. Genauso spannend wäre die Erstellung einer Austauschmutante mit *vraR* aus *S. aureus* VC40R. Mithilfe dieses Stammes *S. aureus* VraR(VC40R) könnte durch RNA-seq oder qRT-PCR die verringerte Aktivität des VraSR-Systems in vivo bestätigt werden.

Es könnte des Weiteren gezeigt werden, dass für *S. aureus* VC40 das Glykosylierungsmuster der WTA entscheidend für einen Teil der verringerten Vancomycin-Empfindlichkeit ist. Dahingehend könnte der Effekt der Glykosylierung weiterführend analysiert werden. Zum einen könnte die Revertante *S. aureus* VC40R mit dem Plasmid pTtarS transformiert werden, um einem induzierbaren Einbau von  $\beta$ -GlcNAc zu erreichen und den Einfluss auf die Vancomycin-MHK zu testen. Damit könnte eine mögliche sekundäre Auswirkung des Salzstress auf die Vancomycin-MHK vermeiden werden. Ebenso sollten die WTA von *S. aureus* VraS(VC40) im H-NMR untersucht werden, um die Ergebnisse der Phagentypisierung durch Podoviridae zu bestätigen, dass sowohl  $\alpha$ -GlcNAc als auch  $\beta$ -GlcNAc vorhanden sind. In dieser Arbeit konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die Glykosylierung einen Effekt auf die Bindung von AtIA an die Zellwand besitzt. Da die WTA neben AtIA auch die PBPs zur Teilungssepte führen, könnte es zu einer ähnlichen Wirkung auf PBP4 kommen. Zur Prüfung könnte fluoreszenz-markiertes PBP4, oder als Näherung auch PBP2, in *S. aureus* VC40, *S. aureus* pTtarM und *S. aureus* pTtarS eingebracht werden. Anschließend könnte dann entweder die Verteilung des Enzyms an der Zelloberfläche unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht werden oder der Anteil an Fluoreszenz der verschiedenen Zellwand-Fragmente der Stämme nach einem Waschschrift im Infinite M Plex Fluorometer analysiert werden. Ebenfalls könnte die Zellwand von *S. aureus* VC40R aus Medium mit 4 % NaCl isoliert und in der UPLC analysiert werden. Sowohl die Quervernetzung als auch der für PBP4 charakteristische „hump“ im Chromatogramm im Vergleich zwischen Zellwänden mit und ohne Salz können Aufschluss auf die veränderte Aktivität von PBP4 in Bezug zu  $\beta$ -glykosylierten WTA geben.

Neben den WTA besitzen auch die LTA von *S. aureus* eine Verbindung zur Autolyse, Zellteilung und Virulenz. Vorläufige Versuche mit aufgereinigten LTA konnten eine geringere Konzentration von LTA in den VISA-Laborstämmen zeigen. Jedoch stellt sich die Aufreinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie auf einer Octyl-Sepharose-Säule mit einem 1-Propanol-Gradienten als Laufmittel als unzuverlässig heraus (Knopp, 2019). Als Lösung könnten die aufgereinigten Proben in einem H-NMR oder einer Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie analysiert werden, wie in Kho und Meredith (2018a) beschrieben. Ebenso könnten nicht-aufbereitete LTA-Rohextrakte der Stämme auf den Phosphat-, Glycerin-, Glukose-, D-Alanin- und D-Glucosamin-Gehalt überprüft werden. Dadurch könnten allerdings nur direkte Vergleiche zwischen den Stämmen angestellt werden. Für die Aufreinigung von LTA-Rohextrakt sollte eine Übernachtskultur geerntet und in 1/20 Volumen 50 mM

## Diskussion

---

Zitronensäure-Puffer pH 4,7 gelöst werden. Der Zellaufschluss würde über Bead-Beating in einem Precellys 24 Homogenisator erfolgen. Anschließend sollten die Zellmembranen bei 20.000 g und 4 °C für 1 h pelletiert werden. Die Membranen sollten in 0,25 mL Zitronensäurepuffer resuspendiert, 1:1 mit 1-Butanol gemischt und bei 37 °C und 180 rpm für 45 min inkubiert werden. Danach würde die Probe erneut zentrifugiert und die untere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt werden. Schließlich könnte die Probe gefriergetrocknet werden, um danach in den bereits beschriebenen Experimenten eingesetzt zu werden. Die Glukose zur Verbindung der Glycerol-Phosphat-Kette mit dem Glycerol-Anker an den Fettsäuren der Membran könnte mittels Anthron-Test nach Herbert et al., (1971) ermittelt werden.

Des Weiteren sind mehrere weiterführende oder neue Experimente vorstellbar. So könnte der Einfluss der *walK*-Mutation in *S. aureus* VC40 näher analysiert werden, um den Abbruch der Auto-phosphorylierungsaktivität in vitro zu bestätigen (Kienemund, 2016). Hierfür könnte *S. aureus* VC40 zunächst mit einem *walR*-FLAG enthaltenen Plasmid transformiert werden. Danach könnte das Zell-lysat in einer Phos-Tag SDS-PAGE eingesetzt werden und anschließend WalR durch einen Maus anti-FLAG M2-Peroxidase Monoklonalen Antikörper in einem Western Blot nachgewiesen werden (Gajdiss et al., 2020). Entsprechend würden so in vivo phosphorylierte und nicht-phosphorylierte WalR-Banden sichtbar werden. Des Weiteren könnten die Zellwände der Stämme nach der UPLC-Analyse zusätzlich durch eine Massenspektrometrie analysiert werden, um amidierete und nicht-amidierete Monomere zu unterscheiden. Der Umsatz der Zellwand aller Stämme könnte auch ermittelt werden. Dazu könnten die Stämme mit radioaktivem oder fluoreszierendem Glucosamin inkubiert werden, um anschließend den Umsatz, nach einer Inkubation mit nicht-markiertem Glucosamin, zu berechnen. Die Membran der Stämme, vor allem von *S. aureus* VC40, könnte näher bestimmt werden. Dazu könnten die Phospholipide durch eine Bligh-Dyer Methode extrahiert und auf einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie aufgetragen werden (Bligh und Dyer, 1959; Nahaie et al., 1984). Interessant wäre auch eine komplette Proteom-Analyse aller Stämme, da einige Mutationen in *S. aureus* VC40, wie in *clpX*, *prsA*, *dnaK* und *lytD*, starken Einfluss auf die Prozessierung, Stabilisierung und Sekretion haben. Hier wäre der Gehalt an Proteasen, Autolysinen und Penicillin-bindenden-Proteinen in der Zellhülle besonders von Bedeutung. Ebenso könnte die Virulenz der einzelnen Stämme mittels eines Invertebraten-Modells mit *Galleria mellonella* nach Peleg et al., (2009) untersucht werden.

# 5 Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* ist ein opportunistischer Erreger, der vor allem bei stationärer Patientenbehandlung zu teilweise schwerwiegenden und schlecht therapierbaren Infektionen führt. Im Fall von multiresistenten Vertretern von *S. aureus* wird oftmals Vancomycin als Reserveantibiotikum zur Behandlung eingesetzt. Vancomycin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum und bildet nicht-kovalente Wasserstoffbindungen zu den endständigen D-Ala-D-Ala-Resten von Lipid II oder nicht vernetzten D-Ala-D-Ala-Gruppen im Peptidoglykan, wodurch die Quervernetzung der Mureinschichten verhindert wird. Durch den Einsatz des Antibiotikums wurden mit der Zeit *S. aureus* Stämme mit geringerer Vancomycin-Empfindlichkeit, sogenannte Vancomycin-intermediär resistente *S. aureus* (VISA) selektiert. Im Gegensatz zu vielen anderen Antibiotika-Resistenzen in *S. aureus* basieren diese in VISA nicht auf dem Erwerb von Resistenz-Genen, sondern auf der Akkumulation von Mutationen, die zu einem ähnlichen Phänotypen mit dicker, geringer quervernetzter Zellwand, geringer Autolyse und abgeschwächter Virulenz führen. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich der VISA-Stamm *S. aureus* VC40 untersucht. Dieser Stamm entstand aus einem Passagerversuch mit Vancomycin und akkumulierte 79 Mutationen in 75 Genen, wodurch eine Vancomycin-MHK von 64 µg/mL erreicht wurde. Darunter waren auch Mutationen in den mit der Entstehung von VISA assoziierten Zweikomponentensystemen (TCS) *vraS* und *walk*. Zudem wurden ein revertierter Stamm, *S. aureus* VC40R (MHK 4 µg/mL), mit einer weiteren Mutation in *vraR*, eine Austauschmutante für *vraS* in einem VSSA-Hintergrund, *S. aureus* VraS(VC40) (MHK 4 µg/mL), und ein klinischer VISA mit IS256-induzierter Überexpression des WalRK-TCS, *S. aureus* 137/93A (MHK 8 µg/mL), analysiert. Ziel dieser Studie war es, die Relevanz der Zellwand, und insbesondere der darin enthaltenen Wandteichonsäuren (WTA), auf die Vancomycin-Empfindlichkeit zu untersuchen.

Dafür wurde die Zellwand aller Stämme isoliert und die Quervernetzung wurde durch UPLC-Analyse bestimmt. Ebenfalls wurden die WTA aufgereinigt und bezüglich des Phosphat-, Glycerol-, D-Alanin- und D-Glucosamin-Gehaltes analysiert. Durch eine H-NMR der WTA wurde die genaue Konfiguration der Glykosylierung bestimmt und es wurde der Einfluss auf die Vancomycin-MHK überprüft. Des Weiteren wurden die Autolysine aufgereinigt und im Zymogramm, sowie gegen Zellwand-Fragmente getestet. Von den Stämmen *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) wurde ebenfalls eine Transkriptom-Analyse mittels RNA-seq durchgeführt. Schließlich wurde die Auswirkung der *vraR*-Mutation in *S. aureus* VC40R mit Hilfe einer Phos-Tag SDS-PAGE analysiert.

Insgesamt zeigten die VISA-Stämme eine dickere Zellwand und sowohl *S. aureus* VC40 als auch *S. aureus* 137/93A wiesen auch eine geringere Quervernetzung auf, die bei beiden auf einer reduzierten Aktivität von PBP4 basierte, deren Grund nicht näher bestimmt werden konnte. Die beiden Stämme,



## Zusammenfassung

---

*S. aureus* VC40 und *S. aureus* VraS(VC40), fielen durch eine stark reduzierte Autolyse und ein verändertes Autolysin-Profil im Zymogramm auf. Interessanterweise waren in *S. aureus* VC40 viele Autolysine in der RNA-seq Analyse hochreguliert. Von allen Stämmen zeigte nur *S. aureus* VC40 eine stark reduzierte Bindung von Cytochrom C und somit eine weniger negativ geladene Zelloberfläche, beruhend auf einer höheren Substitution der WTA mit D-Alanin. *S. aureus* VC40 besaß genau wie die anderen beiden VISA-Laborstämme eine höhere Konzentration an WTA, die ebenfalls stärker glykosyliert waren. Erstmals konnte hier gezeigt werden, dass die Art der Glykosylierung einen Einfluss auf die Vancomycin-Empfindlichkeit hatte, da eine induzierte  $\beta$ -Glykosylierung der WTA in *S. aureus* VC40R zu einem signifikanten Anstieg der MHK führte. Allerdings traf die Verringerung der Vancomycin-Empfindlichkeit nur auf diesen Stamm zu, vermutlich müssen weitere VISA-Merkmale für diesen Effekt vorhanden sein. Zudem zeigten Zellwände mit  $\beta$ -glykosylierten WTA eine geringere Affinität für das Hauptautolysin AtIA. In vitro konnte veranschaulicht werden, dass die Mutation in *vraR* aus *S. aureus* VC40R zu einem Abbruch der Phosphorylierung des Regulators führte, wodurch dieser möglicherweise seine Aktivität reduzierte.

Im Stamm *S. aureus* VC40 führte die verdickte Zellwand mit einer niedrigen Quervernetzung zu einer erhöhten Aufnahme von Vancomycin in die äußeren PGN-Schichten. Diese vermehrte Aufnahme verhinderte eine weitere Diffusion des Antibiotikums zur Teilungssepte, ein sogenannter „Clogging Effekt“. Die Kosten einer verringerten Quervernetzung und dementsprechender reduzierter Stabilität der Zellwand wurden durch eine verringerte Autolyse ausgeglichen. Einerseits geschah dies durch eine veränderte Prozessierung von AtIA. Andererseits führten die Verschiebung des Glykosylierungsmusters hin zu einer vermehrten  $\beta$ -Glykosylierung der WTA und die höhere WTA-Konzentration ebenfalls zu einer geringeren Affinität der Autolysine, trotz deren erhöhter Expression. Die Modifikation der WTA mit D-Alanin führte zu einer geringeren negativen Ladung der Zelloberfläche und so zu einer abnehmenden Interaktion des kationischen Glykopeptides mit den negativ-geladenen WTA. Aufgrund des Vergleichs der Ergebnisse von *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40) konnten die Substitution der WTA mit D-Glucosamin und die reduzierte Autolyse, mit der veränderten Aktivität von VraSR in Verbindung gebracht werden.

Zusammengefasst besteht eine Verbindung der WTA von *S. aureus* zu allen charakteristischen Merkmalen von VISA-Stämmen, wie der veränderten Zellwand, geringeren Autolyse und abgeschwächten Virulenz. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Glykosylierungsmuster der WTA einen weiteren Aspekt in der verringerten Vancomycin-Empfindlichkeit von VISA darstellt. Der Wechsel zu einer Mischung aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -GlcNAc-Modifikationen der WTA führte zu einer mehrfachen Erhöhung der MHK in *S. aureus* VC40R und war womöglich verantwortlich für eine geringere Bindung von AtIA an die Zellwand und damit eine geringere Autolyse.



# Literaturverzeichnis

- Adhikari, R. P., Arvidson, S. and Novick, R. P. (2007). A nonsense mutation in *agrA* accounts for the defect in *agr* expression and the avirulence of *Staphylococcus aureus* 8325-4 *traP::kan*. *Infect Immun* **75** (9), 4534–4540. DOI: 10.1128/IAI.00679-07.
- Akiyama, Y. (1999). Self-processing of FtsH and its implication for the cleavage specificity of this protease. *Biochemistry* **38** (36), 11693–11699. DOI: 10.1021/bi991177c.
- Alexander, E. L., Gardete, S., Bar, H. Y., Wells, M. T., Tomasz, A. and Rhee, K. Y. (2014). Intermediate-type vancomycin resistance (VISA) in genetically-distinct *Staphylococcus aureus* isolates is linked to specific, reversible metabolic alterations. *PLoS One* **9** (5), e97137. DOI: 10.1371/journal.pone.0097137.
- Anderson, A. J., Green, R. S., Sturman, A. J. and Archibald, A. R. (1978). Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: location of wall material incorporated during pulsed release of phosphate limitation, its accessibility to bacteriophages and concanavalin A, and its susceptibility to turnover. *J Bacteriol* **136** (3), 886–899.
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E. and Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* **2** (5), 445–459. DOI: 10.4161/viru.2.5.17724.
- Armstrong, J. J., Baddiley, J., Buchanan, J. G., Carss, B. and Greenberg, G. R. (1958). 882. Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls. *J. Chem. Soc.*, 4344. DOI: 10.1039/JR9580004344.
- Arnaud, M., Chastanet, A. and Débarbouillé, M. (2004). New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70** (11), 6887–6891. DOI: 10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004.
- Atilano, M. L., Pereira, P. M., Yates, J., Reed, P., Veiga, H., Pinho, M. G. and Filipe, S. R. (2010). Teichoic acids are temporal and spatial regulators of peptidoglycan cross-linking in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** (44), 18991–18996. DOI: 10.1073/pnas.1004304107.
- Axtmann, K. (2019). Untersuchung der *clpX*(S30R) Mutation aus *S. aureus* VC40 auf den proteolytischen Abbau des Autolysins AtlA in-vivo und in-vitro. Bachelorarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Azam, A. H., Hoshiga, F., Takeuchi, I., Miyanaga, K. and Tanji, Y. (2018). Analysis of phage resistance in *Staphylococcus aureus* SA003 reveals different binding mechanisms for the closely related Twort-like phages  $\phi$ SA012 and  $\phi$ SA039. *Appl Microbiol Biotechnol* **102** (20), 8963–8977. DOI: 10.1007/s00253-018-9269-x.
- Baba, T. and Schneewind, O. (1998). Targeting of muralytic enzymes to the cell division site of Gram-positive bacteria: repeat domains direct autolysin to the equatorial surface ring of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* **17** (16), 4639–4646. DOI: 10.1093/emboj/17.16.4639.
- Badurina, D. S., Zolli-Juran, M. and Brown, E. D. (2003). CTP:glycerol 3-phosphate cytidylyltransferase (TarD) from *Staphylococcus aureus* catalyzes the cytidylyl transfer via an ordered Bi–Bi reaction mechanism with micromolar K(m) values. *Biochimica et Biophysica Acta* **1646** (1-2), 196–206. DOI: 10.1016/S1570-9639(03)00019-0.
- Bæk, K. T., Gründling, A., Mogensen, R. G., Thøgersen, L., Petersen, A., Paulander, W. and Frees, D. (2014).  $\beta$ -Lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 is increased by inactivation of the ClpXP protease. *Antimicrob Agents Chemother* **58** (8), 4593–4603. DOI: 10.1128/AAC.02802-14.
- Bæk, K. T., Thøgersen, L., Mogensen, R. G., Møllergaard, M., Thomsen, L. E., Petersen, A., Skov, S., Cameron, D. R., Peleg, A. Y. and Frees, D. (2015). Stepwise decrease in daptomycin susceptibility in clinical *Staphylococcus aureus* isolates associated with an initial mutation in *rpoB* and a compensatory inactivation of the *clpX* gene. *Antimicrob Agents Chemother* **59** (11), 6983–6991. DOI: 10.1128/AAC.01303-15.
- Bæk, K. T., Bowman, L., Millership, C., Dupont Søggaard, M., Kaeffer, V., Siljamäki, P., Savijoki, K., Varmanen, P., Nyman, T. A., Gründling, A. and Frees, D. (2016). The cell wall polymer lipoteichoic acid becomes nonessential in *Staphylococcus aureus* cells lacking the ClpX chaperone. *mBio* **7** (4). DOI: 10.1128/mBio.01228-16.
- Baek, J. Y., Chung, D. R., Ko, K. S., Kim, S. H., Yang, S.-J., Kang, C.-I., Peck, K. R. and Song, J.-H. (2017). Genetic alterations responsible for reduced susceptibility to vancomycin in community-associated MRSA strains of ST72. *J Antimicrob Chemother* **72** (9), 2454–2460. DOI: 10.1093/jac/dkx175.
- Baker, T. A. and Sauer, R. T. (2012). ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochim Biophys Acta* **1823** (1), 15–28. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.06.007.
- Balibar, C. J., Shen, X., McGuire, D., Yu, D., McKenney, D. and Tao, J. (2010). *cwrA*, a gene that specifically responds to cell wall damage in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)* **156** (Pt 5), 1372–1383. DOI: 10.1099/mic.0.036129-0.
- Ballal, A., Ray, B. and Manna, A. C. (2008). *sarZ*, a *sarA* family gene, is transcriptionally activated by MgrA and is involved in the regulation of genes encoding exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191** (5), 1656–1665. DOI: 10.1128/JB.01555-08.
- Barna, J. C. and Williams, D. H. (1984). The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu Rev Microbiol* **38**, 339–357. DOI: 10.1146/annurev.mi.38.100184.002011.

- Bates, S. R. and Quake, S. R. (2014). Mapping of protein-protein interactions of *E. coli* RNA polymerase with microfluidic mechanical trapping. *PLoS One* **9** (3). DOI: 10.1371/journal.pone.0091542.
- Baur, S., Rautenberg, M., Faulstich, M., Faulstich, M., Grau, T., Severin, Y., Unger, C., Hoffmann, W. H., Rudel, T., Autenrieth, I. B. and Weidenmaier, C. (2014). A nasal epithelial receptor for *Staphylococcus aureus* WTA governs adhesion to epithelial cells and modulates nasal colonization. *PLoS Pathog* **10** (5), e1004089. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004089.
- Bayer, A. S., Mishra, N. N., Cheung, A. L., Rubio, A. and Yang, S.-J. (2016). Dysregulation of *mprF* and *dltABCD* expression among daptomycin-non-susceptible MRSA clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* **71** (8), 2100–2104. DOI: 10.1093/jac/dkw142.
- Bayles, K. W. (2000). The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol* **8** (6), 274–278. DOI: 10.1016/s0966-842x(00)01762-5.
- Becker, K., Schaumburg, F., Fegeler, C., Friedrich, A. W. and Köck, R. (2017). *Staphylococcus aureus* from the German general population is highly diverse. *Int J Med Microbiol* **307** (1), 21–27. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.11.007.
- Beer, A. (1852). Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Ann. Phys. Chem.* **162** (5), 78–88. DOI: 10.1002/andp.18521620505.
- Belcheva, A. and Golemi-Kotra, D. (2008). A close-up view of the *VraSR* two-component system. A mediator of *Staphylococcus aureus* response to cell wall damage. *J Biol Chem* **283** (18), 12354–12364. DOI: 10.1074/jbc.M710010200.
- Belcheva, A., Verma, V. and Golemi-Kotra, D. (2009). DNA-binding activity of the vancomycin resistance associated regulator protein *VraR* and the role of phosphorylation in transcriptional regulation of the *vraSR* operon. *Biochemistry* **48** (24), 5592–5601. DOI: 10.1021/bi900478b.
- Belcheva, A., Verma, V., Korenevsky, A., Fridman, M., Kumar, K. and Golemi-Kotra, D. (2012). Roles of DNA sequence and sigma A factor in transcription of the *vraSR* operon. *J Bacteriol* **194** (1), 61–71. DOI: 10.1128/JB.06143-11.
- Bem, A. E., Velikova, N., Pellicer, M. T., van Baarlen, P., Marina, A. and Wells, J. M. (2015). Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. *ACS Chem Biol* **10** (1), 213–224. DOI: 10.1021/cb5007135.
- Bera, A., Biswas, R., Herbert, S., Kulauzovic, E., Weidenmaier, C., Peschel, A. and Götz, F. (2007). Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189** (1), 280–283. DOI: 10.1128/JB.01221-06.
- Bernal, P., Zloh, M. and Taylor, P. W. (2009). Disruption of D-alanyl esterification of *Staphylococcus aureus* cell wall teichoic acid by the {beta}-lactam resistance modifier (-)-epicatechin gallate. *J Antimicrob Chemother* **63** (6), 1156–1162. DOI: 10.1093/jac/dkp094.
- Berscheid, A. (2013). Characterization of *Staphylococcus aureus* VC40 reveals a major role of the *VraS* and *Walk* histidine kinases in development of vancomycin and daptomycin resistance. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Berscheid, A., François, P., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Schrenzel, J., Sass, P. and Bierbaum, G. (2014). Generation of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) strain by two amino acid exchanges in *VraS*. *J Antimicrob Chemother* **69** (12), 3190–3198. DOI: 10.1093/jac/dku297.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62** (3), 293–300.
- Bertsche, U., Weidenmaier, C., Kuehner, D., Yang, S.-J., Baur, S., Wanner, S., Francois, P., Schrenzel, J., Yeaman, M. R. and Bayer, A. S. (2011). Correlation of daptomycin resistance in a clinical *Staphylococcus aureus* strain with increased cell wall teichoic acid production and D-alanylation. *Antimicrob Agents Chemother* **55** (8), 3922–3928. DOI: 10.1128/AAC.01226-10.
- Bertsche, U., Yang, S.-J., Kuehner, D., Wanner, S., Mishra, N. N., Roth, T., Nega, M., Schneider, A., Mayer, C., Grau, T., Bayer, A. S. and Weidenmaier, C. (2013). Increased cell wall teichoic acid production and D-alanylation are common phenotypes among daptomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates. *PLoS One* **8** (6), e67398. DOI: 10.1371/journal.pone.0067398.
- Bessa, L. J., Ferreira, M. and Gameiro, P. (2018). Evaluation of membrane fluidity of multidrug-resistant isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in presence and absence of antibiotics. *J Photochem Photobiol B* **181**, 150–156. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.03.002.
- Bhakdi, S., Hahn, H. and Miksits, K. (2009). Infektion. In: Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F. and Suerbaum, S. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Medizin Verlag 6<sup>th</sup> Edition, 13–25.
- Bibek, G. C., Sahukhal, G. S. and Elasri, M. O. (2019). Role of the *msaABCR* operon in cell wall biosynthesis, autolysis, integrity, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **63** (10). DOI: 10.1128/AAC.00680-19.
- Bierbaum, G. and Sahl, H. G. (1985). Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Arch Microbiol* **141** (3), 249–254. DOI: 10.1007/BF00408067.
- Bierbaum, G. and Sahl, H. G. (1987). Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J Bacteriol* **169** (12), 5452–5458.

