

Aus dem Department für diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Über Stringent response, Aminosäure Metabolismus und
essentielle Aminosäuren in *Staphylococcus aureus*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Audretsch, Christof Karl

27. Februar 2020

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professorin Dr. C. Wolz
2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Dandekar
3. Berichterstatter: Professor Dr. R. Feil

Tag der Disputation: 03.12.2019.

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung	5
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S.aureus</i>)	5
Stringent Response (SR)	7
SR in <i>Escherichia coli</i> (gram-negativ)	7
SR in <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S.aureus</i>) (gram-positiv)	9
Aminosäure (AS) Metabolismus und Essentielle AS	10
Systembiologie und synthetische Biologie	13
Logikgatter und Booleansche Algebra	17
Semiquantitative, booleansche Netzwerke	17
Themenverwandte Arbeiten	22
Bedeutung und Aufgabe von RSH in <i>S.aureus</i> (Geiger et al. 2010 [9])	22
Interaktion zwischen Bakterien und Pflanzen (Naseem et al. 2013 [69])	27
AS Katabolismus in <i>S.aureus</i> (Halsey et al 2017 [70])	31
Motivation und Ziel	38
Material und Methoden	39
Wachstumsexperimente	39
Netzwerkgrenzen und Simulationsregeln	40
Simulation und Konstruktion des Netzwerks	41
Einbeziehung der in-vitro Resultate in die Simulation	43
Ergebnisse	50
Das Netzwerk	50
Wichtige zentrale Knoten	51
Logikgatter	58
Experimentelle- und Simulations-Ergebnisse	59
Wachstumsphänotypen der verschiedenen Stämme	59
Vergleich der in-vitro mit den in-silico Ergebnissen	61

Quantifizierung der Ergebnisse	64
Sieben Abhängigkeitsmuster der AS-Synthese von zentralen Knoten	65
Essentielle AS	68
Anpassung an Nahrungsstress	69
<i>Diskussion</i>	71
In-vitro – in-silico Vergleiche	71
Der AS-Synthese-Metabolismus	77
Betrachtung der Synthesewege	77
CodY als zentraler Regulator	80
Essentielle Aminosäuren	81
Erklärung für die Essentialität	84
Wachstum als Surrogatparameter der AS-Synthese	86
Praktische Bedeutung dieser Arbeit	86
<i>Fazit</i>	90
<i>Zusammenfassung</i>	92
<i>Literatur</i>	93
<i>Appendix</i>	100
<i>Erklärung zum Eigenanteil</i>	137
<i>Danksagung</i>	138

EINLEITUNG

STAPHYLOCOCCUS AUREUS (S.AUREUS)

Staphylococcus aureus (S.aureus) ist ein gram-positives Bakterium. Sein Name leitet sich aus dem altgriechischen und lateinischen ab und bezieht sich auf sein Aussehen. Es ist rund (kokkos), typischerweise mit einem Durchmesser von etwa 1µm, angeordnet wie Weintrauben an der Rebe (staphyle), mit einer charakteristischen goldgelben Färbung (aureus), die auf von *S.aureus* produzierte Carotinoide zurückzuführen ist. Diese wirken als Antioxidantien und schützen die Bakterien vermutlich vor schädlichen, beispielsweise durch das Immunsystem produzierte Oxidantien wie Wasserstoffperoxid [1]. Durch das charakteristische Erscheinungsbild unter dem Mikroskop aber, vor allem auch durch diese markante Färbung, lässt sich *S.aureus* recht gut von anderen Bakterien unterscheiden. Weitere Möglichkeiten, um *S.aureus* nachzuweisen und von anderen Bakterien zu unterscheiden, sind positive Ergebnisse beim Coagulase-, Mannitolfermentations- und Desoxyribonuclease-Test [2]. *S.aureus* ist eigenständig nicht mobil, kann sich aber mit Hilfe der Umwelt, wie zum Beispiel dem Blutstrom, fortbewegen, bildet dafür aber keine Sporen. *S.aureus* lebt aerob oder fakultativ aerob und besitzt ein Genom von etwa 2800 Basenpaaren auf einem zirkulären Chromosom [2].

S.aureus besiedelt nicht nur Menschen, sondern auch Tiere. Er ist häufig Teil der natürlichen Wirtsflora ohne Infektionen zu verursachen (kommensaler Lebensstil). Es ist aber auch eines der bedeutendsten Pathogene, verantwortlich für unzählige Krankheiten, insbesondere nosokomiale Infektionen. Durch *S.aureus* verursachte Krankheiten betreffen nahezu jede Region und jedes Organ des Körpers, von Haut und Wundinfektionen über Endokarditis und Gastritis bis zur Osteomyelitis [3]. Aber auch systemische, potentiell tödliche Erkrankungen wie das Toxische-Shock-Syndrom können durch *S.aureus* hervorgerufen werden [4]. Im veterinärmedizinischen Bereich ist vor allem die durch *S.aureus* ausgelöste Mastitis von besonderer Bedeutung [5].

Die Möglichkeit, sich verschiedensten Umweltbedingungen anzupassen, ist ausschlaggebend für die hohe Virulenz von *S.aureus*. Diese hohe Anpassungsfähigkeit

wurde bereits in einer Simulation über das Quorum Sensing (QS) in *S.aureus* gezeigt [6]. QS erlaubt es *S.aureus*, die Genexpression in einer Population zu steuern und damit perfekt an die Umgebung, die Situation und die Umweltbedingungen anzupassen [6]. Auch seine Möglichkeit, die vorhandenen Ressourcen perfekt zu nutzen und so unter unterschiedlichsten Umweltbedingungen mit einer großen Spannbreite verfügbarer Ressourcen zu überleben, ist ein wichtiger Beitrag zu dieser Effektivität [3]. In dieser Arbeit wurde die Stringent Response (SR); der wahrscheinlich bedeutendsten Mechanismus zur Regulation des Aminosäure(AS)-Metabolismus in *S.aureus*. SR ermöglicht es *S.aureus* außerdem, in Situationen mit limitierten Ressourcen, in denen *S.aureus* in Nahrungsstress gerät, klar zu kommen. CodY genauso wie CcpA und RSH scheinen eine entscheidende Rolle in diesem SR-Mechanismus zu spielen [7, 8, 9]. Siehe hierzu auch das Kapitel Stringent response (SR).

Wie viele andere Bakterienstämme kann auch *S.aureus*, wenn es mit Antibiotika behandelt wird, Resistenzen entwickeln. Auf diese Weise kommt es zur Entstehung multiresistenter oder auch Methicillin resistenter *S.aureus* Stämme (MRSA). Solche multiresistenten Stämme sind von hoher Bedeutung vor allem bei nosokomialen Infektionen. Hier war Vancomycin häufig die letzte medikamentöse Behandlungsoption. Allerdings entwickeln immer mehr *S.aureus*-Stämme nun auch eine Resistenz gegen Vancomycin. Dies macht es immer wichtiger, neue Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer, vor allem auch gegen Staphylococccen gerichteter Substanzen zu finden [10]. Eine solche Substanz könnte zum Beispiel in den AS-Metabolismus direkt eingreifen und so die Synthese von zum Überleben von *S.aureus* notwendigen AS verhindern. Ein heute schon existentes Beispiel hierfür ist das Antibiotikum Cotrimoxazol, eine Kombination aus Trimethoprim und Sulfamethoxazole, welche unabhängig voneinander die aufeinanderfolgenden Schritte des Folatsynthese-Stoffwechselweges hemmen und somit auch die Serin- und Glycinsynthese [11]. Auch die Beeinträchtigung oder Manipulation des SR-Mechanismus ist ein vielversprechender Ansatz zur Entwicklung neuer antibiotischer Substanzen. Beispiele hierfür sind Mupirocin und Indolmycin, welche beide die Bildung von beladenen tRNAs durch die Hemmung der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetase verhindern und so das Signal erzeugen, das zur Aktivierung der SR Mechanismen und damit zu einer Fehlregulation des AS-Metabolismus von *S.aureus* führt [12]. Durch den Einfluss auf die Virulenz von *S.aureus* bietet die SR auch einen guten experimentellen Ansatz zu deren Manipulation. Entsprechende

Medikamente könnten dabei helfen zu vermeiden, dass von *S.aureus* ein gefährlicher, invasiver, toxischer Phänotyp angenommen und so neues, gesundes Gewebe infiltriert und schlussendlich auch zerstört wird.

STRINGENT RESPONSE (SR)

Stringent Response (SR) ist ein bei Prokaryoten relativ weit verbreiteter Mechanismus zur Anpassung verschiedener Stoffwechselfvorgänge mit dem Ziel, im Falle von Nahrungsstress, also einer Unterversorgung mit zum Beispiel AS oder Kohlehydraten, die Stressresistenz zu erhöhen. So kann ein möglichst effizientes Wachstum erhalten oder in Extremsituationen sogar das Überleben gesichert werden [7]. Hierzu wird, vergleichbar mit einem Winterschlaf, der Stoffwechsel heruntergefahren und das Wachstum verlangsamt. Stoffwechselwege, die durch SR beeinflusst werden, sind zum Beispiel die AS-Synthese und -Gewinnung; sie werden je nach Bedarf und verbleibender Nahrungsressource gehemmt oder gestärkt [9]. Meistens werden die Transkription und Translation gehemmt, also die Proteinbiosynthese, aber auch Mechanismen für Wachstum und Zellteilung, wie die Synthese von Phospholipiden und Nucleotiden. Der Proteinabbau wird hingegen im Allgemeinen eher gefördert [9].

SR IN ESCHERICHIA COLI (GRAM-NEGATIV)

(p)ppGpp spielt bei der SR als wichtiger Initiator und Alarmon eine zentrale Rolle. In *E.coli*, einem der wichtigsten Modellorganismen zur Erforschung der SR, ist durch zahlreiche Studien in der Vergangenheit eine Verbindung zu vielen Stoffwechselprozessen nachgewiesen worden. (p)ppGpp knock-out Mutanten zeigen einen als „relaxed“ bezeichneten Phänotyp. Die sehr ressourcenintensiven, für Wachstum und Teilung unverzichtbaren Mechanismen wie RNA- und Proteinbiosynthese bleiben auch im Falle von Nahrungsstress unverändert aktiv [13]. Die (p)ppGpp knock-out Mutanten sind zudem auxotroph für elf AS, am ehesten, weil eine effektive Aktivierung der für die Synthese dieser AS wichtigen, normalerweise durch (p)ppGpp aktivierten Gene hier nicht stattfindet [14]. Diese „relaxed“-Phänotypen zeigen außerdem Veränderungen im Fettsäuremetabolismus [15, 16], der DNA Synthese [17, 18], der Synthese von Organellen der Zelloberflächen wie zum Beispiel Fimbrien und Flagellen [19, 20], und der Virulenz [21]. Wobei allerdings längst nicht bei allen Veränderungen der genaue, zugrunde liegende Prozess bekannt ist.

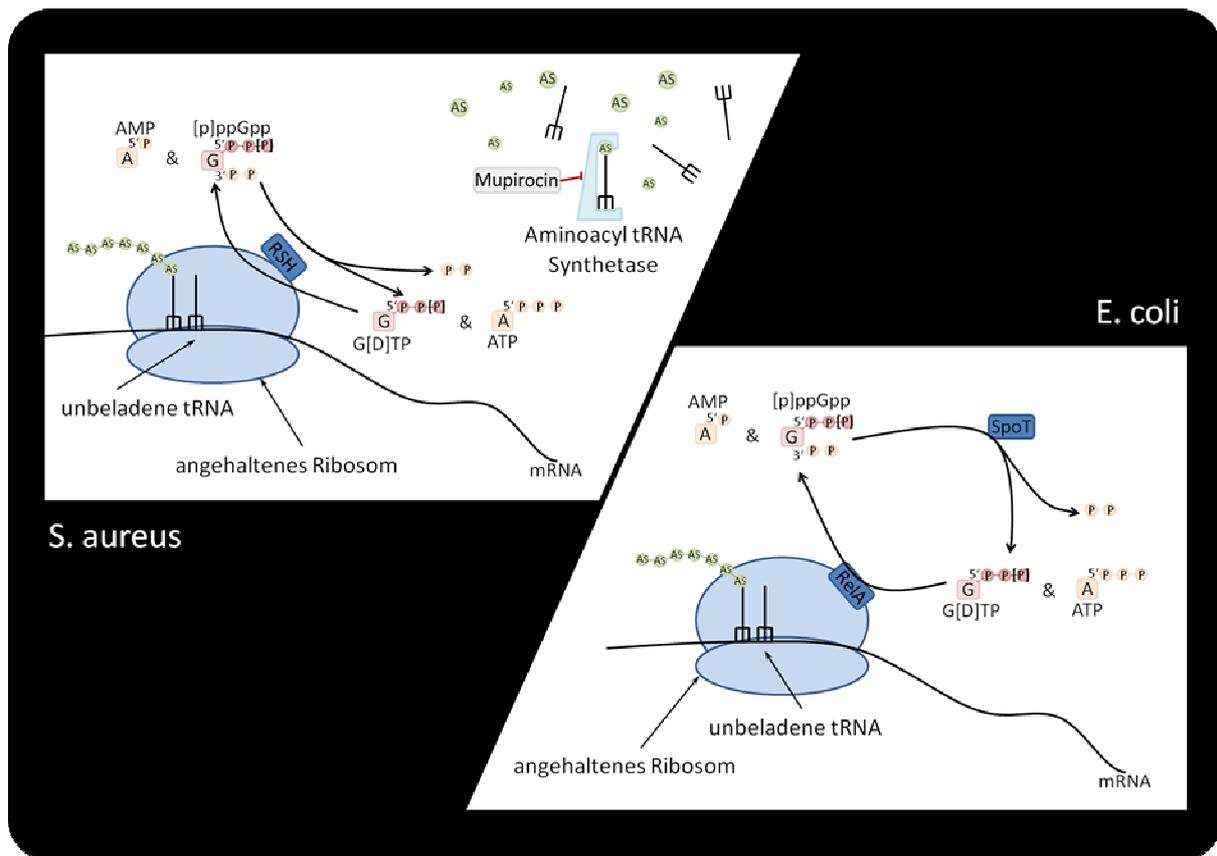


Abbildung 1: SR Mechanismus in *S.aureus* und *E. coli*: Hier sind die Mechanismen gezeigt, die zur Synthese des sowohl in *S.aureus* als auch in *E. coli* essentiellen (p)ppGpp führen. Wichtig für die Initiation ist jeweils ein Mangel an AS. Für eine Erläuterung der Mechanismen siehe auch Fließtext. (Eigene Darstellung).

(p)ppGpp wird in *E.coli* durch RelA aus GTP oder GDP und ATP synthetisiert. RelA kann funktionell in eine C-terminale und eine N-terminale Untereinheit eingeteilt werden, wobei die N-terminale Untereinheit die katalytische Einheit ist, also schlussendlich der Synthese von (p)ppGpp dient. Die C-terminale Untereinheit hingegen ist die regulatorische Einheit, welche also die Syntheseleistung von RelA steuert [22]. Nahrungsstress, genauer gesagt AS Mangel, führt zur Aktivierung von RelA. Durch fehlende AS können nicht mehr alle tRNAs besetzt werden. Bindet nun bei einer im Fortschreiten begriffenen Translation eine unbeladene tRNA an die A-Stelle des Ribosoms, kommt es zum Stillstand. Ein so angehaltenes Ribosom wird nun durch RelA erkannt, RelA bindet an dieses Ribosom und die C-Terminale Untereinheit wird aktiv. Nun wird durch RelA eine Triphosphatgruppe von ATP, für die Synthese von pppGpp auf das 3' Kohlenstoffatom von GTP und für die Synthese von ppGpp auf das 3' Kohlenstoffatom von GDP, übertragen [23]. (p)ppGpp bindet nun mit Hilfe des Proteins DksA an die RNA Polymerase und kann so direkt die Genexpression regulieren [23]. Auch SpoT spielt in der Steuerung des (p)ppGpp Levels und damit der SR eine

entscheidende Rolle. SpoT selber ist zum einen, wenn auch nur in geringem Maße, zur Synthese von (p)ppGpp in der Lage, zum anderen liegt aber die eigentliche und wichtigere Aufgabe von SpoT im Abbau von (p)ppGpp zu GTP beziehungsweise GDP und damit in der Beendigung des SR-Zustandes [23] (siehe auch Abbildung 1).

SR IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS (S.AUREUS) (GRAM-POSITIV)

(p)ppGpp spielt auch für die SR in *S.aureus* als Alarmon eine zentrale Rolle. RSH (RelA/SpoT homolog) ist nach der, zuerst in Protobakterien beschriebenen, konservierten, synthetischen Domäne (RelA/SpoT) benannt. RSH ist ein cytoplasmatisches Enzym mit einer regulatorischen C-terminalen und einer enzymatischen N-terminalen Domäne [9]. Die Synthese von (p)ppGpp über RSH wird durch Nährstoffmangel induziert. Hier spielen vor allem akkumulierende unbeladene t-RNAs und insbesondere auch unbeladene Ile-t-RNA eine wichtige Rolle. Auf diese Weise wirkt das, vor allem auch gegen *S.aureus* potente Antibiotikum Mupirocin SR, anregend; es hemmt die Isoleucin Aminoacyl tRNA-Synthetase [9, 24]. Mupirocin führt also, genauso wie Nährstoffmangel und damit AS Mangel, zu mehr unbeladenen tRNAs, welche RSH aktivieren und so zu einem Anstieg von (p)ppGpp und einem Abfall von GTP, dem Edukt von (p)ppGpp, führen [9] (siehe auch Abbildung 1). GTP wiederum ist entscheidend für die repressive Funktion von CodY [25]. SR sowie AS-Mangel bewirken damit eine Hemmung von CodY, was wiederum zu einer Enthemmung in den durch CodY kontrollierten Teilen des AS-Metabolismus führt. (p)ppGpp hingegen hemmt und reguliert z.B. die Bildung von Ribosomen und damit die Translation und Replication. (p)ppGpp ermöglicht es so *S.aureus*, vor allem unter Nahrungsstress, Nährstoffe und AS zu sparen [9, 24, 26]. Die Fähigkeit in *S.aureus*, in einem gewissen Maß (p)ppGpp aus GTP zu synthetisieren, haben auch zwei weitere verkürzte Enzyme RelP und RelQ [27].

Eine besondere Rolle spielt CodY auch in der Regulation des Metabolismus der verzweigtkettigen Aminosäuren (branched chain amino acids -BCAA). Neben der Regulation durch GTP wird CodY auch durch Isoleucin aktiviert, woraus sich durch die Hemmung der Isoleucinsynthese über IlvCD ein negativer Feedbackmechanismus ergibt [7]. CodY selbst ist mit fünfzehn inhibierenden Effenzen in dieser Simulation einer der bedeutendsten Regulatoren zur Kontrolle des AS-Metabolismus in *S.aureus*. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass CodY einer der Hauptregulatoren in der Expression der für die Virulenz relevanten Gene ist [7, 28]. Die Hemmung von Agr via CodY in Situationen ohne Ressourcenmangel scheint hier einer der wichtigsten Faktoren

Bedeutung sind hier die Glykolyse, aber vor allem der Zitronensäurezyklus, wohl die zentralsten aller Stoffwechselwege der Zellen. Aber auch andersherum können AS abgebaut und zur Energiegewinnung zum Beispiel wieder in die Gluconeogenese oder den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden. Der von Glykolyse und Gluconeogenese abzweigende Pentose-Phosphat-Weg stellt eine weitere Verbindungsstelle der AS-Synthese mit dem Energiestoffwechsel der Zellen dar [31, 32]. Ein wichtiger Knotenpunkt und eine zentrale Substanz vieler metabolischer Prozesse, auch im weit verzweigten AS-Metabolismus, ist das Pyruvat, das gleichzeitig auch das Verbindungsstück zwischen Zitronensäurezyklus und Glykolyse beziehungsweise Gluconeogenese darstellt [31, 32] (siehe auch Abbildung 3 für eine Übersicht).

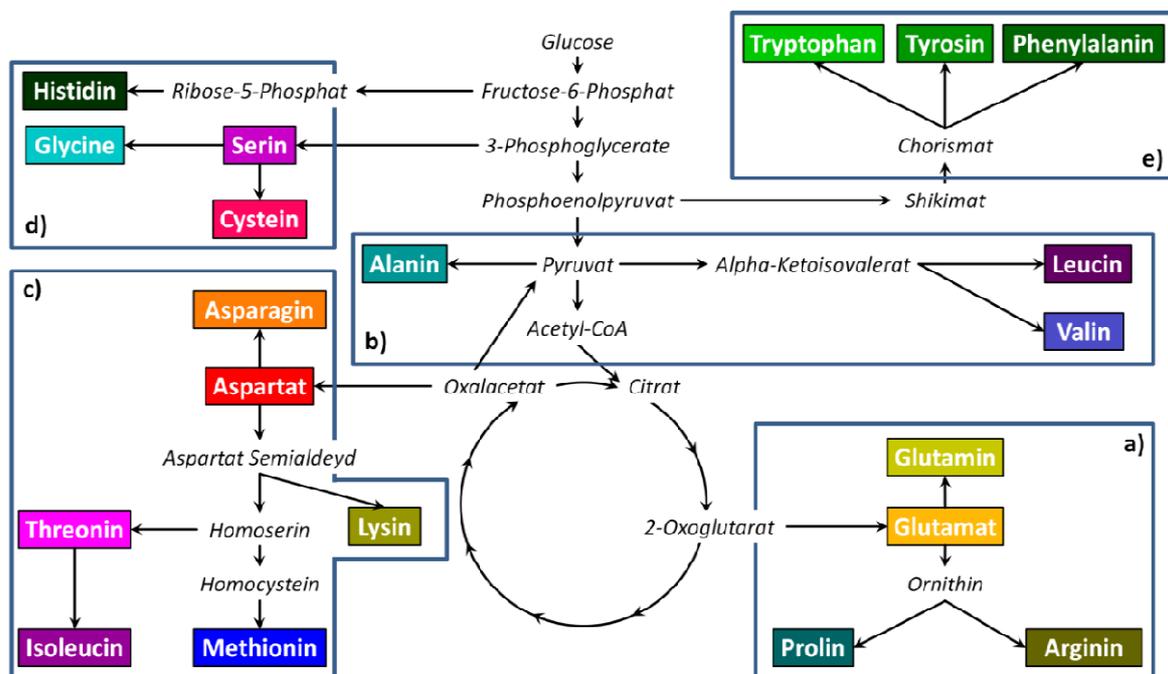


Abbildung 3: Übersicht AS-Metabolismus: Hier wird eine verkürzte und vereinfachte und damit übersichtlichere schematische Darstellung des AS-Metabolismus, vor allem der anabolen Wege gezeigt (igene Darstellung).

Kaum ein Organismus ist allerdings in der Lage, den gesamten AS-Metabolismus aufrecht zu erhalten, sodass die meisten Organismen für einige der AS auxotroph sind. Wenn auch in verschiedenen Studien festgestellt wurde, dass *S.aureus*, vor allem von seinem Genom aus betrachtet, prinzipiell in der Lage sein sollte, alle AS selbständig zu produzieren, ergeben sich in den meisten Fällen doch Auxotrophien für einige der AS [13, 33, 34, 35, 36, 37]. Darüber hinaus ist auch nach wie vor der Begriff der Essentialität nicht eindeutig definiert. Beim Menschen können zum Beispiel die schwefelhaltigen AS

Methionin und Cystein nicht selbständig hergestellt werden, allerdings kann eine der beiden vorhanden ist die andere über Homocystein synthetisiert werden. Hier mangelt es also vor allem auch an einer Möglichkeit der Schwefelfixierung und der Einschleusung dieses Schwefels in den AS-Metabolismus, so wie das in vielen Pflanzen möglich ist [31]. Ähnliches gilt prinzipiell auch für die Versorgung mit Stickstoff. Eine Fixierung und Einschleusung in den AS-Metabolismus ist bei Menschen und in *S.aureus* im Gegensatz zu verschiedenen Pflanzen und anderen Bakterien nicht möglich. Die nicht essentiellen AS können also im engeren Sinne auch nicht ganz eigenständig synthetisiert werden [31, 13]. Eine Wichtige Rolle in der Verteilung und Speicherung spielen daher Aspartat und Glutamat, aus ihnen kann die Hälfte der anderen AS synthetisiert werden; außerdem können über die Aminotransferase ASAT die Aminogruppen zwischen Glutamat und Aspartat ausgetauscht werden. Die Aminotransferase ALAT hingegen erlaubt das Übertragen von Stickstoffgruppen von Glutamat auf Pyruvat und stellt damit die Stickstoffgruppen auch für die Synthese der anderen AS zur Verfügung [31, 32]. In diesem Zusammenhang ist auch die Möglichkeit der Stickstoffspeicherung wichtig. Unter energiereichen Bedingungen findet die Stickstoffspeicherung in Pflanzen vor allem im kohlenstoffreicheren Glutamin mit fünf C-Atomen und zwei N-Atomen statt, unter energieärmeren Bedingungen im kohlenstoffärmeren Asparagin jedoch mit nur vier C-Atomen und zwei N-Atomen [31]. Im Menschen sind die Aminosäuren Isoleucin, Leucin; Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin essentiell. Histidin und Arginin werden als semiessentiell bezeichnet und müssen nur in Phasen extremer Ressourcenausschöpfung, zum Beispiel im Wachstum oder nach schwerer Krankheit, zugeführt werden. Als bedingt essentiell werden AS bezeichnet, welche nur beim Ausfallen bestimmter Stoffwechselwege, zum Beispiel im Zuge einer Krankheit wie der Phenylketonurie, essentiell werden. Hierzu zählen Tyrosin, Arginin, Cystein und Glycin. Die restlichen sieben kanonischen AS Alanin, Asparagin, Aspartat, Glutamat, Glutamin, Prolin und Serin können eigenständig synthetisiert werden und gelten darum als nichtessentielle AS [31, 38].

Wichtige Regulatoren des AS-Metabolismus in *S.aureus* sind sicherlich einerseits CodY (siehe oben), auch mit seiner Verbindung zur SR, aber auch das durch CodY beeinflusste Met-Operon oder auch das Ilv-Operon.