- 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. DOI: 10.1007/s100960050380.
- Biller, S. J., Wayne, K. J., Winkler, M. E. and Burkholder, W. F. (2011). The putative hydrolase YycJ (WalJ) affects the coordination of cell division with DNA replication in *Bacillus subtilis* and may play a conserved role in cell wall metabolism. *J Bacteriol* **193** (4), 896–908. DOI: 10.1128/JB.00594-10.
- 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. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05782.x.
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U. K., Hentschel, P., Thumm, G. and Götz, F. (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiol Lett* **259** (2), 260–268. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00281.x.
- Biswas, R., Martinez, R. E., Göhring, N., Schlag, M., Josten, M., Xia, G., Hegler, F., Gekeler, C., Gleske, A.-K., Götz, F., Sahl, H. G., Kappler, A. and Peschel, A. (2012). Proton-binding capacity of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acid and its role in controlling autolysin activity. *PLoS One* **7** (7), e41415. DOI: 10.1371/journal.pone.0041415.
- Blair, J. E. and Williams, R. E. O. (1961). Phage typing of staphylococci. *Bull World Health Organ* **24** (6), 771–784.
- Bligh, E. G. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37** (8), 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.
- Boneca, I. G., Huang, Z. H., Gage, D. A. and Tomasz, A. (2000). Characterization of *Staphylococcus aureus* cell wall glycan strands, evidence for a new beta-N-acetylglucosaminidase activity. *J Biol Chem* **275** (14), 9910–9918. DOI: 10.1074/jbc.275.14.9910.
- Bose, J. L., Lehman, M. K., Fey, P. D. and Bayles, K. W. (2012). Contribution of the *Staphylococcus aureus* Atl AM and GL murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation. *PLoS One* **7** (7), e42244. DOI: 10.1371/journal.pone.0042244.
- Boudjemaa, R., Cabriel, C., Dubois-Brissonnet, F., Bourg, N., Dupuis, G., Gruss, A., Lévêque-Fort, S., Briandet, R., Fontaine-Aupart, M.-P. and Steenkeste, K. (2018). Impact of bacterial membrane fatty acid composition on the failure of daptomycin to kill *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **62** (7). DOI: 10.1128/AAC.00023-18.
- Boyle-Vavra, S., Yin, S. and Daum, R. S. (2006). The VraS/VraR two-component regulatory system required for oxacillin resistance in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **262** (2), 163–171. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00384.x.
- Boyle-Vavra, S., Yin, S., Jo, D. S., Montgomery, C. P. and Daum, R. S. (2013). VraT/YvqF is required for methicillin resistance and activation of the VraSR regulon in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **57** (1), 83–95. DOI: 10.1128/AAC.01651-12.
- 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. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- Bremer, E. and Krämer, R. (2019). Responses of microorganisms to osmotic stress. *Annu Rev Microbiol* **73**, 313–334. DOI: 10.1146/annurev-micro-020518-115504.
- Brown, S., Zhang, Y.-H. and Walker, S. (2008). A revised pathway proposed for *Staphylococcus aureus* wall teichoic acid biosynthesis based on in vitro reconstitution of the intracellular steps. *Chem Biol* **15** (1), 12–21. DOI: 10.1016/j.chembiol.2007.11.011.
- Brown, S., Xia, G., Luhachack, L. G., Campbell, J., Meredith, T. C., Chen, C., Winstel, V., Gekeler, C., Irazoqui, J. E., Peschel, A. and Walker, S. (2012). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* requires glycosylated wall teichoic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (46), 18909–18914. DOI: 10.1073/pnas.1209126109.
- Brunskill, E. W. and Bayles, K. W. (1996). Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **178** (3), 611–618. DOI: 10.1128/jb.178.3.611-618.1996.
- Büttner, F. M., Zoll, S., Nega, M., Götz, F. and Stehle, T. (2014). Structure-function analysis of *Staphylococcus aureus* amidase reveals the determinants of peptidoglycan recognition and cleavage. *J Biol Chem* **289** (16), 11083–11094. DOI: 10.1074/jbc.M114.557306.
- Cafiso, V., Bertuccio, T., Spina, D., Purrello, S., Campanile, F., Di Pietro, C., Purrello, M. and Stefani, S. (2012). Modulating activity of vancomycin and daptomycin on the expression of autolysis cell-wall turnover and membrane charge genes in hVISA and VISA strains. *PLoS One* **7** (1), e29573. DOI: 10.1371/journal.pone.0029573.
- Camargo, I. L. B. d. C., Neoh, H.-m., Cui, L. and Hiramatsu, K. (2008). Serial daptomycin selection generates daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains with a heterogeneous vancomycin-intermediate phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* **52** (12), 4289–4299. DOI: 10.1128/AAC.00417-08.
- Cameron, D. R., Ward, D. V., Kostoulias, X., Howden, B. P., Moellering, R. C., Eliopoulos, G. M. and Peleg, A. Y. (2012). Serine/threonine phosphatase Stp1 contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **205** (11), 1677–1687. DOI: 10.1093/infdis/jis252.

- Cameron, D. R., Mortin, L. I., Rubio, A., Mylonakis, E., Moellering, R. C., Eliopoulos, G. M. and Peleg, A. Y. (2015). Impact of daptomycin resistance on *Staphylococcus aureus* virulence. *Virulence* **6** (2), 127–131. DOI: 10.1080/21505594.2015.1011532.
- Cameron, D. R., Jiang, J.-H., Kostoulias, X., Foxwell, D. J. and Peleg, A. Y. (2016). Vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is mediated by YycH activation of the WalRK essential two-component regulatory system. *Sci Rep* **6**, 30823. DOI: 10.1038/srep30823.
- Cameron, D. R., Lin, Y.-H., Trouillet-Assant, S., Tafani, V., Kostoulias, X., Mouhtouris, E., Skinner, N., Visvanathan, K., Baines, S. L., Howden, B., Monk, I. R., Laurent, F., Stinear, T. P., Howden, B. P. and Peleg, A. Y. (2017). Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates are attenuated for virulence when compared with susceptible progenitors. *Clin Microbiol Infect* **23** (10), 767–773. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.03.027.
- Campbell, J., Singh, A. K., Santa Maria, J. P., Kim, Y., Brown, S., Swoboda, J. G., Mylonakis, E., Wilkinson, B. J. and Walker, S. (2011). Synthetic lethal compound combinations reveal a fundamental connection between wall teichoic acid and peptidoglycan biosyntheses in *Staphylococcus aureus*. *ACS Chem Biol* **6** (1), 106–116. DOI: 10.1021/cb100269f.
- Canova, M. J., Baronian, G., Brelle, S., Cohen-Gonsaud, M., Bischoff, M. and Molle, V. (2014). A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* vancomycin-resistance-associated response regulator VraR mediated by Stk1 protein phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **447** (1), 165–171. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.03.128.
- Cardona, S. T., Choy, M. and Hogan, A. M. (2018). Essential two-component systems regulating cell envelope functions: opportunities for novel antibiotic therapies. *J Membr Biol* **251** (1), 75–89. DOI: 10.1007/s00232-017-9995-5.
- Carvalho, F., Pucciarelli, M. G., García-del Portillo, F., Cabanes, D. and Cossart, P. (2013). Extraction of cell wall-bound teichoic acids and surface proteins from *Listeria monocytogenes*. *Methods Mol Biol* **966**, 289–308. DOI: 10.1007/978-1-62703-245-2\_18.
- Caveney, N. A., Li, F. K. and Strynadka, N. C. (2018). Enzyme structures of the bacterial peptidoglycan and wall teichoic acid biogenesis pathways. *Curr Opin Struct Biol* **53**, 45–58. DOI: 10.1016/j.sbi.2018.05.002.
- Chambers, H. F. and Deleo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* **7** (9), 629–641. DOI: 10.1038/nrmicro2200.
- Chan, Y. G. Y., Frankel, M. B., Missiakas, D. and Schneewind, O. (2016). SagB glucosaminidase is a determinant of *Staphylococcus aureus* glycan chain length, antibiotic susceptibility, and protein secretion. *J Bacteriol* **198** (7), 1123–1136. DOI: 10.1128/JB.00983-15.
- Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., Boulton, M. L., Tenover, F. C., Downes, F. P., Shah, S., Rudrik, J. T., Pupp, G. R., Brown, W. J., Cardo, D. and Fridkin, S. K. (2003). Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* **348** (14), 1342–1347. DOI: 10.1056/NEJMoa025025.
- Chaudhuri, R. R., Allen, A. G., Owen, P. J., Shalom, G., Stone, K., Harrison, M., Burgis, T. A., Lockyer, M., Garcia-Lara, J., Foster, S. J., Pleasance, S. J., Peters, S. E., Maskell, D. J. and Charles, I. G. (2009). Comprehensive identification of essential *Staphylococcus aureus* genes using Transposon-Mediated Differential Hybridisation (TMDH). *BMC Genomics* **10**, 291. DOI: 10.1186/1471-2164-10-291.
- Chen, P. S., Toribara, T. Y. and Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28** (11), 1756–1758. DOI: 10.1021/ac60119a033.
- Chen, C., Krishnan, V., Macon, K., Manne, K., Narayana, S. V. L. and Schneewind, O. (2013). Secreted proteases control autolysin-mediated biofilm growth of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **288** (41), 29440–29452. DOI: 10.1074/jbc.M113.502039.
- Chen, C.-J., Huang, Y.-C. and Chiu, C.-H. (2015). Multiple pathways of cross-resistance to glycopeptides and daptomycin in persistent MRSA bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* **70** (11), 2965–2972. DOI: 10.1093/jac/dkv225.
- Chen, F.-J., Lauderdale, T.-L., Lee, C.-H., Hsu, Y.-C., Huang, I.-W., Hsu, P.-C. and Yang, C.-S. (2018). Effect of a point mutation in *mprf* on susceptibility to daptomycin, vancomycin, and oxacillin in an MRSA clinical strain. *Front Microbiol* **9**, 1086. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01086.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. and Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* **22** (6), 996–1006.
- Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K.-P., Peschel, A. and Götz, 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. DOI: 10.1128/IAI.00204-06.
- Cong, Y., Yang, S. and Rao, X. (2020). Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: a review of case updating and clinical features. *J Adv Res* **21**, 169–176. DOI: 10.1016/j.jare.2019.10.005.
- Covas, G., Vaz, F., Henriques, G., Pinho, M. G. and Filipe, S. R. (2016). Analysis of cell wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol* **1440**, 201–213. DOI: 10.1007/978-1-4939-3676-2\_15.
- Crosby, H. A., Tiwari, N., Kwiecinski, J. M., Xu, Z., Dykstra, A., Jenul, C., Fuentes, E. J. and Horswill, A. R. (2020). The *Staphylococcus aureus* ArIRS two-component system regulates virulence factor expression through MgrA. *Mol Microbiol* **113** (1), 103–122. DOI: 10.1111/mmi.14404.

- Cui, L., Murakami, H., Kuwahara-Arai, K., Hanaki, H. and Hiramatsu, K. (2000). Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* **44** (9), 2276–2285. DOI: 10.1128/aac.44.9.2276-2285.2000.
- Cui, L., Ma, X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F. C., Mamizuka, E. M., Gemmell, C. G., Kim, M.-N., Ploy, M.-C., El Solh, N., Ferraz, V. and Hiramatsu, K. (2003). Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **41** (1), 5–14. DOI: 10.1128/JCM.41.1.5-14.2003.
- Cui, L., Iwamoto, A., Lian, J.-Q., Neoh, H.-m., Maruyama, T., Horikawa, Y. and Hiramatsu, K. (2006a). Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (2), 428–438. DOI: 10.1128/AAC.50.2.428-438.2006.
- Cui, L., Tominaga, E., Neoh, H.-m. and Hiramatsu, K. (2006b). Correlation between reduced daptomycin susceptibility and vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (3), 1079–1082. DOI: 10.1128/AAC.50.3.1079-1082.2006.
- Cui, L., Neoh, H.-m., Shoji, M. and Hiramatsu, K. (2009). Contribution of *vraSR* and *graSR* point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **53** (3), 1231–1234. DOI: 10.1128/AAC.01173-08.
- Cui, L., Isii, T., Fukuda, M., Ochiai, T., Neoh, H.-m., Camargo, I. L. B. d. C., Watanabe, Y., Shoji, M., Hishinuma, T. and Hiramatsu, K. (2010). An RpoB mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **54** (12), 5222–5233. DOI: 10.1128/AAC.00437-10.
- Cui, J., Zhang, H., Mo, Z., Yu, M. and Liang, Z. (2021). Cell wall thickness and the molecular mechanism of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol* **72** (5), 604–609. DOI: 10.1111/lam.13456.
- Curcio, M. J. and Derbyshire, K. M. (2003). The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (11), 865–877. DOI: 10.1038/nrm1241.
- da Costa, T. M., Oliveira, C. R. de, Chambers, H. F. and Chatterjee, S. S. (2018). PBP4: a new perspective on *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -lactam resistance. *Microorganisms* **6** (3). DOI: 10.3390/microorganisms6030057.
- Dai, Y., Chang, W., Zhao, C., Peng, J., Xu, L., Lu, H., Zhou, S. and Ma, X. (2017). VraR binding to the promoter region of *agr* inhibits its function in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA. *Antimicrob Agents Chemother* **61** (5). DOI: 10.1128/AAC.02740-16.
- Dai, Y., Gao, C., Chen, L., Chang, W., Yu, W., Ma, X. and Li, J. (2019). Heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* uses the VraSR regulatory system to modulate autophagy for increased intracellular survival in macrophage-like cell line RAW264.7. *Front Microbiol* **10**, 1222. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01222.
- Daum, R. S., Gupta, S., Sabbagh, R. and Milewski, W. M. (1992). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *J Infect Dis* **166** (5), 1066–1072. DOI: 10.1093/infdis/166.5.1066.
- Delaune, A., Poupel, O., Mallet, A., Coic, Y.-M., Msadek, T. and Dubrac, S. (2011). Peptidoglycan crosslinking relaxation plays an important role in *Staphylococcus aureus* WalkR-dependent cell viability. *PLoS One* **6** (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0017054.
- Delaune, A., Dubrac, S., Blanchet, C., Poupel, O., Mäder, U., Hiron, A., Leduc, A., Fitting, C., Nicolas, P., Cavillon, J.-M., Adib-Conquy, M. and Msadek, T. (2012). The WalkR system controls major staphylococcal virulence genes and is involved in triggering the host inflammatory response. *Infect Immun* **80** (10), 3438–3453. DOI: 10.1128/IAI.00195-12.
- Demleitner, G. and Götz, F. (1994). Evidence for importance of the *Staphylococcus hyicus* lipase pro-peptide in lipase secretion, stability and activity. *FEMS Microbiol Lett* **121** (2), 189–197. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07098.x.
- Dengler, V., Meier, P. S., Heusser, R., Kupferschmied, P., Fazekas, J., Friebe, S., Staufer, S. B., Majcherczyk, P. A., Moreillon, P., Berger-Bächi, B. and McCallum, N. (2012). Deletion of hypothetical wall teichoic acid ligases in *Staphylococcus aureus* activates the cell wall stress response. *FEMS Microbiol Lett* **333** (2), 109–120. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02603.x.
- Do, T., Page, J. E. and Walker, S. (2020). Uncovering the activities, biological roles, and regulation of bacterial cell wall hydrolases and tailoring enzymes. *J Biol Chem* **295** (10), 3347–3361. DOI: 10.1074/jbc.REV119.010155.
- Doddangoudar, V. C., O'Donoghue, M. M., Chong, E. Y. C., Tsang, D. N. C. and Boost, M. V. (2012). Role of stop codons in development and loss of vancomycin non-susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **67** (9), 2101–2106. DOI: 10.1093/jac/dks171.
- Doi, A., Okajima, T., Gotoh, Y., Tanizawa, K. and Utsumi, R. (2010). X-ray crystal structure of the DNA-binding domain of response regulator WalR essential to the cell viability of *Staphylococcus aureus* and interaction with target DNA. *Biosci Biotechnol Biochem* **74** (9), 1901–1907. DOI: 10.1271/bbb.100307.
- Donat, S., Streker, K., Schirmeister, T., Raketke, S., Stehle, T., Liebeke, M., Lalk, M. and Ohlsen, K. (2009). Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type serine/threonine kinase PknB in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191** (13), 4056–4069. DOI: 10.1128/JB.00117-09.
- Drummelsmith, J., Winstall, E., Bergeron, M. G., Poirier, G. G. and Ouellette, M. (2007). Comparative proteomics analyses reveal a potential biomarker for the detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *J Proteome Res* **6** (12), 4690–4702. DOI: 10.1021/pr070521m.

- 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. DOI: 10.1128/jb.186.4.1175-1181.2004.
- 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. DOI: 10.1128/JB.00645-07.
- 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. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06483.x.
- El Zoeiby, A., Sanschagrín, F. and Levesque, R. C. (2003). Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* **47** (1), 1–12. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03289.x.
- Ernst, C. M., Staubitz, P., Mishra, N. N., Yang, S.-J., Hornig, G., Kalbacher, H., Bayer, A. S., Kraus, D. and Peschel, A. (2009). The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathog* **5** (11), e1000660. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000660.
- Ernst, C. M. and Peschel, A. (2011). Broad-spectrum antimicrobial peptide resistance by MprF-mediated aminoacylation and flipping of phospholipids. *Mol Microbiol* **80** (2), 290–299. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07576.x.
- Ernst, C. M., Slavetinsky, C. J., Kuhn, S., Hauser, J. N., Nega, M., Mishra, N. N., Gekeler, C., Bayer, A. S. and Peschel, A. (2018). Gain-of-function mutations in the phospholipid flippase MprF confer specific daptomycin resistance. *mBio* **9** (6). DOI: 10.1128/mBio.01659-18.
- 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.
- Falord, M., Mäder, U., Hiron, A., Débarbouillé, M. and Msadek, T. (2011). Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraSR regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. *PLoS One* **6** (7), e21323. DOI: 10.1371/journal.pone.0021323.
- Falord, M., Karimova, G., Hiron, A. and Msadek, T. (2012). GraXSR proteins interact with the VraFG ABC transporter to form a five-component system required for cationic antimicrobial peptide sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **56** (2), 1047–1058. DOI: 10.1128/AAC.05054-11.
- Fan, X., Liu, Y., Smith, D., Konermann, L., Siu, K. W. M. and Golemi-Kotra, D. (2007). Diversity of penicillin-binding proteins. resistance factor FmtA of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **282** (48), 35143–35152. DOI: 10.1074/jbc.M706296200.
- Farha, M. A., Leung, A., Sewell, E. W., D’Elia, M. A., Allison, S. E., Ejim, L., Pereira, P. M., Pinho, M. G., Wright, G. D. and Brown, E. D. (2012). Inhibition of WTA synthesis blocks the cooperative action of PBPs and sensitizes MRSA to  $\beta$ -lactams. *ACS Chem Biol* **8** (1), 226–233. DOI: 10.1021/cb300413m.
- Fedtke, I., Mader, D., Kohler, T., Moll, H., Nicholson, G., Biswas, R., Henseler, K., Götz, F., Zähringer, U. and Peschel, A. (2007). A *Staphylococcus aureus* ypfP mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity. *Mol Microbiol* **65** (4), 1078–1091. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05854.x.
- Feng, J., Michalik, S., Varming, A. N., Andersen, J. H., Albrecht, D., Jelsbak, L., Krieger, S., Ohlsen, K., Hecker, M., Gerth, U., Ingmer, H. and Frees, D. (2013). Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in *Staphylococcus aureus*. *J Proteome Res* **12** (2), 547–558. DOI: 10.1021/pr300394r.
- Figueiredo, T. A., Sobral, R. G., Ludovice, A. M., Almeida, J. M. F. de, Bui, N. K., Vollmer, W., Lencastre, H. de and Tomasz, A. (2012). Identification of genetic determinants and enzymes involved with the amidation of glutamic acid residues in the peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* **8** (1), e1002508. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002508.
- Fille, M., Hausdorfer, J., Dierich, M. P. and Miksits, K. (2009). Glykopeptidantibiotika. In: Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F. and Suerbaum, S. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Medizin Verlag 6<sup>th</sup> Edition, 730–731.
- Finan, J. E., Archer, G. L., Pucci, M. J. and Climo, M. W. (2001). Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **45** (11), 3070–3075. DOI: 10.1128/AAC.45.11.3070-3075.2001.
- Fischer, W. and Rösel, P. (1980). The alanine ester substitution of lipoteichoic acid (LTA) in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters* **119** (2), 224–226. DOI: 10.1016/0014-5793(80)80257-2.
- Fischer, W., Rösel, P. and Koch, H. U. (1981). Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **146** (2), 467–475. DOI: 10.1128/JB.146.2.467-475.1981.
- Fleming, A. (1922). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **93** (653), 306–317. DOI: 10.1098/rspb.1922.0023.
- Fournier, B. and Hooper, D. C. (2000). A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182** (14), 3955–3964. DOI: 10.1128/jb.182.14.3955-3964.2000.
- Fox, P. M., Climo, M. W. and Archer, G. L. (2007). Lack of relationship between purine biosynthesis and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a cautionary tale for microarray interpretation. *Antimicrob Agents Chemother* **51** (4), 1274–1280. DOI: 10.1128/AAC.01060-06.



- Frankel, M. B., Hendrickx, A. P. A., Missiakas, D. M. and Schneewind, O. (2011). LytN, a murein hydrolase in the cross-wall compartment of *Staphylococcus aureus*, is involved in proper bacterial growth and envelope assembly. *J Biol Chem* **286** (37), 32593–32605. DOI: 10.1074/jbc.M111.258863.
- Frankel, M. B. and Schneewind, O. (2012). Determinants of murein hydrolase targeting to cross-wall of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan. *J Biol Chem* **287** (13), 10460–10471. DOI: 10.1074/jbc.M111.336404.
- Frees, D., Qazi, S. N. A., Hill, P. J. and Ingmer, H. (2003). Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Mol Microbiol* **48** (6), 1565–1578. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03524.x.
- Frees, D., Andersen, J. H., Hemmingsen, L., Koskeniemi, K., Bæk, K. T., Muhammed, M. K., Gudeta, D. D., Nyman, T. A., Sukura, A., Varmanen, P. and Savijoki, K. (2012). New insights into *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence regulation from an analysis of the role of the ClpP protease in the strains Newman, COL, and SA564. *J Proteome Res* **11** (1), 95–108. DOI: 10.1021/pr200956s.
- Frees, D., Gerth, U. and Ingmer, H. (2014). Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **304** (2), 142–149. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.11.009.
- Fuchs, S., Mehlan, H., Bernhardt, J., Hennig, A., Michalik, S., Surmann, K., Pané-Farré, J., Giese, A., Weiss, S., Backert, L., Herbig, A., Niesel, K., Hecker, M., Völker, U. and Mäder, U. (2018). AureoWiki-The repository of the *Staphylococcus aureus* research and annotation community. *Int J Med Microbiol* **308** (6), 558–568. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.11.011.
- Fujimura, T. and Murakami, K. (1997). Increase of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* caused by deletion of a gene whose product is homologous to lytic enzymes. *J Bacteriol* **179** (20), 6294–6301. DOI: 10.1128/jb.179.20.6294-6301.1997.
- Fukushima, T., Furihata, I., Emmins, R., Daniel, R. A., Hoch, J. A. and Szurmant, H. (2011). A role for the essential YycG sensor histidine kinase in sensing cell division. *Mol Microbiol* **79** (2), 503–522. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07464.x.
- Gajdiss, M., Türck, M. and Bierbaum, G. (2017). Bacterial histidine kinases: overexpression, purification, and inhibitor screen. *Methods Mol Biol* **1520**, 247–259. DOI: 10.1007/978-1-4939-6634-9\_15.
- Gajdiss, M., Monk, I. R., Bertsche, U., Kienemund, J., Funk, T., Dietrich, A., Hort, M., Sib, E., Stinear, T. P. and Bierbaum, G. (2020). YycH and YycI regulate expression of *Staphylococcus aureus* autolysins by activation of WalRK phosphorylation. *Microorganisms* **8** (6). DOI: 10.3390/microorganisms8060870.
- Galbusera, E., Renzoni, A., Andrey, D. O., Monod, A., Barras, C., Tortora, P., Polissi, A. and Kelley, W. L. (2011). Site-specific mutation of *Staphylococcus aureus* VraS reveals a crucial role for the VraR-VraS sensor in the emergence of glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **55** (3), 1008–1020. DOI: 10.1128/AAC.00720-10.
- Gao, C., Dai, Y., Chang, W., Fang, C., Wang, Z. and Ma, X. (2019). VraSR has an important role in immune evasion of *Staphylococcus aureus* with low level vancomycin resistance. *Microbes Infect* **21** (8-9), 361–367. DOI: 10.1016/j.micinf.2019.04.003.
- Gardete, S., Kim, C., Hartmann, B. M., Mwangi, M., Roux, C. M., Dunman, P. M., Chambers, H. F. and Tomasz, A. (2012). Genetic pathway in acquisition and loss of vancomycin resistance in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain of clonal type USA300. *PLoS Pathog* **8** (2), e1002505. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002505.
- Gatermann, S. and Miksits, K. (2009). Staphylokokken. In: Hahn, H., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F. and Suerbaum, S. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer Medizin Verlag 6<sup>th</sup> Edition, 191–202.
- Gautam, S., Kim, T., Lester, E., Deep, D. and Spiegel, D. A. (2016). Wall teichoic acids prevent antibody binding to epitopes within the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *ACS Chem Biol* **11** (1), 25–30. DOI: 10.1021/acscchembio.5b00439.
- Gélinas, M., Museau, L., Milot, A. and Beauregard, P. B. (2020). Cellular adaptation and the importance of the purine biosynthesis pathway during biofilm formation in Gram-positive pathogens. *bioRxiv*. DOI: 10.1101/2020.12.11.422287.
- Gerlach, D., Guo, Y., Castro, C. de, Kim, S.-H., Schlatterer, K., Xu, F.-F., Pereira, C., Seeberger, P. H., Ali, S., Codée, J., Sirisarn, W., Schulte, B., Wolz, C., Larsen, J., Molinaro, A., Lee, B. L., Xia, G., Stehle, T. and Peschel, A. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* alters cell wall glycosylation to evade immunity. *Nature* **563** (7733), 705–709. DOI: 10.1038/s41586-018-0730-x.
- Ginsberg, C., Zhang, Y.-H., Yuan, Y. and Walker, S. (2006). In vitro reconstitution of two essential steps in wall teichoic acid biosynthesis. *ACS Chem Biol* **1** (1), 25–28. DOI: 10.1021/cb0500041.
- Glauner, B. and Höltje, J. V. (1990). Growth pattern of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265** (31), 18988–18996. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)30613-0.
- Goldstein, F. W., Atoui, R., Ben Ali, A., Nguyen, J. C., Ly, A. and Kitzis, M. D. (2004). False synergy between vancomycin and beta-lactams against glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA) caused by inappropriate testing methods. *Clin Microbiol Infect* **10** (4), 342–345. DOI: 10.1111/j.1198-743X.2004.00856.x.
- Gonçalves, F. D. A. and de Carvalho, C. C. R. (2016). Phenotypic modifications in *Staphylococcus aureus* cells exposed to high concentrations of vancomycin and teicoplanin. *Front Microbiol* **7**, 13. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00013.

- Gonzalez-Delgado, L. S., Walters-Morgan, H., Salamaga, B., Robertson, A. J., Hounslow, A. M., Jagielska, E., Sabata, I., Williamson, M. P., Lovering, A. L. and Mesnage, S. (2020). Two-site recognition of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan by lysostaphin SH3b. *Nat Chem Biol* **16** (1), 24–30. DOI: 10.1038/s41589-019-0393-4.
- Götz, F., Heilmann, C. and Stehle, T. (2014). Functional and structural analysis of the major amidase (Atl) in *Staphylococcus*. *Int J Med Microbiol* **304** (2), 156–163. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.11.006.
- Graham, J. W., Lei, M. G. and Lee, C. Y. (2013). Trapping and identification of cellular substrates of the *Staphylococcus aureus* ClpC chaperone. *J Bacteriol* **195** (19), 4506–4516. DOI: 10.1128/JB.00758-13.
- Graßl, M. (1970). D-Alanin. In: Bergmeyer, H. U. Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie 2<sup>nd</sup> Edition, 1641-1644.
- Grein, F., Schneider, T. and Sahl, H. G. (2019). Docking on lipid II - A widespread mechanism for potent bactericidal activities of antibiotic peptides. *J Mol Biol* **431** (18), 3520–3530. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.014.
- Grein, F., Müller, A., Scherer, K. M., Liu, X., Ludwig, K. C., Klöckner, A., Strach, M., Sahl, H. G., Kubitscheck, U. and Schneider, T. (2020). Ca<sup>2+</sup>-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids. *Nat Commun* **11** (1), 1455. DOI: 10.1038/s41467-020-15257-1.
- Grilo, I. R., Ludovice, A. M., Tomasz, A., de Lencastre, H. and Sobral, R. G. (2014). The glucosaminidase domain of Atl - the major *Staphylococcus aureus* autolysin - has DNA-binding activity. *Microbiologyopen* **3** (2), 247–256. DOI: 10.1002/mbo3.165.
- Gross, C. A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J. and Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **63**, 141–155. DOI: 10.1101/sqb.1998.63.141.
- Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F. and Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect Immun* **69** (5), 3423–3426. DOI: 10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001.
- Gründling, A., Missiakas, D. M. and Schneewind, O. (2006a). *Staphylococcus aureus* mutants with increased lysostaphin resistance. *J Bacteriol* **188** (17), 6286–6297. DOI: 10.1128/JB.00457-06.
- Gründling, A. and Schneewind, O. (2006b). Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188** (7), 2463–2472. DOI: 10.1128/JB.188.7.2463-2472.2006.
- Gustafson, J. E., O'Brien, F. G., Coombs, G. W., Malkowski, M. J., Grubb, W. B., Pfeltz, R. F. and Wilkinson, B. J. (2003). Alterations in phage-typing patterns in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* **52** (Pt 8), 711–714. DOI: 10.1099/jmm.0.05210-0.
- Haas, R., Koch, H. U. and Fischer, W. (1984). Alanin turnover from lipoteichoic acid to teichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **21** (1), 27–31. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1984.tb00180.x.
- Hafer, C., Lin, Y., Kornblum, J., Lowy, F. D. and Uhlemann, A.-C. (2012). Contribution of selected gene mutations to resistance in clinical isolates of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **56** (11), 5845–5851. DOI: 10.1128/AAC.01139-12.
- Hamilton, S. M., Alexander, J. A. N., Choo, E. J., Basuino, L., da Costa, T. M., Severin, A., Chung, M., Aedo, S., Strynadka, N. C. J., Tomasz, A., Chatterjee, S. S. and Chambers, H. F. (2017). High-level resistance of *Staphylococcus aureus* to  $\beta$ -lactam antibiotics mediated by penicillin-binding protein 4 (PBP4). *Antimicrob Agents Chemother* **61** (6). DOI: 10.1128/AAC.02727-16.
- Hanaki, H., Kuwahara-Arai, K., Boyle-Vavra, S., Daum, R. S., Labischinski, H. and Hiramatsu, K. (1998a). Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* **42** (2), 199–209. DOI: 10.1093/jac/42.2.199.
- Hanaki, H., Labischinski, H., Inaba, Y., Kondo, N., Murakami, H. and Hiramatsu, K. (1998b). Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* **42** (3), 315–320. DOI: 10.1093/jac/42.3.315.
- Handwerker, S., Pucci, M. J., Volk, K. J., Liu, J. and Lee, M. S. (1994). Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J Bacteriol* **176** (1), 260–264. DOI: 10.1128/jb.176.1.260-264.1994.
- Hardt, P., Engels, I., Rausch, M., Gajdiss, M., Ulm, H., Sass, P., Ohlsen, K., Sahl, H. G., Bierbaum, G., Schneider, T. and Grein, F. (2017). The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **307** (1), 1–10. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.12.001.
- Henze, U., Sidow, T., Wecke, J., Labischinski, H. and Berger-Bächi, B. (1993). Influence of *femB* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **175** (6), 1612–1620. DOI: 10.1128/jb.175.6.1612-1620.1993.
- Heptinstall, S., Archibald, A. R. and Baddiley, J. (1970). Teichoic acids and membrane function in bacteria. *Nature* **225** (5232), 519–521. DOI: 10.1038/225519a0.
- Herbert, D., Phipps, P. J. and Strange, R. E. (1971). Chapter III Chemical Analysis of Microbial Cells. *Methods in Microbiology* **5**, 209–344.
- Herbert, S., Bera, A., Nerz, C., Kraus, D., Peschel, A., Goerke, C., Meehl, M., Cheung, A. and Götz, F. (2007). Molecular basis of resistance to muramidase and cationic antimicrobial peptide activity of lysozyme in staphylococci. *PLoS Pathog* **3** (7), e102. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030102.

- 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. DOI: 10.1093/jac/40.1.135.
- Hiramatsu, K., Kayayama, Y., Matsuo, M., Aiba, Y., Saito, M., Hishinuma, T. and Iwamoto, A. (2014). Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Glob Antimicrob Resist* **2** (4), 213–224. DOI: 10.1016/j.jgar.2014.04.006.
- Hirschhausen, N., Schlesier, T., Peters, G. and Heilmann, C. (2012). Characterization of the modular design of the autolysin/adhesin Aaa from *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **7** (6), e40353. DOI: 10.1371/journal.pone.0040353.
- Holmes, N. E., Tong, S. Y. C., Davis, J. S. and van Hal, S. J. (2015). Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: vancomycin and beyond. *Semin Respir Crit Care Med* **36** (1), 17–30. DOI: 10.1055/s-0034-1397040.
- Horne, K. C., Howden, B. P., Grabsch, E. A., Graham, M., Ward, P. B., Xie, S., Mayall, B. C., Johnson, P. D. R. and Grayson, M. L. (2009). Prospective comparison of the clinical impacts of heterogeneous vancomycin-intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-susceptible MRSA. *Antimicrob Agents Chemother* **53** (8), 3447–3452. DOI: 10.1128/AAC.01365-08.
- Hort, M., Bertsche, U., Nozinovic, S., Dietrich, A., Schrötter, A. S., Mildenerberger, L., Axtmann, K., Berscheid, A. and Bierbaum, G. (2021). The role of  $\beta$ -glycosylated wall teichoic acids in the reduction of vancomycin susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr* **9**:e00528-21. DOI: 10.1128/Spectrum.00528-21.
- Howden, B. P., Johnson, P. D. R., Ward, P. B., Stinear, T. P. and Davies, J. K. (2006). Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (9), 3039–3047. DOI: 10.1128/AAC.00422-06.
- Howden, B. P., Smith, D. J., Mansell, A., Johnson, P. D. R., Ward, P. B., Stinear, T. P. and Davies, J. K. (2008). Different bacterial gene expression patterns and attenuated host immune responses are associated with the evolution of low-level vancomycin resistance during persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *BMC Microbiol* **8**, 39. DOI: 10.1186/1471-2180-8-39.
- Howden, B. P., Davies, J. K., Johnson, P. D. R., Stinear, T. P. and Grayson, M. L. (2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **23** (1), 99–139. DOI: 10.1128/CMR.00042-09.
- Howden, B. P., McEvoy, C. R. E., Allen, D. L., Chua, K., Gao, W., Harrison, P. F., Bell, J., Coombs, G., Bennett-Wood, V., Porter, J. L., Robins-Browne, R., Davies, J. K., Seemann, T. and Stinear, T. P. (2011). Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalkR. *PLoS Pathog* **7** (11), e1002359. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002359.
- Howden, B. P., Peleg, A. Y. and Stinear, T. P. (2014). The evolution of vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous-VISA. *Infect Genet Evol* **21**, 575–582. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.03.047.
- 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. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03661.x.
- Hsieh, M. H., Yu, C. M., Yu, V. L. and Chow, J. W. (1993). Synergy assessed by checkerboard. A critical analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **16** (4), 343–349. DOI: 10.1016/0732-8893(93)90087-n.
- Hu, Q., Peng, H. and Rao, X. (2016). Molecular events for promotion of vancomycin resistance in vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* **7**, 1601. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01601.
- Hyrylainen, H. L., Vitikainen, M., Thwaite, J., Wu, H., Sarvas, M., Harwood, C. R., Kontinen, V. P. and Stephenson, K. (2000). D-Alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane/cell wall interface of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **275** (35), 26696–26703. DOI: 10.1074/jbc.M003804200.
- Hyryläinen, H.-L., Marciniak, B. C., Dahncke, K., Pietiäinen, M., Courtin, P., Vitikainen, M., Seppala, R., Otto, A., Becher, D., Chapot-Chartier, M.-P., Kuipers, O. P. and Kontinen, V. P. (2010). Penicillin-binding protein folding is dependent on the PrsA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **77** (1), 108–127. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07188.x.
- Iandolo, J. J., Worrell, V., Groicher, K. H., Qian, Y., Tian, R., Kenton, S., Dorman, A., Ji, H., Lin, S., Loh, P., Qi, S., Zhu, H. and Roe, B. A. (2002). Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene* **289** (1-2), 109–118. DOI: 10.1016/s0378-1119(02)00481-x.
- Ingavale, S. S., van Wamel, W. and Cheung, A. L. (2003). Characterization of RAT, an autolysis regulator in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **48** (6), 1451–1466. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03503.x.
- Ingmer, H., Gerlach, D. and Wolz, C. (2019). Temperate phages of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Spectr* **7** (5). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0058-2018.
- Jacob-Dubuisson, F., Mechaly, A., Betton, J.-M. and Antoine, R. (2018). Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nat Rev Microbiol* **16** (10), 585–593. DOI: 10.1038/s41579-018-0055-7.

- 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. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.02.002.
- Jansen, A., Szekat, C., Schröder, W., Wolz, C., Goerke, C., Lee, J. C., Türck, M. and Bierbaum, G. (2013). Production of capsular polysaccharide does not influence *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility. *BMC Microbiol* **13**, 65. DOI: 10.1186/1471-2180-13-65.
- Jensen, C., Fosberg, M. J., Thalsø-Madsen, I., Bæk, K. T. and Frees, D. (2019). *Staphylococcus aureus* ClpX localizes at the division septum and impacts transcription of genes involved in cell division, T7-secretion, and SaPI5-excision. *Sci Rep* **9**. DOI: 10.1038/s41598-019-52823-0.
- Jenul, C. and Horswill, A. R. (2019). Regulation of *Staphylococcus aureus* virulence. *Microbiol Spectr* **7** (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0031-2018.
- Jin, Y., Yu, X., Zhang, S., Kong, X., Chen, W., Luo, Q., Zheng, B. and Xiao, Y. (2020). Comparative analysis of virulence and toxin expression of vancomycin-intermediate and vancomycin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Front Microbiol* **11**, 596942. DOI: 10.3389/fmicb.2020.596942.
- Jones, T., Yeaman, M. R., Sakoulas, G., Yang, S.-J., Proctor, R. A., Sahl, H. G., Schrenzel, J., Xiong, Y. Q. and Bayer, A. S. (2008). Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding. *Antimicrob Agents Chemother* **52** (1), 269–278. DOI: 10.1128/AAC.00719-07.
- Jordan, S., Junker, A., Helmann, J. D. and Mascher, T. (2006). Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *J Bacteriol* **188** (14), 5153–5166. DOI: 10.1128/JB.00310-06.
- Jousselin, A., Renzoni, A., Andrey, D. O., Monod, A., Lew, D. P. and Kelley, W. L. (2012). The posttranslocational chaperone lipoprotein PrsA is involved in both glycopeptide and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **56** (7), 3629–3640. DOI: 10.1128/AAC.06264-11.
- Jousselin, A., Manzano, C., Biette, A., Reed, P., Pinho, M. G., Rosato, A. E., Kelley, W. L. and Renzoni, A. (2015). The *Staphylococcus aureus* chaperone PrsA is a new auxiliary factor of oxacillin resistance affecting penicillin-binding protein 2A. *Antimicrob Agents Chemother* **60** (3), 1656–1666. DOI: 10.1128/AAC.02333-15.
- Jung, S.-I., Kiem, S., Lee, N. Y., Kim, Y.-S., Oh, W. S., Cho, H. L., Peck, K. R. and Song, J.-H. (2002). One-point population analysis and effect of osmolarity on detection of hetero-vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **40** (4), 1493–1495. DOI: 10.1128/jcm.40.4.1493-1495.2002.
- Kahl, B. C., Becker, K. and Löffler, B. (2016). Clinical significance and pathogenesis of staphylococcal small colony variants in persistent infections. *Clin Microbiol Rev* **29** (2), 401–427. DOI: 10.1128/CMR.00069-15.
- Kajimura, J., Fujiwara, T., Yamada, S., Suzawa, Y., Nishida, T., Oyamada, Y., Hayashi, I., Yamagishi, J.-i., Komatsuzawa, H. and Sugai, M. (2005). Identification and molecular characterization of an N-acetylmuramyl-L-alanine amidase Sle1 involved in cell separation of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **58** (4), 1087–1101. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04881.x.
- Kalantari, A., Derouiche, A., Shi, L. and Mijakovic, I. (2015). Serine/threonine/tyrosine phosphorylation regulates DNA binding of bacterial transcriptional regulators. *Microbiology (Reading)* **161** (9), 1720–1729. DOI: 10.1099/mic.0.000148.
- Karinou, E., Schuster, C. F., Pazos, M., Vollmer, W. and Gründling, A. (2019). Inactivation of the monofunctional peptidoglycan glycosyltransferase SgtB allows *Staphylococcus aureus* to survive in the absence of lipoteichoic acid. *J Bacteriol* **201** (1). DOI: 10.1128/JB.00574-18.
- Katayama, Y., Murakami-Kuroda, H., Cui, L. and Hiramatsu, K. (2009). Selection of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* **53** (8), 3190–3196. DOI: 10.1128/AAC.00834-08.
- Kato, Y., Suzuki, T., Ida, T. and Maebashi, K. (2010). Genetic changes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: predominance of amino acid substitutions in YvqF/VraSR. *J Antimicrob Chemother* **65** (1), 37–45. DOI: 10.1093/jac/dkp394.
- Kawai, Y., Marles-Wright, J., Cleverley, R. M., Emmins, R., Ishikawa, S., Kuwano, M., Heinz, N., Bui, N. K., Hoyland, C. N., Ogasawara, N., Lewis, R. J., Vollmer, W., Daniel, R. A. and Errington, J. (2011). A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. *EMBO J* **30** (24), 4931–4941. DOI: 10.1038/emboj.2011.358.
- Keinhörster, D., George, S. E., Weidenmaier, C. and Wolz, C. (2019a). Function and regulation of *Staphylococcus aureus* wall teichoic acids and capsular polysaccharides. *Int J Med Microbiol* **309** (6), 151333. DOI: 10.1016/j.ijmm.2019.151333.
- Keinhörster, D., Salzer, A., Duque-Jaramillo, A., George, S. E., Marincola, G., Lee, J. C., Weidenmaier, C. and Wolz, C. (2019b). Revisiting the regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis gene cluster in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **112** (4), 1083–1099. DOI: 10.1111/mmi.14347.
- Kho, K. and Meredith, T. (2018a). Extraction and analysis of bacterial teichoic acids. *Bio-protocol* **8** (21). DOI: 10.21769/BioProtoc.3078.
- Kho, K. and Meredith, T. C. (2018b). Salt-induced stress stimulates a lipoteichoic acid-specific three-component glycosylation system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **200** (12). DOI: 10.1128/JB.00017-18.

- Kienemund, J. (2016). In vitro Untersuchungen zu Protein-Interaktionen des WalRK Zwei-Komponentenregulationssystems aus *Staphylococcus aureus*. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kim, J. W., Chung, G. T., Yoo, J. S., Lee, Y. S. and Yoo, J. I. (2012). Autolytic activity and molecular characteristics of *Staphylococcus haemolyticus* strains with induced vancomycin resistance. *J Med Microbiol* **61** (Pt 10), 1428–1434. DOI: 10.1099/jmm.0.041046-0.
- Kim, J. W. and Lee, K. J. (2020). Single-nucleotide polymorphisms in a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain based on whole-genome sequencing. *Arch Microbiol* **202** (8), 2255–2261. DOI: 10.1007/s00203-020-01906-y.
- Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. and Koike, T. (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* **5** (4), 749–757. DOI: 10.1074/mcp.T500024-MCP200.
- Knopp, J. (2019). Reinigung und Analyse der Lipoteichonsäuren von *Staphylococcus aureus*-Stämmen mit verminderter Vancomycin-Empfindlichkeit. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Koehl, J. L., Muthaiyan, A., Jayaswal, R. K., Ehlert, K., Labischinski, H. and Wilkinson, B. J. (2004). Cell wall composition and decreased autolytic activity and lysostaphin susceptibility of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **48** (10), 3749–3757. DOI: 10.1128/AAC.48.10.3749-3757.2004.
- Kohler, T., Weidenmaier, C. and Peschel, A. (2009). Wall teichoic acid protects *Staphylococcus aureus* against antimicrobial fatty acids from human skin. *J Bacteriol* **191** (13), 4482–4484. DOI: 10.1128/JB.00221-09.
- Komatsuzawa, H., Suzuki, J., Sugai, M., Miyake, Y. and Suginaka, H. (1994). The effect of Triton X-100 on the in-vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Antimicrob Chemother* **34** (6), 885–897. DOI: 10.1093/jac/34.6.885.
- Komatsuzawa, H., Ohta, K., Yamada, S., Ehlert, K., Labischinski, H., Kajimura, J., Fujiwara, T. and Sugai, M. (2002). Increased glycan chain length distribution and decreased susceptibility to moenomycin in a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* mutant. *Antimicrob Agents Chemother* **46** (1), 75–81. DOI: 10.1128/aac.46.1.75-81.2002.
- Koprivnjak, T., Mlakar, V., Swanson, L., Fournier, B., Peschel, A. and Weiss, J. P. (2006). Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188** (10), 3622–3630. DOI: 10.1128/JB.188.10.3622-3630.2006.
- Kreiswirth, B. N., Löfdahl, 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. DOI: 10.1038/305709a0.
- Kresse, H., Belsey, M. J. and Rovini, H. (2007). The antibacterial drugs market. *Nat Rev Drug Discov* **6** (1), 19–20. DOI: 10.1038/nrd2226.
- Krismer, B., Weidenmaier, C., Zipperer, A. and Peschel, A. (2017). The commensal lifestyle of *Staphylococcus aureus* and its interactions with the nasal microbiota. *Nat Rev Microbiol* **15** (11), 675–687. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.104.
- Kühner, D., Stahl, M., Demircioglu, D. D. and Bertsche, U. (2014). From cells to muropeptide structures in 24 h: peptidoglycan mapping by UPLC-MS. *Sci Rep* **4**, 7494. DOI: 10.1038/srep07494.
- Kuroda, M., Kuwahara-Arai, K. and Hiramatsu, K. (2000). Identification of the up- and down-regulated genes in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Mu3 and Mu50 by cDNA differential hybridization method. *Biochem Biophys Res Commun* **269** (2), 485–490. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2277.
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H. and Hiramatsu, K. (2003). Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **49** (3), 807–821. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03599.x.
- Kuroda, M., Sekizuka, T., Matsui, H., Ohsuga, J., Ohshima, T. and Hanaki, H. (2019). IS256-mediated overexpression of the WalkR two-component system regulon contributes to reduced vancomycin susceptibility in a *Staphylococcus aureus* clinical isolate. *Front Microbiol* **10**, 1882. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01882.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lebreton, F. and Cattoir, V. (2020). Resistance to glycopeptide antibiotics. In: Bonev, B. B. and Brown, N. M. Bacterial resistances to antibiotics - from molecules to man. John Wiley & Sons 1<sup>st</sup> Edition, 51–80.
- Lee, J.-H., Kim, N.-H., Winstel, V., Kurokawa, K., Larsen, J., An, J.-H., Khan, A., Seong, M.-Y., Lee, M. J., Andersen, P. S., Peschel, A. and Lee, B. L. (2015). Surface glycopolymers are crucial for in vitro anti-wall teichoic acid IgG-mediated complement activation and opsonophagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **83** (11), 4247–4255. DOI: 10.1128/IAI.00767-15.
- Leonard, P. G., Golemi-Kotra, D. and Stock, A. M. (2013). Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in *Staphylococcus aureus* VraR activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (21), 8525–8530. DOI: 10.1073/pnas.1302819110.
- Leski, T. A. and Tomasz, A. (2005). Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *J Bacteriol* **187** (5), 1815–1824. DOI: 10.1128/JB.187.5.1815-1824.2005.
- Levine, D. P. (2006). Vancomycin: a history. *Clin Infect Dis* **42 Suppl 1**, S5-12. DOI: 10.1086/491709.