CcpA, das „catabolite control protein A“, ist ein weiterer bedeutender Modulator des AS-Metabolismus und hat großen Einfluss auf die Ressourcenverteilung in *S.aureus*.

CcpA wird durch Glucose aktiviert und aktiviert seinerseits im Falle von Glucose-Verfügbarkeit Schlüssel-Enzyme des Glucose Metabolismus, welcher wiederum wichtige Produkte für den AS-Metabolismus zur Verfügung stellt [8]. Darüber hinaus hemmt CcpA direkt die Produktion einiger AS und nimmt so, in Abhängigkeit von der Glucose-Verfügbarkeit, Einfluss auf die Ressourcenverteilung [39] (siehe auch Abbildung 4 für eine Übersicht der durch CcpA regulierten Knoten).

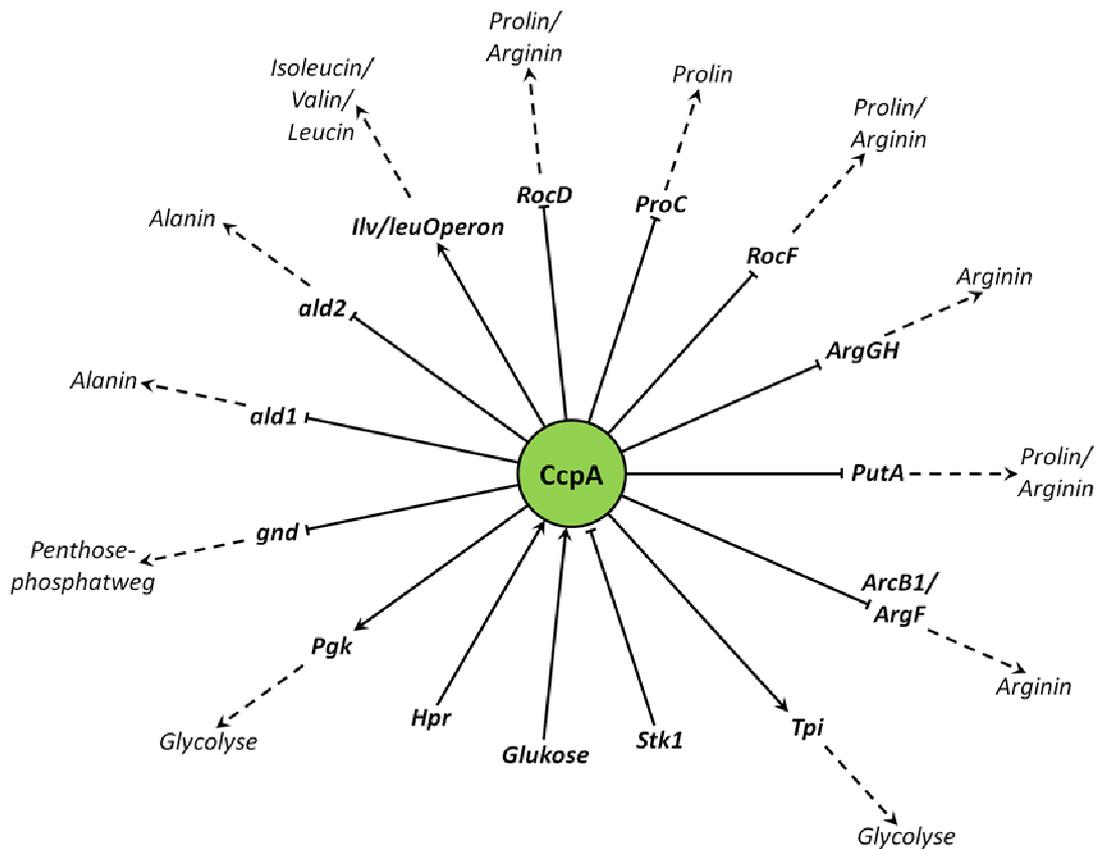


Abbildung 4: Efferenzen und Afferenzen von CcpA: Hier sind die efferenzen und afferenten aktivierenden und hemmenden Verbindungen von CcpA sowie deren Einfluss auf die AS-Synthese dargestellt. (Eigene Darstellung).

SYSTEMBIOLOGIE UND SYNTHETISCHE BIOLOGIE

Die Untersuchung komplexer Abläufe wie Signalkaskaden und Stoffwechselwege mit dem Ziel, Organismen als ganzes System zu verstehen, ist die Domäne der Systembiologie [40]. Hierin mit einbezogen werden theoretisch alle Ebenen, vom Genom über das Proteom bis zum "Verhalten" einer ganzen Zelle. Desweiteren dann aber auch die Interaktionen vieler Zellen und die daraus entstehenden Wechselwirkungen mit intrazellulären Mechanismen sowie mit Mechanismen des ganzen Organismus von

Hormonkaskaden bis hin zum Verhalten [41]. Wichtig für die Systembiologie sind also einerseits das Verhalten der einzelnen Komponenten eines funktionierenden biologischen Systems sowie deren Interaktion, aber andererseits auch die sich hieraus ergebenden Effekte, also Outputs, sowie die Abhängigkeit des Systems und seiner Komponenten von verschiedenen Inputs. Die systembiologischen Untersuchungen dienen jeweils dem Ziel, das Verhalten des Systems als Ganzes sowie seiner Komponenten zu verstehen und Vorhersagen zu ermöglichen [40, 41]. Aufgrund der hohen Komplexität der Systeme sowie der teilweise nur bruchstückhaft zur Verfügung stehenden Eingangsdaten spielen verschiedene Heuristiken sowie häufig darauf aufgebaute Computersimulationen eine wichtige Rolle. Jedoch macht auch die teilweise unübersichtliche Datenflut, wie sie zum Beispiel aus dem Humangenomprojekt oder anderen ähnlichen Arbeiten mit einer Vielzahl qualitativ hochwertiger Daten hervorgeht, die Auswertung und Betrachtung in Computersimulationen notwendig, da eine experimentelle Auswertung aller Möglichkeiten aufgrund der enormen Menge sonst unmöglich wäre. So ist es dann möglich, mit Hilfe von systembiologischen Ansätzen und Simulationen die wichtigsten und vielversprechendsten Ergebnisse vorzuselektieren, diese dann gezielt experimentell zu überprüfen, um so dann auch wieder den systembiologischen Ansatz zu stützen und zu verifizieren [42, 43]. Das Vorgehen in systembiologischen Ansätzen kann mit dem in Abbildung 5 dargestellten Schema gut beschrieben werden. Experimentelle Daten führen zu einer Hypothese oder werden einer Hypothese folgend ermittelt. Diese Daten werden dann meist auf Umwegen über weltweite Datenbanken oder zumindest unter Berücksichtigung von weiteren Daten aus Datenbanken in eine Simulation oder ein Modell integriert. Dieses Modell wird dann einerseits wieder anhand von weiteren Daten überprüft und verifiziert und gegebenenfalls verbessert; andererseits ergeben sich aus dem Modell dann aber auch neue Hypothesen oder alte können korrigiert, präzisiert oder bestätigt werden. Aus der Systembiologie ergeben sich also gut erforschte sowie getestete und verifizierte Systeme, welche in vivo existieren und funktionieren und bei denen der Einfluss verschiedener Inputs, die Mechanismen im System sowie die jeweils erreichten Outputs bekannt sind [40, 41].

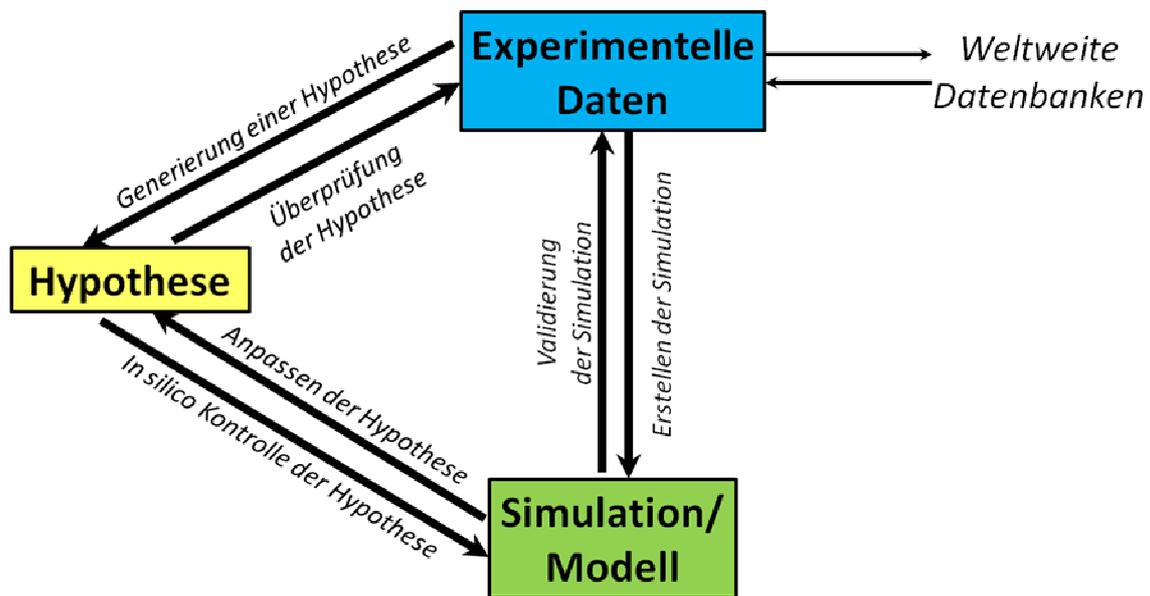


Abbildung 5: Schema einer systembiologischen Herangehensweise: In diesem Schema ist die Entwicklung einer systembiologischen Hypothese dargestellt. Die Hypothese wird aufgrund eigener oder aus Datenbanken bezogener experimenteller Daten generiert. Hieraus wird eine Simulation unter Verwendung der Daten erstellt, die dann wiederum mit der Hypothese und den bestehenden, aber auch neuen Daten verglichen und so validiert wird.

Synthetische Biologie ist der Wissenschaftszweig, der sich damit beschäftigt, wie biologische Komponenten, also biologische Systeme und Strukturen genutzt werden können, um nicht natürlich existierende biologische Systeme zu schaffen. Solche biologischen Komponenten sollten ähnlich wie Legosteine leicht verbunden und kombiniert werden können, um so theoretisch künstliche biologische Systeme bis hin zu Organismen konstruieren zu können [44]. Beispiele für solche biologischen Komponenten sind Enzyme, genetische Regelkreise, Signalkaskaden, Stoffwechselwege oder sogar ganze Zellen und Organe. Biologische Komponenten sind also unabhängige biologische Einheiten, welche miteinander kombiniert und zusammengesetzt werden können, um so ihre vordefinierte Funktion in einem neuen Kontext zu erfüllen. Als Komponenten können hierfür schon bestehende biologische Einheiten so genutzt werden, wie sie auch in der Natur zu finden sind, oder sie können modelliert und verändert werden, um bestimmte Voraussetzungen zu erfüllen. Konkrete Beispiele für solche biologischen Komponenten sind das Quorumsensing System, der AS-Metabolismus oder die SR, wie sie unter anderem in *S.aureus* gefunden werden können.

Biologische Komponenten können mit elektronischen Komponenten, zum Beispiel Widerständen oder Kondensatoren, verglichen werden, wie sie in elektrischen Schaltkreisen verwendet werden. Wie also Ingenieure heutzutage zusammengesetzte Schaltkreise, Prozessoren und andere technische Systeme aus einzelnen technischen Komponenten konstruieren und produzieren, ist es das Ziel der synthetischen Biologie, konstruierte biologische Systeme zu entwerfen und herzustellen [45]. Ein möglicher Weg ist, dafür bestehende Organismen zu verwenden und sie mit neuen Komponenten und so auch neuen Funktionen auszustatten. Ein anderer, komplizierterer Weg und ein großes Ziel der synthetischen Biologie ist es, lebende Organismen aus den einzelnen Komponenten zu schaffen und sie mit den gewünschten und ggf. neuartigen Eigenschaften und Funktionen auszustatten. Es ist also das Ziel, emergente Eigenschaften von lebenden Organismen durch das Zusammenfügen unbelebter Teile und damit auch sich reproduzierende, der darwinschen Evolution folgende Systeme zu erschaffen [45]. Hierfür können beispielsweise Minimalorganismen, also Organismen welche mit nur den wichtigsten grundlegenden Komponenten und Genen auskommen, entwickelt und dann genutzt werden. Diese Minimalorganismen dienen dann als Grundeinheiten, die ausgebaut und so für Verschiedene Anwendungen und Aufgaben ausgestattet werden können. Das besondere solcher Systeme ist, dass sie Konzepte wie Genetik, Vererbung, Evolution und Selbstreproduktion auf künstliche Systeme übertragen [46]. Im Falle von *S.aureus* können die SR, ihr Einfluss auf den AS Metabolismus und natürlich auch der AS-Metabolismus selber, aber auch Systeme wie das auf Agr basierende QS-System [6] solche Komponenten sein, die zur Veränderung von existierenden oder zur Erschaffung neuer Organismen genutzt werden können. Gerade der AS-Metabolismus oder Teile von ihm können für die Entwicklung von synthetischen Organismen eine wichtige Rolle spielen. Die regulatorischen Systeme wie die SR oder das QS können zur Regulierung und Steuerung anderer biologischer Einheiten verwendet werden. Eine andere Möglichkeit ist, durch die weitere Analyse der Mechanismen in *S.aureus* diese auf ein mögliches Minimum zu reduzieren und so nicht von Grund auf, sondern durch Reduktion ein Minimalorganismus zu erhalten. Die regulatorischen Systeme oder Teile der Stoffwechselwege könnten auch isoliert und ihre Mechanismen so zur Konstruktion von zum Beispiel Logikgattern genutzt werden.

Genauso wie in vielen anderen Stoffwechselwegen sind auch in den AS-Synthesewegen von *S.aureus* nicht nur die Edukte, sondern auch die entsprechenden Enzyme für die Stoffwechselreaktion unabdingbar. In dieser Studie werden darum von mir entwickelte Logikgatter, und zwar in diesem Falle AND-Logikgatter genutzt. Bei der hier verwendeten Simulationsmethode SQUAD sind keine Logikgatter vorgesehen, weswegen die vorgegebenen Randbedingungen genutzt wurden, um AND Logikgatter auf dieser Basis zu konstruieren und schließlich auch für die Simulation zu nutzen.

Logikgatter stellen die Grundlage der binären Datenverarbeitung dar. Sie dienen der Verarbeitung binärer Eingangssignale zu binären Ausgangssignalen der booleanschen Logik folgend [47]. Meist sind diese Gatter als elektronische Schaltungen realisiert und erlauben die technische Darstellung simpler „wenn-dann-Beziehungen“. Die basalsten Logikgatter sind OR oder AND und NOT. Hieraus lassen sich prinzipiell die anderen Logikgatter XOR, NAND, NOR, XNOR sowie alle möglichen anderen Verschaltungen komplizierterer Logikabfolgen erstellen [47]. Logikgatter haben ihren Ursprung in der Elektrotechnik und spielen eine große Rolle bei Schaltungen in Computern, können aber prinzipiell auch chemisch, biologisch oder mechanisch konstruiert werden [48, 49]. So wie zum Beispiel auch im ersten von Conrad Zuse entwickelten Computer Z1, in dem elektromechanisch konstruierte Logikgatter zum Einsatz kamen [50]. Zur Darstellung der Eingangs- und möglichen Ausgangssignale werden Wahrheitstabellen verwendet, in denen alle möglichen Kombinationen der Eingangssignale zusammen mit den möglichen Ausgangssignalen aufgelistet sind

Mit zunehmender Leistungsfähigkeit und Verbreitung von PCs, aber auch mit zunehmender Menge und Komplexität der zur Verfügung stehenden Daten hat sich in den letzten Jahrzehnten das Interesse immer mehr auf das Studium der oft sehr komplexen Interaktionen einzelner Moleküle in biologischen Systemen ausgedehnt. Beispiele hierfür sind Signalkaskaden, Stoffwechselwege oder anderen regulatorischen Netzwerke [40].

Um ein besseres Verständnis und einen besseren Einblick zu bekommen und die komplexen Interaktionen studieren zu können, die im SR-Mechanismus, in dessen

Einfluss auf den AS-Metabolismus genauso wie im AS-Metabolismus selbst ablaufen, wurde der gesamte SR-Mechanismus von *S.aureus* genauso wie die AS-Synthesewege und deren Interaktionen modelliert.

Neben der Möglichkeit einer booleanschen Simulation gibt es verschiedene andere Methoden, ein solch komplexes Netzwerk zu modellieren. Der mathematische Ansatz ist sehr exakt, allerdings ist es sehr komplex, die Simulation zu erstellen und zu nutzen. Darüber hinaus sind Bearbeitung und Veränderungen an solchen mathematischen Modellen üblicherweise ein großer Aufwand. Auf der anderen Seite ist ein booleansches Netzwerk aus Knoten, die einander aktivieren oder inhibieren, leicht zu erstellen und zu bearbeiten, und Änderungen können leicht eingefügt werden.

Kinetische Daten und Stöchiometrie wie zum Beispiel Aktivierungsstärke oder die Anzahl der beteiligten Moleküle sind von besonderer Bedeutung für solche Netzwerke. Mindestens genauso wichtig ist aber auch die Art der Verbindung (aktivierend oder hemmend). Diese Art der Interaktion zwischen den verschiedenen Molekülen steht häufig zur Verfügung, da sie in den meisten Fällen experimentell recht einfach herauszufinden ist. Stöchiometrische und kinetische Daten hingegen sind häufig sehr schwer zu ermitteln und stehen darum für die meisten der beschriebenen Interaktionen nicht zur Verfügung. Gerade diese Daten sind aber für die Modellierung einer Signalkaskade häufig essentiell.

Um diesen Mangel auszugleichen wurde von Mendoza et al. [51] ein hybrides Modellierungssystem entwickelt, welches sie als „Standardized Qualitative Dynamical System“ bezeichneten und mit welchem diskrete booleansche und kontinuierliche Modellierungsansätze verbunden werden. Somit wurden dynamische Simulationen, ohne dass die exakten kinetischen Daten vorliegen müssen, möglich. Klassische booleansche Netzwerke sind digital, in ihnen können Knoten also nur die zwei Zustände 1 (An) und 0 (Aus) annehmen. Ihre Aktivität wird durch Interaktion mit benachbarten Knoten über entweder aktivierende oder hemmende Verbindungen reguliert [51]. SQUAD erstellt nun, unter Zuhilfenahme von gewöhnlichen Differentialgleichungen, für jeden der Knoten im Netzwerk eine kontinuierliche Reihe von Werten, die jeweils mit den beiden booleanschen Ausgangswerten 0 und 1 beginnt und endet [51, 52]. Mit booleanschen Netzwerken erhält man umgehend semiquantitative Daten von allen in das simulierte System mit einbezogenen Knoten. Deswegen haben sie sich als besonders

nützlich für das Verständnis von komplexen Signalkaskaden gezeigt, zumal man darüber hinaus noch Informationen über qualitative Veränderungen des gesamten Systems erhält [51, 52]. Ein großer Vorteil dieser booleanschen Netzwerke ist, dass sie direkt aus der Netzwerktopologie erstellt werden können und somit ohne detaillierte kinetische Daten auskommen. Dies erlaubt Simulationen von Systemen, bei denen die kinetischen Eigenschaften der Interaktionen nicht bis ins Detail untersucht sind. In biologischen oder medizinischen Studien – zum Beispiel, wenn es darum geht, die Pathogenese einer Infektion zu verstehen oder nach neuen Ansatzpunkten für eine medikamentöse Intervention zu suchen – können solche Modelle somit hilfreiche Informationen liefern. Booleansche Simulationen können also einen ersten Schritt zur Aufklärung prinzipieller Mechanismen des untersuchten Systems darstellen, welche dann natürlich wieder hilfreich sind für die schlussendliche Aufklärung der tatsächlichen, den Interaktionen zugrunde liegenden Vorgänge und Kinetiken [53, 54]. Unterschiedliche Reaktionen des Systems auf verschiedene externe Stimuli, aber auch auf interne Veränderungen, also Veränderungen im Model selbst, wie z.B. knock-out Mutationen, können einfach simuliert und nachvollzogen werden. Darüber hinaus ist es sogar möglich, booleansche Netzwerke miteinander zu verbinden. Über das Zusammenfügen von Simulationen einzelner Systeme können Simulationen ganzer Zellen oder Mikroorganismen entstehen. Durch das Zusammenfügen verschiedener Zellmodelle wiederum ist es perspektivisch das Ziel, dynamische Simulationen ganzer mehrzelliger Organismen darzustellen [54]. Das Zusammenführen der einzelnen Simulationen stellt kein großes Problem dar, vorausgesetzt alle Simulationen wurden nach den gleichen Regeln erstellt. Schlatter et al. [55] schlägt Regeln vor, die für die Verbindung verschiedener booleanscher Netzwerke Beachtung finden sollten. Diese Regeln haben das Ziel, den Umgang mit zum Beispiel absoluten und relativen Zeiten und Ereignisabfolgen, mit quantitativen experimentellen Daten, mit Eingangs und Ausgangsknoten, aber auch mit unbekanntem oder postulierten Knoten zu vereinheitlichen. Angelehnt daran hier die von mir erstellten und für das konstruieren der booleanschen Simulation berücksichtigten Regeln (siehe auch [56]). Die Aktivierung eines Knotens oberhalb eines relevanten Schwellenwertes, der für einen relevanten Wechsel der Auswirkung des Knotens auf das Netzwerk ausschlaggebend ist, wird in der klassischen digitalen booleanschen Algebra, in der es nur "An" (1) und "Aus" (0) gibt, in aller Regel mit einer 1, eine Aktivierung unterhalb des Schwellenwertes hingegen mit einer 0 dargestellt. Die dynamische Simulation ermöglicht es, Knoten stufenlos zu simulieren; dafür müssen vor allem die

Extreme neu und exakter definiert werden. Der Wert „0“ stellt nun nicht mehr einfach nur eine Aktivierung unterhalb des Schwellenwertes dar, sondern repräsentiert tatsächlich die qualitative Abwesenheit des mit dem entsprechenden Knoten korrespondierenden biologischen Äquivalentes, wie das zum Beispiel in einer knock-out Mutante der Fall sein kann. Der Zustand „1“ sollte hingegen wie in den nicht dynamischen Simulationen nicht als absoluter quantitativer Wert angesehen werden, da durch die Simulation nur qualitative Aussagen getroffen werden können. Darüber hinaus stellt der Zustand „1“ zwar das höchste Aktivitätslevel dar, beschreibt aber nicht zwingend eine Aktivierung oberhalb eines Schwellenwertes mit einem im Vergleich zu anderen Aktivitätsleveln unterschiedlichen Einfluss auf das System. Darum sollten auch hier quantitativ unterschiedliche Werte nur dann in Betracht gezogen werden, wenn sich hieraus ein relevanter unterschiedlicher Einfluss auf das System ergibt, zum Beispiel wenn ein Knoten bis über einen bestimmten Schwellenwert aktiviert wird. Das Netzwerk ist semiquantitativ, weswegen quantitative experimentelle Daten allgemein nicht einfach übernommen werden können. Vielmehr sollten sowohl die relative Veränderung auch im Vergleich zu anderen Werten als auch der veränderte Einfluss auf das System –zum Beispiel, wenn sich eine Veränderung des Aktivitätslevels über einen Schwellenwert hinweg ergibt – bewertet und übernommen werden. Auch die zeitlichen Abläufe sind in der Simulation nicht eins zu eins repräsentiert und können nicht einfach mit den Zeiten der in-vitro Experimente verglichen werden. In der Simulation ergibt sich aus den Zeiten eher eine Angabe über die Abfolge der Ereignisse als die tatsächlichen exakten Zeiten. Es können also jeweils nur die zeitlichen Abfolgen von Ereignissen und nicht die konkreten Zeitabstände verglichen werden.

Eingangs- und Ausgangsknoten sind neben den normalen Knoten mit biologisch-chemischem Korrelat weitere Knoten, die in eine Simulation integriert werden können, um bestimmte Situationen zu simulieren und besser darzustellen. Konstante externe Einflüsse, wie zum Beispiel die Nährstoffverfügbarkeit im verwendeten Medium oder andere Umweltgegebenheiten, können mittels Eingangsknoten zusammengefasst und simuliert werden. In einem Ausgangsknoten hingegen werden Reaktionen des Netzwerks durch Integration hemmender und aktivierender Einflüsse aus dem gesamten Netzwerk zusammengefasst, wodurch der schlussendliche Effekt der Vorgänge innerhalb des Netzwerks in einem Knoten dargestellt wird. Der Knoten Translation in der hier vorgestellten Simulation sowie der Knoten Biofilm in meinem

letzten Netzwerk über die Simulation des Agr Systems und die Biofilmbildung in *S.aureus* [6] sind gute Beispiele für solche Ausgangsknoten. Eine weitere Klasse an Knoten, jedenfalls theoretisch mit biologisch-chemischem Korrelat, sind die postulierten Knoten. Wie ihr Name schon sagt, handelt es sich bei ihnen um postulierte, also nicht nachgewiesene Knoten. Mit ihrer Hilfe können in-vitro gefundene Interaktionen im Netzwerk und in den Reaktionen des Netzwerks in-silico nachvollziehbar gemacht und so untersucht werden. Sobald die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen aufgeklärt sind und die entsprechenden Informationen zur Verfügung stehen, müssen diese Knoten im Netzwerk natürlich umgehend durch eine Simulation der tatsächlichen Gegebenheiten ersetzt werden. Außerdem müssen diese postulierten Knoten bis dahin eindeutig als postulierte Knoten markiert und als solche erkennbar sein.