- Li, M., Cha, D. J., Lai, Y., Villaruz, A. E., Sturdevant, D. E. and Otto, M. (2007). The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **66** (5), 1136–1147. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.05986.x.
- Li, X., Gerlach, D., Du, X., Larsen, J., Stegger, M., Kühner, P., Peschel, A., Xia, G. and Winstel, V. (2015). An accessory wall teichoic acid glycosyltransferase protects *Staphylococcus aureus* from the lytic activity of Podoviridae. *Sci Rep* **5**, 17219. DOI: 10.1038/srep17219.
- Li, X., Koç, C., Kühner, P., Stierhof, Y.-D., Krismer, B., Enright, M. C., Penadés, J. R., Wolz, C., Stehle, T., Cambillau, C., Peschel, A. and Xia, G. (2016). An essential role for the baseplate protein Gp45 in phage adsorption to *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* **6**. DOI: 10.1038/srep26455.
- Libby, E. A., Goss, L. A. and Dworkin, J. (2015). The eukaryotic-like Ser/Thr kinase PrkC regulates the essential WalRK two-component system in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **11** (6), e1005275. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005275.
- Liu, J., Chen, D., Peters, B. M., Li, L., Li, B., Xu, Z. and Shirliff, M. E. (2016a). Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCCmec): a mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* **101**, 56–67. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.10.028.
- Liu, Q., Yeo, W.-S. and Bae, T. (2016b). The SaeRS two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Genes (Basel)* **7** (10). DOI: 10.3390/genes7100081.
- Liu, H., Shang, W., Hu, Z., Zheng, Y., Yuan, J., Hu, Q., Peng, H., Cai, X., Tan, L., Li, S., Zhu, J., Li, M., Hu, X., Zhou, R., Rao, X. and Yang, Y. (2018). A novel SigB(Q225P) mutation in *Staphylococcus aureus* retains virulence but promotes biofilm formation. *Emerg Microbes Infect* **7** (1), 72. DOI: 10.1038/s41426-018-0078-1.
- Loskill, P., Pereira, P. M., Jung, P., Bischoff, M., Herrmann, M., Pinho, M. G. and Jacobs, K. (2014). Reduction of the peptidoglycan crosslinking causes a decrease in stiffness of the *Staphylococcus aureus* cell envelope. *Biophys J* **107** (5), 1082–1089. DOI: 10.1016/j.bpj.2014.07.029.
- Majcherczyk, P. A., Barblan, J.-L., Moreillon, P. and Entenza, J. M. (2008). Development of glycopeptide-intermediate resistance by *Staphylococcus aureus* leads to attenuated infectivity in a rat model of endocarditis. *Microb Pathog* **45** (5-6), 408–414. DOI: 10.1016/j.micpath.2008.09.003.
- Maki, H. and Murakami, K. (1997). Formation of potent hybrid promoters of the mutant *llm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179** (22), 6944–6948. DOI: 10.1128/jb.179.22.6944-6948.1997.
- Maki, H., McCallum, N., Bischoff, M., Wada, A. and Berger-Bächi, B. (2004). *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **48** (6), 1953–1959. DOI: 10.1128/AAC.48.6.1953-1959.2004.
- Marples, R. R. and van Leeuwen, W. J. (1987). International committee on systematic bacteriology subcommittee on phage typing of staphylococci. *Int J Syst Bacteriol* **37** (2), 174–175. DOI: 10.1099/00207713-37-2-174.
- Matsuo, M., Cui, L., Kim, J. and Hiramatsu, K. (2013). Comprehensive identification of mutations responsible for heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA)-to-VISA conversion in laboratory-generated VISA strains derived from hVISA clinical strain Mu3. *Antimicrob Agents Chemother* **57** (12), 5843–5853. DOI: 10.1128/AAC.00425-13.
- Maya-Martinez, R., Alexander, J. A. N., Otten, C. F., Ayala, I., Vollmer, D., Gray, J., Bougault, C. M., Burt, A., Laguri, C., Fonvielle, M., Arthur, M., Strynadka, N. C. J., Vollmer, W. and Simorre, J.-P. (2019). Recognition of peptidoglycan fragments by the transpeptidase PBP4 from *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* **9**. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03223.
- McAleese, F., Wu, S. W., Sieradzki, K., Dunman, P., Murphy, E., Projan, S. and Tomasz, A. (2006). Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate-*S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J Bacteriol* **188** (3), 1120–1133. DOI: 10.1128/JB.188.3.1120-1133.2006.
- McCallum, N., Karazum, H., Getzmann, R., Bischoff, M., Majcherczyk, P., Berger-Bächi, B. and Landmann, R. (2006). In vivo survival of teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* and fitness cost of teicoplanin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (7), 2352–2360. DOI: 10.1128/AAC.00073-06.
- McCallum, N., Meier, P. S., Heusser, R. and Berger-Bächi, B. (2011). Mutational analyses of open reading frames within the *vraSR* operon and their roles in the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **55** (4), 1391–1402. DOI: 10.1128/AAC.01213-10.
- McCarthy, H., Waters, E. M., Bose, J. L., Foster, S., Bayles, K. W., O'Neill, E., Fey, P. D. and O'Gara, J. P. (2016). The major autolysin is redundant for *Staphylococcus aureus* USA300 LAC JE2 virulence in a murine device-related infection model. *FEMS Microbiol Lett* **363** (9). DOI: 10.1093/femsle/fnw087.
- McEvoy, C. R. E., Tsuji, B., Gao, W., Seemann, T., Porter, J. L., Doig, K., Ngo, D., Howden, B. P. and Stinear, T. P. (2013). Decreased vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus* caused by IS256 tempering of WalKR expression. *Antimicrob Agents Chemother* **57** (7), 3240–3249. DOI: 10.1128/AAC.00279-13.
- McGuinness, W. A., Malachowa, N. and Deleo, F. R. (2017). Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med* **90** (2), 269–281.
- Meehl, M., Herbert, S., Götz, F. and Cheung, A. (2007). Interaction of the GraRS two-component system with the *VraFG* ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **51** (8), 2679–2689. DOI: 10.1128/AAC.00209-07.

- Memmi, G., Nair, D. R. and Cheung, A. (2012). Role of ArlRS in autolysis in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* **194** (4), 759–767. DOI: 10.1128/JB.06261-11.
- Meredith, T. C., Swoboda, J. G. and Walker, S. (2008). Late-stage polyribitol phosphate wall teichoic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **190** (8), 3046–3056. DOI: 10.1128/JB.01880-07.
- Mildenberger, L. (2011). Charakterisierung des Zweikomponenten-Regulationssystems VraSR von *Staphylococcus aureus*. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Miller, W. R., Bayer, A. S. and Arias, C. A. (2016). Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6** (11). DOI: 10.1101/cshperspect.a026997.
- 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. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0399.
- 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. DOI: 10.1128/AAC.01682-08.
- Mishra, N. N., Liu, G. Y., Yeaman, M. R., Nast, C. C., Proctor, R. A., McKinnell, J. and Bayer, A. S. (2011). Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* **55** (2), 526–531. DOI: 10.1128/AAC.00680-10.
- Mishra, N. N. and Bayer, A. S. (2013). Correlation of cell membrane lipid profiles with daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **57** (2), 1082–1085. DOI: 10.1128/AAC.02182-12.
- Mishra, N. N., Yang, S.-J., Chen, L., Muller, C., Saleh-Mghir, A., Kuhn, S., Peschel, A., Yeaman, M. R., Nast, C. C., Kreiswirth, B. N., Crémieux, A.-C. and Bayer, A. S. (2013). Emergence of daptomycin resistance in daptomycin-naïve rabbits with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection is associated with resistance to host defense cationic peptides and *mprF* polymorphisms. *PLoS One* **8** (8), e71151. DOI: 10.1371/journal.pone.0071151.
- Mistretta, N., Brossaud, M., Telles, F., Sanchez, V., Talaga, P. and Rokbi, B. (2019). Glycosylation of *Staphylococcus aureus* cell wall teichoic acid is influenced by environmental conditions. *Sci Rep* **9** (1), 3212. DOI: 10.1038/s41598-019-39929-1.
- Mongodin, E., Finan, J., Climo, M. W., Rosato, A., Gill, S. and Archer, G. L. (2003). Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin. *J Bacteriol* **185** (15), 4638–4643. DOI: 10.1128/jb.185.15.4638-4643.2003.
- Monk, I. R., Shah, I. M., Xu, M., Tan, M.-W. and Foster, T. J. (2012). Transforming the untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio* **3** (2). DOI: 10.1128/mBio.00277-11.
- Monk, I. R., Shaikh, N., Begg, S. L., Gajdiss, M., Sharkey, L. K. R., Lee, J. Y. H., Pidot, S. J., Seemann, T., Kuiper, M., Winnen, B., Hvorup, R., Collins, B. M., Bierbaum, G., Udagedara, S. R., Morey, J. R., Pulyani, N., Howden, B. P., Maher, M. J., McDevitt, C. A., King, G. F. and Stinear, T. P. (2019). Zinc-binding to the cytoplasmic PAS domain regulates the essential WalK histidine kinase of *Staphylococcus aureus*. *Nat Commun* **10** (1), 3067. DOI: 10.1038/s41467-019-10932-4.
- Monteiro, J. M., Fernandes, P. B., Vaz, F., Pereira, A. R., Tavares, A. C., Ferreira, M. T., Pereira, P. M., Veiga, H., Kuru, E., VanNieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., Filipe, S. R. and Pinho, M. G. (2015). Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. *Nat Commun* **6**, 8055. DOI: 10.1038/ncomms9055.
- Monteiro, J. M., Pereira, A. R., Reichmann, N. T., Saraiva, B. M., Fernandes, P. B., Veiga, H., Tavares, A. C., Santos, M., Ferreira, M. T., Macário, V., VanNieuwenhze, M. S., Filipe, S. R. and Pinho, M. G. (2018). Peptidoglycan synthesis drives an FtsZ-treadmilling-independent step of cytokinesis. *Nature* **554** (7693), 528–532. DOI: 10.1038/nature25506.
- Monteiro, J. M., Covas, G., Rausch, D., Filipe, S. R., Schneider, T., Sahl, H. G. and Pinho, M. G. (2019). The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity. *Sci Rep* **9** (1), 5010. DOI: 10.1038/s41598-019-41461-1.
- Moormeier, D. E. and Bayles, K. W. (2017). *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol* **104** (3), 365–376. DOI: 10.1111/mmi.13634.
- Moreira, B., Boyle-Vavra, S., deJonge, B. L. and Daum, R. S. (1997). Increased production of penicillin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **41** (8), 1788–1793. DOI: 10.1128/AAC.41.8.1788.
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S. and Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Front Microbiol* **10**, 539. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00539.
- Müller, A., Wenzel, M., Strahl, H., Grein, F., Saaki, T. N. V., Kohl, B., Siersma, T., Bandow, J. E., Sahl, H. G., Schneider, T. and Hamoen, L. W. (2016). Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113** (45), E7077-E7086. DOI: 10.1073/pnas.1611173113.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263–273. DOI: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.

- Münch, D., Roemer, T., Lee, S. H., Engeser, M., Sahl, H. G. and Schneider, T. (2012). Identification and in vitro analysis of the GatD/MurT enzyme-complex catalyzing lipid II amidation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* **8** (1), e1002509. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002509.
- Murakami, H., Matsumaru, H., Kanamori, M., Hayashi, H. and Ohta, T. (1999). Cell wall-affecting antibiotics induce expression of a novel gene, *drp35*, in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* **264** (2), 348–351. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1388.
- Mwangi, M. M., Wu, S. W., Zhou, Y., Sieradzki, K., Lencastre, H. de, 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. DOI: 10.1073/pnas.0609839104.
- Nahaie, M. R., Goodfellow, M., Minnikin, D. E. and Hájek, V. (1984). Polar lipid and isoprenoid quinone composition in the classification of *Staphylococcus*. *J Gen Microbiol* **130** (9), 2427–2437. DOI: 10.1099/00221287-130-9-2427.
- Nair, D., Memmi, G., Hernandez, D., Bard, J., Beaume, M., Gill, S., Francois, P. and Cheung, A. L. (2011). Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *J Bacteriol* **193** (9), 2332–2335. DOI: 10.1128/JB.00027-11.
- Nathenson, S. G., Ishimoto, N., Anderson, J. S. and Strominger, J. L. (1966). Enzymatic synthesis and immunochemistry of alpha- and beta-N-acetylglucosaminylribitol linkages in teichoic acids from several strains of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **241** (3), 651–658.
- Nega, M., Dube, L., Kull, M., Ziebandt, A.-K., Ebner, P., Albrecht, D., Krismer, B., Rosenstein, R., Hecker, M. and Götz, F. (2015). Secretome analysis revealed adaptive and non-adaptive responses of the *Staphylococcus carnosus femB* mutant. *Proteomics* **15** (7), 1268–1279. DOI: 10.1002/pmic.201400343.
- Nega, M., Tribelli, P. M., Hipp, K., Stahl, M. and Götz, F. (2020). New insights in the coordinated amidase and glucosaminidase activity of the major autolysin (Atl) in *Staphylococcus aureus*. *Commun Biol* **3** (1), 695. DOI: 10.1038/s42003-020-01405-2.
- Neher, S. B., Flynn, J. M., Sauer, R. T. and Baker, T. A. (2003). Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev* **17** (9), 1084–1089. DOI: 10.1101/gad.1078003.
- Nelson, J. L., Rice, K. C., Slater, S. R., Fox, P. M., Archer, G. L., Bayles, K. W., Fey, P. D., Kreiswirth, B. N. and Somerville, G. A. (2007). Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains have impaired acetate catabolism: implications for polysaccharide intercellular adhesin synthesis and autolysis. *Antimicrob Agents Chemother* **51** (2), 616–622. DOI: 10.1128/AAC.01057-06.
- Neuhaus, F. C. and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67** (4), 686–723. DOI: 10.1128/mmbr.67.4.686-723.2003.
- Nickerson, N. N., Joag, V. and McGavin, M. J. (2008). Rapid autocatalytic activation of the M4 metalloprotease aureolysin is controlled by a conserved N-terminal fungalsin-thermolysin-propeptide domain. *Mol Microbiol* **69** (6), 1530–1543. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06384.x.
- Nishi, H., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., McCallum, N. and Sugai, M. (2004). Reduced content of lysyl-phosphatidylglycerol in the cytoplasmic membrane affects susceptibility to moenomycin, as well as vancomycin, gentamicin, and antimicrobial peptides, in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **48** (12), 4800–4807. DOI: 10.1128/AAC.48.12.4800-4807.2004.
- Nishio, E. K., Ribeiro, J. M., Oliveira, A. G., Andrade, C. G. T. J., Proni, E. A., Kobayashi, R. K. T. and Nakazato, G. (2016). Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. *Sci Rep* **6**, 21641. DOI: 10.1038/srep21641.
- Novick, R. P. and Richmond, M. H. (1965). Nature and interactions of the genetic elements governing penicillinase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **90**, 467–480. DOI: 10.1128/JB.90.2.467-480.1965.
- Novick, R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48** (6), 1429–1449. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03526.x.
- Ogston, A. (1882). Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol* **17** (Pt 1), 24–58.
- Oku, Y., Kurokawa, K., Matsuo, M., Yamada, S., Lee, B.-L. and Sekimizu, K. (2009). Pleiotropic roles of polyglycerolphosphate synthase of lipoteichoic acid in growth of *Staphylococcus aureus* cells. *J Bacteriol* **191** (1), 141–151. DOI: 10.1128/JB.01221-08.
- Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y. M., Suginaka, H. and Tomasz, A. (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (1), 285–289. DOI: 10.1073/pnas.92.1.285.
- Paharik, A. E. and Horswill, A. R. (2016). The staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response. *Microbiol Spectr* **4** (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015.
- Parasassi, T. and Gratton, E. (1995). Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. *J Fluoresc* **5** (1), 59–69. DOI: 10.1007/BF00718783.



- Pasquina, L. W., Santa Maria, J. P. and Walker, S. (2013). Teichoic acid biosynthesis as an antibiotic target. *Curr Opin Microbiol* **16** (5), 531–537. DOI: 10.1016/j.mib.2013.06.014.
- Pasztor, L., Ziebandt, A.-K., Nega, M., Schlag, M., Haase, S., Franz-Wachtel, M., Madlung, J., Nordheim, A., Heinrichs, D. E. and Götz, F. (2010). Staphylococcal major autolysin (Atl) is involved in excretion of cytoplasmic proteins. *J Biol Chem* **285** (47), 36794–36803. DOI: 10.1074/jbc.M110.167312.
- Peleg, A. Y., Monga, D., Pillai, S., Mylonakis, E., Moellering, R. C. and Eliopoulos, G. M. (2009). Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. *J Infect Dis* **199** (4), 532–536. DOI: 10.1086/596511.
- Peleg, A. Y., Miyakis, S., Ward, D. V., Earl, A. M., Rubio, A., Cameron, D. R., Pillai, S., Moellering, R. C. and Eliopoulos, G. M. (2012). Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **7** (1), e28316. DOI: 10.1371/journal.pone.0028316.
- Peng, H., Rao, Y., Yuan, W., Zheng, Y., Shang, W., Hu, Z., Yang, Y., Tan, L., Xiong, K., Li, S., Zhu, J., Hu, X., Hu, Q. and Rao, X. (2018). Reconstruction of the vancomycin-susceptible *Staphylococcus aureus* phenotype from a vancomycin-intermediate *S. aureus* XN108. *Front Microbiol* **9**, 2955. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02955.
- Pereira, P. M., Filipe, S. R., Tomasz, A. and Pinho, M. G. (2007). Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **51** (10), 3627–3633. DOI: 10.1128/AAC.00431-07.
- Pereira, M. P., D'Elia, M. A., Troczynska, J. and Brown, E. D. (2008). Duplication of teichoic acid biosynthetic genes in *Staphylococcus aureus* leads to functionally redundant poly(ribitol phosphate) polymerases. *J Bacteriol* **190** (16), 5642–5649. DOI: 10.1128/JB.00526-08.
- Peschel, A., Ottenwälder, B. and Götz, 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. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08119.x.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G. and Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274** (13), 8405–8410. DOI: 10.1074/jbc.274.13.8405.
- Peschel, A., Vuong, C., Otto, M. and Götz, F. (2000). The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **44** (10), 2845–2847. DOI: 10.1128/aac.44.10.2845-2847.2000.
- Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W. F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K. P. and van Strijp, J. A. (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med* **193** (9), 1067–1076. DOI: 10.1084/jem.193.9.1067.
- Pfultz, R. F. and Wilkinson, B. J. (2004). The escalating challenge of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4** (4), 273–294. DOI: 10.2174/1568005043340470.
- Pieper, R., Gatlin-Bunai, C. L., Mongodin, E. F., Parmar, P. P., Huang, S.-T., Clark, D. J., Fleischmann, R. D., Gill, S. R. and Peterson, S. N. (2006). Comparative proteomic analysis of *Staphylococcus aureus* strains with differences in resistance to the cell wall-targeting antibiotic vancomycin. *Proteomics* **6** (15), 4246–4258. DOI: 10.1002/pmic.200500764.
- Pinho, M. G., Kjos, M. and Veening, J.-W. (2013). How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol* **11** (9), 601–614. DOI: 10.1038/nrmicro3088.
- Pohl, K., Francois, P., Stenz, L., Schlink, F., Geiger, T., Herbert, S., Goerke, C., Schrenzel, J. and Wolz, C. (2009). CodY in *Staphylococcus aureus*: a regulatory link between metabolism and virulence gene expression. *J Bacteriol* **191** (9), 2953–2963. DOI: 10.1128/JB.01492-08.
- Poupel, O., Moyat, M., Groizeleau, J., Antunes, L. C. S., Gribaldo, S., Msadek, T. and Dubrac, S. (2016). Transcriptional analysis and subcellular protein localization reveal specific features of the essential WalkR system in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **11** (3), e0151449. DOI: 10.1371/journal.pone.0151449.
- Poupel, O., Proux, C., Jagla, B., Msadek, T. and Dubrac, S. (2018). SpdC, a novel virulence factor, controls histidine kinase activity in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* **14** (3), e1006917. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006917.
- Price-Whelan, A., Poon, C. K., Benson, M. A., Eidem, T. T., Roux, C. M., Boyd, J. M., Dunman, P. M., Torres, V. J. and Krulwich, T. A. (2013). Transcriptional profiling of *Staphylococcus aureus* during growth in 2 M NaCl leads to clarification of physiological roles for Kdp and Ktr K<sup>+</sup> uptake systems. *mBio* **4** (4). DOI: 10.1128/mBio.00407-13.
- Qamar, A. and Golemi-Kotra, D. (2012). Dual roles of FmtA in *Staphylococcus aureus* cell wall biosynthesis and autolysis. *Antimicrob Agents Chemother* **56** (7), 3797–3805. DOI: 10.1128/AAC.00187-12.
- Radkov, A. D., Hsu, Y.-P., Booher, G. and VanNieuwenhze, M. S. (2018). Imaging bacterial cell wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **87**, 991–1014. DOI: 10.1146/annurev-biochem-062917-012921.
- Rahman, M. M., Hunter, H. N., Prova, S., Verma, V., Qamar, A. and Golemi-Kotra, D. (2016). The *Staphylococcus aureus* methicillin resistance factor FmtA is a d-amino esterase that acts on teichoic acids. *mBio* **7** (1), e02070-15. DOI: 10.1128/mBio.02070-15.

- Rajagopal, M. and Walker, S. (2017). Envelope structures of Gram-positive bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* **404**, 1–44. DOI: 10.1007/82\_2015\_5021.
- Ramadurai, L. and Jayaswal, R. K. (1997). Molecular cloning, sequencing, and expression of *lytM*, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179** (11), 3625–3631.
- Rapun-Araiz, B., Haag, A. F., Solano, C. and Lasa, I. (2020). The impact of two-component sensorial network in staphylococcal speciation. *Curr Opin Microbiol* **55**, 40–47. DOI: 10.1016/j.mib.2020.02.004.
- Raulinaitis, V., Tossavainen, H., Aitio, O., Juuti, J. T., Hiramatsu, K., Kontinen, V. and Permi, P. (2017). Identification and structural characterization of LytU, a unique peptidoglycan endopeptidase from the lysostaphin family. *Sci Rep* **7** (1), 6020. DOI: 10.1038/s41598-017-06135-w.
- Raychaudhuri, D. and Chatterjee, A. N. (1985). Use of resistant mutants to study the interaction of Triton X-100 with *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **164** (3), 1337–1349.
- Reed, P., Veiga, H., Jorge, A. M., Terrak, M. and Pinho, M. G. (2011). Monofunctional transglycosylases are not essential for *Staphylococcus aureus* cell wall synthesis. *J Bacteriol* **193** (10), 2549–2556. DOI: 10.1128/JB.01474-10.
- Reichmann, N. T., Cassona, C. P. and Gründling, A. (2013). Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology (Reading)* **159** (Pt 9), 1868–1877. DOI: 10.1099/mic.0.069898-0.
- Reichmann, N. T., Piçarra Cassona, C., Monteiro, J. M., Bottomley, A. L., Corrigan, R. M., Foster, S. J., Pinho, M. G. and Gründling, A. (2014). Differential localization of LTA synthesis proteins and their interaction with the cell division machinery in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **92** (2), 273–286. DOI: 10.1111/mmi.12551.
- Reichmann, N. T., Tavares, A. C., Saraiva, B. M., Jousselin, A., Reed, P., Pereira, A. R., Monteiro, J. M., Sobral, R. G., VanNieuwenhze, M. S., Fernandes, F. and Pinho, M. G. (2019). SEDS-bPBP pairs direct lateral and septal peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nat Microbiol* **4** (8), 1368–1377. DOI: 10.1038/s41564-019-0437-2.
- Reipert, A., Ehler, 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. DOI: 10.1128/aac.47.2.568-576.2003.
- Renzone, A., Barras, C., François, P., Charbonnier, Y., Huggler, E., Garzoni, C., Kelley, W. L., Majcherczyk, P., Schrenzel, J., Lew, D. P. and Vaudaux, P. (2006). Transcriptomic and functional analysis of an autolysis-deficient, teicoplanin-resistant derivative of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (9), 3048–3061. DOI: 10.1128/AAC.00113-06.
- Renzone, A., Andrey, D. O., Jousselin, A., Barras, C., Monod, A., Vaudaux, P., Lew, D. and Kelley, W. L. (2011). Whole genome sequencing and complete genetic analysis reveals novel pathways to glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **6** (6), e21577. DOI: 10.1371/journal.pone.0021577.
- Rice, K., Peralta, R., Bast, D., Azavedo, J. de and McGavin, M. J. (2001). Description of staphylococcus serine protease (*ssp*) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of *sspA*-encoded serine protease. *Infect Immun* **69** (1), 159–169. DOI: 10.1128/IAI.69.1.159-169.2001.
- Rice, K. C., Firek, B. A., Nelson, J. B., Yang, S.-J., Patton, T. G. and Bayles, K. W. (2003). The *Staphylococcus aureus cidAB* operon: evaluation of its role in regulation of murein hydrolase activity and penicillin tolerance. *J Bacteriol* **185** (8), 2635–2643. DOI: 10.1128/jb.185.8.2635-2643.2003.
- Rismondo, J., Percy, M. G. and Gründling, A. (2018). Discovery of genes required for lipoteichoic acid glycosylation predicts two distinct mechanisms for wall teichoic acid glycosylation. *J Biol Chem* **293** (9), 3293–3306. DOI: 10.1074/jbc.RA117.001614.
- Romaniuk, J. A. H. and Cegelski, L. (2015). Bacterial cell wall composition and the influence of antibiotics by cell-wall and whole-cell NMR. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **370** (1679). DOI: 10.1098/rstb.2015.0024.
- Rong, J. C. and Helmann, J. D. (1994). Genetic and physiological studies of *Bacillus subtilis* sigma A mutants defective in promoter melting. *J Bacteriol* **176** (17), 5218–5224. DOI: 10.1128/jb.176.17.5218-5224.1994.
- Rosenbach, F. J. (1884). Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. J. F. Bergmann Verlag 1<sup>st</sup> Edition, 17 – 25.
- Rosenberg, S. M. (2013). Reverse mutation. In: Maloy, S. and Hughes, K. Brenner's encyclopedia of genetics. Academic Press 2<sup>nd</sup> Edition, 220 – 221. DOI: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01325-5
- 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. DOI: 10.1007/BF02531316.
- Rubinstein, E. and Keynan, Y. (2014). Vancomycin revisited - 60 years later. *Front Public Health* **2**, 217. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00217.
- Rubio, A., Conrad, M., Haselbeck, R. J., G C, K., Brown-Driver, V., Finn, J. and Silverman, J. A. (2011). Regulation of *mprF* by antisense RNA restores daptomycin susceptibility to daptomycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **55** (1), 364–367. DOI: 10.1128/AAC.00429-10.
- Sabat, A. J., Tinelli, M., Grundmann, H., Akkerboom, V., Monaco, M., Del Grosso, M., Errico, G., Pantosti, A. and Friedrich, A. W. (2018). Daptomycin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with novel non-synonymous mutations in the

- mprF* and *vraS* genes: a new insight into daptomycin resistance. *Front Microbiol* **9**, 2705. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02705.
- Sahukhal, G. S., Batte, J. L. and Elasri, M. O. (2015). *msaABC* operon positively regulates biofilm development by repressing proteases and autolysis in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **362** (4). DOI: 10.1093/femsle/fnv006.
- Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Wennersten, C., Venkataraman, L., Novick, R. P. and Gold, H. S. (2002). Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **46** (5), 1492–1502. DOI: 10.1128/aac.46.5.1492-1502.2002.
- Samanta, D. and Elasri, M. O. (2014). The *msaABC* operon regulates resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **58** (11), 6685–6695. DOI: 10.1128/AAC.03280-14.
- Sambrook, J., Fritsch, E. R. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2<sup>nd</sup> Edition, 94 – 99.
- 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. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sass, P. (2005). Klonierung, Expression und Aktivitätsanalyse von Endolysinen aus *Staphylococcus aureus* NCTC8325 mit Untersuchungen zu deren Wirkung auf Staphylokokken-Biofilme. Diplomarbeit. 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. DOI: 10.1128/AEM.01616-06.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. and Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32** (2), 234–258. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.
- Schaaff, F., Reipert, A. and Bierbaum, G. (2002). An elevated mutation frequency favors development of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46** (11), 3540–3548. DOI: 10.1128/aac.46.11.3540-3548.2002.
- Schaefer, K., Owens, T. W., Kahne, D. and Walker, S. (2018). Substrate preferences establish the order of cell wall assembly in *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc* **140** (7), 2442–2445. DOI: 10.1021/jacs.7b13551.
- Schirner, K., Stone, L. K. and Walker, S. (2011). ABC transporters required for export of wall teichoic acids do not discriminate between different main chain polymers. *ACS Chem Biol* **6** (5), 407–412. DOI: 10.1021/cb100390w.
- Schlag, M., Biswas, R., Krismer, B., Kohler, T., Zoll, S., Yu, W., Schwarz, H., Peschel, A. and Götz, F. (2010). Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin Atl. *Mol Microbiol* **75** (4), 864–873. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.07007.x.
- Schleifer, K. H. and Fischer, U. (1982). Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *J J Syst Bacteriol* **32** (2), 153–156. DOI: 10.1099/00207713-32-2-153.
- Schneewind, O. and Missiakas, D. M. (2012). Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367** (1592), 1123–1139. DOI: 10.1098/rstb.2011.0210.
- Schneewind, O. and Missiakas, D. (2014). Lipoteichoic acids, phosphate-containing polymers in the envelope of Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **196** (6), 1133–1142. DOI: 10.1128/JB.01155-13.
- Schneider, T., Senn, M. M., Berger-Bächi, B., Tossi, A., Sahl, H. G. and Wiedemann, I. (2004). In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **53** (2), 675–685. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04149.x.
- Schneider, T. and Sahl, H. G. (2010). An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *Int J Med Microbiol* **300** (2-3), 161–169. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.10.005.
- Schreiber, F. (2015). Die Rolle von Insertionselementen in der Evolution der Antibiotikaresistenz von *Staphylococcus aureus*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Schrötter, A. S. (2018). Untersuchung zur Zellwandstruktur von Vancomycin-intermediär resistenten Staphylokokken unter Benutzung des Autolysins AtlA. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Sewell, E. W. C. and Brown, E. D. (2014). Taking aim at wall teichoic acid synthesis: new biology and new leads for antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)* **67** (1), 43–51. DOI: 10.1038/ja.2013.100.
- Sharif, S., Kim, S. J., Labischinski, H. and Schaefer, J. (2009). Characterization of peptidoglycan in *fem*-deletion mutants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by solid-state NMR. *Biochemistry* **48** (14), 3100–3108. DOI: 10.1021/bi801750u.
- Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J. and Foster, S. J. (2004). The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading)* **150** (Pt 1), 217–228. DOI: 10.1099/mic.0.26634-0.
- Shoji, M., Cui, L., Iizuka, R., Komoto, A., Neoh, H.-m., Watanabe, Y., Hishinuma, T. and Hiramatsu, K. (2011). *walk* and *clpP* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **55** (8), 3870–3881. DOI: 10.1128/AAC.01563-10.

- Sieradzki, K. and Tomasz, A. (1997). Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179** (8), 2557–2566.
- Sieradzki, K. and Tomasz, A. (1999). Gradual alterations in cell wall structure and metabolism in vancomycin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **181** (24), 7566–7570.
- Sieradzki, K. and Tomasz, A. (2003). Alterations of cell wall structure and metabolism accompany reduced susceptibility to vancomycin in an isogenic series of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **185** (24), 7103–7110. DOI: 10.1128/jb.185.24.7103-7110.2003.
- Sieradzki, K. and Tomasz, A. (2006). Inhibition of the autolytic system by vancomycin causes mimicry of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*-type resistance, cell concentration dependence of the MIC, and antibiotic tolerance in vancomycin-susceptible *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (2), 527–533. DOI: 10.1128/AAC.50.2.527-533.2006.
- Simanski, M., Gläser, R., Köten, B., Meyer-Hoffert, U., Wanner, S., Weidenmaier, C., Peschel, A. and Harder, J. (2013). *Staphylococcus aureus* subverts cutaneous defense by D-alanylation of teichoic acids. *Exp Dermatol* **22** (4), 294–296. DOI: 10.1111/exd.12114.
- Singh, S. K., Rozycki, J., Ortega, J., Ishikawa, T., Lo, J., Steven, A. C. and Maurizi, M. R. (2001). Functional domains of the ClpA and ClpX molecular chaperones identified by limited proteolysis and deletion analysis. *J Biol Chem* **276** (31), 29420–29429. DOI: 10.1074/jbc.M103489200.
- Singh, V. K., Carlos, M. R. and Singh, K. (2010). Physiological significance of the peptidoglycan hydrolase, LytM, in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* **311** (2), 167–175. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02087.x.
- Singh, M., Chang, J., Coffman, L. and Kim, S. J. (2017). A hidden mode of action of glycopeptide antibiotics: inhibition of wall teichoic acid biosynthesis. *J Phys Chem B* **121** (16), 3925–3932. DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b00324.
- Sobral, R. and Tomasz, A. (2019). The staphylococcal cell wall. *Microbiol Spectr* **7** (4). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0068-2019.
- Soldo, B., Lazarevic, V., Pooley, H. M. and Karamata, D. (2002). Characterization of a *Bacillus subtilis* thermosensitive teichoic acid-deficient mutant: gene *mnaA* (*yvyH*) encodes the UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase. *J Bacteriol* **184** (15), 4316–4320. DOI: 10.1128/jb.184.15.4316-4320.2002.
- Srisuknimit, V., Qiao, Y., Schaefer, K., Kahne, D. and Walker, S. (2017). Peptidoglycan crosslinking preferences of *Staphylococcus aureus* penicillin-binding proteins have implications for treating MRSA. *J Am Chem Soc* **139** (29), 9791–9794. DOI: 10.1021/jacs.7b04881.
- 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. DOI: 10.1128/JB.00734-07.
- Stranden, A. M., Ehlert, K., Labischinski, H. and Berger-Bächi, B. (1997). Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179** (1), 9–16. DOI: 10.1128/jb.179.1.9-16.1997.
- 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. DOI: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.
- Suntharalingam, P., Senadheera, M. D., Mair, R. W., Lévesque, C. M. and Cvitkovitch, D. G. (2009). The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **191** (9), 2973–2984. DOI: 10.1128/JB.01563-08.
- Suzuki, T., Campbell, J., Kim, Y., Swoboda, J. G., Mylonakis, E., Walker, S. and Gilmore, M. S. (2012). Wall teichoic acid protects *Staphylococcus aureus* from inhibition by Congo red and other dyes. *J Antimicrob Chemother* **67** (9), 2143–2151. DOI: 10.1093/jac/dks184.
- Swoboda, J. G., Campbell, J., Meredith, T. C. and Walker, S. (2010). Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBiochem* **11** (1), 35–45. DOI: 10.1002/cbic.200900557.
- Taglialegna, A., Varela, M. C., Rosato, R. R. and Rosato, A. E. (2019). VraSR and virulence trait modulation during daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *mSphere* **4** (1). DOI: 10.1128/mSphere.00557-18.
- Tajbakhsh, G. and Golemi-Kotra, D. (2019). The dimerization interface in VraR is essential for induction of the cell wall stress response in *Staphylococcus aureus*: a potential druggable target. *BMC Microbiol* **19** (1), 153. DOI: 10.1186/s12866-019-1529-0.
- Takada, H. and Yoshikawa, H. (2018). Essentiality and function of WalK/WalR two-component system: the past, present, and future of research. *Biosci Biotechnol Biochem* **82** (5), 741–751. DOI: 10.1080/09168451.2018.1444466.
- Tam, K. and Torres, V. J. (2019). *Staphylococcus aureus* secreted toxins and extracellular enzymes. *Microbiol Spectr* **7** (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.
- Tan, X.-E., Neoh, H.-m., Looi, M.-L., Chin, S. F., Cui, L., Hiramatsu, K., Hussin, S. and Jamal, R. (2017). Activated ADI pathway: the initiator of intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol* **63** (3), 260–264. DOI: 10.1139/cjm-2016-0439.

- Tan, X.-E., Neoh, H.-m., Cui, L., Hiramatsu, K. and Jamal, R. (2019). Oxidative stress resistance and fitness-compensatory response in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA). *Can J Microbiol* **65** (8), 623–628. DOI: 10.1139/cjm-2019-0048.
- Thoendel, M., Kavanaugh, J. S., Flack, C. E. and Horswill, A. R. (2011). Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev* **111** (1), 117–151. DOI: 10.1021/cr100370n.
- Tiwari, K. B., Gatto, C., Walker, S. and Wilkinson, B. J. (2018). Exposure of *Staphylococcus aureus* to targocil blocks translocation of the major autolysin Atl across the membrane, resulting in a significant decrease in autolysis. *Antimicrob Agents Chemother* **62** (7). DOI: 10.1128/AAC.00323-18.
- Trotonda, M. P., Xiong, Y. Q., Memmi, G., Bayer, A. S. and Cheung, A. L. (2009). Role of *mgrA* and *sarA* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* autolysis and resistance to cell wall-active antibiotics. *J Infect Dis* **199** (2), 209–218. DOI: 10.1086/595740.
- Türck, M. (2009). Das essentielle YycFGHI-Regulationssystem von *Staphylococcus aureus*: Charakterisierung von Überexpressions-Mutanten und die Etablierung zweier in vitro-Modellsysteme. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Türck, M. and Bierbaum, G. (2012). Purification and activity testing of the full-length YycFGHI proteins of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **7** (1), e30403. DOI: 10.1371/journal.pone.0030403.
- Utaiida, S., Dunman, P. M., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., Singh, V. K., Jayaswal, R. K. and Wilkinson, B. J. (2003). Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology (Reading)* **149** (Pt 10), 2719–2732. DOI: 10.1099/mic.0.26426-0.
- Utaiida, S., Pfeltz, R. F., Jayaswal, R. K. and Wilkinson, B. J. (2006). Autolytic properties of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (4), 1541–1545. DOI: 10.1128/AAC.50.4.1541-1545.2006.
- van Belkum, A., Melles, D. C., Nouwen, J., van Leeuwen, W. B., van Wamel, W., Vos, M. C., Wertheim, H. F. L. and Verbrugh, H. A. (2009). Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* **9** (1), 32–47. DOI: 10.1016/j.meegid.2008.09.012.
- van Dalen, R., Peschel, A. and van Sorge, N. M. (2020). Wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* host interaction. *Trends Microbiol* **28** (12), 985–998. DOI: 10.1016/j.tim.2020.05.017.
- van Hal, S. J. and Paterson, D. L. (2011). Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **55** (1), 405–410. DOI: 10.1128/AAC.01133-10.
- Vergara-Irigaray, M., Maira-Litrán, T., Merino, N., Pier, G. B., Penadés, J. R. and Lasa, I. (2008). Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Microbiology (Reading)* **154** (Pt 3), 865–877. DOI: 10.1099/mic.0.2007/013292-0.
- Vermassen, A., Leroy, S., Talon, R., Provot, C., Popowska, M. and Desvaux, M. (2019). Cell wall hydrolases in bacteria: insight on the diversity of cell wall amidases, glycosidases and peptidases toward peptidoglycan. *Front Microbiol* **10**, 331. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00331.
- Vickery, C. R., Wood, B. M., Morris, H. G., Losick, R. and Walker, S. (2018). Reconstitution of *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid synthase activity identifies Congo red as a selective inhibitor. *J Am Chem Soc* **140** (3), 876–879. DOI: 10.1021/jacs.7b11704.
- Vidaillac, C., Gardete, S., Tewhey, R., Sakoulas, G., Kaatz, G. W., Rose, W. E., Tomasz, A. and Rybak, M. J. (2013). Alternative mutational pathways to intermediate resistance to vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **208** (1), 67–74. DOI: 10.1093/infdis/jit127.
- Villarejo, M. R. and Zabin, I. (1974).  $\beta$ -galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* **120** (1), 466–474.
- Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Li, J. and Jabbouri, S. (2006). Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus aureus* MN8m, a biofilm forming strain. *Carbohydr Res* **341** (6), 738–743. DOI: 10.1016/j.carres.2006.01.012
- Vollmer, W., Blanot, D. and Pedro, M. A. de (2008a). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* **32** (2), 149–167. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. and Foster, S. (2008b). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* **32** (2), 259–286. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x.
- Walsh, C. T. (1989). Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *Journal of Biological Chemistry* **264** (5), 2393–2396. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)81624-1.
- 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. DOI: 10.1093/nar/gkh694.
- Wang, Y., Li, X., Jiang, L., Han, W., Xie, X., Jin, Y., He, X. and Wu, R. (2017). Novel mutation sites in the development of vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* **7**. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02163.

- Wanner, S., Schade, J., Keinhörster, D., Weller, N., George, S. E., Kull, L., Bauer, J., Grau, T., Winstel, V., Stoy, H., Kretschmer, D., Kolata, J., Wolz, C., Bröker, B. M. and Weidenmaier, C. (2017). Wall teichoic acids mediate increased virulence in *Staphylococcus aureus*. *Nat Microbiol* **2**, 16257. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.257.
- Wecke, J., Lahav, M., Ginsburg, I. and Giesbrecht, P. (1982). Cell wall degradation of *Staphylococcus aureus* by lysozyme. *Arch Microbiol* **131** (2), 116–123. DOI: 10.1007/BF01053992.
- Wecke, J., Madela, K. and Fischer, W. (1997). The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading)* **143** (9), 2953–2960. DOI: 10.1099/00221287-143-9-2953.
- Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J. F., Kristian, S. A., Chanturiya, T., Kalbacher, H., Gross, M., Nicholson, G., Neumeister, B., Mond, J. J. and Peschel, A. (2004). Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med* **10** (3), 243–245. DOI: 10.1038/nm991.
- Weidenmaier, C., Peschel, A., Kempf, V. A. J., Lucindo, N., Yeaman, M. R. and Bayer, A. S. (2005a). DltABCD- and MprF-mediated cell envelope modifications of *Staphylococcus aureus* confer resistance to platelet microbicidal proteins and contribute to virulence in a rabbit endocarditis model. *Infect Immun* **73** (12), 8033–8038. DOI: 10.1128/IAI.73.12.8033-8038.2005.
- Weidenmaier, C., Peschel, A., Xiong, Y.-Q., Kristian, S. A., Dietz, K., Yeaman, M. R. and Bayer, A. S. (2005b). Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis* **191** (10), 1771–1777. DOI: 10.1086/429692.
- Weidenmaier, C. and Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat Rev Microbiol* **6** (4), 276–287. DOI: 10.1038/nrmicro1861.
- Wenzel, M., Vischer, N., Strahl, H. and Hamoen, L. (2018). Assessing membrane fluidity and visualizing fluid membrane domains in bacteria using fluorescent membrane dyes. *Bio-protocol* **8** (20). DOI: 10.21769/BioProtoc.3063.
- Werner, G., Strommenger, B. and Witte, W. (2008). Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiol* **3** (5), 547–562. DOI: 10.2217/17460913.3.5.547.
- Wheeler, R., Turner, R. D., Bailey, R. G., Salamaga, B., Mesnage, S., Mohamad, S. A. S., Hayhurst, E. J., Horsburgh, M., Hobbs, J. K. and Foster, S. J. (2015). Bacterial cell enlargement requires control of cell wall stiffness mediated by peptidoglycan hydrolases. *mBio* **6** (4), e00660. DOI: 10.1128/mBio.00660-15.
- Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* **3** (2), 163–175. DOI: 10.1038/nprot.2007.521.
- Wieland, K. P., Wieland, B. and Götz, F. (1995). A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*. *Gene* **158** (1), 91–96. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00137-u.
- Winstel, V., Liang, C., Sanchez-Carballo, P., Steglich, M., Munar, M., Bröker, B. M., Penadés, J. R., Nübel, U., Holst, O., Dandekar, T., Peschel, A. and Xia, G. (2013). Wall teichoic acid structure governs horizontal gene transfer between major bacterial pathogens. *Nat Commun* **4**, 2345. DOI: 10.1038/ncomms3345.
- Winstel, V., Xia, G. and Peschel, A. (2014). Pathways and roles of wall teichoic acid glycosylation in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **304** (3–4), 215–221. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.10.009.
- Winstel, V., Kühner, P., Salomon, F., Larsen, J., Skov, R., Hoffmann, W., Peschel, A. and Weidenmaier, C. (2015). Wall teichoic acid glycosylation governs *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *mBio* **6** (4), e00632. DOI: 10.1128/mBio.00632-15.
- Wootton, M., Bennett, P. M., MacGowan, A. P. and Walsh, T. R. (2005). Reduced expression of the *atl* autolysin gene and susceptibility to autolysis in clinical heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* (hGISA) and GISA strains. *J Antimicrob Chemother* **56** (5), 944–947. DOI: 10.1093/jac/dki289.
- Wu, X., Zha, J., Koffas, M. A. G. and Dordick, J. S. (2019). Reducing *Staphylococcus aureus* resistance to lysostaphin using CRISPR-dCas9. *Biotechnol Bioeng* **116** (12), 3149–3159. DOI: 10.1002/bit.27143.
- Xia, G., Kohler, T. and Peschel, A. (2010a). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **300** (2–3), 148–154. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.10.001.
- Xia, G., Maier, L., Sanchez-Carballo, P., Li, M., Otto, M., Holst, O. and Peschel, A. (2010b). Glycosylation of wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* by TarM. *J Biol Chem* **285** (18), 13405–13415. DOI: 10.1074/jbc.M109.096172.
- Xia, G., Corrigan, R. M., Winstel, V., Goerke, C., Gründling, A. and Peschel, A. (2011). Wall teichoic acid-dependent adsorption of staphylococcal siphovirus and myovirus. *J Bacteriol* **193** (15), 4006–4009. DOI: 10.1128/JB.01412-10.
- Xia, G. and Wolz, C. (2014). Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infect Genet Evol* **21**, 593–601. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.04.022.
- Xiong, M., Zhao, J., Huang, T., Wang, W., Wang, L., Zhao, Z., Li, X., Zhou, J., Xiao, X., Pan, Y., Lin, J. and Li, Y. (2020). Molecular characteristics, virulence gene and wall teichoic acid glycosyltransferase profiles of *Staphylococcus aureus*: a multicenter study in China. *Front Microbiol* **11**, 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2020.02013.
- Xu, J., Pang, L., Ma, X. X., Hu, J., Tian, Y., Yang, Y. L. and Sun, D. D. (2018). Phenotypic and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility derived in vitro. *Open Med (Wars)* **13**, 475–486. DOI: 10.1515/med-2018-0071.

- Yamada, S., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Nakashima, S., Oshida, T., Matsumoto, A. and Suginaka, H. (1996). An autolysin ring associated with cell separation of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **178** (6), 1565–1571. DOI: 10.1128/jb.178.6.1565-1571.1996.
- Yan, J., Han, D., Liu, C., Gao, Y., Di Li, Liu, Y. and Yang, G. (2017). *Staphylococcus aureus* VraX specifically inhibits the classical pathway of complement by binding to C1q. *Mol Immunol* **88**, 38–44. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.05.018.
- Yang, S.-J., Xiong, Y. Q., Dunman, P. M., Schrenzel, J., François, P., Peschel, A. and Bayer, A. S. (2009). Regulation of *mprF* in daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **53** (6), 2636–2637. DOI: 10.1128/AAC.01415-08.
- 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. DOI: 10.1016/0378-1119(85)90120-9.
- Young, M., Artsatbanov, V., Beller, H. R., Chandra, G., Chater, K. F., Dover, L. G., Goh, E.-B., Kahan, T., Kaprelyants, A. S., Kyrpides, N., Lapidus, A., Lowry, S. R., Lykidis, A., Mahillon, J., Markowitz, V., Mavromatis, K., Mukamolova, G. V., Oren, A., Rokem, J. S., Smith, M. C. M., Young, D. I. and Greenblatt, C. L. (2010). Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living actinobacterium. *J Bacteriol* **192** (3), 841–860. DOI: 10.1128/JB.01254-09.
- Zhao, G., Meier, T. I., Kahl, S. D., Gee, K. R. and Blaszczyk, L. C. (1999). Bocillin FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **43** (5), 1124–1128.
- Zhu, J., Liu, B., Shu, X. and Sun, B. (2021). A novel mutation of *walk* confers vancomycin-intermediate resistance in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **311** (2), 151473. DOI: 10.1016/j.ijmm.2021.151473.
- Ziebuhr, W., Heilmann, C., Götz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E. and Hacker, J. (1997). Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* **65** (3), 890–896.
- Zoll, S., Schlag, M., Shkumatov, A. V., Rautenberg, M., Svergun, D. I., Götz, F. and Stehle, T. (2012). Ligand-binding properties and conformational dynamics of autolysin repeat domains in staphylococcal cell wall recognition. *J Bacteriol* **194** (15), 3789–3802. DOI: 10.1128/JB.00331-12.