Das von DiCara et al. entwickelte und vorgestellte Programm SQUAD [43] ist nicht die einzige Möglichkeit, aus diskreten Simulationen kontinuierliche zu machen. Es gibt zahlreiche weitere Programme hierfür, wie das hier verwendete Programm Jimena [57], den CellNetAnalyzer (CNA) [58] oder Odefy [59]. Diese Programme sollen hier kurz vorgestellt und bezüglich ihrer Vor- und Nachteile verglichen werden. SQUAD [43] basiert, ebenso wie das zur Simulation des hier vorgestellten Netzwerks verwendete Programm Jimena, auf Java und beide haben eine einfach zu handhabende graphische Oberfläche. Sie erlauben außerdem eine dynamische Simulation, inklusive der Erstellung von Perturbationen, um das Verhalten des gesamten Systems sowie die Bedeutung und den Einfluss jedes einzelnen Knotens zu untersuchen. Sowohl SQUAD als auch Jimena verwenden hierfür den von Mendoza et al. entwickelten und vorgestellten Standardized Qualitative Approach [51]. Mit diesem wird aus den Netzwerken ein System gewöhnlicher Differentialgleichungen erstellt und so ein booleansches Netzwerk in ein Standardized Qualitative Dynamical System umgewandelt. Hierzu wird ein heuristischer Algorithmus aus miteinander verknüpften Exponentialfunktionen verwendet, um so eine qualitative näherungsweise Abbildung der Realität im Netzwerkverhalten zu erreichen. Alle für diesen Prozess benötigten Gleichungen werden durch das jeweilige Programm automatisch beim Einlesen des in einem Extraprogramm erstellten booleanschen Netzwerks generiert und gelöst. Ein weiteres Programm für die Umwandlung von diskreten in kontinuierliche Simulationen ist der CellNetAnalyzer (CNA) [58]. Hierbei handelt es sich um eine Matlab-Werkzeugkiste. Der Vorteil, der sich hieraus ergibt, sind die zahlreichen verschiedenen Werkzeuge und Möglichkeiten, wie

zum Beispiel ein Werkzeug zur Analyse von Feedbackmechanismen und Stoffwechselwegen. Der Nachteil ist hier, dass oszillierende Knoten, welche vor allem in Netzwerken mit Rückkopplungsschleifen auftreten können, ausgeschlossen werden und nur Knoten berechnet werden, die sich einem Steady-State annähern. Odefy [59] ist ein weiteres wichtiges und viel genutztes Programm. Es verwendet eine als HillCube Interpolation bezeichnete Simulationstechnik, mit der die booleschen Netzwerke in Systeme aus Differentialgleichungen umgewandelt und so simuliert werden.

THEMENVERWANDTE ARBEITEN

BEDEUTUNG UND AUFGABE VON RSH IN S.AUREUS (GEIGER ET AL. 2010 [9])

RSH und seine Rolle in der Steuerung der SR wurde bereits in zahlreichen anderen Firmicuten untersucht [60, 61, 62, 63, 64, 65, 66]. In [9] zeigen Geiger et al. die Essentialität von RSH für das Wachstum von *S.aureus*. In *S.aureus* spielt die Bifunktionalität von RSH eine entscheidende Rolle für Wachstum und Überleben. RSH besitzt eine Synthase- und eine Hydrolase-Untereinheit. Um die Bedeutung von RSH und der einzelnen Untereinheiten besser darstellen zu können, wurden Experimente mit einer *rsh*-Mutante und mit einer *rsh*-Mutante, in der die Hydrolase-Untereinheit wiederhergestellt wurde (*rsh_{syn}*), durchgeführt.

In einem ersten Schritt konnten Geiger et al. [9] zeigen, dass eine fehlende Hydrolase-Untereinheit die Überlebensfähigkeit von *S.aureus* in einem nährstoffreichen Milieu drastisch senkt; ein Fehlen nur der Synthase-Einheit führt hingegen bei gutem Nährstoffangebot, also ohne Aktivierung der SR zu keiner relevanten Wachstumsminde rung (siehe auch Abbildung 6). Hier spielt laut Geiger et al. wahrscheinlich auch eine zumindest teilweise Übernahme der Syntheseleistung durch RelP/Q eine entscheidende Rolle. In Stämmen ohne die Hydrolase-Aktivität kommt es hingegen wahrscheinlich zu einer toxischen (p)ppGpp Akkumulation.

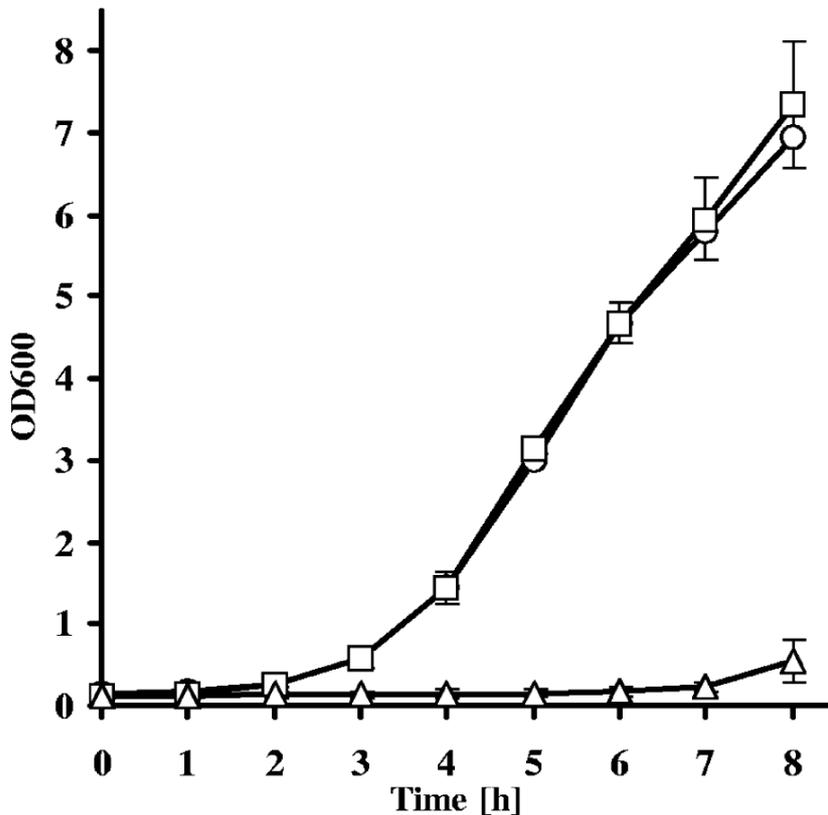


Abbildung 6: Wachstum ohne Nahrungsstress: Wachstum von WT (Kreis), der *rsh*-Mutante ohne die Hydrolase- und die Synthase-Untereinheit (Dreieck) und die *rsh_{syn}* Mutante mit wiederhergestellter Hydrolase-Einheit bei verbleibender Deaktivierung der Synthase-Einheit (Viereck) im Vollmedium, also ohne Nahrungsstress und ohne Induktion der SR (Abbildung aus Geiger et al. 2010 [9]).

In nährstoffarmen Milieus allerdings, in denen es auch zu einer Induktion der SR kommt, wird die Bedeutung der Synthase-Einheit und des Vorhandenseins von pppGpp ersichtlich. In der Arbeit von Geiger et al. wird die SR durch den Entzug von Leucin und Valin oder durch Behandlung mit Mupirocin induziert. Dabei konnte gezeigt werden, wie es durch eine aktivierte RSH Synthase-Einheit zu einer gesteigerten Umwandlung von GTP in (p)ppGpp kommt. Ohne Aktivierung der SR und bei defekter RSH Synthase-Einheit kann diese Umwandlung hingegen nicht beobachtet werden (siehe auch Abbildung 7).

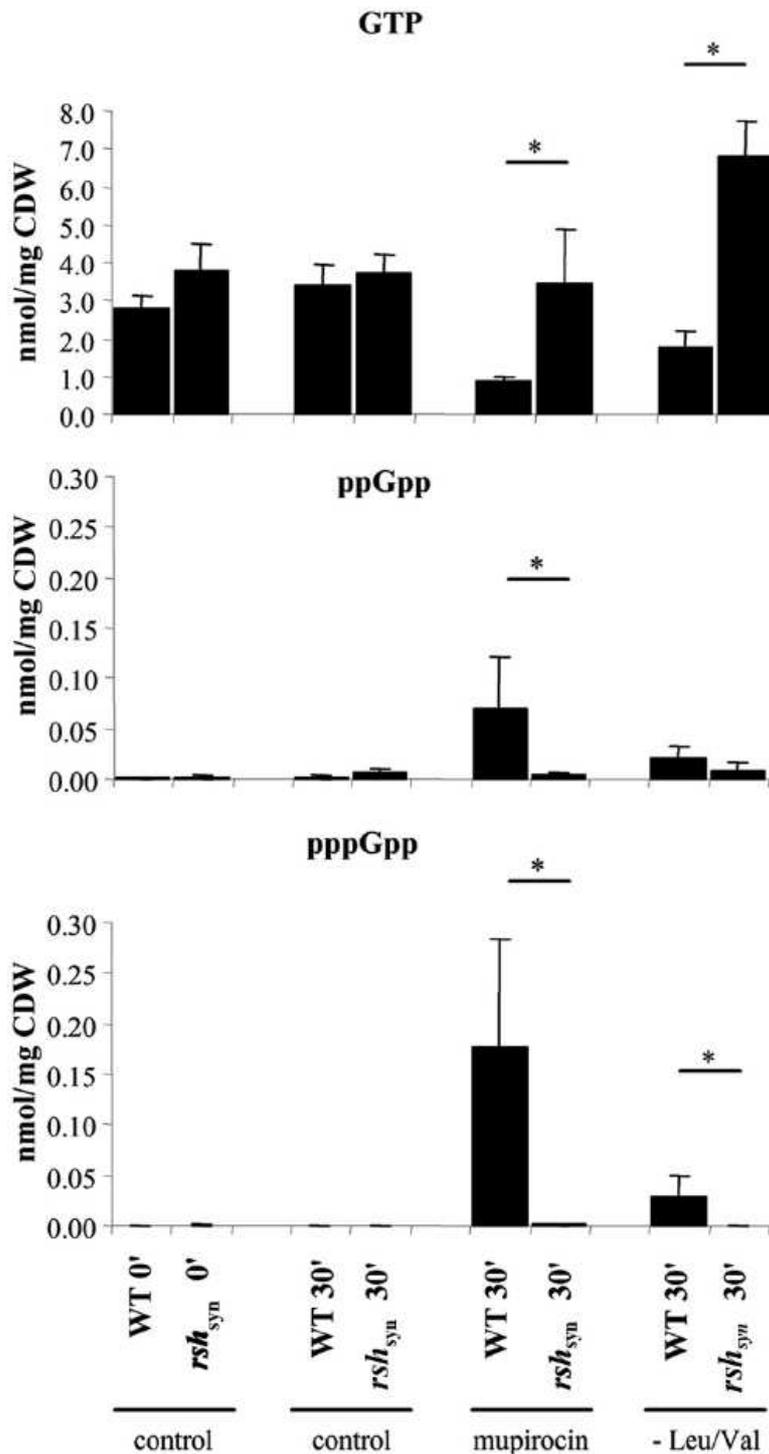


Abbildung 7: SR induzierte und RSH vermittelte Umwandlung von GTP in (p)ppGpp: Syntheseleistung von (p)ppGpp aus GTP in WT und *rsh_{syn}* nach 30 Minuten unter SR induzierenden Bedingungen (Mupirocin-Behandlung oder Leucin- und Valin-Entzug). Es ist zu erkennen, dass die SR, vermittelt über die Synthese-Untereinheit von RSH, zu einer Umwandlung von GTP in ppGpp und pppGpp und damit auch zu einer Verminderung von GTP führt. Sowohl ohne die Induktion der SR als auch bei ausgeschalteter RSH-Synthase ist diese Umwandlung nicht darstellbar (Abbildung aus Geiger et al. 2010 [9]).

Die Auswirkung auf die Überlebens- und Wachstumsfähigkeit von *S.aureus* zeigt Abbildung 8. Stämme, die ohne Nahrungsstress bebrütet werden, zeigen keinen Unterschied im Wachstum. Nahrungsstress allerdings senkt die Wachstums- und Überlebensfähigkeit des WT-Stammes in geringem Ausmaß, die der *rsh_{syn}* Mutante aber sehr deutlich. Dies zeigt die Bedeutung der RSH-Synthase für das Überleben und Wachstum von *S.aureus* unter Nahrungsstress, also unter Bedingungen, in denen die SR getriggert wird.

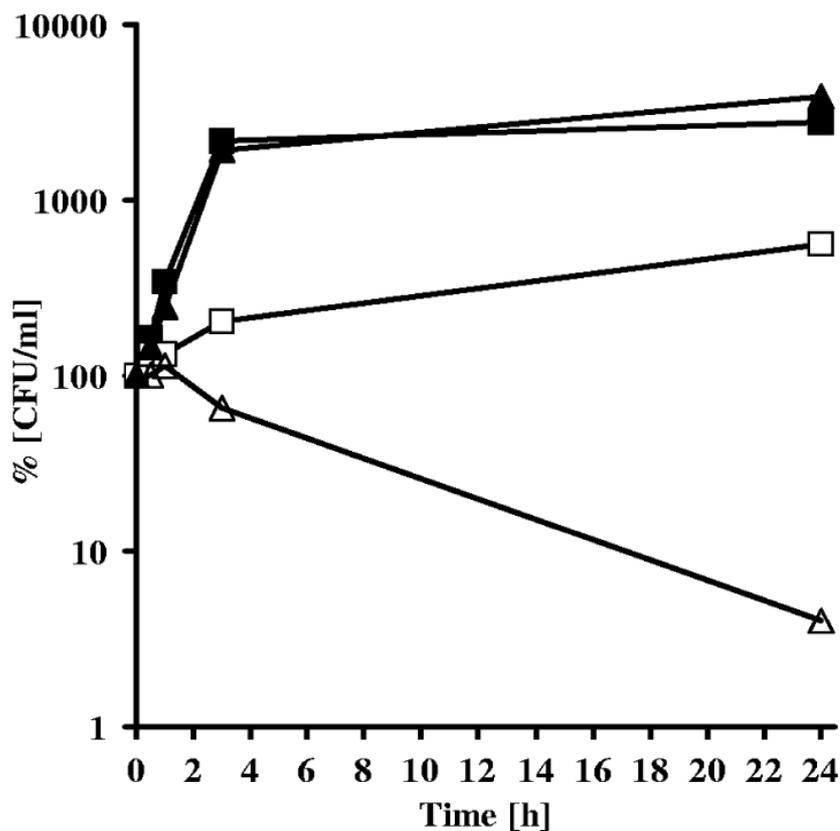


Abbildung 8: Wachstum unter Normalbedingungen und unter SR induzierenden Bedingungen: Die Kurven mit den ausgefüllten Symbolen repräsentieren die normale- und die leeren Symbole die SR induzierende Situation unter Leucin- und Valin-Entzug. Dreiecke stellen jeweils die *rsh_{syn}* Mutante und das Viereck den WT dar. Die Wachstums- und Überlebensfähigkeit ist unter SR-Bedingungen deutlich gemindert, vor allem in der *rsh_{syn}* Mutante (Abbildung aus Geiger et al. 2010 [9]).

In ihrer Arbeit konnten Geiger et al [24] auch den weiteren Signalweg nach Aktivierung der SR durch Entzug der verzweigt-kettigen AS Leucin und Valin darstellen. Es gibt zahlreiche durch RSH gehemmte und aktivierte Gene. Gehemmt werden vor

allem Gene, die zur Steigerung der Translation dienen, also vermehrt AS verbrauchen würden. Aktiviert werden hingegen Gene, die der Synthese von AS dienen. Ein Großteil der Regulation findet aber, wie auch schon in anderen Firmicuten gezeigt [63, 67, 68], über die Aktivierung von CodY statt [24]. CodY entfaltet, nachdem es das durch *rsh_{syn}* abgebaute GTP gebunden hat, seine hemmende Wirkung auf seine Zielgene durch Bindung an spezielle CodY Bindestellen. RSH enthemmt also die Synthese dieser durch CodY regulierten Gene.

In ihrer Arbeit konnten Geiger et al. also die Bedeutung von RSH und seiner Untereinheiten in der Signalkaskade der SR in *S.aureus* darstellen. Die Synthase-Untereinheit dient der Anpassung von *S.aureus* an Situationen mit Nahrungsstress, also der Induktion der SR, welche die AS verbrauchenden Mechanismen herunter und die AS produzierenden Mechanismen herauf reguliert. Die Hydrolase-Untereinheit hingegen hilft bei der Beendigung dieses Prozesses und erlaubt so die Rückkehr zu und das Aufrechterhalten von Stoffwechselmechanismen mit der größten Effizienz in Situationen ohne Nährstoffstress. Abbildung 9 zeigt nochmal sehr schön die Bedeutung von RSH und CodY für das Überleben und die Virulenz von *S.aureus* in einem Maus-Infektions-Modell. Dieses Bild der gestaffelten Abhängigkeit von CodY und RSH lässt sich auch, einmal deutlicher und einmal weniger deutlich, in den AS-Wachstumskurven in dieser Arbeit beobachten (vergleiche z.B. Abbildung 21).

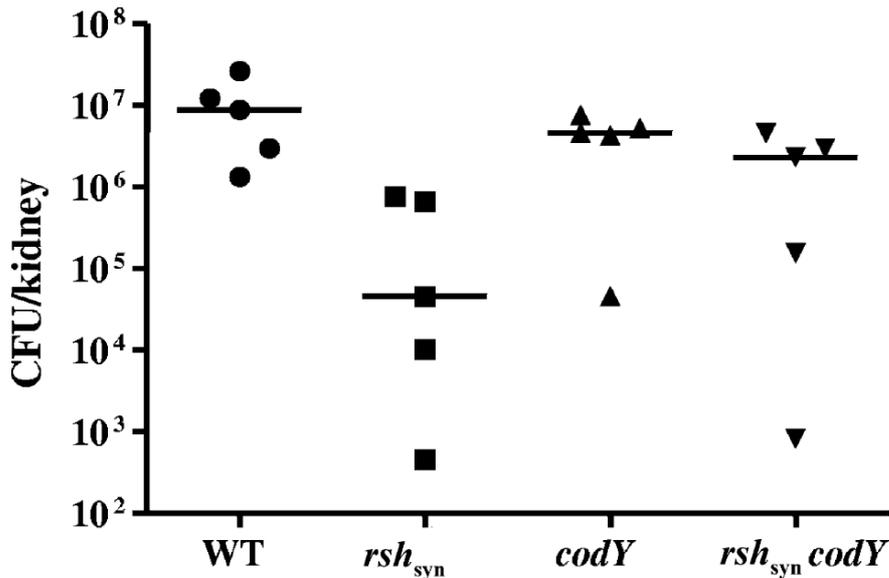


Abbildung 9: Wachstum verschiedener Stämme in einem Maus-Infektions-Modell: Hier ist die Bedeutung der Enthemmung der AS-Synthese durch die Repression von CodY unter SR-Bedingungen gut zu erkennen. Im WT ist eine Hemmung von CodY möglich, da GTP unter SR-Bedingungen zu (p)ppGpp umgewandelt wird und so CodY nicht mehr aktivieren kann. Dieser Mechanismus fällt in den *rsh_{syn}* Mutanten weg, kommt allerdings in der *codY*- Mutante logischerweise nicht zum Tragen (Abbildung aus Geiger et al. 2010 [9]).

INTERAKTION ZWISCHEN BAKTERIEN UND PFLANZEN (NASEEM ET AL. 2013 [69])

Booleansche Modellierung und Simulationen können für verschiedene Fragestellungen verwendet werden. Ein gutes Beispiel, an dem auch sehr gut die Verwendung und der Nutzen von Input und Output-Knoten gesehen werden kann, ist die Arbeit von Naseem et al. [69]. Hier wird, im Rahmen einer Infektion mit *Pseudomonas* (Pst DC3000), der Einfluss der Input-Knoten Zytokin und Auxin auf das Immunsystem von Arabidopsis, welches durch den Output-Knoten PR1 repräsentiert wird, simuliert. Abbildung 10a zeigt sowohl das komplette für die Simulation verwendete Netzwerklayout mit der komplexen Reaktion des Immunsystems in Arabidopsis sowie der Aktivierung von Virulenzfaktoren in Pst DC3000, aber auch die Interaktion zwischen Wirt und Pathogen. Ebenfalls zu erkennen sind die Input-Knoten Auxin und Zytokin, aber auch der Output-Knoten PR1. Abbildung 10b zeigt nochmal eine schematische, übersichtlichere Darstellung der wichtigsten Verschaltungen und Interaktionen.

a



b

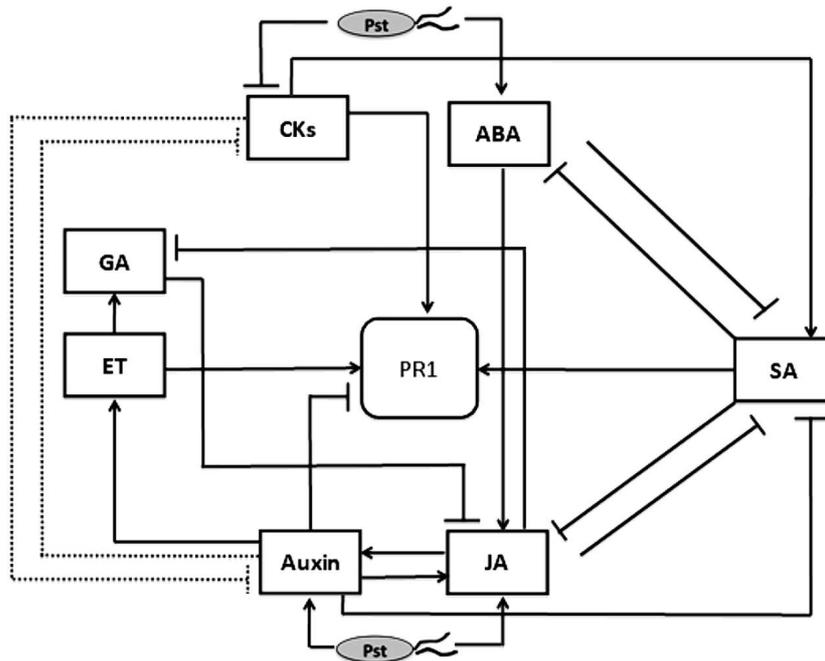


Abbildung 10: Boolesches Modell und schematisches Layout des hormonellen Crosstalk zwischen Pseudomonas und Arabidopsis. a: Im oberen Teil sind die Mechanismen von Pst DC3000 abgebildet, die auf die im unteren Teil dargestellten Reaktionsmechanismen der Immunreaktion von Arabidopsis einwirken. Auxin als hemmender und Zytokin als aktivierender Haupt-Eingangsknoten sind genauso repräsentiert wie der Haupt-Ausgangsknoten des Arabidopsis Immunsystems PR1. b: Auch im schematischen Layout sind die Eingangsknoten Auxin und Zytokin sowie ihre Interaktionen zum Beispiel mit JA und *S.aureus*, aber auch der Ausgangsknoten PR1 zu erkennen (Abbildung aus Naseem et al. 2013 [69]).

Eine Infektion von Arabidopsis mit Pst DC300 führt zu einer Steigerung der Auxinproduktion, wohingegen Zytokine gehemmt werden. Salizylsäure wird wiederum durch Auxin gehemmt und durch Zytokine aktiviert, sodass sich insgesamt eine Hemmung der Salizylsäure durch eine Pst DC 3000 Infektion ergibt. Salizylsäure ist wieder über eine gegenseitige Hemmung mit sowohl Jasmonsäure als auch mit Abscisinsäure verbunden, die so also durch eine Pst DC3000 Infektion aktiviert werden. Jasmonsäure aktiviert nun wiederum die Auxinproduktion und kann seinerseits direkt durch Auxin aktiviert werden. Die sich selbst verstärkende gegenseitige Aktivierung von Auxin und Jasmonsäure führt nun einerseits indirekt über Ethylen zu einer Aktivierung, andererseits direkt zu einer Hemmung von PR1. Aber auch Salizylsäure und auch Zytokine fördern die Aktivierung von PR1.

Bei einer Infektion mit Pst DC3000 kommt es also zu einer Aktivierung von Auxin. Dies führt einerseits über Ethylen zu einer Aktivierung von PR1, andererseits aber über eine Hemmung der PR1 aktivierenden Salizylsäure auch zu einer Hemmung von PR1. Das durch die Pst DC3000 gehemmte CK kann nun nicht mehr direkt und auch nicht mehr indirekt über die Salizylsäure PR1 aktivieren. Auxin hemmt also die in dieser Simulation durch PR1 repräsentierte Immunreaktion von Arabidopsis, wohingegen diese durch Zytokine eher gefördert wird. Durch gezielte Hemmung der Zytokine und Aktivierung der Auxine hemmt Pst DC3000 also die Immunreaktion von Arabidopsis gezielt. Dies kann auch in Abbildung 11 gut nachvollzogen werden, hier führt eine Augmentation der Zytokine zu einer gesteigerten Immunreaktion, repräsentiert durch das Aktivierungslevel von PR1. Eine Augmentation von Auxin hingegen führt zu einer Hemmung der Immunreaktion. Diese Arbeit ist also ein sehr gutes Beispiel für eine booleansche Simulation und insbesondere dafür, wie verschiedene Systeme über eine Simulation miteinander verbunden werden können. Sie ist aber auch ein Beispiel dafür, wie Eingangs- und Ausgangsknoten in einer solchen Simulation funktionieren und so die komplexen Interaktionen, ihre Beeinflussungen und ihre Effekte in einem Netzwerk zusammenfassen können.