# Anhang

## Bakterienstämme

Tabelle 42 Alle in dieser Arbeit hergestellte Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Beschreibung
<i>Staphylococcus aureus</i>	
RN4220 pTvraSR	Induzierbare Expression des VraSR-TCS ohne VraT
RN4220 pTvraTSR	Induzierbare Expression des VraTSR-TCS
RN4220 pTtarM	Induzierbare Expression der WTA-Glycosyltransferase TarM
RN4220 pTtarS	Induzierbare Expression der WTA-Glycosyltransferase TarS
RN4220 pMAD_araC(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>araC</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_dnaK(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>dnaK</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_glmM(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>glmM</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_lacE(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>lacE</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_lexA(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>lexA</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_lysP(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>lysP</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_modA(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>modA</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_mraZ(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>mraZ</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_nsaR(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>nsaR</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_opp1D(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>opp1D</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_recD(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>recD</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_reIP(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>reIP</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_rpoD(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>rpoD</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_ssaA(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>ssaA</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 pMAD_vraG(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>vraG</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
RN4220 $\Delta tarM\Delta tarS$ pTX15	Leervektor pTX15
RN4220 $\Delta tarM\Delta tarS$ pTtarM	Induzierbare Expression der WTA-Glycosyltransferase TarM
RN4220 $\Delta tarM\Delta tarS$ pTtarS	Induzierbare Expression der WTA-Glycosyltransferase TarS
NCTC8325 pTX15	Leervektor pTX15
NCTC8325 pTvicA	Induzierbare Expression des WalRK-TCS
NCTC8325 pTvraSR	Induzierbare Expression des VraSR-TCS ohne VraT
NCTC8325 pTvraTSR	Induzierbare Expression des VraTSR-TCS
NCTC8325 pTtarM	Induzierbare Expression der WTA-Glycosyltransferase TarM
NCTC8325 pTtarS	Induzierbare Expression der WTA-Glycosyltransferase TarS
NCTC8325 pMAD_araC(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>araC</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_dnaK(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>dnaK</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_glmM(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>glmM</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_lacE(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>lacE</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_lexA(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>lexA</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_lysP(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>lysP</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_modA(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>modA</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_mraZ(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>mraZ</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40



Bakterienstamm	Beschreibung
NCTC8325 pMAD_nsaR(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>nsaR</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_opp1D(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>opp1D</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_recD(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>recD</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_relP(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>relP</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_rpoD(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>rpoD</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_ssaA(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>ssaA</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 pMAD_vraG(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>vraG</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
NCTC8325 AraC(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>araC</i> -Gen aus SA VC40
NCTC8325 LacE(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>lacE</i> -Gen aus SA VC40
NCTC8325 LexA(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>lexA</i> -Gen aus SA VC40
NCTC8325 ModA(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>modA</i> -Gen aus SA VC40
NCTC8325 MprF(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>mprF</i> -Gen aus SA VC40
NCTC8325 MraZ(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>mraZ</i> -Gen aus SA VC40
NCTC8325 NsaR(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>nsaR</i> -Gen aus SA VC40
NCTC8325 RecD(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>recD</i> -Gen aus SA VC40
NCTC8325 RelP(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>relP</i> -Gen aus SA VC40
NCTC8325 VraG(VC40)	SA NCTC8325 Stamm mit dem <i>vraG</i> -Gen aus SA VC40
<i>Escherichia coli</i>	
DC10B pMAD_araC(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>araC</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_dnaK(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>dnaK</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_glmM(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>glmM</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_lacE(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>lacE</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_lexA(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>lexA</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_lysP(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>lysP</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_modA(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>modA</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_mraZ(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>mraZ</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_nsaR(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>nsaR</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_opp1D(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>opp1D</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_recD(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>recD</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_relP(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>relP</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_rpoD(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>rpoD</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_ssaA(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>ssaA</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
DC10B pMAD_vraG(VC40)	Allelic Exchange mit dem <i>vraG</i> -Gen aus <i>S. aureus</i> VC40
JM109 pET22bΔpelB_vraR(M54T)	Überexpression von VraR(M54T) zur Proteinaufreinigung
BL21(DE3) pET22bΔpelB_vraR(M54T)	Überexpression von VraR(M54T) zur Proteinaufreinigung

## Oligonukleotide

Tabelle 43 Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer, mit Funktion und markierten Restriktionsenzymen (*NarI* (GGCGCC), *BamHI* (GGATCC), *EcoRI* (GAATTC), *NcoI* (CCATGG)).

Name	Sequenz	Annealing Tm (°C)	Funktion
araC_for	ATTTGGATCCCTATCATCAAACCTGACACTC	53	Allelic Exchange
araC_rev	ATTTGAATTCAAGTTGATCGCTTATTGGAA	55	Allelic Exchange
dnak_for	ATTTGGATCCGTTGCTGTTGAGCCGCTTG	62	Allelic Exchange
dnak_rev	ATTTGAATTCAAGGTGAACGTCCAATGGC	60	Allelic Exchange
glmM_for	ATTTGGATCCCTAGTGATGATGTTGAACCA	54	Allelic Exchange
glmM_rev	ATTTGAATTCTGGTACAGACGGAGTAAGA	56	Allelic Exchange
lacE_for	ATTTGGATCCTCTGTAAAGATTCGCTGT	55	Allelic Exchange

Name	Sequenz	Annealing Tm (°C)	Funktion
lacE_rev	ATTTGAATTCGAGAAGAAGTCCAATTATTAGG	53	Allelic Exchange
lexA_for	ATTTGGATCCGCTCGCTCCTGTAAATTATT	55	Allelic Exchange
lexA_rev	ATTTGAATTCATTCATGTGCCAGTTATTGG	56	Allelic Exchange
lysP_for	ATTTGGATCCAGGAATTAACATACCGATAAC	52	Allelic Exchange
lysP_rev	ATTTCCATGGTATTTGCCAGTATCAGGTT	53	Allelic Exchange
modA_for	ATTTGGATCCACGACGATACAACCATTTA	53	Allelic Exchange
modA_rev	ATTTCCATGGTGTGACGTATTTATGTCTG	52	Allelic Exchange
mraZ_for	ATTTGGATCCCCTTAATATAACCAAGGGTTTAGC	54	Allelic Exchange
mraZ_rev	ATTTGAATTCATGATATGATGAAACACTTCAA	52	Allelic Exchange
nsaR_for	ATTTGGATCCAGAGAGTTTAGCATCTGAAC	54	Allelic Exchange
nsaR_rev	ATTTGAATTCCAATTAAGCAGTTCTACTT	51	Allelic Exchange
opp1D_for	ATTTGGATCCCTCATCGCACAGTCAAAGTGT	60	Allelic Exchange
opp1D_rev	ATTTGAATTCACCTGGACAGATCAACCACT	61	Allelic Exchange
recD_for	ATTTGGATCCCAGATTCCTTGATTTGCTGAA	53	Allelic Exchange
recD_rev	ATTTGAATTCAGATACAATTTGGGCTTAG	53	Allelic Exchange
relP_for	ATTTGGATCCCTCACTCAAACCTAAGTAACAC	53	Allelic Exchange
relP_rev	ATTTCCATGGACACAATCCTATAACATCATAT	51	Allelic Exchange
rpoD_for	ATTTGGATCCGCAGCATGATCTGAAGGACT	60	Allelic Exchange
rpoD_rev	ATTTGAATTCGACCCAGTTTCGTATGTACCT	58	Allelic Exchange
ssaA_for	ATTTGGATCCCTCAAACGACCCAACATCAT	59	Allelic Exchange
ssaA_rev	ATTTGAATTCACGTGAAGTTACAACACCTG	58	Allelic Exchange
vraG_for	ATTTGGATCCAGGCAAAGCATATCGTCTCT	59	Allelic Exchange
vraG_rev	ATTTGAATTCCTCAGTATAGTTTCGTGAATCC	56	Allelic Exchange
t161c_for	CATGAGTTGAAGCCAGATTTAATTTTAACGGATTT ACTTATGGATGACA	64	Mutagenese
t161c_rev	TGTCATCCATAAGTAAATCCGTTAAAATTAATCT GGCTTCAACTCATG	64	Mutagenese
gyrB_for	TTAGTGTGGGAAATTGTCGATAAT	58	qRT-PCR
gyrB_rev	AGTCTTGTGACAATGCGTTTACA	61	qRT-PCR
gyrB_ST_for	AACACGGATAATTATGGTGCTGGGCAAATACA	64	qRT-PCR
gyrB_ST_rev	CTGTAATGTTTCATAGTTGTATACAGTTGTCTC	59	qRT-PCR
sgtB_for	CGCCCTCAAGCGTATATTGA	60	qRT-PCR
sgtB_rev	CGACAGAGATGTGCAAGGTG	61	qRT-PCR
sgtB_ST_for	ATTGTGACATAGCCTGTTGATATTG	55	qRT-PCR
sgtB_ST_rev	ATGAAACACGAACCTCACTATAATACG	57	qRT-PCR
vraS_for	CTCGTGCTAGTCTTTGACGTTT	61	qRT-PCR
vraS_rev	GTTGGTTCGGTACTCGCTTA	59	qRT-PCR
vraS_ST_for	TCTGGCAATGATACAATATGGAAC	55	qRT-PCR
vraS_ST_rev	CAATTGGTTCAATGCTCATCTTAGTA	55	qRT-PCR
dnaKseq_for	ATTCAGCATCTTCTACAGTAC	54	Sequenzierung
dnaKseq_rev	TTGGTATAGACTTAGGTACAACA	56	Sequenzierung
glmMseq_for	ATACGCATCGGCTCATTTG	58	Sequenzierung
glmMseq_rev	TGGTACAGACGGAGTAAG	55	Sequenzierung
lacEseq_for	CCATCTCGTGTCAATTTGAT	55	Sequenzierung
lacEseq_rev	AGCACAAACAAGCCTGTT	57	Sequenzierung
lysPseq_for	GTGCTTCTACTTGGTTTCG	55	Sequenzierung
lysPseq_rev	TGGAAAGGGAGCTTATATGT	56	Sequenzierung
modAseq_for	GTGTTAAGTCAGGCATGGA	57	Sequenzierung
modAseq_rev	ATATAAACAGGCAACGGTTC	55	Sequenzierung
mprFseq_for	TCAAAGGTTAAATGATATGC	50	Sequenzierung
mprFseq_int1	TGGTACATCAGCTAAGAAG	53	Sequenzierung
mprFseq_rev	ATCAGGCATAACTGTATAC	51	Sequenzierung
mraZseq_for	CAAGAAACACTCCATCCAATG	57	Sequenzierung
mraZseq_rev	AGTTGTGGGCTTGAACAC	58	Sequenzierung
opp1Dseq_for	CCATCACATTGACACATCAC	56	Sequenzierung
opp1Dseq_rev	GGAGTGGTGAATCATG	55	Sequenzierung

Name	Sequenz	Annealing Tm (°C)	Funktion
pMAD_mcs1	CTAGCTAATGTTACGTTACAC	53	Sequenzierung
pMAD_mcs2	GAAGCGAGAAGAATCATAATG	54	Sequenzierung
pTX15seq_for	GTCACTATGATCCCAACCTTTCATG	61	Sequenzierung
pTX15seq_rev	CCGTCTATTCTTCCTTATTTGAGTG	59	Sequenzierung
relPseq_for	CGAGCAAGTACAATTTCCAC	56	Sequenzierung
relPseq_rev	AGCCCAAAGTTCGATAGTG	57	Sequenzierung
rpoDseq_for	TGTACCAACCTCACTCAAG	56	Sequenzierung
rpoDseq_rev	GTTTCATGTCTGATAACACAG	54	Sequenzierung
ssaAseq_for	AACTTGATCGTTCGTGTCGA	59	Sequenzierung
ssaAseq_rev	GAAACCTTGTTGGCGTAAAC	57	Sequenzierung
T7_for	TAATACGACTCACTATAGG	49	Sequenzierung
T7_rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	58	Sequenzierung
tarSseq_int1	TAATGTCCCTTCGCCAATCA	56	Sequenzierung
vicAseq_int1	ACAACATGAGTAGAGGTCG	56	Sequenzierung
vicAseq_int2	GTGAGAAACGTAGACTGGAC	57	Sequenzierung
vraTSRseq_int1	CGTTTATCGGAGACGTAGAG	57	Sequenzierung
vraTSRseq_int2	CAATCATCATCTTGTTCGTC	54	Sequenzierung
vraTSRseq_int3	TCAGAATTACACAGGAAGC	54	Sequenzierung
tarM_for	TAAAATGTAGGATCCACTGAGGTAAAGGAATAA	49	Überexpression
tarM_rev	CATCATTCGGGCGCCCTAGGTACTCATGAAT	44	Überexpression
tarS_for	ATTAGGATCCGTGGGAGAGGTATAATGATG	54	Überexpression
tarS_rev	AGACGTGGCGCCCTCAAATCATGTTGGCTCA	58	Überexpression
vraSR_for	TAAAATGTAGGATCCACGTAGAGGTGATTTATCGA	55	Überexpression
vraSR_rev	CATCATTCGGGCGCCCTGATTGGCGTAAGTAACT	53	Überexpression
vraTSR_for	ATAGGATCCATAGAAAGGCGGCGAAACATGA	62	Überexpression
vraTSR_rev	AAACATGGCGCCGGCGTAAGTAACTTTTCTTAATT CGATATGA	62	Überexpression

# Vektor-Karten

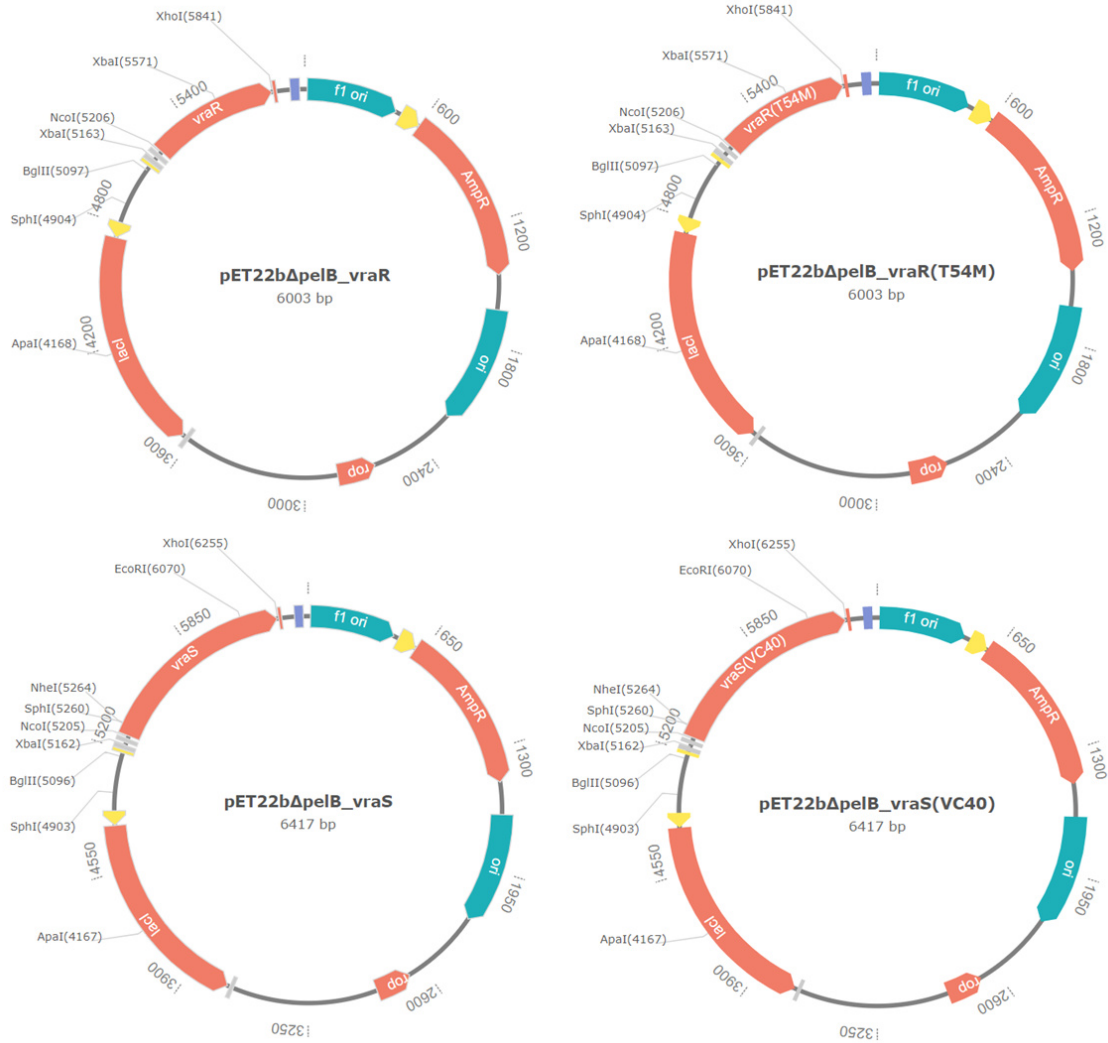


Abbildung 62 Vektor-Karten basierend auf pET22bΔpelB zur Aufreinigung von Proteinen in *E. coli* BL21(DE3).



Abbildung 63 Vektor-Karten basierend auf pTX15 zur induzierbaren Expression von Proteinen in *S. aureus*.

## Ergebnisse

Tabelle 44 RNA-seq Expressionsraten für Gene mit Mutationen in *S. aureus* VC40 für die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40). Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220Δ*mutS* bzw. *S. aureus* NCTC8325 und ist nach gene locus tag geordnet (#NV = nicht vorhanden; schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).

Gen	Aminosäureaustausch in VC40	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>walk</i>	I544M	SAOUHSC_00021	0,70	0,32	1,25
<i>drm</i>	A237V	SAOUHSC_00101	0,34	0,19	1,48
Hypo. Protein	P266L	SAOUHSC_00106	0,64	0,36	1,48
Hypo. Protein	-	SAOUHSC_00262	0,05	0,03	0,47
<i>geh</i>	-	SAOUHSC_00300	0,33	0,12	1,20
<i>hprT</i>	S75L	SAOUHSC_00485	1,69	2,70	0,82
<i>sdrC</i>	-	SAOUHSC_00544	0,10	0,23	0,10
Hypo. Protein	G118E	SAOUHSC_00582	0,73	0,82	0,90
Hypo. Protein	P41L	SAOUHSC_00592	0,38	0,50	0,74
Hypo. Protein	Insertion	SAOUHSC_00599	0,55	0,73	0,72
<i>vraG</i>	G570R	SAOUHSC_00668	3,67	1,19	0,95
Hypo. Protein	Deletion	SAOUHSC_00683	1,94	3,11	0,69
Hypo. Protein	Insertion	SAOUHSC_00690	1,86	2,58	0,72
Hypo. Protein	W253R	SAOUHSC_00696	2,40	4,49	0,81
Hypo. Protein	Y216C	SAOUHSC_00706	0,26	0,24	7,90
Hypo. Protein	-	SAOUHSC_00713	1,04	1,48	0,98
Hypo. Protein	Insertion	SAOUHSC_00784	0,83	0,68	1,81
<i>pgm</i>	-	SAOUHSC_00798	0,13	0,06	3,04
Hypo. Protein	M1V	SAOUHSC_00846	1,23	0,42	0,90
<i>pepF</i>	-	SAOUHSC_00937	1,37	1,44	0,73
<i>pdhD</i>	A208T	SAOUHSC_01043	0,56	0,47	1,96
<i>potD</i>	-	SAOUHSC_01049	1,42	1,54	0,63
<i>pycA</i>	D642N	SAOUHSC_01064	0,47	0,27	1,30
<i>mraZ</i>	2x Insertion	SAOUHSC_01142	1,27	1,33	0,79
<i>rsgA</i>	Deletion	SAOUHSC_01188	1,20	1,48	0,81
<i>smc</i>	-	SAOUHSC_01204	0,62	0,39	1,37
Hypo. Protein	2x Insertion	SAOUHSC_01298	1,71	268,96	#NV
<i>lexA</i>	E173K	SAOUHSC_01333	1,74	0,97	0,73
<i>sbcD</i>	I67T	SAOUHSC_01341	1,68	1,52	0,67
<i>mprF</i>	H224Y	SAOUHSC_01359	3,10	0,49	1,40
Hypo. Protein	Q38stop	SAOUHSC_01404	#NV	#NV	#NV
<i>gcvPA</i>	R316C	SAOUHSC_01633	0,35	0,17	2,21
Hypo. Protein	W424stop	SAOUHSC_01648	#NV	#NV	#NV
<i>rpoD</i>	D201N	SAOUHSC_01662	1,81	2,41	0,88
<i>dnaK</i>	Insertion	SAOUHSC_01683	1,22	1,50	0,80
Hypo. Protein	-	SAOUHSC_01706	2,21	3,38	0,50
<i>recD</i>	V60A	SAOUHSC_01723	2,71	2,58	0,73
<i>clpX</i>	S30R	SAOUHSC_01778	3,12	5,30	0,77
<i>lysP</i>	I172V	SAOUHSC_01787	0,39	0,28	0,68
<i>phoR</i>	-	SAOUHSC_01799	1,26	1,71	0,95
Hypo. Protein	E105G	SAOUHSC_01866	0,72	0,64	0,80
<i>lytD</i>	Insertion	SAOUHSC_01895	6,38	5,12	0,69
<i>prsA</i>	Insertion/Deletion	SAOUHSC_01972	1,26	1,37	3,80
<i>rluA</i>	Insertion	SAOUHSC_01982	1,49	2,59	0,66

Gen	Aminosäureaustausch in VC40	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
Hypo. Protein	Y127H	SAOUHSC_02004	5,32	9,63	0,92
<i>vraS</i>	D242G/L114S	SAOUHSC_02099	1,25	1,07	2,60
<i>agrA</i>	Deletion	SAOUHSC_02265	1,14	0,94	0,27
<i>glmM</i>	A93V	SAOUHSC_02405	1,48	1,95	0,78
Hypo. Protein	Deletion	SAOUHSC_02440	#NV	#NV	#NV
<i>lacE</i>	M2T	SAOUHSC_02450	3,78	2,44	1,24
<i>topB</i>	-	SAOUHSC_02517	1,03	0,71	1,00
<i>modA</i>	Deletion	SAOUHSC_02549	1,09	1,39	0,60
<i>ureF</i>	-	SAOUHSC_02563	1,37	0,63	1,64
<i>ssaA</i>	G128S	SAOUHSC_02571	42,84	13,20	1,14
Hypo. Protein	Y362F	SAOUHSC_02605	0,74	0,44	1,28
<i>tcaR</i>	-	SAOUHSC_02637	#NV	#NV	#NV
<i>araC</i>	Deletion	SAOUHSC_02664	0,52	0,72	1,02
Hypo. Protein	Deletion	SAOUHSC_02733	0,39	0,29	0,78
<i>opp-1D</i>	V115A	SAOUHSC_02764	1,04	1,01	0,65
Hypo. Protein	N42S	SAOUHSC_02797	0,49	0,53	1,05
<i>relP</i>	H155R	SAOUHSC_02811	3,39	3,87	1,34
<i>nsaR</i>	Insertion	SAOUHSC_02956	1,09	1,72	1,51