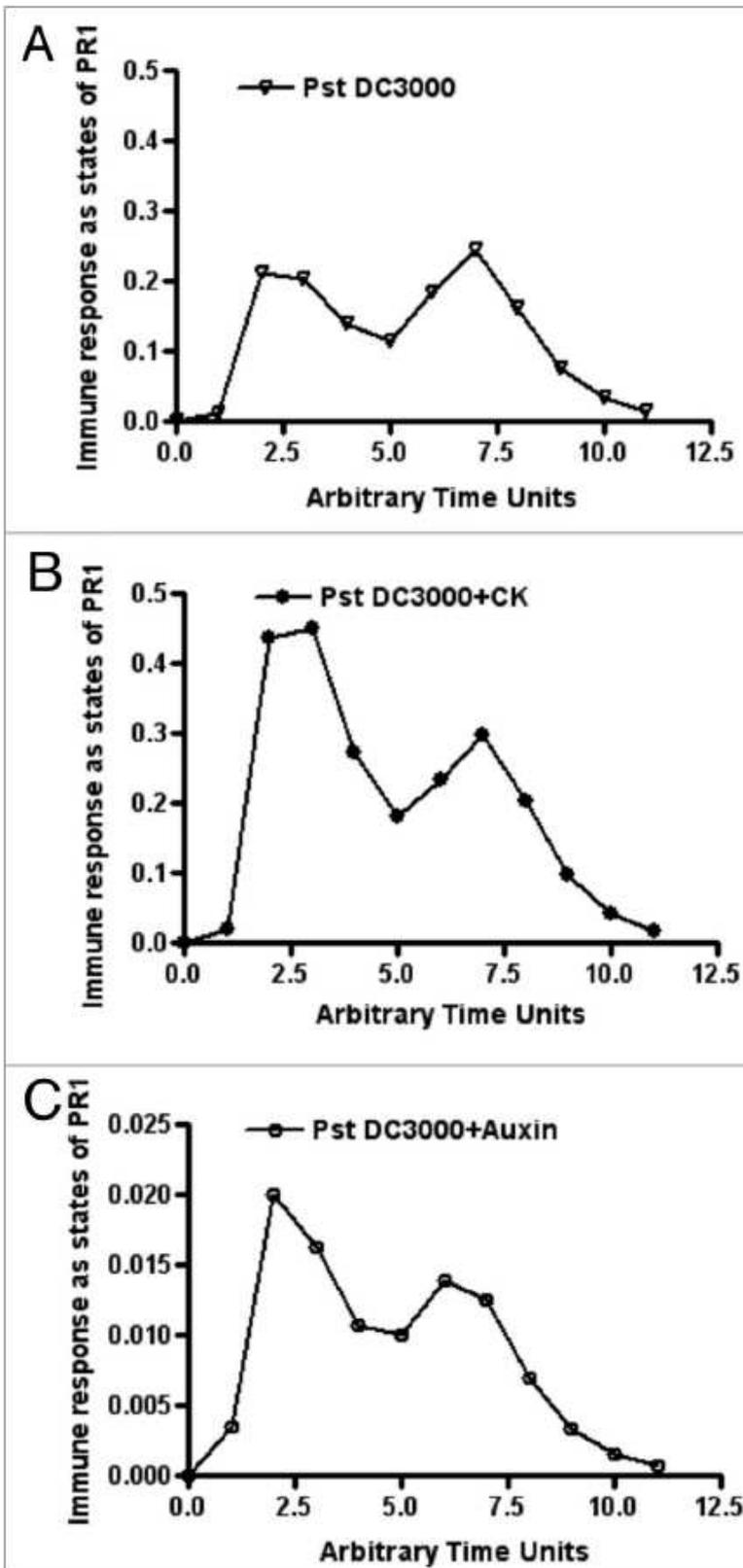


Abbildung 11: Simulierte Immunreaktion und der Einfluss von Zytokin und Auxin: Hier ist die simulierte Aktivierung und Hemmung der Immunreaktion von Arabidopsis durch Aktivierung der Eingangsknoten Zytokin oder Auxin gezeigt. Repräsentiert wird die Stärke der Immunreaktion hier durch die Aktivierungsstärke des Ausgangsknoten PR1 (Abbildung aus Naseem et al. 2013 [69]).

AS KATABOLISMUS IN *S.AUREUS* (HALSEY ET AL 2017 [70])

Der Abbau überzähliger AS ist neben der Synthese der einzelnen AS im AS Stoffwechsel von zentraler Bedeutung und eng mit ihr verbunden. Damit einher gehen auch die Möglichkeit zum Umbau der AS in andere AS, an denen Mangel herrscht, oder auch das Nutzen dieser abgebauten AS als Karbonquelle im Falle von Glucosemangel.

Laut der Arbeit von Halsey et al. [70] gibt es also zwei wichtige Wege des AS Abbaus: Alanin, Threonin, Glycin und Serin werden zu Pyruvat abgebaut, Arginin, Prolin, Glutamat, Glycin und Histidin werden über 2-Oxoglutarat, Aspartat und Asparagin hingegen über Oxaloacetat in den Zitratsäurezyklus eingeschleust. Wichtige Effekte dieser Synthesewege sind einerseits die ATP Generierung über den Abbau von Pyruvat zu Acetat, andererseits die Gluconeogenese aus dem Zitratsäurezyklus heraus sowie die Bereitstellung von Ammonium für die Synthese benötigter AS. (Siehe Abbildung 12).

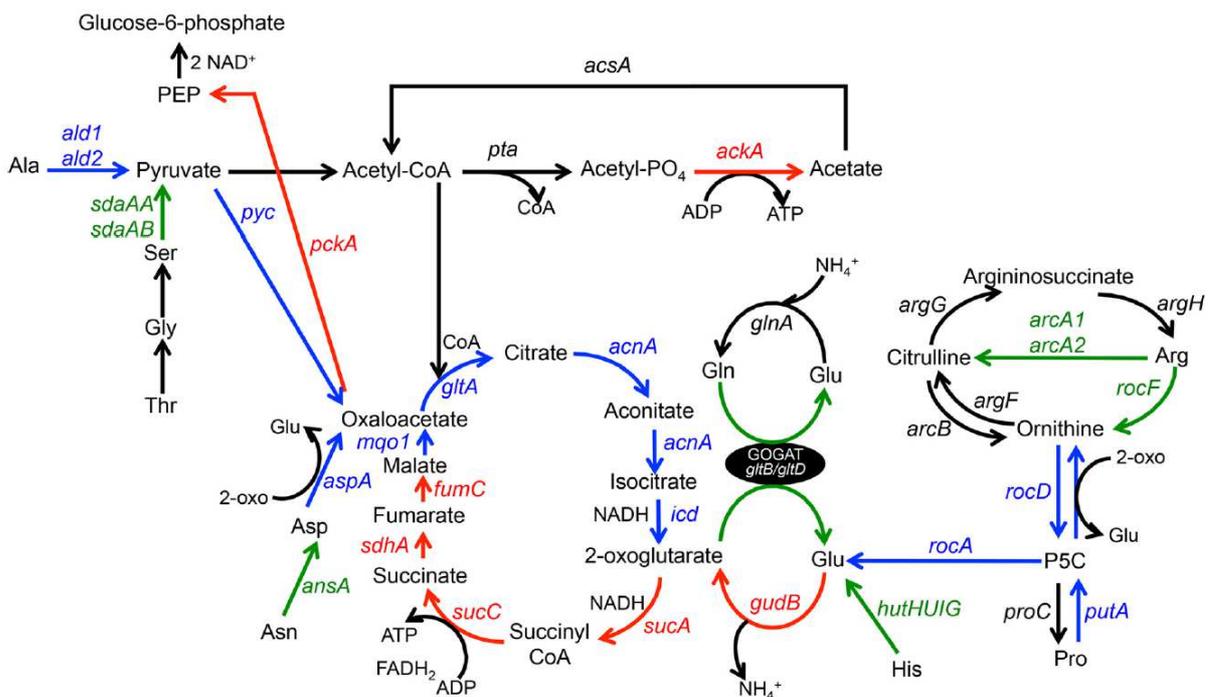


Abbildung 12: Katabole AS Stoffwechselwege: Rechts ist der Abbauweg von Arginin, Prolin und Histidin zu Glutamat und schließlich über den mittig dargestellten Zitratsäurezyklus in die Gluconeogenese links oben dargestellt. In den Zitratsäurezyklus und damit auch in die Gluconeogenese werden außerdem Aspartat und Asparagin eingeschleust, links im Bild. Links mittig im Bild und nach rechts oben im Bild reichend ist der Abbauweg von Alanin, Serin, Glycin und Threonin über Pyruvat zu Acetat und damit auch der Weg der ATP Synthese dargestellt (Abbildung aus Halsey et al. 2017[70]).

In dieser Arbeit stellen Halsey et al. [70] die zentrale Rolle von Glutamat im Aminosäure Katabolismus sowie für die Gluconeogenese dar. Glutamat ist das Ziel vieler kataboler AS-Abbauwege, es ist der Hauptlieferant für Amino-Gruppen, liefert seine Karbon-Gruppen aber auch in den Zitratsäurezyklus und damit auch in die Gluconeogenese.

Der katabole Weg zur Glutamatsynthese findet seinen Ursprung in den AS Arginin, Prolin und Histidin, wobei Arginin und Prolin prinzipiell ineinander umgewandelt werden können. Wichtiges Intermediat ist hierbei das Ornithin. Diese Umwandlung steht unter enger Kontrolle von CcpA, welches die Bildung der für diese Umwandlung notwendigen Enzyme reguliert. Das entscheidende Enzym für die Umwandlung von Glutamat in 2-oxoglutarat und damit die Einschleusung von Glutamat in den Zitratsäurezyklus ist gudB. Halsey et al. [70] zeigen in ihrer Arbeit die Bedeutung dieses katabolen Stoffwechselweges im Glucosemangelmedium, wobei der Abbau von Prolin zu Glutamat eine besonders bedeutende Rolle spielt und die Abbauwege von Arginin und Histidin eher zu vernachlässigen sind.

NMR Analysen bei Wachstum mit C13 markierter Glucose zeigten, dass diese C13 Atome in Glutamat eingebaut wurden sich aber nicht in Prolin und Arginin fanden. Der Abbauweg stellt also zumindest bei Glucose-Verfügbarkeit und damit auch Hemmung verschiedener Enzyme durch CcpA eine Einbahnstraße Richtung Glutamat dar und scheint auch die Umwandlung von Arginin und Prolin ineinander zu verhindern. In Fällen von Glukosemangel wird schon aus stöchiometrischen Gründen auch eher der katabole Weg bevorzugt werden. Die Synthese von Arginin aus Prolin scheint also nur unter Glukosemangel bei gehemmter CcpA Hemmung möglich zu sein. In den von mir vorgestellten Experimenten ist Glucose verfügbar, die Arginin-Synthese aus Prolin ist also gehemmt und zwar in einem Ausmaß, wie es durch die Simulation nicht abgebildet wird. Die von mir erstellte und verwendete Simulation unterschätzt hier also die Wirkung von CcpA. Halsey et al. [70] bestätigen aber das Ergebnis der von mir präsentierten Experimente, nämlich dass unter Glucose-Verfügbarkeit die AS Arginin und Prolin essentiell sind.

CcpA als catabolite control protein spielt also in diesen Vorgängen eine entscheidende regulatorische Rolle. In meiner Arbeit, in der es hauptsächlich um die anabolen AS-

Stoffwechselwege geht, ist die Bedeutung und Wirkung von CcpA nur am Rande berührt, nimmt aber dennoch eine zentrale Stellung im Netzwerk ein.

Die Arbeit von Halsey et al. [70] legt also nahe, dass meine Simulation den über CcpA vermittelten hemmenden Effekt von Glucose auf den Katabolismus von Prolin und Arginin und damit auch auf die Umwandlung dieser beiden AS ineinander unterschätzt.

Die Bedeutung des katabolen Abbauweges über den Zitronensäurezyklus kann gut in Abbildung 12 erkannt werden. Dort sind in Rot alle Knoten dargestellt, die für das Überleben von *S.aureus* in einem Glukosemangelmedium essentiell sind. Es fällt auf, dass der direkte Weg von Glutamat zu PEP rot markiert ist, also unter diesen Bedingungen essentiell ist. Eine Ausnahme stellt mpq1 dar. Dieser Knoten ist nicht essentiell, da die Bildung von Oxalacetat aus der Transaminierung von Aspartat substituiert werden kann. Dies ist auch sehr gut in Abbildung 13 zu erkennen. Wird *S.aureus* durch Wachstum im Aspartat Mangelmedium der eine Syntheseweg genommen, kann noch ein suffizientes Wachstum beobachtet werden. Erst durch zusätzliches Ausschalten von mqa1 kommt es zu einem Wachstumsstopp. Dass ein reines Substituieren von Oxalacetat das Wachstum in einer im Zitronensäurezyklus vorgeschalteten Mutation (SucC) nicht wiederherstellen kann, zeigt die Bedeutung des Zitronensäurezyklus für Stoffwechselwege abseits der Einschleusung von Carbongruppen in die Gluconeogenese.

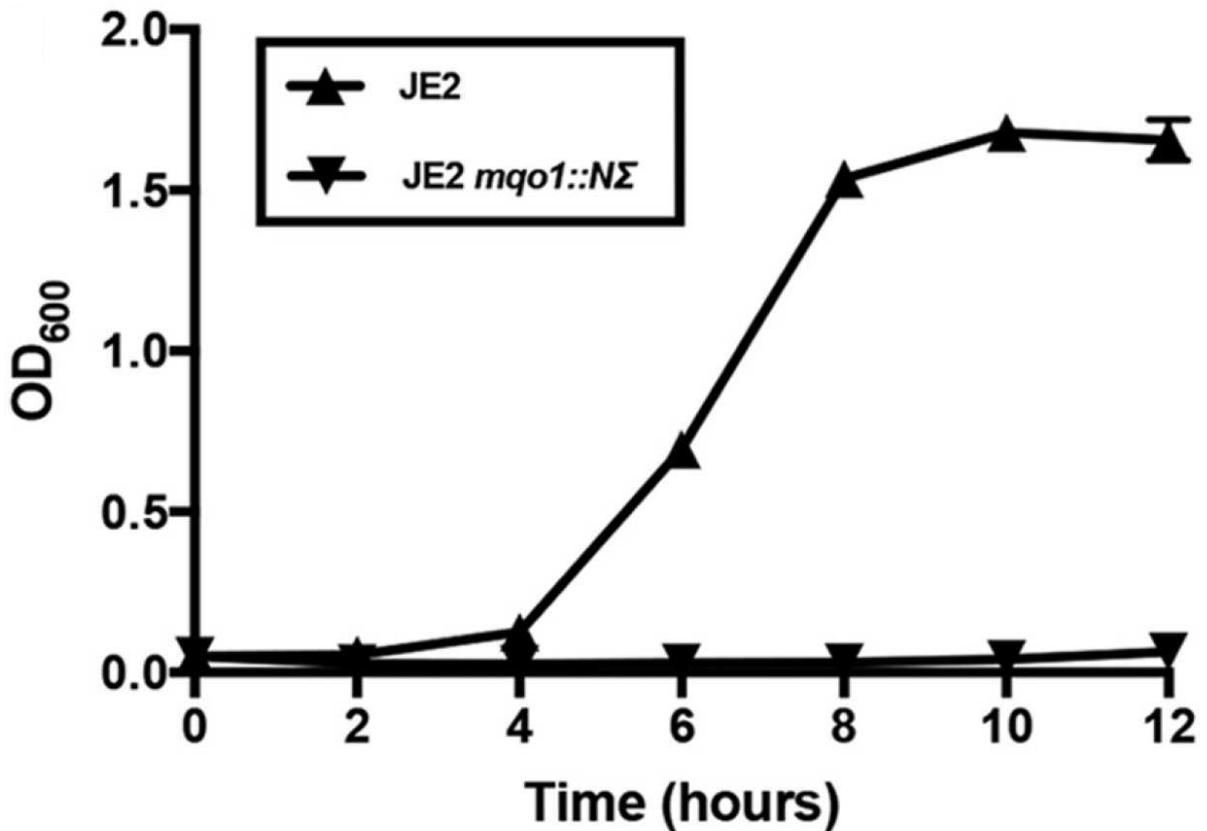


Abbildung 13: Einschleusung von Aspartat in den Zitronensäurezyklus: Bei Wachstum in Aspartat Mangelmedium zeigt der WT ein gutes Wachstum. Die *mqa1* Mutante hingegen kann Oxalacetat nicht über den Zitronensäurezyklus, aber aufgrund des Aspartatmangels im Medium auch nicht über den Abbau von Aspartat bereitstellen und zeigt somit ein deutlich gemindertetes Wachstum (Abbildung aus Halsey et al. 2017 [70]).

Beim Vergleich der Abbildungen 14 a und b fällt auf, dass bei verfügbarer Glucose Arginin, Histidin und Prolin, also die AS, welche in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden, nicht aufgebraucht werden. Unter Glukosemangel hingegen werden diese AS aufgebraucht, da ihre Kohlenstoffgruppen wahrscheinlich für die Gluconeogenese benötigt werden. Halsey et al. [70] konnten aber auch zeigen, dass Prolin das wichtigste Substrat für die Glutamat Synthese darstellt. Erst nachdem Prolin aufgebraucht ist, findet der Abbau von Histidin statt, Arginin spielt hingegen nur eine untergeordnete Rolle für die Glutamatsynthese im katabolen Stoffwechsel. Dass gerade Prolin von so entscheidender Bedeutung ist, liegt nahe, wenn man bedenkt, dass Prolin die dominante AS in Collagen ist und damit für *S.aureus* vermutlich in den meisten Infektionen in großer Menge zur Verfügung steht.

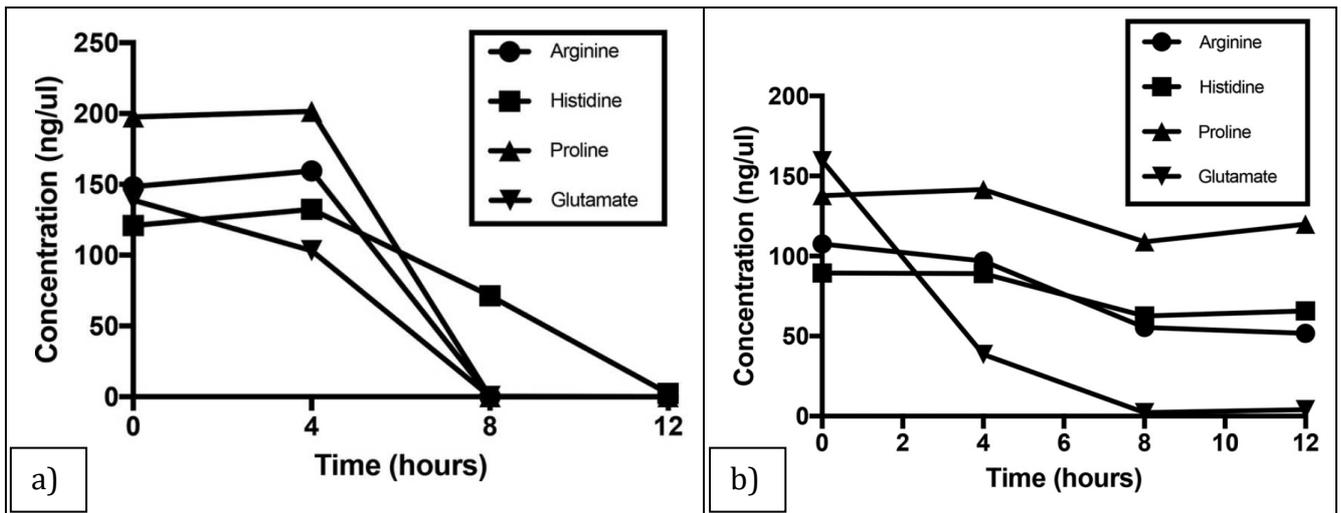


Abbildung 14 a/b: AS Verbrauch mit (b) und ohne Glucose (a): Bei Wachstum ohne Glucose, wie in der linken Abbildung (a) werden Arginin, Histidin und Prolin verbraucht und wahrscheinlich über den Zitratsäurezyklus der Gluconeogenese zugeführt. Steht Glucose zur Verfügung (b), besteht kein Grund zur Gluconeogenese und es kommt nicht zu diesem Abbau (Abbildung aus Halsey et al. 2017 [70]).

Glutamat ist also die zentrale AS im Abbau vieler anderer AS und damit auch in der Umwandlung vieler AS ineinander. Mit seiner Verbindung zum Zitratsäurezyklus und der Gluconeogenese ist es auch die zentrale Karbonquelle unter Glukosemangelstress.

Neben dem Recycling von Amino-Gruppen und dem Auffüllen des Zitratsäurezyklus sowie der Bereitstellung von Kohlenstoffgruppen für die Gluconeogenese spielt der AS-Katabolismus auch eine entscheidende Rolle in der Bereitstellung von ATP. Halsey et al. [70] spekulieren, dass die im Zitratsäurezyklus entstehenden Reduktionsäquivalente in Form von NADH nicht in üblichem Ausmaß für die Zellatmung Verwendung finden können, sondern zumindest teilweise in der Gluconeogenese verbraucht werden. Somit lässt sich nach Ausschalten von *ackA*, welches für die ATP-Synthese im Abbauweg von Pyruvat zu Acetat verantwortlich ist, eine deutliche Wachstumsminde rung feststellen. AS, die vor allem zu Pyruvat abgebaut werden und so als Substrat für diesen katabolen Stoffwechselweg dienen, sind Serin, Glycin, Threonin und Alanin.

Scheinbar ist der kurze Weg von Pyruvat zu Acetat zur Bereitstellung von ATP bevorzugt, ein kleiner Teil fließt aber auch über AcetylCoA in den Zitratsäurezyklus und damit in die Gluconeogenese ab. Ohne weiteren Nachschub aus Pyruvat entleert sich also der Acetatspeicher und dieser Weg der Energiebereitstellung versiegt. Dieser Weg der ATP-Bereitstellung ist von besonderer Bedeutung, da unter Bedingungen des

Glukosemangels und der aktivierten Gluconeogenese, die im Zitratsäurezyklus entstehenden Reduktionsäquivalente, welche normalerweise über die Zellatmung unter O₂ Verbrauch zur ATP Synthese dienen, in der Gluconeogenese verbraucht werden. Hierdurch wird die Zellatmung und damit auch die ATP-Synthese gehemmt. Der Weg über Acetat zu ATP stellt unter Glukosestress also einen entscheidenden Schritt für die Bereitstellung von Energieäquivalenten dar (siehe auch Abbildung 15). Es bleibt jedoch unklar, ob die Wachstumshemmung einer *ackA* Mutante unter Glukosemangel wirklich nur auf die gehemmte ATP-Synthese zurückzuführen ist. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die Wachstumshemmung multifaktoriell ist und dass zum Beispiel auch CoA nicht regeneriert wird. Damit fehlt CoA in der Umwandlung von 2-Oxoglutarat zu Succinyl-CoA, was so den Stoffwechselweg von Glutamat Richtung Gluconeogenese hemmt.

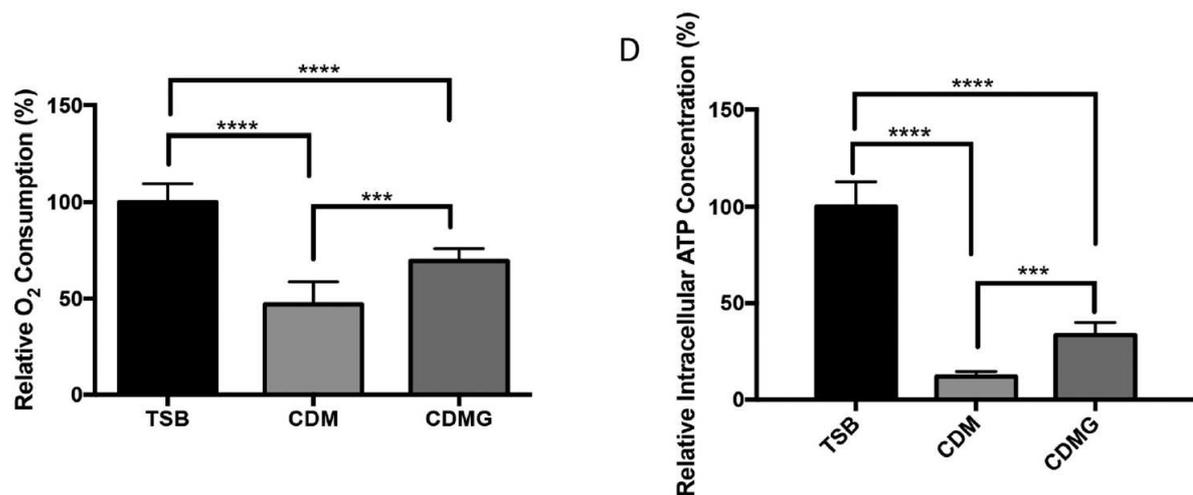


Abbildung 15: Zellatmung unter Wachstumsbedingungen mit und ohne Glucose: Bei Wachstum ohne Glucose (CDM) zeigt sich ein deutlich geminderter O₂-Verbrauch sowie eine deutlich geminderte ATP-Synthese im Vergleich zu Wachstum mit Glucose (TSB/CDMG) (Abbildung aus Halsey et al. 2017 [70]).

Wichtig für das Wachstum von *S.aureus* im Glukosemangelmedium sind also die katabolen Stoffwechselwege von Alanin, Serin, Glycin und Threonin über Pyruvat zu Acetat und damit zur ATP Synthese. Aber auch die katabolen Stoffwechselwege von Histidin, Prolin und Arginin über Ornithin und Glutamat und ebenso von Aspartat über 2-Oxoglutarat in den Zitratsäurezyklus und damit in die Gluconeogenese.

In Abbildung 16 ist die Bedeutung dieser beiden Abbauwege für das Wachstum von *S.aureus* gut zu sehen. Für den ersten Weg von Pyruvat über Acetat zu ATP ist *ackA* ein entscheidendes Schlüsselenzym. Das Schlüsselenzym für den zweiten Weg, den Abbau von AS über den Zitratsäurezyklus in die Gluconeogenese, ist *gudB*.