Tabelle 45 RNA-seq Expressionsraten für alle potentiellen Gene unter der Kontrolle von VraSR (Kuroda et al., 2003) der Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40). Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS bzw. *S. aureus* NCTC8325. Die Tabelle ist absteigend geordnet nach der Expression in *S. aureus* VC40 und unterteilt in nicht hypothetische und hypothetische Gene (#NV = nicht vorhanden; schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>cwrA</i>	SAOUHSC_02872	13,79	7,52	18,88
<i>sgtB</i>	SAOUHSC_02012	6,05	5,69	2,57
<i>lytU</i>	SAOUHSC_00174	4,72	2,83	2,00
<i>recU</i>	SAOUHSC_01466	3,89	1,15	2,66
<i>opuD1</i>	SAOUHSC_01346	3,80	1,68	0,89
<i>fmtA</i>	SAOUHSC_00998	3,79	5,85	1,85
<i>relP</i>	SAOUHSC_02811	3,39	3,87	1,34
<i>ctpA</i>	SAOUHSC_01427	3,17	4,00	1,03
<i>tcaA</i>	SAOUHSC_02635	2,92	2,17	2,79
<i>pbp2</i>	SAOUHSC_01467	2,75	0,70	3,12
<i>spsA</i>	SAOUHSC_00902	2,50	3,80	2,11
<i>ltaS</i>	SAOUHSC_00728	2,23	2,37	1,02
<i>tagA</i>	SAOUHSC_00640	1,83	2,53	0,48
<i>vraR</i>	SAOUHSC_02098	1,63	1,53	2,30
<i>vraU</i>	SAOUHSC_02101	1,43	1,12	3,09
<i>murZ</i>	SAOUHSC_02365	1,43	1,31	1,34
<i>proP</i>	SAOUHSC_00556	1,27	1,76	0,60
<i>prsA</i>	SAOUHSC_01972	1,26	1,37	3,80
<i>vraS</i>	SAOUHSC_02099	1,25	1,07	2,60
<i>vraT</i>	SAOUHSC_02100	1,12	0,91	2,80
<i>htrA1</i>	SAOUHSC_01838	0,91	0,73	2,21
<i>crr</i>	SAOUHSC_01430	0,85	0,89	2,98
<i>rumA</i>	SAOUHSC_02113	0,78	0,53	5,13
<i>drp35</i>	SAOUHSC_03023	0,71	1,07	1,46
<i>cysJ</i>	SAOUHSC_02947	0,64	0,68	0,89

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>dinP</i>	SAOUHSC_02111	0,50	0,42	0,88
<i>lcpC</i>	SAOUHSC_02583	0,40	0,26	3,75
<i>copA</i>	SAOUHSC_02873	0,34	0,29	1,55
<i>tcaB</i>	SAOUHSC_02632	#NV	#NV	#NV
Hypo. Protein	SAOUHSC_01761	7,49	5,69	8,93
Hypo. Protein	SAOUHSC_01005	4,89	4,99	2,47
Hypo. Protein	SAOUHSC_02596	4,39	5,73	3,58
Hypo. Protein	SAOUHSC_02812	4,32	1,75	0,69
Hypo. Protein	SAOUHSC_01062	3,73	5,09	1,14
Hypo. Protein	SAOUHSC_02810	3,06	3,74	1,90
Hypo. Protein	SAOUHSC_00659	2,48	3,43	2,85
Hypo. Protein	SAOUHSC_01025	2,46	3,07	1,32
Hypo. Protein	SAOUHSC_01971	2,33	3,87	0,52
Hypo. Protein	SAOUHSC_02112	1,96	0,87	1,93
Hypo. Protein	SAOUHSC_01969	1,75	2,81	0,89
Hypo. Protein	SAOUHSC_01837	1,47	1,69	0,81
Hypo. Protein	SAOUHSC_00560	1,27	0,99	7,25
Hypo. Protein	SAOUHSC_02724	1,23	0,65	4,38
Hypo. Protein	SAOUHSC_01429	1,11	1,24	2,87
Hypo. Protein	SAOUHSC_02723	1,01	0,40	4,85
Hypo. Protein	SAOUHSC_02725	0,43	0,33	1,01

Tabelle 46 RNA-seq Expressionsraten für alle potentiellen Gene unter der Kontrolle von WalRK (Delaune et al., 2012) der Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40). Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS bzw. *S. aureus* NCTC8325. Die Tabelle ist absteigend geordnet nach der Expression in *S. aureus* VC40 und unterteilt in nicht hypothetische und hypothetische Gene (#NV = nicht vorhanden; schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>sceD</i>	SAOUHSC_02333	366,63	293,24	1,57
<i>ssaA</i>	SAOUHSC_02571	42,84	13,20	1,14
<i>sarT</i>	SAOUHSC_02799	23,91	59,85	0,90
<i>isaA</i>	SAOUHSC_02887	16,98	11,69	0,91
<i>cwrA</i>	SAOUHSC_02872	13,79	7,52	18,88
<i>vraX</i>	SAOUHSC_00561	12,60	3,49	216,65
<i>sarS</i>	SAOUHSC_00070	5,82	16,94	0,55
<i>fnbA</i>	SAOUHSC_02803	5,04	0,88	1,52
<i>lytM</i>	SAOUHSC_00248	4,41	1,11	3,09
<i>spdC (lyrA)</i>	SAOUHSC_02611	4,25	3,67	0,88
<i>fmtA</i>	SAOUHSC_00998	3,79	5,85	1,85
<i>ddh</i>	SAOUHSC_02830	2,73	3,95	1,32
<i>ohr</i>	SAOUHSC_00831	2,44	2,01	0,69
<i>atIA</i>	SAOUHSC_00994	2,31	0,66	1,23
<i>scc</i>	SAOUHSC_01115	2,14	0,50	2,96
<i>opuD2</i>	SAOUHSC_02444	2,03	1,20	1,51
<i>efb</i>	SAOUHSC_01114	1,99	0,40	3,27
<i>mepR</i>	SAOUHSC_00314	1,88	3,32	0,73
<i>selX</i>	SAOUHSC_00354	1,84	3,22	1,11
<i>spIC</i>	SAOUHSC_01939	1,69	0,63	1,87
<i>fmtB</i>	SAOUHSC_02404	1,63	1,61	1,59
<i>prmA</i>	SAOUHSC_01681	1,63	1,31	1,26



Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>flr</i>	SAOUHSC_01112	1,63	2,58	1,27
<i>potA</i>	SAOUHSC_01046	1,63	1,60	0,93
<i>hlgA</i>	SAOUHSC_02708	1,59	3,23	1,16
<i>bmrU</i>	SAOUHSC_00736	1,58	1,63	1,22
<i>hrcA</i>	SAOUHSC_01685	1,52	2,45	0,57
<i>secDF</i>	SAOUHSC_01746	1,46	1,11	1,21
<i>spIE</i>	SAOUHSC_01936	1,40	0,89	1,49
<i>grpE</i>	SAOUHSC_01684	1,39	1,97	0,62
<i>nptA</i>	SAOUHSC_00060	1,38	0,34	1,11
<i>ebpS</i>	SAOUHSC_01501	1,31	1,12	1,35
<i>sdrH</i>	SAOUHSC_02257	1,29	1,01	0,77
<i>proP</i>	SAOUHSC_00556	1,27	1,76	0,60
<i>prsA</i>	SAOUHSC_01972	1,26	1,37	3,80
<i>fnbB</i>	SAOUHSC_02802	1,26	0,43	1,35
<i>saeS</i>	SAOUHSC_00714	1,25	2,49	1,42
<i>sle1</i>	SAOUHSC_00427	1,25	0,75	0,53
<i>spIB</i>	SAOUHSC_01941	1,23	0,48	#NV
<i>spIF</i>	SAOUHSC_01935	1,22	1,47	0,91
<i>dprA</i>	SAOUHSC_01221	1,20	0,94	1,49
<i>mtID</i>	SAOUHSC_02403	1,18	1,51	1,12
<i>icaR</i>	SAOUHSC_03001	1,12	3,21	1,37
<i>crtO</i>	SAOUHSC_02882	1,10	1,07	0,56
<i>saeR</i>	SAOUHSC_00715	1,04	2,23	1,43
<i>coa</i>	SAOUHSC_00192	1,01	0,57	1,43
<i>crtP</i>	SAOUHSC_02881	0,97	0,48	0,97
<i>sasG</i>	SAOUHSC_02798	0,97	0,47	2,10
<i>dnaJ</i>	SAOUHSC_01682	0,97	0,32	1,66
<i>emp</i>	SAOUHSC_00816	0,96	1,34	1,71
<i>vicR (walR; yycF)</i>	SAOUHSC_00020	0,93	0,84	0,88
<i>hlgC</i>	SAOUHSC_02709	0,84	0,94	2,00
<i>spID</i>	SAOUHSC_01938	0,74	0,24	1,27
<i>saeQ</i>	SAOUHSC_00716	0,74	1,67	1,53
<i>vicK (walk; yycG)</i>	SAOUHSC_00021	0,70	0,32	1,25
<i>spIA</i>	SAOUHSC_01942	0,63	0,55	1,39
<i>ausA</i>	SAOUHSC_00144	0,60	0,31	1,93
<i>radA</i>	SAOUHSC_00507	0,60	0,52	1,82
<i>glpQ</i>	SAOUHSC_00897	0,57	0,52	0,74
<i>ecb</i>	SAOUHSC_01110	0,57	0,09	1,90
<i>hlgB</i>	SAOUHSC_02710	0,56	0,57	1,64
<i>hxlA</i>	SAOUHSC_00553	0,56	0,64	1,00
<i>dinP</i>	SAOUHSC_02111	0,50	0,42	0,88
<i>sbi</i>	SAOUHSC_02706	0,50	0,15	1,40
<i>pyrE</i>	SAOUHSC_01172	0,43	1,12	2,56
<i>clpB</i>	SAOUHSC_00912	0,39	0,97	0,47
<i>carB (pyrAB)</i>	SAOUHSC_01170	0,38	0,49	4,71
<i>pyrF</i>	SAOUHSC_01171	0,37	0,57	4,13
<i>saeP</i>	SAOUHSC_00717	0,36	0,14	3,91
<i>gehB</i>	SAOUHSC_00300	0,33	0,12	1,20
<i>carA (pyrAA)</i>	SAOUHSC_01169	0,30	0,39	5,34

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>clpC</i>	SAOUHSC_00505	0,29	0,27	1,12
<i>hla</i>	SAOUHSC_01121	0,29	0,17	2,25
<i>pyrC</i>	SAOUHSC_01168	0,24	0,56	6,52
<i>mcsA</i>	SAOUHSC_00503	0,19	0,24	0,72
<i>set (ssl11)</i>	SAOUHSC_00399	0,18	0,29	2,45
<i>pyrB</i>	SAOUHSC_01166	0,16	0,85	5,72
<i>alsS (budB)</i>	SAOUHSC_02468	0,14	0,24	0,12
<i>sdrD</i>	SAOUHSC_00545	0,13	0,22	0,20
<i>lukG</i>	SAOUHSC_02241	0,10	0,15	2,78
<i>lukH</i>	SAOUHSC_02243	0,08	0,11	2,42
<i>sarX</i>	SAOUHSC_00674	0,07	0,09	0,25
<i>spa</i>	SAOUHSC_00069	0,03	0,09	0,40
<i>pflA</i>	SAOUHSC_00188	0,02	0,03	0,80
<i>ilvA1</i>	SAOUHSC_01451	0,01	0,02	0,46
<i>sasD</i>	SAOUHSC_00094	0,01	0,04	0,52
<i>scn</i>	SAOUHSC_02167	#NV	#NV	0,72
<i>vwb</i>	SAOUHSC_00814	#NV	#NV	#NV
<i>chp</i>	SAOUHSC_02169	#NV	#NV	#NV
Hypo. Protein	SAOUHSC_02576	34,07	5,04	2,40
Hypo. Protein	SAOUHSC_01760	23,57	29,60	4,81
Hypo. Protein	SAOUHSC_02883	9,61	4,19	0,72
Hypo. Protein	SAOUHSC_00671	8,32	4,35	1,57
Hypo. Protein	SAOUHSC_02855	8,12	4,53	0,59
Hypo. Protein	SAOUHSC_01917	7,69	10,95	0,42
Hypo. Protein	SAOUHSC_01761	7,49	5,69	8,93
Hypo. Protein	SAOUHSC_02936	7,37	7,72	0,69
Hypo. Protein	SAOUHSC_00191	7,37	15,08	0,78
Hypo. Protein	SAOUHSC_01895	6,38	5,12	0,69
Hypo. Protein	SAOUHSC_01024	5,92	2,99	0,45
Hypo. Protein	SAOUHSC_00704	5,56	4,13	0,67
Hypo. Protein	SAOUHSC_02572	5,18	2,21	0,72
Hypo. Protein	SAOUHSC_00624	4,02	3,67	1,09
Hypo. Protein	SAOUHSC_02702	3,67	3,50	0,83
Hypo. Protein	SAOUHSC_00420	3,58	1,90	0,21
Hypo. Protein	SAOUHSC_02842	3,54	1,92	0,54
Hypo. Protein	SAOUHSC_02320	3,46	6,47	0,70
Hypo. Protein	SAOUHSC_00773	3,45	3,35	1,08
Hypo. Protein	SAOUHSC_00428	3,26	5,86	0,88
Hypo. Protein	SAOUHSC_01815	3,23	5,14	0,89
Hypo. Protein	SAOUHSC_00356	3,04	3,13	0,69
Hypo. Protein	SAOUHSC_01944	3,01	4,09	0,31
Hypo. Protein	SAOUHSC_01264	3,01	3,72	1,22
Hypo. Protein	SAOUHSC_00619	2,83	4,14	0,61
Hypo. Protein	SAOUHSC_00134	2,80	7,89	1,12
Hypo. Protein	SAOUHSC_02013	2,61	4,58	0,75
Hypo. Protein	SAOUHSC_03032	2,08	1,18	0,52
Hypo. Protein	SAOUHSC_02112	1,96	0,87	1,93
Hypo. Protein	SAOUHSC_00690	1,86	2,58	0,72
Hypo. Protein	SAOUHSC_02266	1,79	2,66	0,44
Hypo. Protein	<u>SAOUHSC_01045</u>	1,77	2,36	0,85
Hypo. Protein	SAOUHSC_02338	1,75	2,14	0,95

Gen	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
Hypo. Protein	SAOUHSC_00401	1,73	0,74	3,04
Hypo. Protein	SAOUHSC_00182	1,72	1,39	1,02
Hypo. Protein	SAOUHSC_00430	1,65	2,05	0,78
Hypo. Protein	SAOUHSC_00820	1,50	1,70	1,18
Hypo. Protein	SAOUHSC_02931	1,48	2,89	0,54
Hypo. Protein	SAOUHSC_00977	1,46	2,09	0,56
Hypo. Protein	SAOUHSC_00821	1,41	1,41	0,97
Hypo. Protein	SAOUHSC_02753	1,30	1,68	0,82
Hypo. Protein	SAOUHSC_02774	1,29	1,05	1,05
Hypo. Protein	SAOUHSC_00429	1,28	1,37	0,74
Hypo. Protein	SAOUHSC_00712	1,25	1,84	0,86
Hypo. Protein	SAOUHSC_02925	1,24	1,73	0,53
Hypo. Protein	SAOUHSC_01113	1,18	1,78	0,43
Hypo. Protein	SAOUHSC_02930	1,10	3,09	0,55
Hypo. Protein	SAOUHSC_00285	1,09	2,09	0,56
Hypo. Protein	SAOUHSC_00065	1,01	1,77	0,46
Hypo. Protein	SAOUHSC_01027	1,00	0,63	0,88
Hypo. Protein	SAOUHSC_02161	0,96	0,84	1,88
Hypo. Protein	SAOUHSC_01721	0,96	1,01	1,17
Hypo. Protein	SAOUHSC_02387	0,92	0,90	0,60
Hypo. Protein	SAOUHSC_02754	0,88	0,53	0,56
Hypo. Protein	SAOUHSC_01992	0,87	0,92	1,00
Hypo. Protein	SAOUHSC_00431	0,85	0,62	1,12
Hypo. Protein	SAOUHSC_02244	0,84	0,97	1,09
Hypo. Protein	SAOUHSC_00508	0,79	0,86	1,68
Hypo. Protein	SAOUHSC_00143	0,76	0,77	0,90
Hypo. Protein	SAOUHSC_00689	0,69	0,53	1,43
Hypo. Protein	SAOUHSC_02908	0,61	0,51	0,82
Hypo. Protein	SAOUHSC_01918	0,59	0,51	0,45
Hypo. Protein	SAOUHSC_01919	0,53	0,28	0,60
Hypo. Protein	SAOUHSC_02900	0,50	0,32	1,14
Hypo. Protein	SAOUHSC_02899	0,44	0,16	1,24
Hypo. Protein	SAOUHSC_01101	0,43	0,44	2,46
Hypo. Protein	SAOUHSC_02109	0,41	0,47	0,62
Hypo. Protein	SAOUHSC_03027	0,41	0,37	0,81
Hypo. Protein	SAOUHSC_02994	0,39	0,30	0,70
Hypo. Protein	SAOUHSC_02445	0,32	0,23	0,88
Hypo. Protein	SAOUHSC_00617	0,31	1,16	0,83
Hypo. Protein	SAOUHSC_01991	0,20	0,54	0,42
Hypo. Protein	SAOUHSC_01450	0,09	0,10	0,40
Hypo. Protein	SAOUHSC_00303	#NV	#NV	#NV
Hypo. Protein	SAOUHSC_02657	#NV	#NV	#NV
Hypo. Protein	SAOUHSC_02165	#NV	#NV	#NV
Hypo. Protein	SAOUHSC_01733	#NV	#NV	#NV
Hypo. Protein	SAOUHSC_02164	#NV	#NV	1,12
Hypo. Protein	SAOUHSC_02083	#NV	#NV	1,18
Hypo. Protein	SAOUHSC_00813	#NV	#NV	#NV

**Tabelle 47 RNA-seq Expressionsraten für ausgewählte, charakterisierte Gene mit einer hohen Expression (> 5) in mindestens einem der Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R oder *S. aureus* VraS(VC40). Hypothetische Gene sind nur dargestellt, wenn sie zu einem Operon mit charakterisierten Genen gehören. Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220Δ*mutS* bzw. *S. aureus* NCTC8325. Alle Gene sind nach gene locus tag geordnet (#NV = nicht vorhanden; schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).**

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>purA</i>	Purin Biosynthese	SAOUHSC_00019	1,23	16,39	1,17
<i>sarS</i>	Transkriptioneller Regulator	SAOUHSC_00070	5,82	16,94	0,55
<i>sirA</i>	Eisen Transport	SAOUHSC_00074	1,82	6,73	0,74
<i>ssuB</i>	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_00136	0,19	0,14	6,31
<i>ssuA</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00137	0,18	0,13	5,58
<i>IrgA</i>	Holin-Antiholin Protein	SAOUHSC_00232	1,62	0,75	14,44
<i>IrgB</i>	Holin-Antiholin Protein	SAOUHSC_00233	0,75	0,23	29,39
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_00560	1,27	0,99	7,25
<i>vraX</i>	Komplement System Inhibitor	SAOUHSC_00561	12,60	3,49	216,65
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_00651	2,92	5,47	0,85
<i>fhuC</i>	Eisen Transport	SAOUHSC_00652	4,41	5,06	1,03
<i>fruR</i>	Transkriptioneller Regulator	SAOUHSC_00706	0,26	0,24	7,90
<i>sstA</i>	Eisen Transport	SAOUHSC_00746	3,45	16,20	2,17
<i>sstB</i>	Eisen Transport	SAOUHSC_00747	3,13	9,90	2,55
<i>sstC</i>	Eisen Transport	SAOUHSC_00748	2,59	8,84	2,70
<i>opp-3B</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00923	0,34	0,50	24,94
<i>opp-3C</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00924	0,20	0,19	37,95
<i>opp-3D</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00925	0,21	0,12	42,29
<i>opp-3F</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00926	0,20	0,15	40,47
<i>opp-3A</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00927	0,34	0,43	28,58
<i>purE</i>	Purin Biosynthese	SAOUHSC_01008	2,22	50,25	0,76
<i>purK</i>	Purin Biosynthese	SAOUHSC_01009	1,21	17,26	1,13
<i>purC</i>	Purin Biosynthese	SAOUHSC_01010	1,06	16,26	1,15
<i>purS</i>	Purin Biosynthese	SAOUHSC_01011	0,88	12,65	1,29
<i>purD</i>	Purin Biosynthese	SAOUHSC_01018	0,43	8,58	1,05
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_01023	5,14	2,83	0,85
<i>graF</i>	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_01024	5,92	2,99	0,45
<i>pyrP</i>	Pyrimidine Biosynthese	SAOUHSC_01165	0,18	0,89	7,53
<i>pyrB</i>	Pyrimidine Biosynthese	SAOUHSC_01166	0,16	0,85	5,72
<i>pyrC</i>	Pyrimidine Biosynthese	SAOUHSC_01168	0,24	0,56	6,52
<i>carA</i>	Pyrimidine Biosynthese	SAOUHSC_01169	0,30	0,39	5,34
<i>fakA</i>	Fettsäure Biosynthese	SAOUHSC_01193	3,46	5,48	0,76
<i>acpP</i>	Fettsäure Biosynthese	SAOUHSC_01201	7,76	10,31	0,83
<i>guaC</i>	GMP Reduktase	SAOUHSC_01330	1,50	10,06	1,33
<i>fer</i>	Ferredoxin	SAOUHSC_01504	10,68	15,52	1,04
<i>holA</i>	DNA-Polymerase Untereinheit	SAOUHSC_01690	4,13	7,08	0,74
<i>purB</i>	Purin Biosynthese	SAOUHSC_02126	1,44	12,32	0,62
<i>ilvD</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02281	0,24	0,06	5,38
<i>yidC</i>	Membran Protein Insertase	SAOUHSC_02327	3,58	5,09	0,74
<i>htsA</i>	Eisen Transport	SAOUHSC_02430	3,21	7,70	0,98
<i>lacF</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_02451	5,44	2,69	#NV
<i>lacB</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_02454	8,02	10,49	#NV
<i>lacA</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_02455	12,48	23,64	0,19

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>sarY</i>	Transkriptioneller Regulator	SAOUHSC_02569	2,86	5,13	0,76
<i>sarT</i>	Transkriptioneller Regulator	SAOUHSC_02799	23,91	59,85	0,90
<i>mhqR</i>	Transkriptioneller Regulator	SAOUHSC_02826	3,84	5,74	0,42
<i>feoA</i>	Eisen Transport	SAOUHSC_02865	3,26	6,20	#NV
<i>betA</i>	Betain Biosynthese	SAOUHSC_02932	46,73	37,88	0,92
<i>betB</i>	Betain Biosynthese	SAOUHSC_02933	107,46	94,22	0,78
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_02934	353,48	1193,11	#NV
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_02935	7,41	22,46	0,57
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_02936	7,37	7,72	0,69
<i>cudT</i>	Betain Transporter	SAOUHSC_02937	14,85	14,80	0,74
<i>arcR</i>	Transkriptioneller Regulator	SAOUHSC_02964	2,34	6,18	0,99
<i>arcC</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02965	3,24	8,88	1,20
<i>arcA</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02969	0,27	0,45	6,32
<i>cspB</i>	Cold-shock Protein	SAOUHSC_03045	5,56	6,46	0,47
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_03046	15,56	16,85	0,36

Tabelle 48 RNA-seq Expressionsraten für ausgewählte, charakterisierte Gene mit einer niedrigen Expression (< 0,2) in mindestens einem der Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R oder *S. aureus* VraS(VC40). Hypothetische Gene sind nur dargestellt, wenn sie zu einem Operon mit charakterisierten Genen gehören. Die Expression bezieht sich auf die Elternstämme *S. aureus* RN4220Δ*mutS* bzw. *S. aureus* NCTC8325. Alle Gene sind nach gene locus tag geordnet (#NV = nicht vorhanden; schwarz = hochreguliert; hellgrau = runterreguliert).