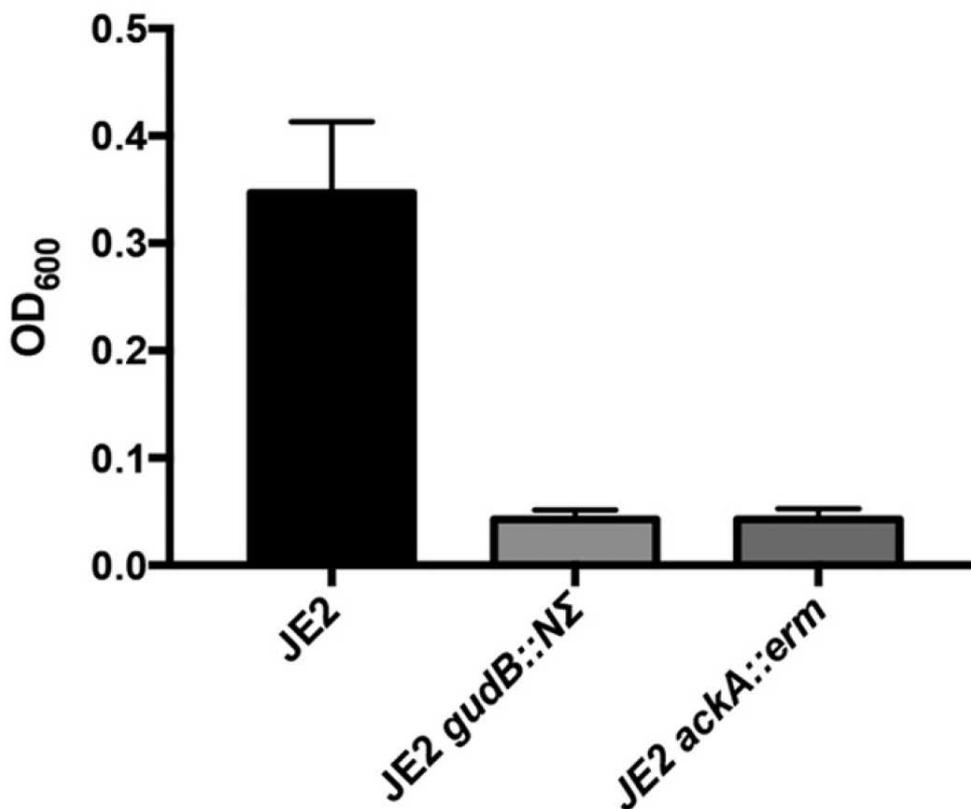


Abbildung 16: Bedeutung der beiden wichtigen katabolen AS-Stoffwechselwege für das AS-Wachstum: Der WT kann unter Glukosemangel gut wachsen, ganz im Gegensatz zu den zwei getesteten Mutanten. Der *gudB*-Mutante fehlt ein essentielles Gen für die Einschleusung von Glutamat in den Zitratsäurezyklus und damit für die Einschleusung in die Gluconeogenese und die Bereitstellung von Ammoniumgruppen. Der *ackA*-Mutante fehlt ein essentielles Gen für den Abbau von Pyruvat zu Acetat und damit für die Bereitstellung der Energieäquivalente ATP (Abbildung aus Halsey et al. 2017 [70]).

Die Arbeit von Halsey et al. [70] stellt also klar dar, wie wichtig es für die AS Synthese ist, auch die katabolen Stoffwechselwege zu betrachten, mehr noch, sie als gleichwertige Mechanismen zu den anabolen Synthesewegen zu sehen. Der nächste Schritt muss also sein, die katabolen Stoffwechselwege, insbesondere die Steuerung über *CcpA*, genauso wie den Zitratsäurezyklus, aber auch den Harnstoffzyklus zu simulieren und mit unserem anabolen Modell zu verbinden.

Als einer der bedeutendsten nosokomialen Krankheitserreger, häufig mit Resistenzen gegen die gängigen Antibiotika, ist *S.aureus* sowohl in der Medizin als auch als Modellorganismus in der medizinisch-biologischen Grundlagenforschung von großer Bedeutung [2]. Die Simulation der Interaktion von Signalmolekülen sowie von Zwischen- und Endprodukten ist ein effizientes und kostengünstiges Werkzeug zur Erforschung wichtiger Stoffwechselwege. Die mathematische Simulation ist sehr genau, jedoch auch komplex in der alltäglichen Handhabung [71]. Sie erfordert viel Zeit und mathematisches Wissen. Außerdem sind häufig z.B. kinetische Daten notwendig, die noch nicht verfügbar und auch experimentell nur schwer zu ermitteln sind. Die Anpassung sowie Simulation booleanscher Netzwerke kann recht unkompliziert über die Verwendung entsprechender Programme erfolgen [72]. Vorteil ist, dass keine quantitativen Daten benötigt werden, der Nachteil ist die Möglichkeit, nur qualitative Ergebnisse zu erhalten.

Ziel dieser Arbeit war es ein booleansches Netzwerk zu erstellen mit dessen Hilfe der AS-Metabolismus und die SR in *S.aureus* einfach simuliert und experimentell überprüft werden kann. Um die häufig vorkommenden AND-Bedingungen darstellen zu können, sollen für dieses Netzwerk Logik-Gatter entwickelt, getestet und dann in der Simulation verwendet werden. Das Netzwerk soll dann mit aus der Literatur bekannten Daten, aber auch anhand experimenteller Ergebnisse aus Wachstumsversuchen verschiedener knock-out *S.aureus*-Stämme in verschiedenen AS-Mangelmedien getestet und so verifiziert werden. Mit diesem Netzwerk können dann die bisher teilweise sehr unterschiedlichen Angaben über die Essentialität der verschiedenen AS in *S.aureus* überprüft werden, um wenn möglich, mechanistische, aus der Simulation abgeleitete Erklärungen für die gefundenen Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen zu geben.

Das Netzwerk soll das aktuelle Wissen umfassend repräsentieren und so eine Ausgangsplattform für weitere Hypothesen und Untersuchungen darstellen. So können zum Beispiel speziell auf den jeweiligen *S.aureus* Stamm sowie die konkrete Situation angepasste Therapien entwickelt werden, ggf. unter Ausnutzung des für Stamm und Situation spezifischen Essentialitätsmusters.

MATERIAL UND METHODEN

WACHSTUMSEXPERIMENTE

Die in Tabelle 1 gezeigten Bakterien wurden von der AG Wolz zur Verfügung gestellt, und auf mit den entsprechenden Antibiotika versetzten tryptic soy agar Platten ausgestrichen. Auf diesen Agarplatten wurden die Bakterien bei 37°C angezüchtet. Um eine Übernachtskultur zu erhalten, wurden die Bakterien von den Agarplatten genommen und in 5ml CDM Vollmedium überführt. Die Bakterien wurden dann eine Nacht lang unter konstantem Schütteln bei 37°C angezüchtet. Danach wurde die Bakterienkultur 1:100 mit CDM Vollmedium verdünnt und die optische Dichte bei 600nm (OD600) mit einem Photometer gemessen. Die Tagkulturen wurden mit einer Ausgangs-OD600 von 0.05 angeimpft und erneut unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden bis zu einer OD600 von 0,5 angezüchtet. Nun wurden 2ml der Bakterienkultur entnommen, in ein 2ml Eppendorf cup überführt und für 90sec bei 10.000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2ml PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Danach wurde 1ml der PBS-Bakterien-Suspension erneut mit dem Photometer gemessen. Der andere 1ml wurde genutzt, um die 96-Well Platten mit einer OD600 von 0.05 anzuimpfen. Hierzu wurde CDM medium verwendet, in dem jeweils eine AS fehlte. Die Bakterien werden unter konstantem Schütteln bei 37°C in einem Mikroplatten Reader [Tecan infinite M200 Pro Tecan Group Ltd.; Männedorf; Schweiz] für 18 Stunden inkubiert. Die OD600 und damit das Wachstum der Bakterien wurde alle 30 Minuten bestimmt.

Tabelle 1: Experimentell genutzte Stämme

StammNr./Typ	Stamm Name	Beschreibung	Referenz
1) WT	HG001	<i>rsbU</i> wieder Hergestellt RN1 (8325)	(Herbert et al., 2010) [24]
2) <i>codY</i> -	HG001-21	HG001 $\Delta codY::tet(K)$	(Pohl et al., 2009) [25]
3) <i>ccpA</i> -	HG001 CcpA	HG001, $\Delta ccpA::tet(L)$	Diese Arbeit
4) <i>rsh</i> -	HG001-86	HG001 <i>rsh_{syn}</i> ($\Delta 942-950nt$)	(Geiger et al., 2012) [26]
5) <i>relP/Q</i> -; <i>rsh</i> -; <i>codY</i> -	(p)ppGpp0-21	HG001, <i>rsh/relP/relQ</i> , <i>codY::tet(K)</i>	Diese Arbeit

In dieser Tabelle sind die *S.aureus*-Stämme, welche für die in-vitro Wachstumsexperimente verwendet wurden, dargestellt.

Aus verschiedenen Quellen, z.B. Datenbanken wie KEEG (<http://www.genome.jp/kegg/>) und STRING (<http://string.embl.de>) wurden Informationen über die unterschiedlichen Knoten und Interaktionen im Netzwerk gesammelt und hieraus ein erstes grundlegendes Netzwerk erstellt. Um zusätzliche Knoten und Interaktionen zu finden und die anderen Knoten und Interaktionen zu verifizieren, wurden weitere Informationen aus der Literatur genutzt und mit dem schon bestehenden Netzwerk verglichen. So wurde sichergestellt, dass das Netzwerk alle wichtigen Gene, Produkte, metabolischen Zwischenprodukte und Enzyme sowie deren Interaktionen enthält. Nach dem Sammeln der grundlegenden Daten für das Netzwerk fängt jedoch die Simulationsarbeit erst an. Die Daten wurden mit Wissen aus anderen *S.aureus* Stämmen und auch mit dem Wissen aus verwandten Arten verglichen. Häufig wurden Knoten oder Mechanismen postuliert, die empirisch nur in verwandten Stämmen oder Arten nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus stehen die Daten in unterschiedlichen Publikationen manchmal in Konflikt zueinander und die schlüssigsten und überzeugendsten unter ihnen mussten ermittelt und festgestellt werden. Darüber hinaus musste natürlich auch bewertet werden, von welcher biologischen Relevanz die gefundenen Knoten oder Mechanismen für das Netzwerk sind, und somit, wie groß das Netzwerk werden soll und welcher Knoten und welche Interaktion mit einzuschließen sind. Dazu mussten die verschiedenen Datenbanken und Literaturquellen zusammen mit Expertenwissen verglichen werden, sodass am Ende ein verlässliches und nützliches Netzwerk erstellt werden konnte.

Die Konstruktion des Netzwerks im yED-Graph Editor geschah unter Berücksichtigung der folgenden vier Regeln, welche auch schon für die Erstellung der in meiner letzten Arbeit gezeigten Simulation Verwendung fanden [6]:

1) Jede, die SR und den AS-Metabolismus in *S.aureus* betreffende Verbindung, die gefunden werden konnten, wurde implementiert.

2) Gab es widersprüchliche Informationen, wurde die am häufigsten gefundene gewählt; gab es keine Unterschiede in der Häufigkeit der Information, wurde dieser Knoten bzw. diese Verbindung entweder entfernt oder der bzw. die kohärenteste aus der verlässlichsten Quelle gewählt.

3) Bei Unklarheit über die Wichtigkeit eines Knotens oder einer Interaktion für die SR und den AS-Metabolismus von *S.aureus* wurde im Zweifel immer die Entscheidung getroffen, die Information zu implementieren und so sicherzustellen, dass keine biologisch relevanten Knoten oder Interaktionen übersehen werden.

4) Bei biologischen Tatsachen, die nicht leicht zu vereinfachen und an das Aktivierungs-/Inhibierungs-Netzwerk anzupassen sind, ging es mir vor allem darum, die biologische Tatsache möglichst korrekt widerzuspiegeln und nicht alle verfügbaren Interaktionen zu implementieren.

Durch die Nutzung dieser Vielzahl an Daten und Quellen können, soweit verfügbar, alle biologisch bedeutenden Facetten eines Gens in das erstellte Netzwerk miteingeschlossen werden. Es werden also nicht nur die mRNA oder das entsprechende Protein eines einzelnen Knoten repräsentiert sondern alle funktionellen Aspekte eines Gens, unabhängig davon, ob der Effekt im Netzwerk durch DNA, RNA, Proteine oder eine andere funktionale Einheit vermittelt wird. Es wird in einem Knoten des Netzwerks also nicht die Wirkung der physikalischen Komponenten einzeln repräsentiert, sondern in einer funktionellen Einheit der Effekt, den z.B. ein Gen-Lokus als Ganzes, inklusive der hieraus entstehenden Produkte, auf das Netzwerk ausübt. Aber obwohl alle relevanten Knoten und deren Interaktionen und Aspekte in das Netzwerk implementiert wurden, fanden, um das Modell so einfach wie möglich zu halten, keine biophysikalischen oder biochemischen Details (z.B. Affinitätskonstanten oder on/off Kinetiken) Berücksichtigung.

Häufig werden in den Synthesewegen der verschiedenen AS zahlreiche Zwischenprodukte gebildet. Diese werden dann durch Enzyme zu weiteren Zwischenprodukten und schlussendlich zu den AS weiter verstoffwechselt. Entscheidend für das Fortschreiten der Verstoffwechslung zum Produkt ist also sowohl das Enzym als auch das entsprechende Zwischenprodukt, also das Edukt dieser Reaktion. Um dies im simulierten Netzwerk darzustellen, wurden UND-Logikgatter konstruiert, getestet und dann in der Simulation verwendet.

SIMULATION UND KONSTRUKTION DES NETZWERKS

Für die Erstellung des Netzwerks wurde das Programm yEd-Designer (v3.14.1) verwendet. Hierfür wurden, den oben dargestellten Regeln folgend, die aus der Literatur

erhaltenen Informationen über Knoten und ihre Interaktionen in das Programm übernommen. Dieses Programm zur Konstruktion und Visualisierung von Netzwerken ermöglicht es, Knoten einfach per Drag and Drop zu platzieren und mit einem Mausklick mit aktivierenden oder inhibierenden Interaktionen zu verbinden.

Das so erstellte Netzwerk wurde dann in Jimena [57] übernommen. Jimena berechnet nach den implementierten SQUAD Kinetiken die Aktivierung oder Inhibierung der Knoten ausgehend von den aktivierenden und inhibierenden Verbindungen des Netzwerkes [43]. So konnte ein umfassendes Netzwerk simuliert werden mit allen bekannten, für die SR und den AS-Metabolismus wichtigen Knoten und den Verbindungen zwischen diesen (siehe auch Abbildung 17a für einen Überblick über das Netzwerk und Tabelle 1 im Appendix für eine detaillierte Liste aller Knoten des Netzwerkes, inklusive ihrer Interaktionen und der jeweiligen Quellen. Siehe außerdem Abbildung 18 a-f für eine detailliertere Darstellung). Zunächst wurde in Jimena eine Simulation des Mediums implementiert, indem die Knoten, welche die Substanzen des Mediums repräsentieren, zu einem gewissen Maß (0,7) aktiviert wurden. Außerdem wurden alle Eingangsknoten des Netzwerkes, also alle Knoten ohne afferente Verbindung, zu einem gewissen Maße (0,35) aktiviert, um so ein konstantes gleichmäßiges Aktivitätslevel zu erhalten. Durch das Netzwerk selbst beeinflusste Knoten wurden nicht in ihrer Aktivität modelliert. Die weitere Berechnung der Interaktionen im Netzwerk und der Aktivierungsstärke der Knoten geschieht automatisch, den in Jimena implementierten SQUAD Kinetiken folgend. Dazu wird durch Jimena aus der yED-Darstellung ein booleansches Netzwerk mit den booleanschen Zuständen 0 = „aus“ bzw. 1 = „an“ für jeden Knoten berechnet. Ausgehend von diesem digitalen Netzwerk erstellt Jimena unter Berücksichtigung der Stärke und der logischen Verknüpfung mit anderen Knoten im nächsten Schritt eine semiquantitative Simulation. Dafür wird durch Integration der Afferenzen die Aktivierung jedes einzelnen Knotens berechnet. Dies geschieht, indem unter jeweiliger Beachtung des Aktivitätslevels des Ausgangsknotens die Dominanz einer Verbindungsart über die andere und somit die in der jeweiligen Situation resultierende Aktivierung des betrachteten Knoten berechnet wird. Die für diese semiquantitative Simulation notwendige Umformung des Netzwerkes geschieht automatisch in Jimena unter Beachtung der logischen Verknüpfungen im Netzwerk. Hierzu wird zwischen den „an“- und „aus“-Zuständen der Netzwerkknoten unter Verwendung verknüpfter E-Funktionen interpoliert [43]. Obwohl sie die kinetischen

Parameter nur annäherungsweise und vereinfacht abbilden, erlauben diese E-Funktionen eine Simulation, die zeigt, ob ein Knoten durch die Kombination der unterschiedlichen aktivierenden und inhibierenden Einflüsse aktiviert oder inhibiert wird. Diese Simulationen erlaubt es uns, im Detail die logische Abfolge der Ereignisse im Netzwerk widerzuspiegeln.

Neben den oben erwähnten in Jimena programmierten konstanten Aktivierungen des Mediums und der Eingangsknoten wurden in Jimena verschiedene zeitlich begrenzte Impulse programmiert. Mit diesen können experimentelle Settings simuliert und in-silico nachvollzogen werden. In diesem Fall sollten die Simulationsergebnisse aus Jimena qualitativ mit den experimentellen in-vitro-Daten verglichen werden. Mit Hilfe dieser zeitlich begrenzten Impulse wurden also die verschiedenen experimentellen in-vitro-Bedingungen mit den unterschiedlichen knock-out-Stämmen und den unterschiedlichen Minimalmedien reproduziert. Diese konstanten und auch die zeitlich begrenzten Impulse waren wie folgt: Die Substanzen im simulierten Medium wurden mit 0,7 aktiviert. Eingangsknoten, also Knoten ohne eigene Afferenzen, wurden mit 0,35 aktiviert. Zur Simulation der unterschiedlichen knock-out-Mutanten wurde der jeweilige Knoten auf 0,0 reguliert. Um die unterschiedlichen Medien zu simulieren, wurde die jeweilige AS im simulierten Medium auf 0,0 reguliert.

EINBEZIEHUNG DER IN-VITRO RESULTATE IN DIE SIMULATION

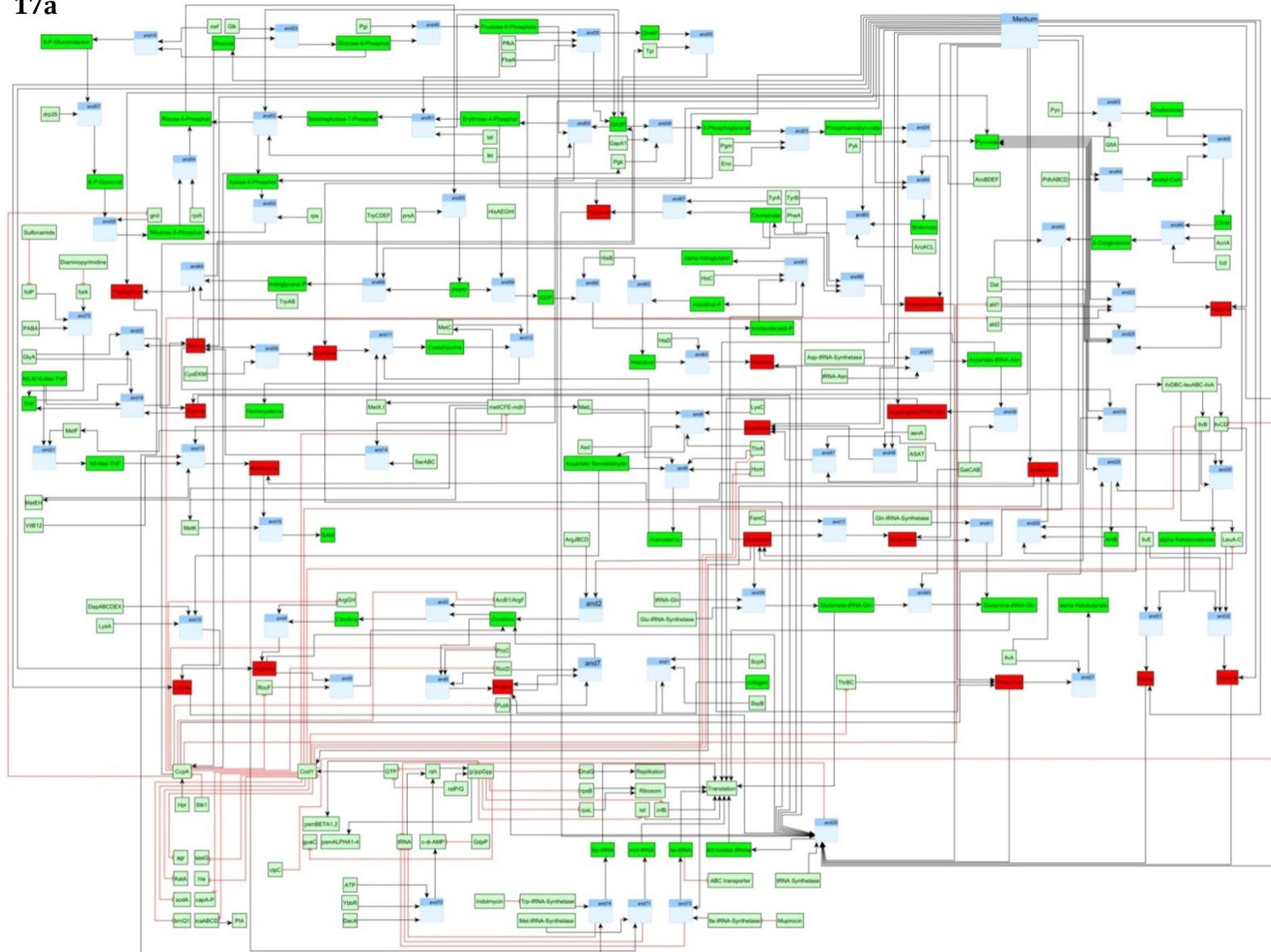
Die qualitative Übereinstimmung der in-vitro-Experimente sowohl mit dem aus der Literatur erstellten Netzwerk als auch mit Netzwerken, in denen kleine Veränderungen durchgeführt worden waren, wurde durch zusätzliche Modellierungsarbeit ermittelt. Einige vergleichsweise kleine gezielte Veränderungen konnten die Übereinstimmung überproportional beeinflussen und teilweise auch optimieren. Es ist nicht davon auszugehen, dass bereits alle Mechanismen, Knoten und Interaktionen in der SR und dem AS-Metabolismus in *S.aureus* bekannt und beschrieben sind. Es ist daher anzunehmen, dass in dem Netzwerk eins (NW 1), welches allein aus Literaturdaten erstellt wurde, einige Verbindungen oder Knoten fehlen. Mit einem iterativen Prozess wurde nun versucht, diese zu ermitteln, indem zunächst weitere in der Literatur verfügbare Informationen, zum Beispiel auch über verwandte Arten, mit einbezogen wurden. Daraufhin wurden noch gemäß unseren experimentellen Daten unverzichtbare Knoten und Verbindungen hinzugefügt. Nun redundante, überflüssige und überzählige

Knoten und Verbindungen wurden jetzt wieder entfernt. Das Ergebnis ist ein Netzwerk (NW2), welches nicht nur die Literaturdaten, sondern auch die Informationen meiner in-silico- und vor allem meiner in-vitro Experimente und damit das gesamte aktuelle Wissen über die SR und den AS-Metabolismus in *S.aureus* widerspiegelt (siehe auch Abbildung 17b für eine Übersicht über das Netzwerk sowie Abbildung 18a-f für eine detailliertere Darstellung der einzelnen Ausschnitte des Stoffwechselweges entsprechend dem schematischen Überblick in Abbildung 3).

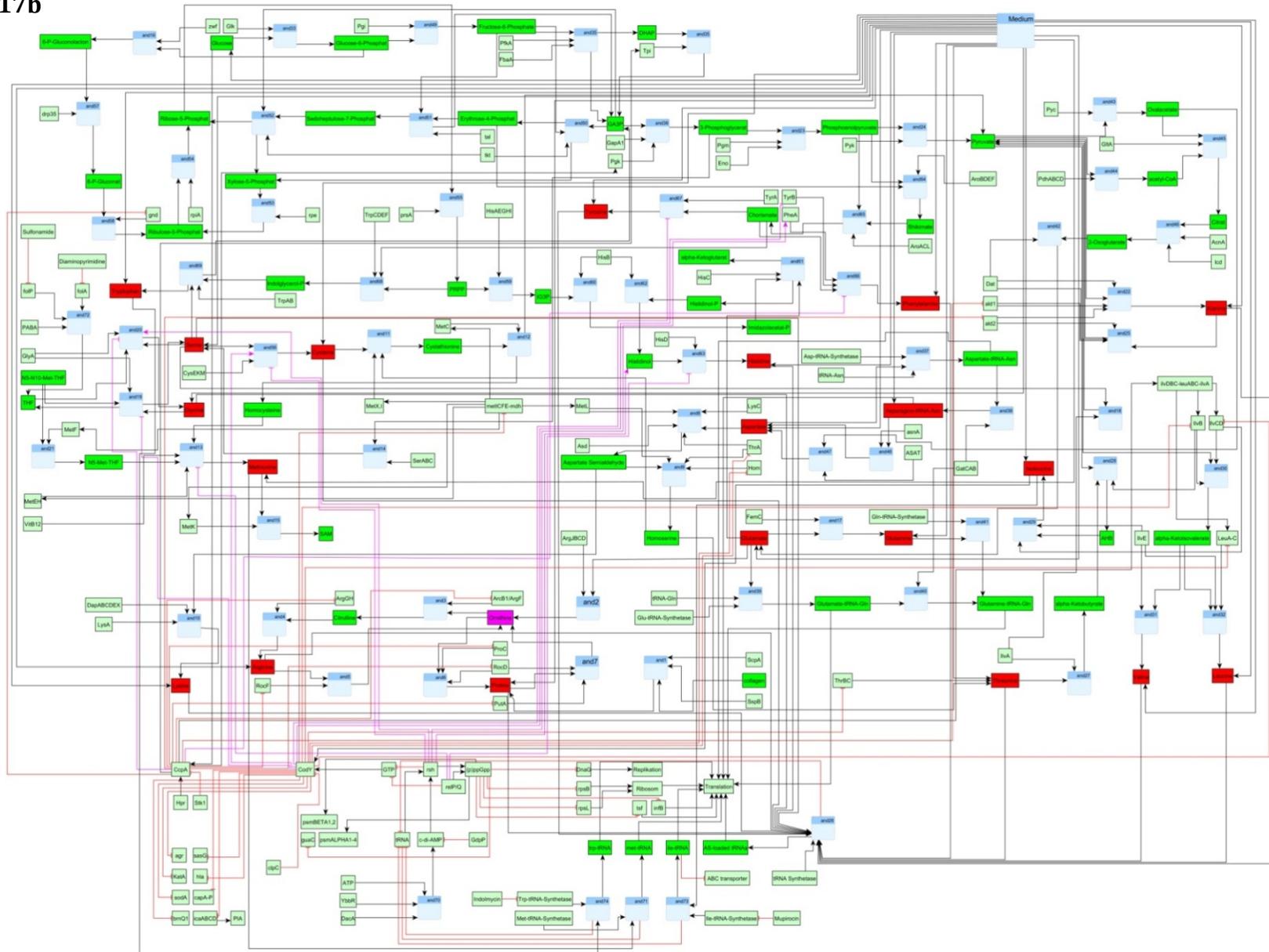
Dieses Netzwerklayout sowie dieses Aktivierungsmuster führen also zur besten Übereinstimmung der in-silico-Ergebnisse mit den in-vitro-Daten und dem in-vitro beobachteten Verhalten. Das schlussendliche Konnektivitätsmuster lag aber nicht von Anfang an klar auf der Hand, sondern musste erst, wie oben beschrieben, durch Simulationsarbeit und das Zusammenfügen von Informationen, die wir aus den experimentellen Daten der Wachstumsexperimente erhielten, sowie durch Wissen aus der Literatur über *S.aureus* und andere Bakterien – wie z.B. unterschiedliche andere Staphylokokken-Spezies, aber z.B. auch *E.coli* – erstellt werden. Diese Simulationsarbeit wurde in JImena und yEd Designer durchgeführt, in dem indem die logischen Verknüpfungen der verschiedenen Netzwerkknoten, unter Berücksichtigung ender mit einbezogenen Schlüsselknoten der Regulation, in einem systematischen Muster verändert wurden. Das ermöglichte es uns, ein Netzwerk mit nur wenigen zusätzlichen Interaktionen zu erstellen, welches die experimentellen Ergebnisse am besten widerspiegelt.