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>adsA</i>	Nukleotidase	SAOUHSC_00025	0,16	0,20	0,72
<i>sbnC</i>	Siderophor Biosynthese	SAOUHSC_00077	0,30	0,17	4,73
<i>sbnD</i>	Siderophor Transporter	SAOUHSC_00078	0,32	0,15	3,21
<i>sbnH</i>	Siderophor Biosynthese	SAOUHSC_00082	0,28	0,20	2,21
<i>sasD</i>	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_00094	0,01	0,04	0,52
<i>deoB</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_00101	0,34	0,19	1,48
<i>phnE1</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00102	0,51	0,16	2,19
<i>adhE</i>	Alkohol Dehydrogenase	SAOUHSC_00113	0,13	0,17	0,68
<i>ssuB</i>	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_00136	0,19	0,14	6,31
<i>ssuA</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00137	0,18	0,13	5,58
<i>ssuC</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00138	0,15	0,15	4,72
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_00146	0,08	0,08	1,45
<i>argJ</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_00148	0,48	0,17	3,57
<i>argC</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_00149	0,38	0,13	3,71
<i>argD</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_00150	0,45	0,14	4,75
<i>azoR</i>	Azoreduktase	SAOUHSC_00173	0,41	0,34	0,18
<i>pflB</i>	Pyruvat Fermentation	SAOUHSC_00187	0,04	0,11	0,73
<i>pflA</i>	Pyruvat Fermentation	SAOUHSC_00188	0,02	0,03	0,80
<i>ldh1</i>	Pyruvat Fermentation	SAOUHSC_00206	0,16	0,22	0,73
<i>rbsD</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_00240	0,38	0,13	2,03
<i>rbsU</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_00241	0,48	0,18	1,24
<i>brnQ2</i>	Transporter	SAOUHSC_00282	0,33	0,17	0,82
<i>tatC</i>	Protein Transport	SAOUHSC_00328	0,23	0,07	1,92

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>tatA</i>	Protein Transport	SAOUHSC_00329	0,24	0,08	1,75
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_00330	0,31	0,16	1,18
<i>metC</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_00340	0,46	0,16	2,54
<i>ahpF</i>	Schutz gegen DNA Schäden	SAOUHSC_00364	0,41	0,09	2,92
<i>xpt</i>	Purin Metabolismus	SAOUHSC_00372	0,08	0,03	0,26
<i>pbuX</i>	Purin Metabolismus	SAOUHSC_00373	0,08	0,03	0,37
<i>guaB</i>	Purin Metabolismus	SAOUHSC_00374	0,22	0,09	0,84
<i>mpsA</i>	Putative Transporter	SAOUHSC_00412	0,12	0,12	3,97
<i>mpsB</i>	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_00413	0,13	0,11	3,70
<i>metN2</i>	Aminosäure Transporter	SAOUHSC_00423	0,23	0,17	3,69
<i>gltB</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_00435	1,27	0,23	0,11
<i>treP</i>	Transporter	SAOUHSC_00437	0,15	0,34	1,93
<i>prs</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_00472	0,29	0,13	1,24
<i>pdxS</i>	Cofaktor Biosynthese	SAOUHSC_00499	0,17	0,16	1,74
<i>nupC</i>	Pyrimidin Metabolismus	SAOUHSC_00501	0,13	0,23	0,53
<i>mcsA</i>	Stress Antwort	SAOUHSC_00503	0,19	0,24	0,72
<i>cysE</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_00510	0,31	0,18	2,62
<i>mrnC</i>	Ribonuklease	SAOUHSC_00512	0,31	0,19	3,86
<i>sigH</i>	Sigma Faktor	SAOUHSC_00515	0,38	0,18	3,36
<i>fusA</i>	Elongationsfaktor	SAOUHSC_00529	0,64	0,12	1,78
<i>tuf</i>	Elongationsfaktor	SAOUHSC_00530	0,55	0,18	2,03
<i>hchA</i>	Chaperon	SAOUHSC_00533	0,20	0,10	1,26
<i>adh1</i>	Alkohol Dehydrogenase	SAOUHSC_00608	0,03	0,03	0,82
<i>sarX</i>	Transkriptioneller Regulator	SAOUHSC_00674	0,07	0,09	0,25
<i>fruB</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_00707	0,16	0,07	4,18
<i>nrdI</i>	Ribonukleotid Reduktase	SAOUHSC_00741	0,47	0,17	1,06
<i>gapA</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_00795	0,20	0,21	1,24
<i>pgk</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_00796	0,12	0,05	2,94
<i>tpiA</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_00797	0,13	0,05	2,90
<i>pgm</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_00798	0,13	0,06	3,04
<i>metN1</i>	Aminosäure Transporter	SAOUHSC_00842	0,34	0,15	0,96
<i>metP1</i>	Aminosäure Transporter	SAOUHSC_00843	0,31	0,17	0,91
<i>argG</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_00899	0,18	0,39	0,40
<i>fabH</i>	Fettsäure Biosynthese	SAOUHSC_00920	0,18	0,16	1,67
<i>fabF</i>	Fettsäure Biosynthese	SAOUHSC_00921	0,25	0,15	2,03
<i>opp-3C</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00924	0,20	0,19	37,95
<i>opp-3D</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00925	0,21	0,12	42,29
<i>opp-3F</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_00926	0,20	0,15	40,47
<i>qoxB</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01001	0,18	0,07	1,38
<i>qoxA</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01002	0,21	0,11	1,09
<i>thiX</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_01019	0,41	0,13	1,18
<i>thiW</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_01021	0,33	0,08	1,32
<i>thiV</i>	ABC Transporter	SAOUHSC_01022	0,34	0,10	1,05
<i>pdhB</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01041	0,43	0,09	3,06
<i>pdhC</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01042	0,42	0,12	2,67
<i>sdhA</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01104	0,20	0,07	1,81
<i>pyrP</i>	Pyrimidine Biosynthese	SAOUHSC_01165	0,18	0,89	7,53
<i>pyrB</i>	Pyrimidine Biosynthese	SAOUHSC_01166	0,16	0,85	5,72
<i>sucC</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01216	0,24	0,15	1,38
<i>sucD</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01218	0,31	0,17	1,21

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>glpF</i>	Polyol Metabolismus	SAOUHSC_01275	0,20	0,19	0,89
<i>glpD</i>	Polyol Metabolismus	SAOUHSC_01278	0,04	0,07	1,51
<i>hom</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_01320	0,25	0,20	1,51
<i>tkt</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01337	0,38	0,14	1,67
<i>citB</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01347	0,21	0,12	1,38
<i>trpC</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_01369	0,16	0,20	1,78
<i>trpF</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_01370	0,19	0,25	1,53
<i>dapA</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_01396	0,31	0,17	2,26
<i>dapB</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_01397	0,28	0,12	2,32
<i>cspA</i>	Cold Shock Protein	SAOUHSC_01403	0,03	0,04	0,50
<i>norB</i>	Quinolone Resistenz Protein	SAOUHSC_01448	0,16	0,15	0,40
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_01450	0,09	0,10	0,40
<i>ilvA1</i>	Aminosäure Abbau	SAOUHSC_01451	0,01	0,02	0,46
<i>ald1</i>	Aminosäure Abbau	SAOUHSC_01452	0,02	0,03	0,33
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_01583	0,21	0,09	0,76
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_01584	0,23	0,08	0,50
<i>srrB</i>	TCS Sensorkinase	SAOUHSC_01585	0,40	0,18	1,41
<i>gcvPA</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_01633	0,35	0,17	2,21
<i>cshB</i>	RNA Helicase	SAOUHSC_01659	0,61	0,16	1,21
<i>ackA</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_01820	0,68	0,07	0,62
<i>leuS</i>	tRNA Synthetase	SAOUHSC_01875	0,27	0,20	1,17
<i>putP</i>	Prolin Transporter	SAOUHSC_02119	0,19	0,12	0,72
<i>groES</i>	Chaperon	SAOUHSC_02255	0,27	0,14	1,23
<i>ilvB</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02282	0,36	0,16	4,29
<i>ilvH</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02283	0,28	0,17	3,96
<i>ilvC</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02284	0,31	0,12	4,53
<i>leuA</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02285	0,34	0,17	4,15
<i>leuB</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02286	0,35	0,10	4,91
<i>leuC</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02287	0,31	0,11	4,10
<i>atpD</i>	ATP Synthase	SAOUHSC_02341	0,34	0,10	1,79
<i>atpA</i>	ATP Synthase	SAOUHSC_02345	0,35	0,10	2,07
<i>atpH</i>	ATP Synthase	SAOUHSC_02346	0,34	0,12	2,02
<i>atpF</i>	ATP Synthase	SAOUHSC_02347	0,34	0,11	1,97
<i>atpE</i>	ATP Synthase	SAOUHSC_02349	0,31	0,13	1,70
<i>atpB</i>	ATP Synthase	SAOUHSC_02350	0,35	0,19	1,76
<i>upp</i>	Pyrimidin Metabolismus	SAOUHSC_02353	0,45	0,19	2,23
<i>glyA</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_02354	0,42	0,13	2,18
Hypo. Protein	Hypothetisches Protein	SAOUHSC_02355	0,50	0,19	1,79
<i>deoC2</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_02379	0,13	0,19	0,94
<i>deoC2</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_02379	0,13	0,19	0,94
<i>lacA</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_02455	12,48	23,64	0,19
<i>rplM</i>	Ribosomales Protein	SAOUHSC_02478	0,57	0,19	1,31
<i>rpsK</i>	Ribosomales Protein	SAOUHSC_02486	0,80	0,20	1,96
<i>adk</i>	Purin Metabolismus	SAOUHSC_02490	0,83	0,17	2,29
<i>rpsE</i>	Ribosomales Protein	SAOUHSC_02494	1,02	0,16	1,69
<i>rplP</i>	Ribosomales Protein	SAOUHSC_02505	1,10	0,20	1,81
<i>rpsS</i>	Ribosomales Protein	SAOUHSC_02508	1,11	0,20	1,97

Gen	Funktion	Gene locus tag	VC40	VC40R	VraS(VC40)
<i>rpIB</i>	Ribosomales Protein	SAOUHSC_02509	0,99	0,20	1,61
<i>rpIW</i>	Ribosomales Protein	SAOUHSC_02510	0,81	0,20	1,81
<i>rpID</i>	Ribosomales Protein	SAOUHSC_02511	0,83	0,14	2,09
<i>glcU</i>	Transporter	SAOUHSC_02520	0,27	0,14	0,77
<i>moeA</i>	Cofaktor Biosynthese	SAOUHSC_02542	0,28	0,13	1,68
<i>moaB</i>	Cofaktor Biosynthese	SAOUHSC_02544	0,31	0,17	1,66
<i>ureB</i>	Stickstoff Metabolismus	SAOUHSC_02559	1,25	0,19	3,23
<i>lctP2</i>	Transporter	SAOUHSC_02648	0,14	0,32	0,70
<i>narK</i>	Nitrat Transporter	SAOUHSC_02671	0,04	0,05	0,98
<i>narJ</i>	Nitrat Atmung	SAOUHSC_02679	0,02	0,01	2,32
<i>narH</i>	Nitrat Atmung	SAOUHSC_02680	0,01	0,01	3,19
<i>narG</i>	Nitrat Atmung	SAOUHSC_02681	0,01	0,01	2,23
<i>nasF</i>	Nitrat Atmung	SAOUHSC_02682	0,06	0,11	1,40
<i>nasE</i>	Nitrat Atmung	SAOUHSC_02683	0,02	0,01	2,02
<i>nasD</i>	Nitrat Atmung	SAOUHSC_02684	0,02	0,02	1,96
<i>nirR</i>	Nitrat Atmung	SAOUHSC_02685	0,06	0,07	1,40
<i>tcyC</i>	Aminosäure Transporter	SAOUHSC_02697	0,34	0,19	1,70
<i>cidA</i>	Holin-Antiholin Protein	SAOUHSC_02851	0,16	0,33	0,12
<i>clpL</i>	Protease	SAOUHSC_02862	0,05	0,04	2,33
<i>panC</i>	Cofaktor Biosynthese	SAOUHSC_02918	0,23	0,20	1,13
<i>ldh2</i>	Pyruvat Fermentation	SAOUHSC_02922	0,04	0,06	0,72
<i>lqo</i>	Kohlenhydrat Metabolismus	SAOUHSC_02927	0,14	0,10	1,24
<i>hisA</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_03009	0,65	0,18	1,26
<i>hisZ</i>	Aminosäure Biosynthese	SAOUHSC_03015	0,87	0,20	0,44

Tabelle 49 Berechneter prozentualer Anteil an Genen mit Consensus-Sequenz für WalR (*sceD*, *ssaA*, *lytM*, *isaA*, *atIA*, *ebpS*, *sdrD*, SAOUHSC\_00671, SAOUHSC\_00773, SAOUHSC\_02576, SAOUHSC\_02883), die innerhalb des WalRK-Regulon (Dubrac et al., 2008; Delaune et al., 2012) für eine Hoch- bzw. Runterregulierung des TCS sprechen, für die Stämme *S. aureus* VC40, *S. aureus* VC40R und *S. aureus* VraS(VC40).

Stamm	VC40 (%)	VC40R (%)	VraS(VC40) (%)
TCS hochreguliert	91	64	18
TCS runterreguliert	9	9	9
TCS nicht beeinflusst	0	27	73



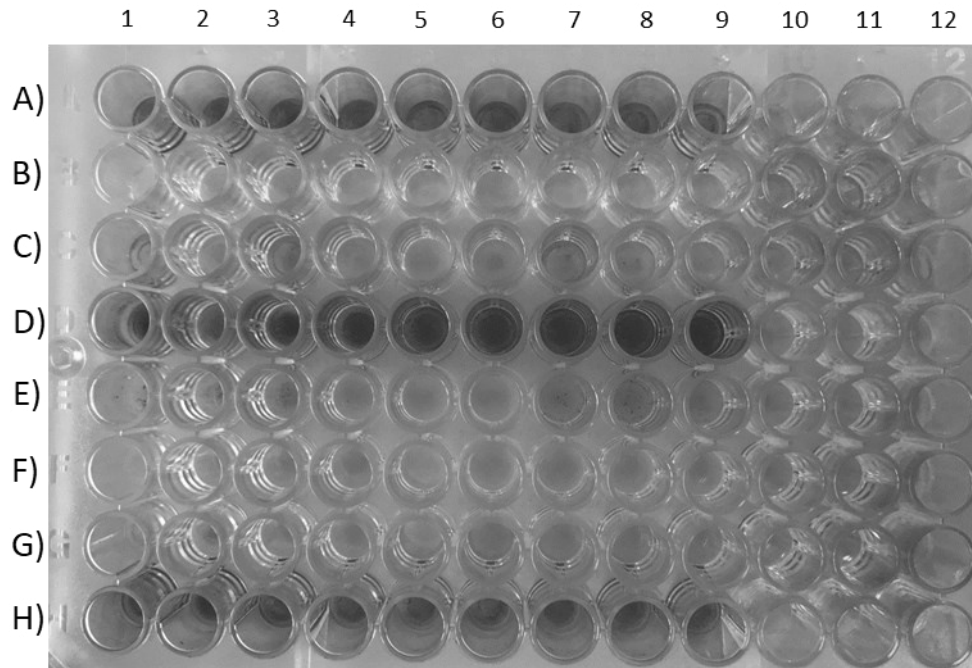


Abbildung 64 Biofilm-Assay von *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (A 1-9)), *S. aureus* VC40 (B 1-9) und *S. aureus* VC40R (C 1-9), *S. aureus* NCTC8325 (D 1-9), *S. aureus* VraS(VC40) (E 1-9), *S. aureus* 137/93A (F 1-9), *S. aureus* 1450/94 (G 1-9), Positivkontrolle *S. aureus* RN4220 (H 1-9) und Negativkontrolle *S. carnosus* (A/B/C 10-12).

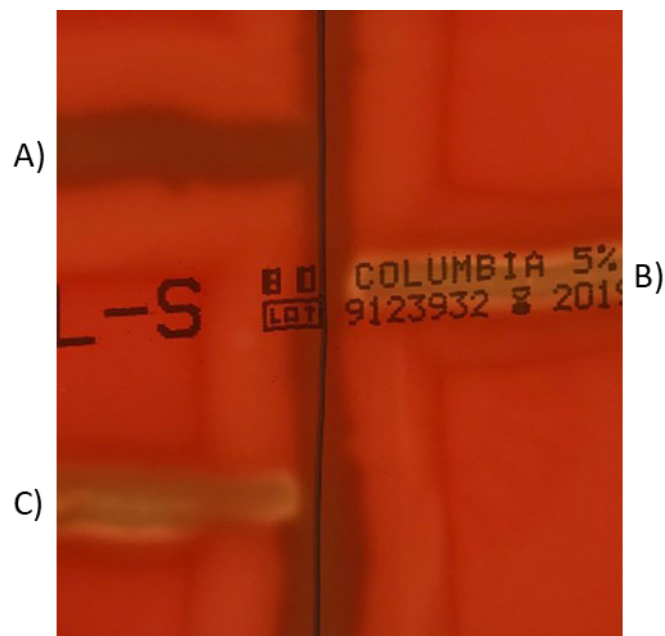


Abbildung 65  $\beta$ -Hämolysin-Assay auf Columbia-Blutagar zum Nachweis der Agr-Funktion für *S. aureus* RN4220 $\Delta$ mutS (A), *S. aureus* VC40 (B) und *S. aureus* VC40R (C). Der  $\beta$ -Hämolysin-produzierende Stamm *S. aureus* RN4220 ist vertikal ausgestrichen.

# Publikationen

## Veröffentlichungen

**Kleinert F, Kallies R, Hort M, Zweynert A, Szekat C, Nagel M and Bierbaum G (2017)**

Influence of IS256 on genome variability and formation of SCV in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**(8) pii: e00144-17  
DOI: 10.1128/AAC.00144-17

**Gajdiss M, Monk IR, Bertsche U, Kienemund J, Funk T, Dietrich A, Hort M, Sib E, Stinear TP and Bierbaum G (2020)**

YycH and YycI regulate expression of *Staphylococcus aureus* autolysins by activation of WalRK phosphorylation. *Microorganisms.* **8**(6), 870  
DOI: 10.3390/microorganisms8060870

**Hort M, Bertsche U, Nozinovic S, Dietrich A, Schrötter AS, Mildenerberger L, Axtmann K, Berscheid A and Bierbaum G (2021)**

Novel insights into the role of  $\beta$ -glycosylated wall teichoic acids in the reduction of vancomycin susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Spectr.* **9**:e00528-21  
DOI: 10.1128/Spectrum.00528-21

## Poster-Präsentationen

**Kleinert F, Hort M, Zweynert A, Türck M, Nagel M, Szekat C and Bierbaum G**

The role of the insertion sequence IS256 in genetic flexibility in *Staphylococcus aureus*. 15.09 - 17.09.2016; **3<sup>rd</sup>** International Conference Pathophysiology of Staphylococci; Tübingen, Germany

**Kleinert F, Hort M, Szekat C and Bierbaum G**

IS256 promotes formation of unstable antibiotic resistant small colony variants in *Staphylococcus aureus*. 13.08 – 17.08.2017; **4<sup>th</sup>** International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance; Lansing, United States of America

**Hort M, Bertsche U and Bierbaum G**

Analysis of the cell wall architecture of vancomycin intermediate *S. aureus* strains. 19.02 – 21.02.2018; **70<sup>ste</sup>** Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e. V.; Bochum, Germany

**Hort M, Bertsche U and Bierbaum G**

Examination of the cell wall structure of a vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* strain. 15.04 – 18.04.2018; Annual Conference **2018** of the Association for General and Applied Microbiology; Wolfsburg, Germany

**Hort M, Bertsche U and Bierbaum G**

Unusual autolysis profile in a laboratory *Staphylococcus aureus* strain with intermediate susceptibility to vancomycin. 23.08 – 26.08.2018; **18<sup>th</sup>** International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections; Kopenhagen, Denmark

**Hort M, Bertsche U, Schrötter AS and Bierbaum G**

The impact of the cell wall composition on vancomycin susceptibility in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. 10.03 – 13.03.2019; **6<sup>th</sup>** International Symposium of the SFB 766 – The Bacterial Cell Envelope: “A 12-Year-Journey”; Tübingen, Germany

**Hort M, Bertsche U, Schrötter AS and Bierbaum G**

Analysis of the wall teichoic acid composition in *Staphylococcus aureus* strains with intermediate susceptibility to vancomycin. 17.03 – 20.03.2019; Annual Conference **2019** of the Association for General and Applied Microbiology; Mainz, Germany

**Hort M, Schrötter AS, Berscheid A, Bertsche U and Bierbaum G**

The role of VraSR on the reduced susceptibility to vancomycin in a laboratory VISA strain. 08.03 – 11.03.2020; **6<sup>th</sup>** Joint Conference of the DGHM & VAAM; Leipzig, Germany

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gabriele Bierbaum für die Gelegenheit bedanken, dass ich nach meiner Masterarbeit, auch meine Promotion in ihrer Arbeitsgruppe durchführen konnte. Vielen Dank für die Bereitstellung dieses spannenden Themas, sowie die hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Frau Prof. Dr. Tanja Schneider für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Gabriele König und Herrn Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck für die Bereitschaft sich der Promotionskommission als fachnahes und fachfremdes Mitglied anzuschließen.

Ein großer Dank geht genauso an meine komplette Arbeitsgruppe. Ich hatte eine hervorragende Zeit und bedanke mich für die gegenseitige Unterstützung. Auch nach misslungenen Versuchen und schlechten Ergebnissen konnten wir zusammen lachen und den Laboralltag unterhaltsam gestalten. Meiner Labormitbewohnerin Frau Christiane Szekat danke ich für die großartige Atmosphäre und die vielen Ratschläge im Labor. Bei Frau Anna Schallenberg möchte ich mich für die hilfreiche Unterweisung der Phagentypisierung bedanken. Michael Josten danke ich für die Einweisung in die Gefriertrocknungsanlage und die Corona-bedingte Aufnahme in ihr Labor. Für die allgemeine Hilfsbereitschaft, die vielen wissenschaftlichen und privaten Gespräche und die ausgelassenen Feiern zu Karneval und auf Konferenzen danke ich meinen Kollegen Alina Dietrich, Kathrin Janssen, Mike Gajdiss, Ursula Steffens, Katja Kehl und Dominik Schuster. Mike Gajdiss danke ich des Weiteren für die Bereitstellung der Proteine PBP4, WalK und WalR. Bei Alina Dietrich bedanke ich mich außerdem herzlich für die Aufreinigung der WTA aus dem Stamm *S. aureus* VC40R in Medium mit 4 % NaCl und die folgende NMR-Analyse. Im Besonderen möchte ich mich bei meinen Studentinnen für ihre wertvolle Arbeit bedanken. Anne Sophie Schrötter danke ich für die heterologe Expression von AtIA und die Untersuchung der Lyse von verschiedenen Zellwand-Aufreinigungen. Katharina Axtmann danke ich für die Untersuchung des proteolytischen Abbaus von AtIA und die Einführung zweier *S. aureus* VC40 Mutationen in den Laborstamm *S. aureus* NCTC8325. Jaspara Knopp danke ich für die anspruchsvolle Aufreinigung und Analyse der Lipoteichonsäuren meiner *S. aureus* Stämme.

Zudem danke ich Frau Dr. Anne Berscheid für die hilfreiche und informative Korrespondenz zu allen Fragen rund um ihre Doktorarbeit, sowie für die Bereitstellung der Stämme und der aufgereinigten Proteinen VraS(VC40), ClpX(WT), ClpX(VC40) und ClpP(WT).

Des Weiteren möchte ich mich bei einigen Kooperationspartnern für Ihre Arbeit und Ihre Unterstützung bedanken. Frau Dr. Ute Bertsche danke ich für die Analyse des Peptidoglykan mittels UPLC. Herrn Dr. Marc Sylvester danke ich für die massenspektrometrische Analyse meines VraR(M54T) Proteins. Frau Dr. Senada Nozinovic danke ich für die NMR-Analyse der Wandteichonsäuren. Bei der AG Peschel möchte ich mich für die Bereitstellung der verwendeten Podoviridae und Myoviridae Phagen, sowie des Stammes *S. aureus*  $\Delta tarM\Delta tarS$  bedanken.

Ebenfalls dankende Erwähnung finden soll die Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG. Durch die Bereitstellung ihrer finanziellen Mittel wurde dieses Projekt ermöglicht.

Bei Frau Elena Kohlwey und Frau Pia Sassmannshausen möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Ohne sie gäbe es sehr viel mehr Rechtschreibfehler in dieser Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich noch meiner Familie und meinem Ehemann für die Unterstützung während der gesamten Studienzeit im Allgemeinen und während der Promotion im Besonderen danken.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich für meine Promotion keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe, und dass die inhaltlich und wörtlich aus anderen Werken entnommenen Stellen und Zitate als solche gekennzeichnet sind. Diese Arbeit 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 vorgelegt worden ist. Teile der Dissertation sind vorab an den unter Punkt „Publikationen“ aufgeführten Stellen auszugsweise veröffentlicht worden.

Bonn, November 2021

---

Michael Hort