Alle Simulationen wurden auf einem Computer mit Windows Home 10 (64 Bit) und einem Intel core I7-4700MQ CPU mit 2.40 GHz und 8 GB RAM durchgeführt.

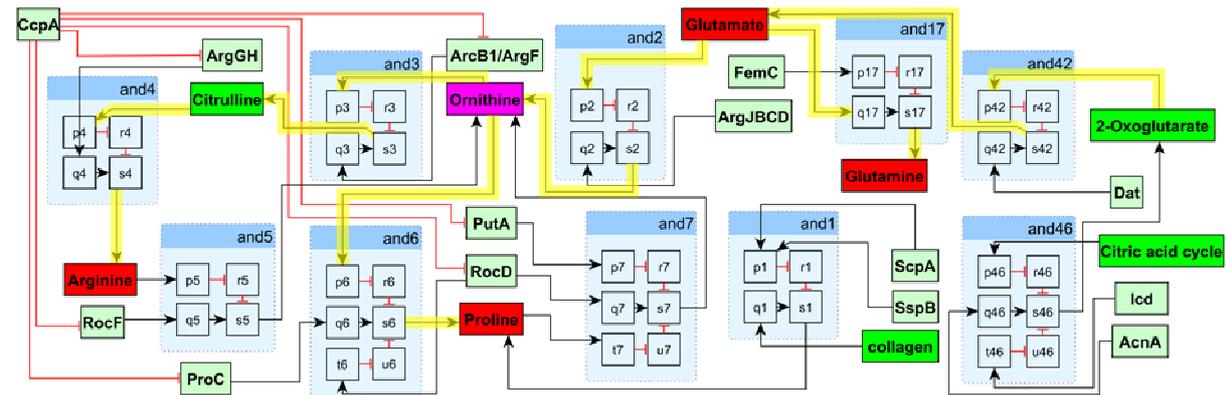
17a



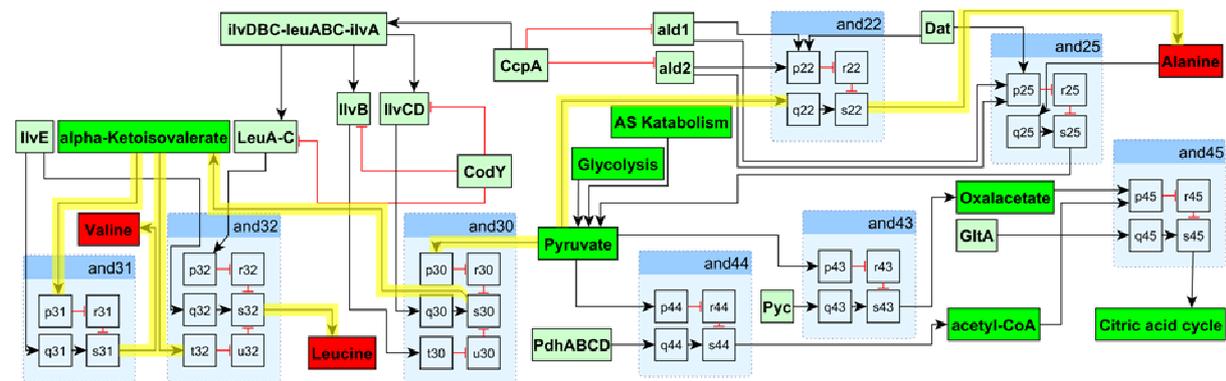
17b



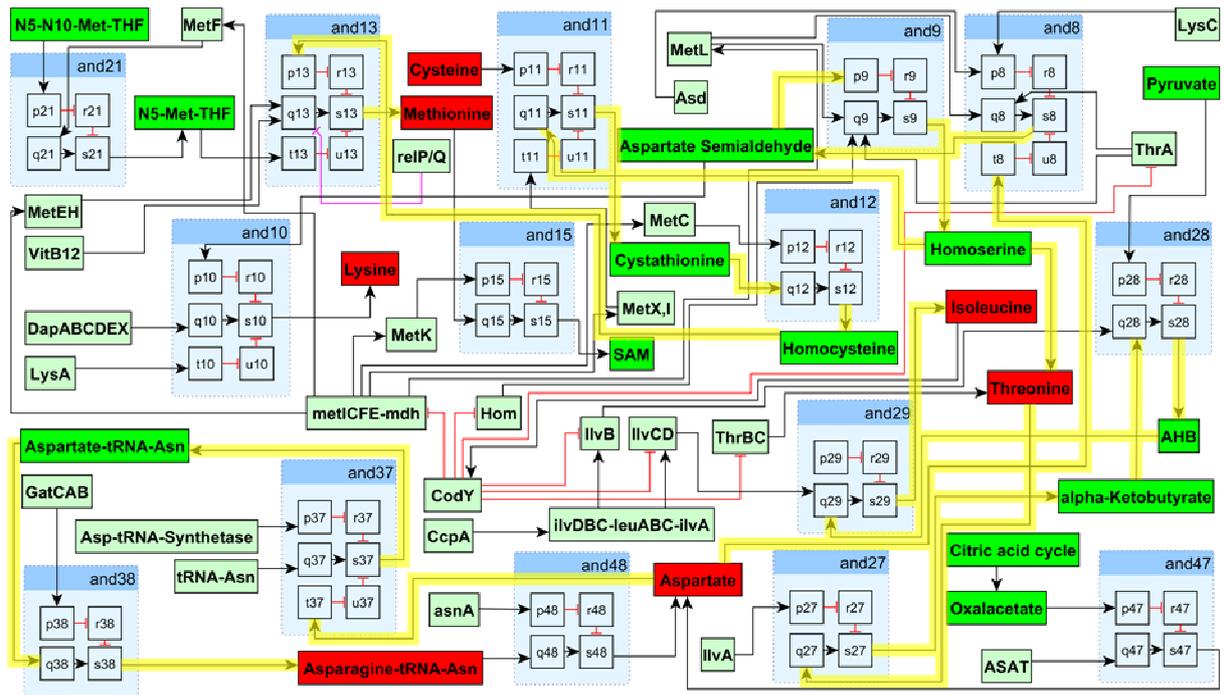
Abbildungen 17a&b: Das Netzwerk: Abbildung 17a zeigt das Netzwerk 1 (NW1), erstellt nach dem Wissen aus verschiedenen Publikationen und Datenbanken. AS sind als rote und Zwischenprodukte als grüne Knoten dargestellt. Die blauen Boxen stellen die hier vorgestellten und beschriebenen UND-Logikgatter dar. Abbildung 17b zeigt das optimierte Netzwerk 2 (NW2) mit all den postulierten Anpassungen in Pink. Abgebildet hier ist eine Übersichtsdarstellung, für Details siehe auch Abbildungen 18. Als Supplement sind die Abbildungen 17a&b auch als zoombare digitale Versionen verfügbar.



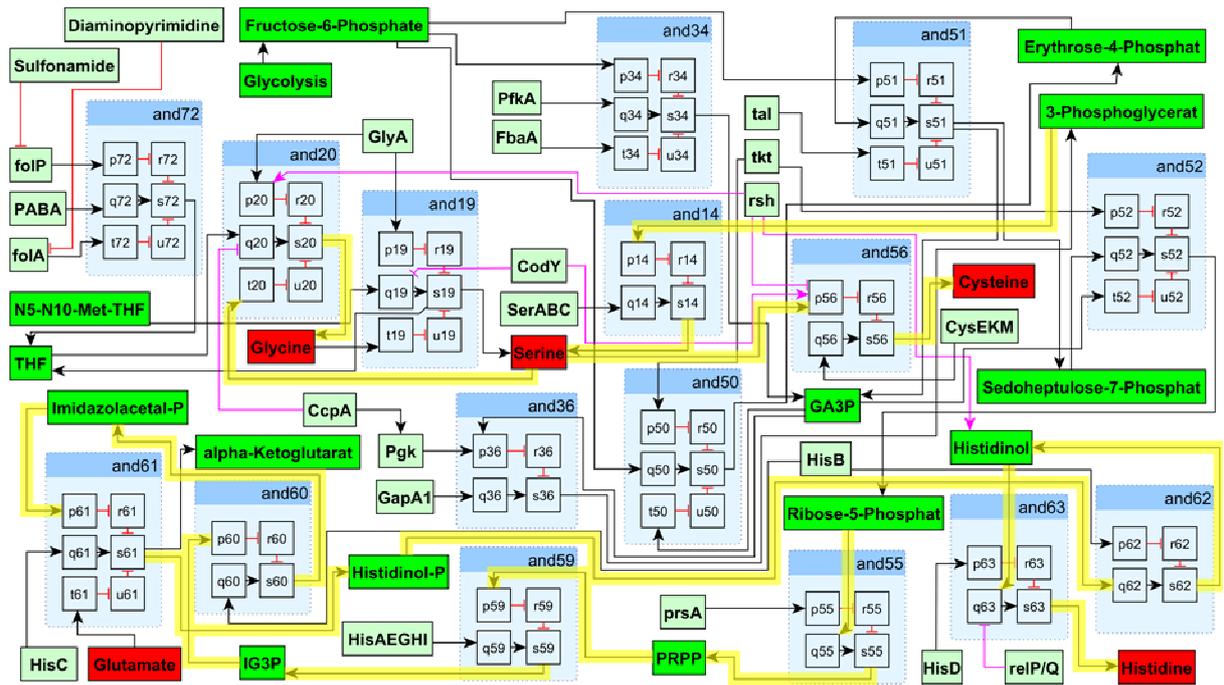
a)



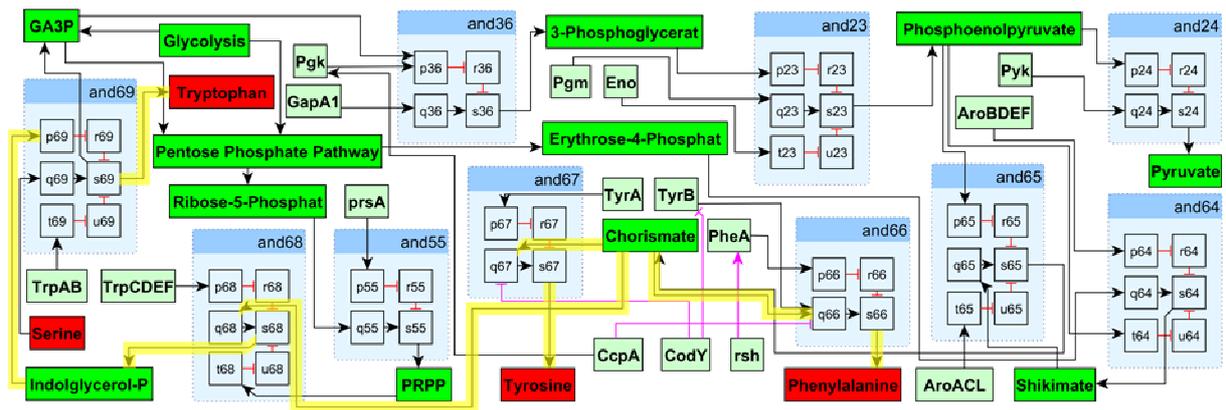
b)



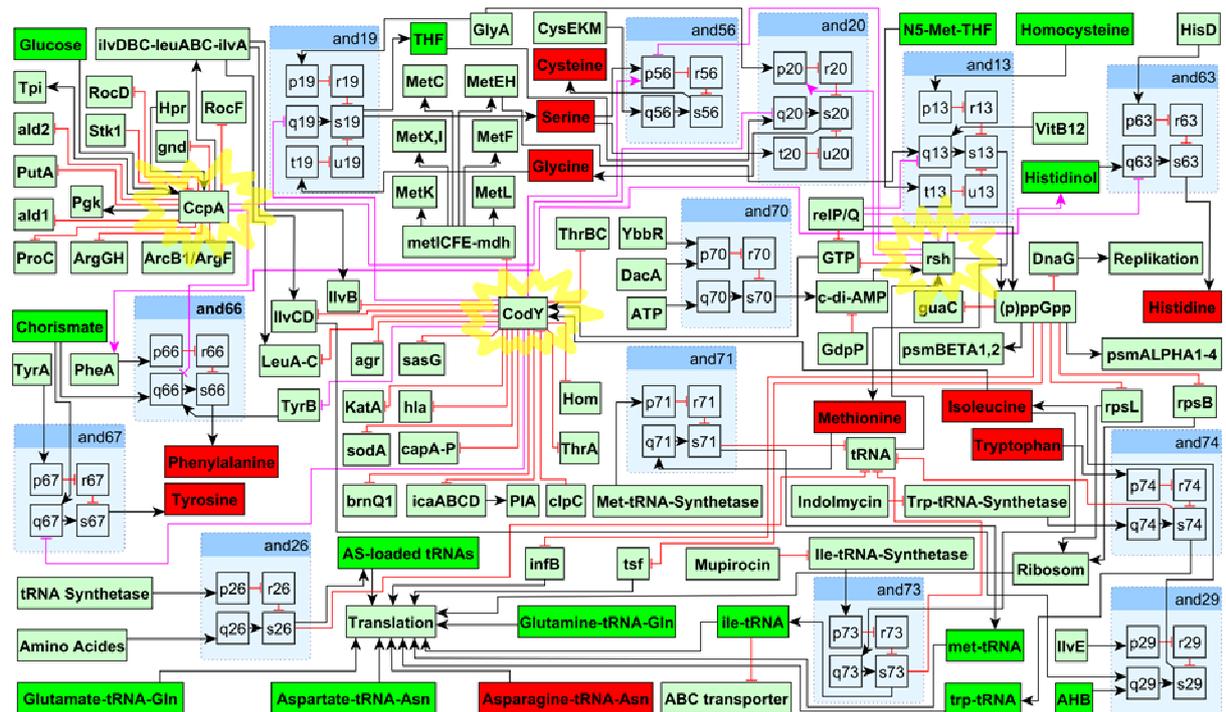
c)



d)



e)



f)

Abbildungen 18a-f: Ausschnitte des NW2 mit geöffneten logic gates: In diesen Abbildungen werden dem schematischen Überblick in Abbildung 3 entsprechend verschiedene Ausschnitte des NW2 mit geöffneten Logic gates dargestellt. Die Synthesewege der AS sind gelb markiert, genauso wie in Abb. 18f die zentralen Knoten der SR. Für einen schematischen Überblick siehe auch Abbildung 3.

ERGEBNISSE

DAS NETZWERK

Das Ziel dieser Simulation und des hier präsentierten Netzwerkes ist es, in-silico Ergebnisse zu erzielen, die mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmen und somit für Vorhersagen über die Bedeutung unterschiedliche Knoten und deren Interaktionen verwendet werden können. Auch Vorhersagen über die Synthese verschiedener AS, über den Effekt des Ausschaltens eines Knotens auf das Netzwerk sowie über den Einfluss von durch AS Mangel bedingten Nahrungsstress auf die SR können getroffen werden. Die Genauigkeit dieser Vorhersagen steht in direkter Abhängigkeit zu der Vollständigkeit des jetzigen Wissens, aber auch zur Präzision mit der dieses Wissen in der Simulation wiedergespiegelt werden kann.

Für die Erstellung des Netzwerkes mit 195 Knoten und 320 Kanten wurden also Daten aus verschiedenen Quellen, z.B. aus bereits bestehenden Netzwerken, aus Datenbanken wie STRING oder aus verschiedenen Publikationen verwendet (siehe auch Tabelle 1 im Appendix. So konnte sichergestellt werden, dass alle für SR und AS-Metabolismus wichtigen und aus der Literatur bekannten Knoten, Enzyme, AS und Zwischenprodukte (z.B. CodY, RSH, (p)ppGpp, CcpA, das Ilv-Operon und viele andere) mit eingeschlossen wurden. Das Ergebnis ist ein Netzwerk, welches einen kompletten Überblick über unser aktuelles Wissen rund um die zentralen Signalkaskaden und ihren Einfluss auf die unterschiedlichen wichtigen Knoten des AS Metabolismus sowie die SR in *S.aureus* bietet.

Zu Interpretation der simulierten Ergebnisse ist es wichtig zu wissen, dass dieses Netzwerk so konstruiert ist, dass ein Knoten nicht nur das Gen oder nur die zugehörige Proteinaktivität, sondern vielmehr die Aktivität des gesamten logischen Knotens darstellt. Hierbei handelt es sich natürlich zumeist um einen Gen-Lokus, dessen Aktivität häufig hauptsächlich durch die Stärke seiner Genexpression bedingt ist. Das experimentell beobachtete Wachstum stellt nur ein Ersatzparameter für die AS-Produktion dar. Dennoch wurden die Resultate der Wachstumsexperimente qualitativ mit den zugehörigen simulierten AS-Produktionen der jeweiligen knock-out-Mutanten

verglichen. Diese Simulationen wurden in Jimena einfach durch Herunterregulieren des zugehörigen AS-Inputs aus dem simulierten Medium, sowie durch in-silico Herunterregulieren der in-vitro ausgeschalteten Knoten erstellt.

WICHTIGE ZENTRALE KNOTEN

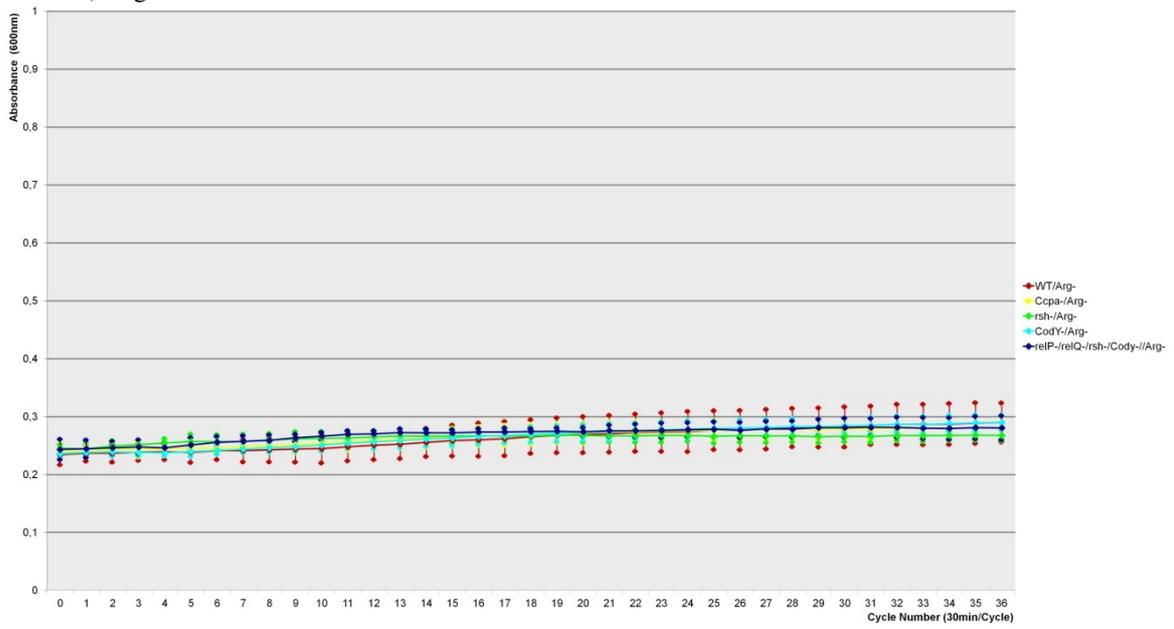
Die Knoten und damit auch die Mutanten, die in den hier vorgestellten Experimenten Verwendung fanden, wurden aufgrund ihrer anzunehmenden Bedeutung im aufgestellten Netzwerk ausgewählt. Die Höhe der Vernetzung eines Knotens mit anderen Knoten des Netzwerkes lässt hier einen relativ dazu größeren Einfluss auf das gesamte Netzwerk vermuten. Deshalb wurde wie in den vorangegangenen Studien [6] entschieden, die Stärke der Vernetzung der Knoten als einen Prädiktor zur Identifikation zentraler regulatorischer Knoten zu verwenden. Weil das Netzwerk eine allumfassende Darstellung des AS Metabolismus und der SR Mechanismen in *S.aureus* ist, wurden diese Knoten als ebenso bedeutsam und zentral für den AS-Metabolismus und die SR-Mechanismen in *S.aureus* in-vitro betrachtet. Für die Wachstumsexperimente wurden also vier unterschiedliche knock-out-Mutanten so ermittelter zentraler Knoten (*codY*-, *ccpA*-, *rsh*-, *relP/Q*- / *rsh*- / *codY*-) und der Wildtyp (WT)-Stamm verwendet. Diese Stämme wurden in MinimalMedien, in denen jeweils eine AS fehlte, angezüchtet. Wir bestimmten und untersuchten so das Wachstum der verschiedenen Stämme unter Bedingungen, in denen jeweils eine andere AS fehlte (siehe Abbildungen 19a-d für eine beispielhafte Auswahl einerseits der Wachstumsergebnisse oben und im Vergleich dazu der entsprechenden in-silico-Ergebnisse von NW1 in der Mitte und NW2 unten. Siehe auch Abbildungen 1a-t im Appendix für alle Darstellungen).

CodY ist mit 15 efferenten und afferenten Verbindungen der am weitesten vernetzte Knoten dieses Netzwerks. Durch Inhibierung verschiedener wichtiger Knoten der AS-Synthese, wie zum Beispiel dem *thr*-, dem *met*- oder dem *ilv*-Lokus, aber auch zahlreicher anderer zentraler Regulatoren kann durch CodY die Produktion verschiedener AS, wie z.B. Methionin, Valin, Leucin und viele andere reguliert werden [7, 9, 28, 73, 74]. Der *agr*-Lokus wird durch CodY über eine inhibierende Verbindung gehemmt. So wird, wie schon in früheren Simulationen gezeigt [6], die Fähigkeit von *S.aureus* einen Biofilm auszubilden verstärkt. Auch umgekehrt haben AS Einfluss auf die Aktivität von CodY. Dies geschieht zum Beispiel über eine indirekt hemmende Afferenz von RSH, einem zentralen Knoten der SR, welcher seinerseits indirekt durch vorhandene

AS inhibiert wird. Darüber hinaus wird CodY selbst durch Isoleucin aktiviert. CodY scheint also ein zentraler Regulator zu sein, welcher auf der einen Seite die AS-Produktion herunter fährt und so Ressourcen spart, wenn diese extern verfügbar sind, auf der anderen Seite jedoch die AS-Produktion freigibt, wenn sie benötigt wird; also in Situationen, in denen die externe Verfügbarkeit von AS gering ist.

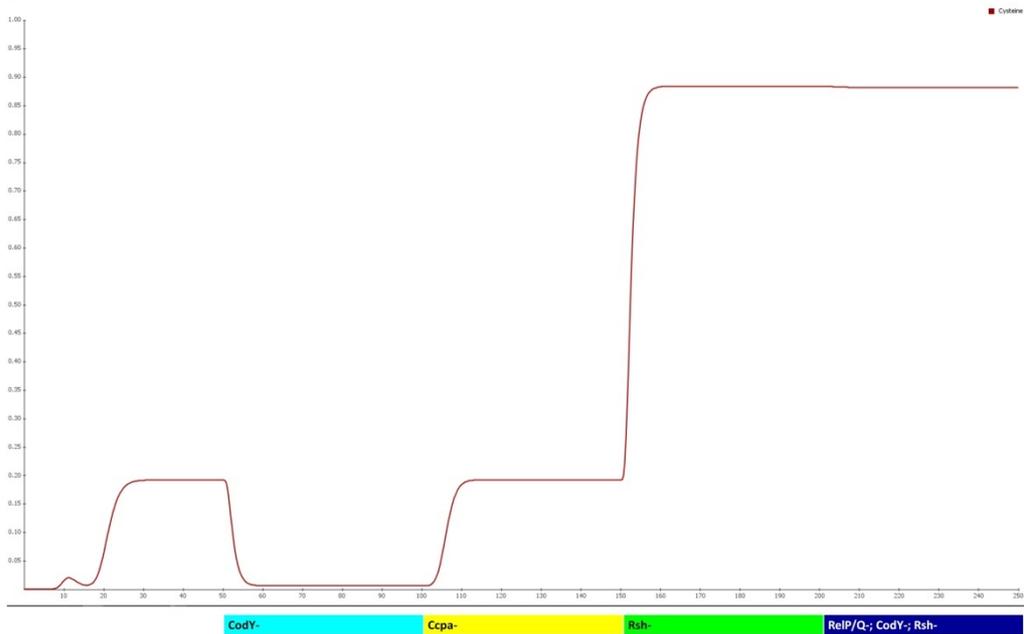
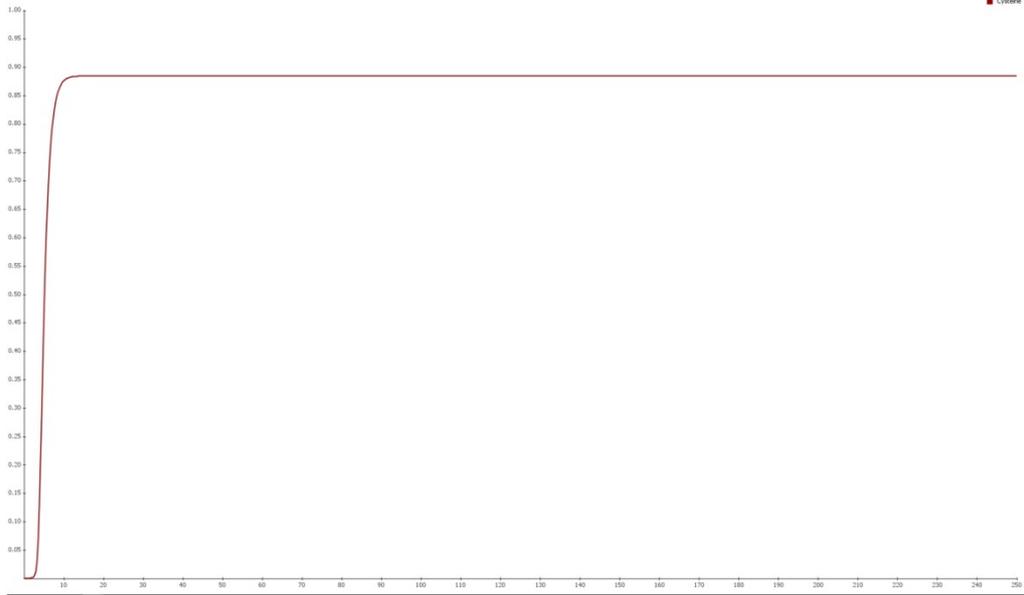
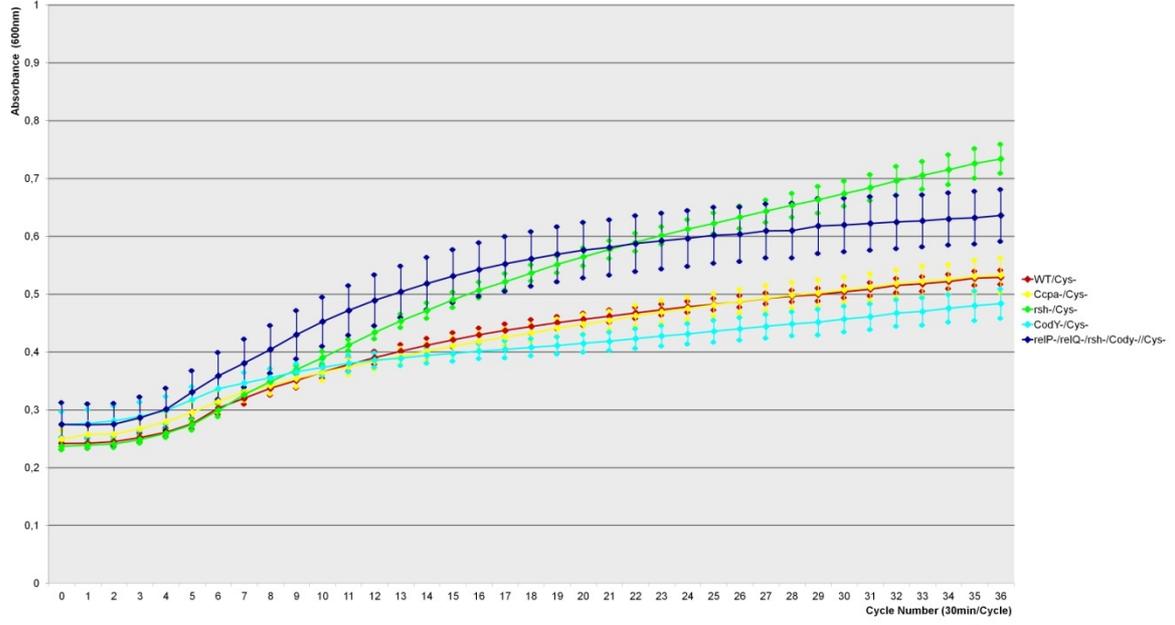
Mit 12 efferenten und 2 afferenten Verbindungen ist CcpA der Knoten mit den zweitmeisten Verbindungen. CcpA wird zum Beispiel durch Glucose aktiviert, was zu einer Hochregulation von CcpA in Situationen führt, in denen viel Glucose zur Verfügung steht. Efferente, aktivierende Verbindungen wiederum führen zu einer Hochregulation von für die Glykolyse wichtigen Enzymen [8]. Die Verwertung von Glucose für den Pentosephosphatweg wird reguliert über eine hemmende Efferenz von CcpA, die *gnd* und damit die Einschleusung von Kohlehydraten in den Pentosephosphatweg hemmt [8]. Über CcpA aktiviert Glucose also für die Glykolyse wichtige Knoten und hemmt die Einschleusung in den Pentosephosphatweg. CcpA konzentriert so in Situationen mit Glukoseverfügbarkeit den Metabolismus auf die Glykolyse und spielt damit auch eine zentrale Rolle bei der Produktion wichtiger Metaboliten für den AS Metabolismus. Das *ilvDBC-leuABC-ilvA*-Operon wird über eine weitere aktivierende Efferenz von CcpA aktiviert, was zu einer verstärkten Produktion von verzweigtkettigen AS führt [28, 75]. Durch die Hemmungen von ArgF,G und H, RocD,F, ProC und PutA kontrolliert CcpA die Umwandlung von Prolin in Arginin und umgekehrt [39]. Über weitere hemmende Efferenzen auf Ald1 und Ald2 hemmt CcpA z.B. auch die Produktion von Alanin [8, 76]. CcpA führt also, wenn es zum Beispiel durch vorhandene Glucose aktiviert wird, zu einer Konzentration des Metabolismus auf die verbesserte Nutzung von Glucose und auf die Synthese von verzweigtkettigen AS.

19a) Arg-

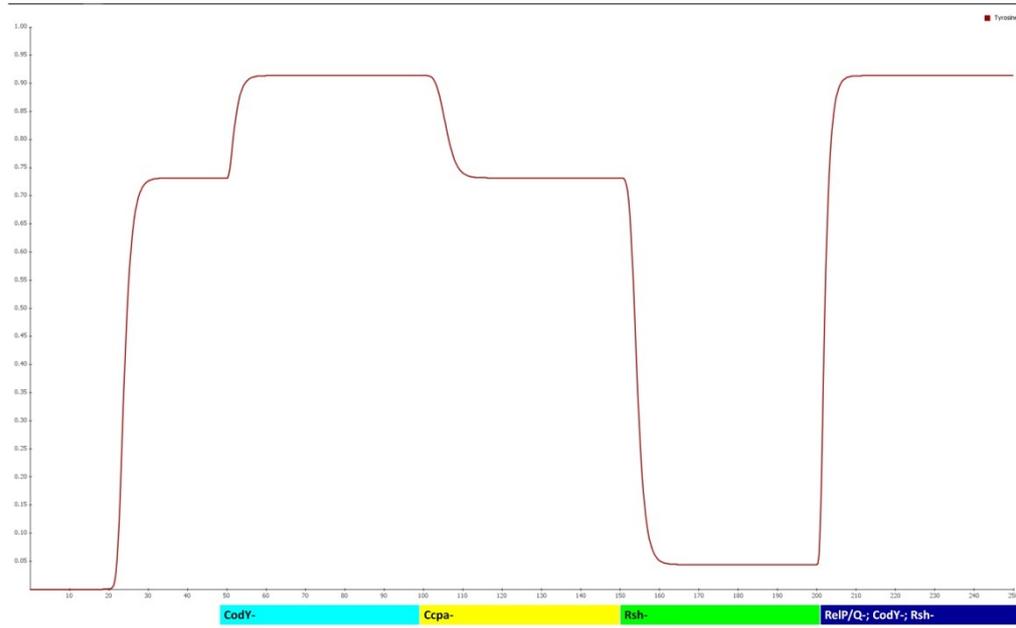
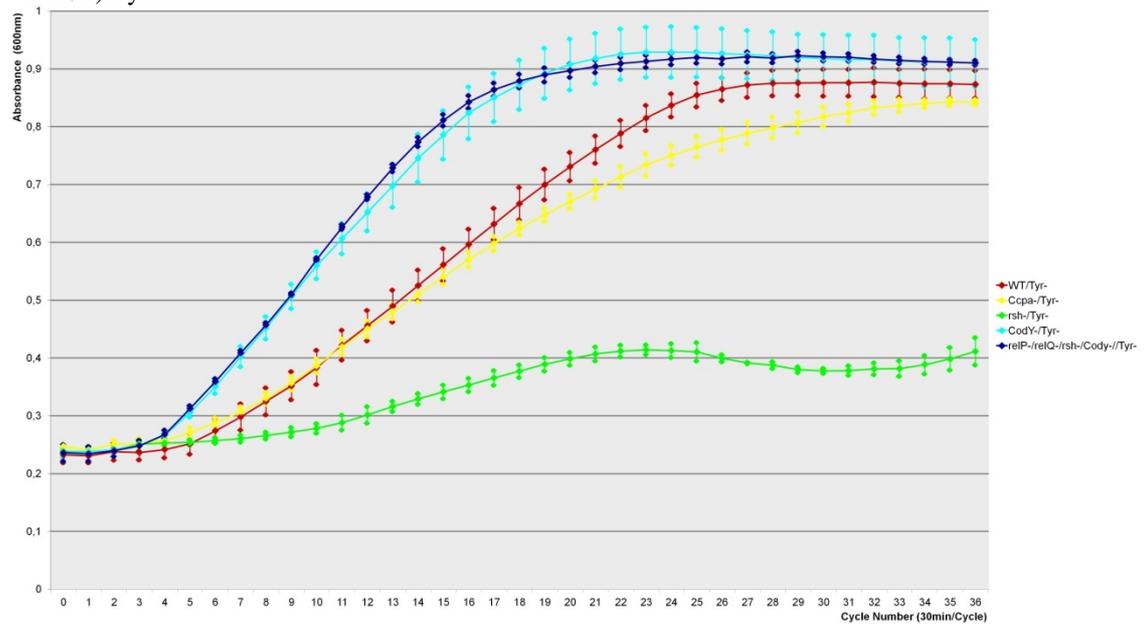


Cody- CcpA- Rsh- RelP/Q; Cody-; Rsh-

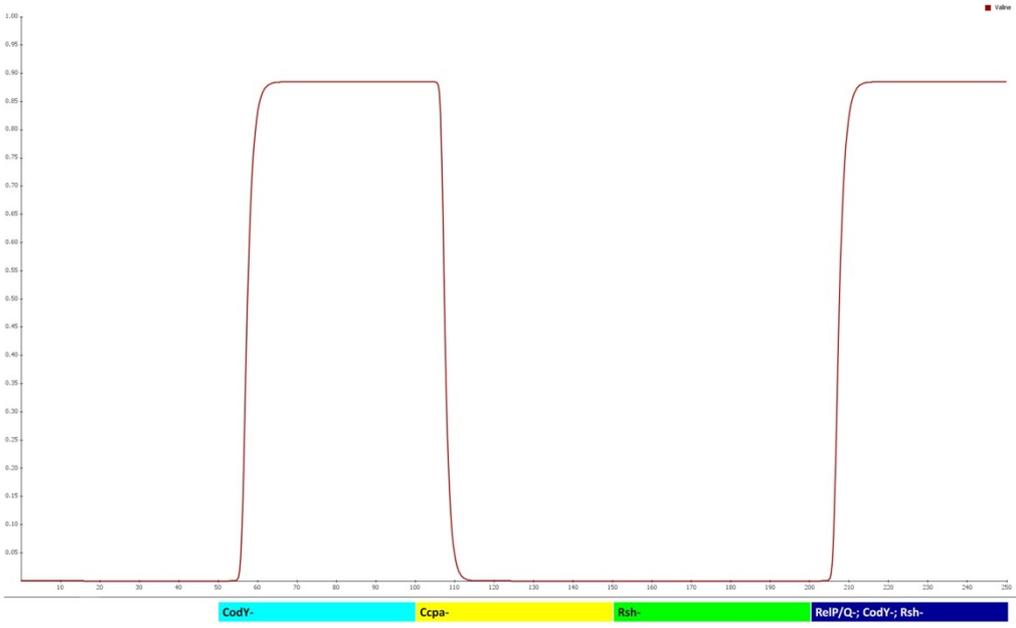
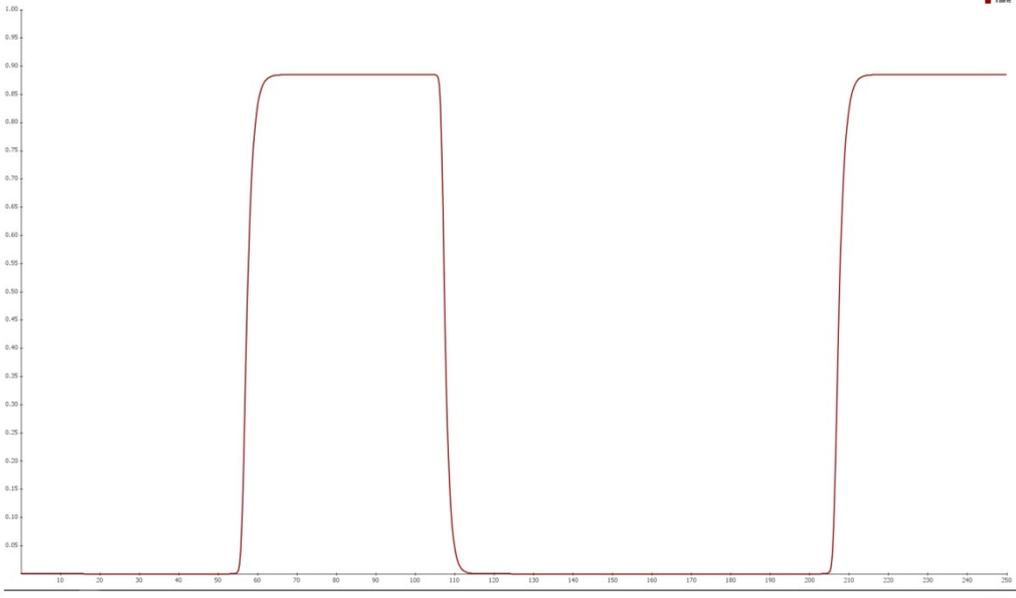
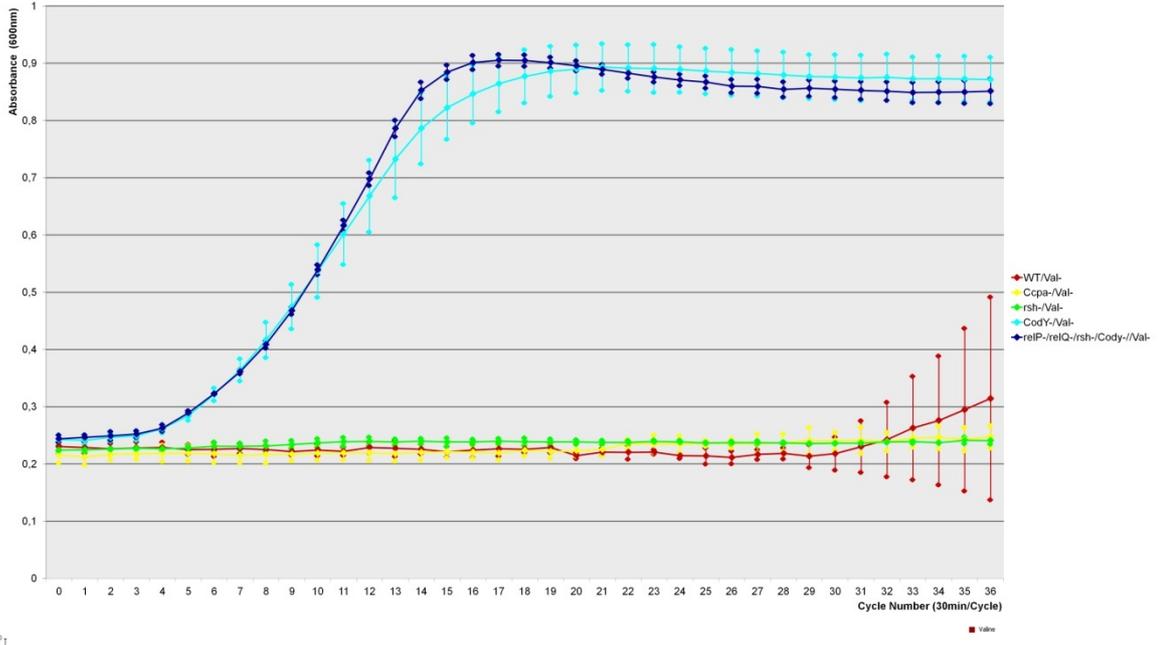
19b) Cys-



19c) Tyr-



19d) Val-



Abbildungen 19 a-d: In-vitro - in-silico-Vergleich: Im oberen Teil jeder Abbildung sind die Daten der Wachstumsexperimente in den Mangelmedien ohne die jeweilige AS aufgetragen. Die verschiedenen knock-out Mutanten sind hier anhand der verschiedenfarbigen Kurven dargestellt. Im mittleren und unteren Teil jeder Abbildung ist die in-silico-Syntheseleistung der jeweiligen AS unter den verschiedenen knock-out-Bedingungen dargestellt. Die mittlere Grafik zeigt die Simulationsergebnisse von Netzwerk 1; die untere Abbildung zeigt die Simulationsergebnisse von Netzwerk 2. In dieser Abbildung ist eine Auswahl der verschiedenen AS Mangelmedien gezeigt. Für eine komplette Darstellung aller Experimente siehe auch Abbildung 1 a-t im Appendix.

Bei dem Knoten mit den drittmeisten Verbindungen handelt es sich um (p)ppGpp einen Knoten ohne genetisches Korrelat. Vielmehr ist er ein als Signalstoff wirkendes metabolisches Intermediat, welches unter enger Kontrolle von RSH steht und durch RSH aktiviert wird [24]. Diese Aktivierung geschieht, indem GTP durch RSH zu (p)ppGpp umgewandelt wird. Das genetische Korrelat zur Synthese von (p)ppGpp wird somit am ehesten durch RSH dargestellt. GTP wird also durch RSH gehemmt und aktiviert seinerseits wiederum CodY. Mit seinem indirekt hemmenden Einfluss auf CodY und dem aktivierenden Einfluss auf (p)ppGpp ist RSH also zumindest der dritt bedeutendste regulatorische Knoten dieses Netzwerkes. Unbeladene tRNA, ein Signal für AS- und damit auch für Ressourcenmangel, aktivieren RSH [24]. RSH produziert, wie oben schon erwähnt, (p)ppGpp, welches Translation und Transkription hemmt und damit auch in Fällen von AS-Mangel den Ressourcenverbrauch reduziert [9]. Für die Produktion von (p)ppGpp wird GTP verbraucht und somit durch RSH inhibiert. Dies führt indirekt zu einer Hemmung von CodY durch RSH, was eine Entthemmung vieler für die AS-Produktion essentieller Knoten zur Folge hat [9, 25]. Somit wird in Fällen von AS Mangel über diesen Mechanismus die AS Produktion gesteigert, anders herum aber bei AS Überschuss gehemmt. RSH passt somit den AS Metabolismus in *S.aureus* an die Ressourcenverfügbarkeit an.

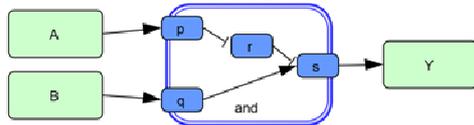
In dieser Arbeit wurde also wieder starke Vernetztheit zur Identifizierung von zentralen regulatorischen Knoten verwendet und stellte sich erneut als guter Richtwert hierfür heraus. Drei regulatorische Schlüsselknoten (CodY, CcpA, RSH) wurden identifiziert und ihr Verhalten in-vitro in Wachstumsexperimenten, aber auch in-silico in der Simulation untersucht. Die in-vitro- und auch die in-silico-Resultate heben beide die fein abgestimmte regulatorische Rolle von CodY, CcpA und RSH hervor. Von besonderer Bedeutung sind diese Knoten vor allem für die Regulation der SR, also die Reaktion des Metabolismus von *S.aureus* auf AS-Mangelzustände und damit auch auf die Regulation der AS-Synthese und -Nutzung.

AND Gate:

Boolesche Darstellung $Y = A \wedge B$

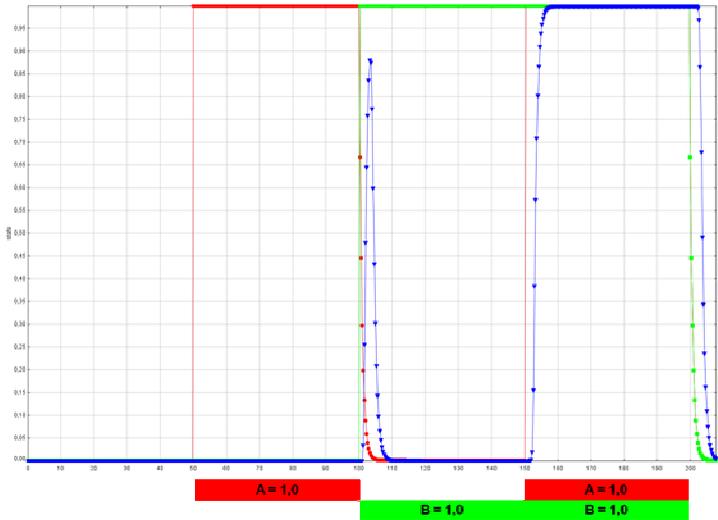


Konstruktion:



Wahrheitstabelle:

A	B	Y
0	0	0
1	0	0
0	1	0
1	1	1

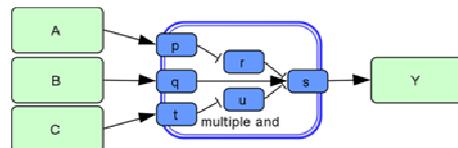


3 Input AND Gate:

Boolesche Darstellung $Y = A \wedge B \wedge C$



Konstruktion:



Wahrheitstabelle:

A	B	C	Y
0	0	0	0
1	0	0	0
0	1	0	0
0	0	1	0
1	1	0	0
1	0	1	0
0	1	1	0
1	1	1	1

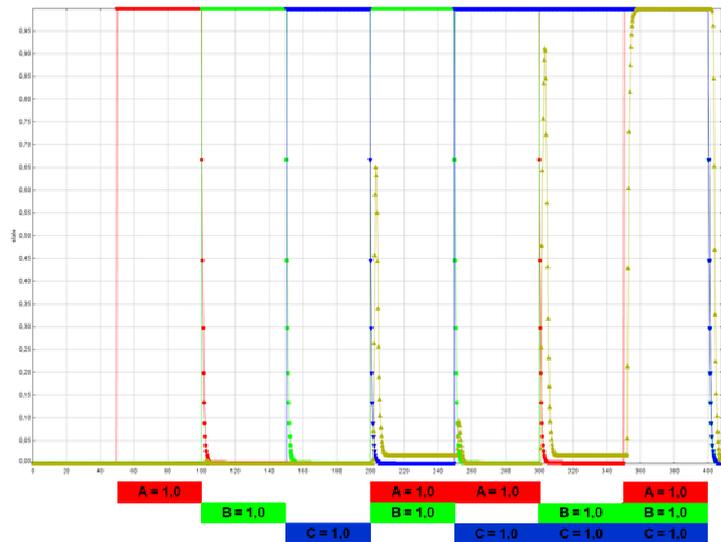


Abbildung 20: Boolesche AND Logikgatter: Hier sind zwei AND-Logikgatter dargestellt, inklusive der jeweiligen Wahrheitstabellen, der in-silico-Konstruktionen, der booleschen Schreibweisen und Darstellungen sowie der Reaktion der Knoten in der Simulation. Unterhalb der Simulationsgrafik sind die jeweiligen Perturbationen dargestellt. Siehe auch Abbildungen 2a-g im Appendix für weitere Logikgatter.

Für die präzise Widerspiegelung dieser Daten im Netzwerk ist es wichtig, in-silico die Bedeutung der Verfügbarkeit, sowohl aller notwendigen Edukte als auch aller notwendigen Enzyme zur Herstellung des Produktes, abzubilden. Dies ist wichtig, da im AS-Metabolismus häufig ein oder mehrere Zwischenprodukte durch ein oder mehrere Enzyme in weitere Zwischen- oder Endprodukte umgewandelt werden. Darum wurde

eine Methode entwickelt, um unterschiedliche Logikgatter, insbesondere „UND Bedingungen“ in SQUAD Simulationen implementieren zu können. Mit diesen kann nun auch simuliert werden, dass häufig nicht nur die Edukte, sondern z.B. auch Enzyme für die Synthese eines Produkts unumgänglich sind. Diese unterschiedlichen Logikgatter wurden in-silico in SQUAD konstruiert und erfolgreich getestet (siehe auch Abbildung 20 für das "AND-Logikgatter" sowie Abbildungen 2a-g im Appendix für weitere Logikgatter). Das wichtigste Logikgatter, das "UND-Logikgatter" wurde in dem hier vorgestellten Netzwerk verwendet und stellt hier seine Funktionalität unter Beweis.

EXPERIMENTELLE- UND SIMULATIONS-ERGEBNISSE

Verschiedene spezielle *S.aureus* Mutanten wurden in definierten Medien jeweils unter Entzug einer AS angezchtet, um in-vitro den Einfluss zentraler regulatorischer Knoten und Schaltkreise zu analysieren und darzustellen.. Hierzu wurde das Wachstum des WT (HG 001) verglichen mit den Mutanten *codY*, *ccpA* und *rsh_{syn}* (mutiert in der Synthedomäne von *rsh*) sowie der (p)ppGpp0-/*codY*- quadruple Mutante mit Mutationen in allen drei (p)ppGpp Synthetasen (*rsh*, *relP*, *relQ*) und *codY*. Obwohl jeweils eine der AS vorenthalten wurde und verschiedene zentrale Knoten ausgeschaltet wurden ließ sich doch zumeist ein gutes Wachstum beobachten. (Siehe auch Abbildung 19 sowie Abbildung 1a-t im Appendix).

Das hier gefundene Wachstum ist ein Surrogat Parameter für die Synthese der vorenthaltenen AS und wurde darum mit der in-silico gefundenen AS-Synthese verglichen.

Das erstellte Netzwerk wurde für die Simulation in Jimena geladen und die jeweiligen ausgeschalteten Knoten sowie die Eingangsknoten der entzogenen AS auf einen Wert von 0 herunterreguliert. Für die Bewertung und Interpretation der so erhaltenen in-silico Darstellung der in-vitro-Experimente ist es wichtig zu berücksichtigen, dass ein Knoten in der Simulation nicht einfach nur die Proteinaktivität, sondern vielmehr die funktionelle Aktivität des entsprechenden Knotens als Ganzes, oft natürlich hauptsächlich bedingt durch die Stärke der Genexpression, widerspiegelt.

WACHSTUMSPHÄNOTYPEN DER VERSCHIEDENEN STÄMME

Für den WT kann in den in-vitro-Wachstumskurven eine Essentialität für Leucin und Valin gefunden werden, die sowohl in NW1 als auch in NW2 gut nachvollzogen werden

kann. Das gehemmte Wachstum unter Prolin-Entzug wird in-silico nur in NW 2 widerspiegelt und dann auch nur wenn zusätzlich Hydroxyprolin vorenthalten wird. Ohne den Entzug von Hydroxyprolin zeigen weder NW1 noch NW2 diesen Effekt. Die in-vitro gefundene Wachstumshemmung ohne Arginin und Cystein findet sich in-silico nur in NW2; NW1 zeigt diesen Effekt hingegen nicht. Das Gleiche gilt auch für Glycin, Methionin und Phenylalanin. Die in-vitro gefundenen Hemmungen des Wachstums unter Entzug dieser AS kann in-silico auch nur in NW2 und nicht in NW1 gefunden werden. Die NW2-Simulation von Histidin zeigt im WT genauso wie in der *codY*- und der *ccpA*-Mutante eine geringe Synthesehemmung welche in dem Ausmaß in-vitro aber auch in NW1 nicht nachvollzogen werden kann.

Die *codY*-Mutante zeigt in der Abwesenheit von Arginin oder Cystein in-vitro eine deutliche Wachstumsreduktion, die durch NW2 in der Simulation perfekt abgebildet wird. Im Gegensatz dazu kann die in-vitro gefundene Wachstumsreduktion der *codY*-Mutante ohne Prolin weder in NW1 noch in NW2 nachvollzogen werden. Wird jedoch Hydroxyprolin zusätzlich zu Prolin entzogen, kann die reduzierte Prolinsynthese nun auch in NW2 nachvollzogen werden. Die Anzucht der *codY*-Mutante ohne Glycin führt zu einem gehemmten Wachstum, welches quantitativ so in-silico nicht reproduziert werden kann. Ohne Methionin oder Phenylalanin zeigt sich in-vitro ein reduziertes Wachstum des in *codY*- mutierten Stammes. Dies kann in-silico in NW2, jedoch nicht in NW1 nachvollzogen werden.

Bei Anzucht von *S.aureus* mit mutiertem *ccpA* zeigt sich sowohl in-vitro als auch in-silico in NW2 eine Essentialität für Arginin, Cystein und Methionin. Die Essentialität für Leucin und Valin kann in-vitro sowie in beiden in-silico Simulationen (NW1 und NW2) gefunden werden. Genauso wie in den anderen Stämmen kann auch für die *ccpA*-Mutante in-vitro ohne Prolin und auch bei zusätzlichem Entzug von Hydroxyprolin ein reduziertes Wachstum gefunden werden welches in-silico nur in NW2 bei kombiniertem Entzug von Prolin und Hydroxyprolin und nicht in NW1 oder bei Belassen von Hydroxyprolin gefunden werden kann. Das in-vitro ohne Leucin oder Phenylalanin andeutungsweise reduzierte Wachstum kann in-silico quantitativ weder in NW1 noch in NW2 reproduziert werden.

Die *rsh* Mutante zeigt in-vitro sowie in-silico in NW1 und NW2 genauso wie die *ccpA*-Mutante und der WT eine Essentialität für Valin und Leucin. Darüber hinaus ist die *rsh*

Mutante in-vitro auch essentiell für Arginin, Glycin, Methionin, Phenylalanin und Tyrosin. In diesen Fällen kann dies in-silico aber nur in NW2 und nicht in NW1 nachvollzogen werden. Ohne Histidin zeigt die *rsh* Mutante sowohl in-vitro als auch in-silico in NW2 ein reduziertes Wachstum. Genauso wie in den ersten drei beschriebenen Stämmen lässt sich auch hier in-vitro die Essentialität für Prolin finden welche sich in-silico nur in NW2 und dann nur bei zusätzlichem Entzug von Hydroxyprolin reproduzieren lässt.

Die Dreifachmutante mit ausgeschaltetem *rsh*, *relP/Q* und *codY* zeigt in-vitro wiederum die Essentialität für Prolin, welche in-silico nur in NW2 bei zusätzlichem Entzug von Hydroxyprolin gefunden werden kann. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass in all den getesteten Stämmen in-silico in NW1 aber auch in NW2 die Fähigkeit zur Synthese von Prolin aus Hydroxyprolin überbewertet wird. Darüber hinaus zeigt diese Mutante in-vitro eine Essentialität für Arginin, Glycin und Phenylalanin, welche auch in-silico in NW2 gefunden werden kann (Siehe auch Abbildungen 3a-e im Appendix sowie Tabelle 3).

VERGLEICH DER IN-VITRO MIT DEN IN-SILICO ERGEBNISSEN

Ohne Arginin konnte eine eindeutige Hemmung des Wachstums in-vitro beobachtet werden. Dies legt nahe, dass Arginin essentiell, zumindest für die hier getesteten Bakterien ist. Auch Prolin scheint essentiell für das Wachstum von *S.aureus* zu sein. Wird *S.aureus* ausschließlich Prolin entzogen kann ein minimales Restwachstum in-vitro beobachtet werden. Am ehesten lässt sich dies damit erklären, dass Hydroxyprolin, eine Prolin-Vorstufe, welche unter anderem auch in Kollagen zu finden ist, weiter eine gewisse Versorgung mit Prolin sicherstellt und somit ein minimales Restwachstum aufrechterhält. Der zusätzliche Entzug von Hydroxyprolin in-vitro verringert das Wachstum weiter. In-vitro zeigten sich Arginin sowie Prolin in den Experimenten ohne Zweifel essentiell. In der Literatur hingegen und somit auch in NW1 sind Arginin und Prolin nicht als essentiell beschrieben. Schon alleine das Herunterregulieren von Ornithin, einer Vorstufe von sowohl Arginin als auch Prolin, hat in-silico in NW2 die Essentialität von Prolin und Arginin zur Folge.

Im Cystein-Mangelmedium konnte in den in-vitro Experimenten ebenfalls ein gehemmtetes Wachstum beobachtet werden. *S.aureus* zeigt eine moderate Wachstumsgeschwindigkeit in der Wachstumsphase und erreicht dann nur ein verhältnismäßig niedriges Plateau und somit eine verminderte Populationsdichte. Das

beste Wachstum mit einem zumindest teilweise wieder hergestellten Wachstum findet sich in der *rsh*-Mutante. Das geringste Wachstum kann hingegen in der *codY*-Mutante gefunden werden. CcpA hingegen scheint keinen Einfluss auf die Cystein-Synthese und damit auf das Wachstum von *S.aureus* in einem Cystein-Mangelmedium zu haben. Ganz im Gegensatz zu dem auf Literaturdaten basierenden Netzwerk NW1 zeigt das verbesserte Netzwerk NW2 diese Effekte in-silico sehr gut.

Wenn *S.aureus* in einem Medium ohne Histidin angezchtet wird zeigt die *rsh*-Mutante ein langsames Wachstum mit einer weniger steilen Wachstumskurve, jedoch mit einer vergleichbaren schlussendlichen Populationsdichte wie der WT. Die *ccpA*-Mutante und die *codY*-Mutante weisen, verglichen mit dem WT, keine relevanten Unterschiede im Wachstum auf. Die Dreifachmutante hingegen zeigt ein deutlich verbessertes Wachstum, das so weder im *codY* noch im *rsh* knock-out-Stamm gefunden werden kann. Dieses verbesserte Wachstum muss also entweder ein Ergebnis des Ausschaltens von *relP/Q* oder aber ein emergenter Effekt sein, der sich durch das Ausschalten aller drei Knoten zusammen ergibt. Dies kann in-silico sehr gut reproduziert werden, indem RelP/Q, wie in NW2 umgesetzt, die Histidinproduktion beeinflusst. Ob es sich hierbei allerdings tatsächlich um einen durch RelP/Q direkt vermittelten Effekt oder vielmehr um einen additiven/emergenten Effekt handelt, muss in weiteren Experimenten gezeigt werden.

Wenn *S.aureus* Glycin entzogen wird kann in den hier durchgeführten Experimenten im WT nur ein moderates Wachstum und in der *rsh*-Mutante ein noch schlechteres Wachstum gefunden werden. Durch das Ausschalten von *codY* und noch viel deutlicher durch das Ausschalten von *ccpA* zeigt sich hingegen ein verstärktes Wachstum, was eine vermehrte Glycinproduktion nahelegt, welche das verbesserte Wachstum dieser *S.aureus*-Stämme im glycinarmen Medium bewirkt. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die Glycinproduktion in *S.aureus* unter den hier getesteten Knoten insbesondere durch CcpA und zu einem geringeren Anteil auch durch CodY gehemmt wird. RSH hingegen fördert die Glycinsynthese und damit auch das Wachstum von *S.aureus* unter Glycinentzug. Da dies, der durchgeführten Literaturrecherche zufolge, bis dato nicht gezeigt und beschrieben wurde, wird es in-silico durch das auf Literaturdaten basierende Netzwerk - NW1 nicht wiedergespiegelt, wohingegen NW2 diesen Effekt in-silico sehr gut darstellt.

Das ohne Leucin genauso wie ohne Valin in-vitro zu beobachtende, gehemmte Wachstum kann durch das Ausschalten von *codY* wiederhergestellt werden. Dies legt nahe, dass CodY für die Essentialität des WT *S.aureus* Stammes für Leucin und Valin verantwortlich ist. Dieser Effekt kann in-silico sowohl in NW1 als auch in NW2 reproduziert werden.

S.aureus welche in Medium ohne Tyrosin oder Methionin angezüchtet werden, zeigen in den Wachstumsexperimenten eine deutliche Abhängigkeit vom SR-System. Dies bedeutet, dass ihr Wachstum durch RSH aktiviert und durch CodY gehemmt wird. Ob der RSH Effekt direkt oder, zum Beispiel über die Hemmung von CodY, indirekt ist, muss in zukünftigen Experimenten herausgearbeitet werden. NW1 zeigt, da in der Literatur bis heute nicht beschrieben, diese Abhängigkeit von RSH/CodY, also dem SR-System, nicht. NW2 hingegen spiegelt diese Beeinflussung sehr gut wider.

Threonin Limitation hat eine Wachstumskurve zur Folge welche in der exponentiellen Phase die gleiche Abhängigkeit von RSH/CodY, also von dem SR-System zeigt, wie sie auch unter Tyrosin- oder Methioninentzug gefunden werden kann. Die schlussendliche Populationsdichte hingegen ist davon nicht wirklich beeinflusst. Diese Abhängigkeit von RSH/CodY unter Threoninentzug kann in-silico in NW1 und in gleicher Weise auch in NW2 beobachtet werden.

In-vitro führt der Entzug von Phenylalanin zu einer gehemmten Wachstumsgeschwindigkeit mit einer nicht mehr exponentiellen, sondern vielmehr nur noch linearen Wachstumsphase welche sich außerdem durch CcpA und CodY gehemmt und durch RSH gestärkt zeigt. Das Wachstum ist also durch das Ausschalten von *rsh* deutlich gehemmt. Diese Abhängigkeit der Phenylalaninsynthese von *rsh* ist bisher in der Literatur nicht beschrieben und somit in-silico in der NW1-Simulation nicht nachvollziehbar. NW2 hingegen zeigt in-silico eine eindeutige Abhängigkeit der Phenylalaninsynthese von RSH und ebenso wie die in-vitro Wachstumskurven, ein verbessertes Wachstum bei ausgeschaltetem *ccpA* oder *codY*.

In den in-vitro-Experimenten zeigt *S.aureus* mit mutiertem *rsh* unter Serinentzug ein gering abgeschwächtes Wachstum in der exponentiellen Phase, erreicht aber schlussendlich etwa die gleiche Populationsdichte wie der WT im Vollmedium. Mutationen von *codY* hingegen führen zu einem verbesserten Wachstum unter Serinentzug. Die auf Literaturdaten basierende in-silico-Simulation mit NW1 zeigt in

diesen Fällen keine Syntheseänderung und spiegelt somit die Plateauphase sehr gut wider. Die Simulation mit NW2 hingegen reproduziert sehr gut die in-vitro beobachteten Veränderungen in der exponentiellen Wachstumsphase und zeigt den hemmenden Effekt von CodY durch die in diesem Falle verbesserte Serinsynthese. Außerdem zeigt die Simulation mit NW2 sehr gut den die Serinsynthese fördernden Effekt von RSH durch die unter Bedingungen mit ausgeschaltetem RSH reduzierte Serinsynthese.

QUANTIFIZIERUNG DER ERGEBNISSE

Zur Beurteilung der Relevanz und Verlässlichkeit des Netzwerkes ist natürlich die in-vitro - in-silico- Übereinstimmung, also die Übereinstimmung zwischen den Experimenten und der Simulation, von zentraler Bedeutung. Um nun einen Eindruck zu bekommen, wie verlässlich die Simulation die in-vitro-Ergebnisse und damit die Prozesse der realen Welt tatsächlich widerspiegelt, wurden diese in-vitro - in-silico-Übereinstimmungen berechnet, indem das Maximum des Wachstums am Ende der Wachstumsexperimente (Zyklus 36) mit den Ergebnissen der Simulationen verglichen wurde. Das Wachstumsverhalten wird allerdings durch diese Momentaufnahme bei Zyklus 36 nur sehr ungenügend widerspiegelt. Vielmehr ergibt sich die Wachstumsleistung und damit auch die AS-Syntheseleistung der getesteten AS-Stämme aus der entsprechenden Leistung im gesamten Experiment. Durch Integration über die Wachstumskurve ergibt sich die Fläche unter der Kurve, die „area under the curve“ (AUC), welche die Wachstumsleistung und damit auch die AS-Syntheseleistung des gesamten Experimentes viel präziser darstellt.

Unter den verschiedenen AS-Mangelbedingungen war das Wachstum der unterschiedlichen *S.aureus*-Stämme und damit der Surrogatparameter der Synthese der entsprechenden AS in den meist Fällen qualitativ gut übereinstimmend mit den Ergebnissen der Simulation. Im Vergleich des, nach eingehender Literaturrecherche, aufgrund der Literaturangaben erstellten Netzwerkes NW1 mit den Wachstumsexperimenten zeigte sich eine in-vitro - in-silico-Übereinstimmung von 62%. Trotz dieser schon sehr guten Übereinstimmung wurden zwölf weitere Kanten postuliert und so ein zweites Netzwerk, NW2 erstellt, um die realen Prozesse in *S.aureus* noch wahrheitsgetreuer widerzuspiegeln und ein noch realistischeres Netzwerk zu erhalten. In diesem NW2 hat CcpA nun eine hemmende Verbindung zu Phenylalanin und

Glycin. CodY hemmt jetzt zusätzlich Phenylalanin, Tyrosin, THF und Serin. Cystein hingegen wird nun durch CodY aktiviert. RSH hat drei postulierte zusätzliche aktivierende Efferenzen. Eine zu Phenylalanin sowie jeweils eine zu Glycin und Histidinol. Eine zusätzliche hemmende Efferenz verknüpft RSH mit Cystein. RelP/Q hemmt nun Histidin und Methionin. Alleine durch die postulierte Unfähigkeit Ornithin zu produzieren, sind die in den Wachstums-Experimenten klar essentiellen AS Prolin und Arginin nun auch in der Simulation essentiell. Darum wurde in NW 2 neben den zwölf postulierten Kanten auch der Ornithin-Knoten inaktiviert. Diese postulierten Veränderungen in NW2 erzielten mit 81% eine deutlich verbesserte in-vitro - in-silico-Übereinstimmung der Wachstumsexperimente mit der Simulation (siehe auch Tabelle 2).

Tabelle 2: In-vitro - in-silico-Übereinstimmung.

in-vitro - in-silico Übereinstimmung		WT		<i>codY</i> -		<i>ccpA</i> -		<i>rsh</i> -		<i>relP/Q</i> -; <i>rsh</i> -; <i>codY</i> -		Gesamt-übereinstimmung	
Zyklus 36 vs	NW1	13/21	62%	16/21	76%	15/21	71%	13/21	62%	16/21	76%	73/105	70%
	NW2	13/21	62%	16/21	76%	15/21	71%	13/21	62%	18/21	86%	75/105	71%
AUC vs	NW1	13/21	62%	14/21	67%	13/21	62%	11/21	52%	14/21	67%	65/105	62%
	NW2	16/21	76%	18/21	86%	15/21	71%	18/21	86%	18/21	86%	85/105	81%

In dieser Tabelle ist die Übereinstimmung beider in-silico Netzwerke NW1 und NW2 mit den in-vitro-Ergebnissen gezeigt. Die beiden Netzwerke werden oben mit der Populationsdichte am Ende des Experiments, also nach 36 Messzyklen, und unten mit der AUC (area under the curve), welche das Wachstum über das gesamte Experiment widerspiegelt, verglichen. In der jeweils ersten Spalte ist die Anzahl an übereinstimmenden Knoten und in der zweiten Spalte die Übereinstimmung in Prozent dargestellt.

Mit 62% in-vitro - in-silico-Übereinstimmung zeigt NW1 bereits eine gute Vergleichbarkeit mit den experimentellen in-vitro-Ergebnissen. NW2 jedoch erreicht eine in-vitro - in-silico-Übereinstimmung von 81%. NW2 stellt also aufgrund dieser hohen Übereinstimmung die Grundlage für eine verlässliche und passende Simulation der SR Mechanismen und des AS Metabolismus in *S.aureus* dar.

SIEBEN ABHÄNGIGKEITSMUSTERT DER AS-SYNTHESE VON ZENTRALEN KNOTEN

Werden unterschiedlichen *S.aureus* Stämmen verschiedenen einzelne AS entzogen und dann die Wachstumskurven verglichen, zeigen sich sieben verschiedene Wachstumsmuster. Dies legt sieben Mechanismen nahe, nach denen die unterschiedlichen zentralen Knoten die Synthese einer AS und damit auch das

Wachstum von *S.aureus* in einem Medium ohne die entsprechende AS beeinflussen (siehe auch Abbildung 21).

Die erste Gruppe, für welche das Wachstum unter Tyrosinmangel das Paradebeispiel ist, zeigt eine Abhängigkeit von sowohl RSH als auch von CodY, wobei RSH die CodY-Expression hemmt. Dies führt dann zu einer Enthemmung und somit Hochregulation der AS Synthese. Das Ergebnis daraus ist ein verstärktes Wachstum bei ausgeschaltetem *codY*. Das Ausschalten von *rsh* jedoch bedeutet eine Enthemmung von CodY und zieht darum eine verminderte AS Synthese und damit ein geringeres Wachstum nach sich.

Das zweite Wachstumsmuster ist gekennzeichnet durch ein vermindertes Wachstum einzig von Stämmen mit ausgeschaltetem *codY*. Beispiele für diese Gruppe sind das Wachstum unter Leucin- oder Valinmangel. In weiteren Experimenten muss geklärt werden, ob es sich hierbei um eine neue Gruppe mit separatem Mechanismus oder vielmehr um ein Extrem der ersten Gruppe handelt, in welcher eine so starke Hemmung der AS Synthese durch CodY besteht, dass eine Hemmung von CodY durch RSH nicht ins Gewicht fällt und damit den Phänotyp nicht beeinflussen kann.

Gruppe drei beinhaltet alle essentiellen AS und somit all die Wachstumsbedingungen, unter welchen alle getesteten Stämme ein gehemmtes Wachstum zeigen. Arginin ist ein gutes Beispiel für dieses Wachstumsmuster. Zu dieser Gruppe gerechnet werden auch die Wachstumsergebnisse in Prolin und Prolin/Hydroxyprolin-Mangelmedium.

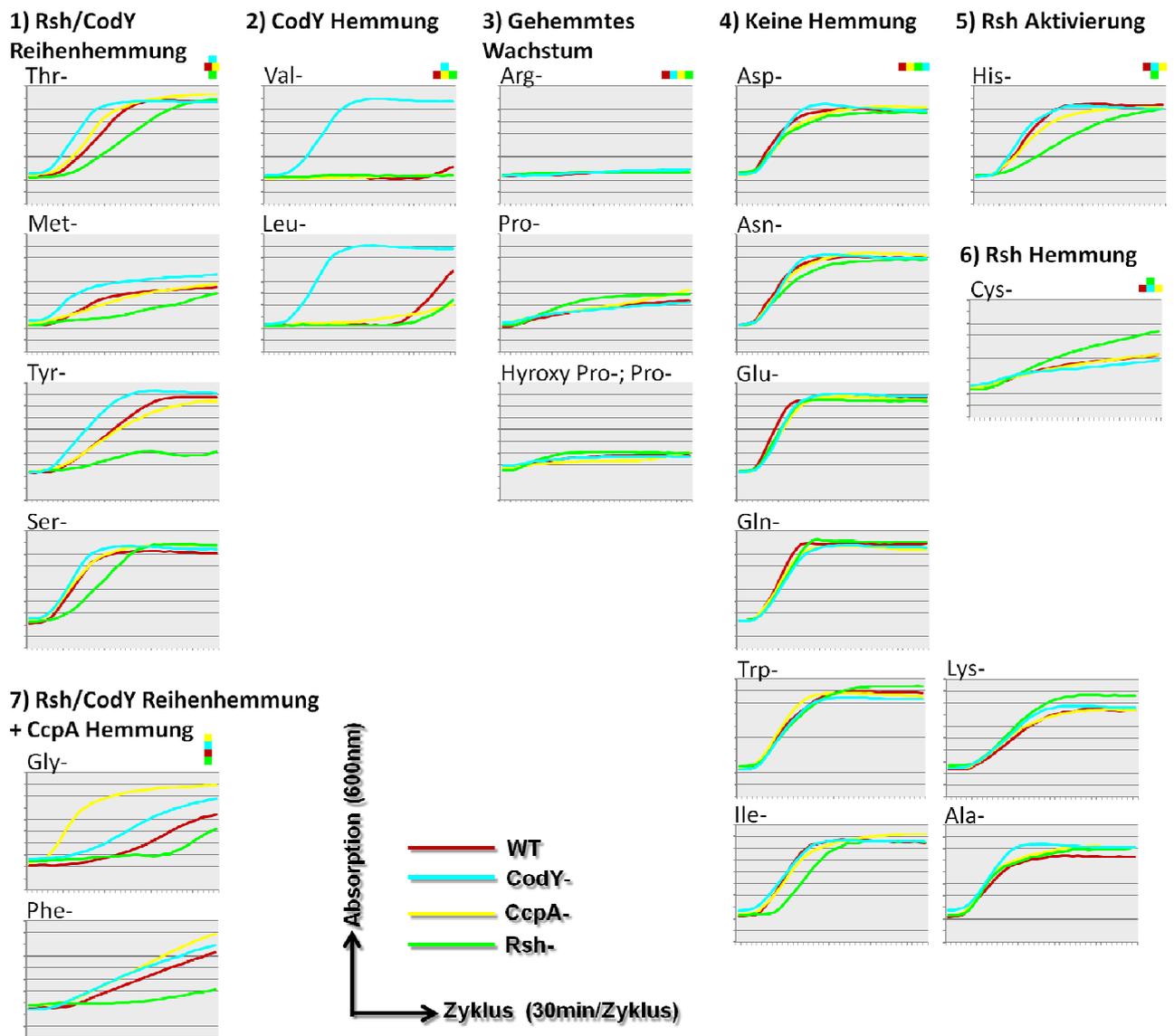
Das vierte Wachstumsmuster zeichnet sich durch ein starkes Wachstum aller getesteten Stämme aus. Ein gutes Beispiel für diese Gruppe ist das Wachstum in Asparagin-Mangelmedium. Ähnliche Ergebnisse können aber auch unter Entzug von Alanin, Aspartat, Glutamat, Glutamin, Isoleucin, Tryptophan oder Lysine gefunden werden.

Wachstum unter Histidinentzug repräsentiert das fünfte Wachstumsmuster, welches sich durch eine Aktivierung der AS-Synthese und damit des Wachstums durch RSH auszeichnet.

Im Gegensatz zu Gruppe fünf zeigt die sechste Gruppe eine Hemmung von AS-Synthese und Wachstum durch RSH. Jedoch ist die durch das Wachstum im Cystein-Mangelmedium repräsentierte Gruppe sechs nicht einfach das Gegenteil von Gruppe

fünf, sondern, mit der Hemmung des Wachstums bei ausgeschaltetem *codY*, vielmehr das Gegenstück zum ersten Wachstumsmuster.

Wachstumsmuster sieben, welches sich bei Anzucht von *S.aureus* unter Entzug von Glycin oder Phenylalanin zeigt, ähnelt ebenfalls dem erstem Wachstumsmuster, jedoch mit einer zusätzlichen Hemmung der AS Synthese durch CcpA.



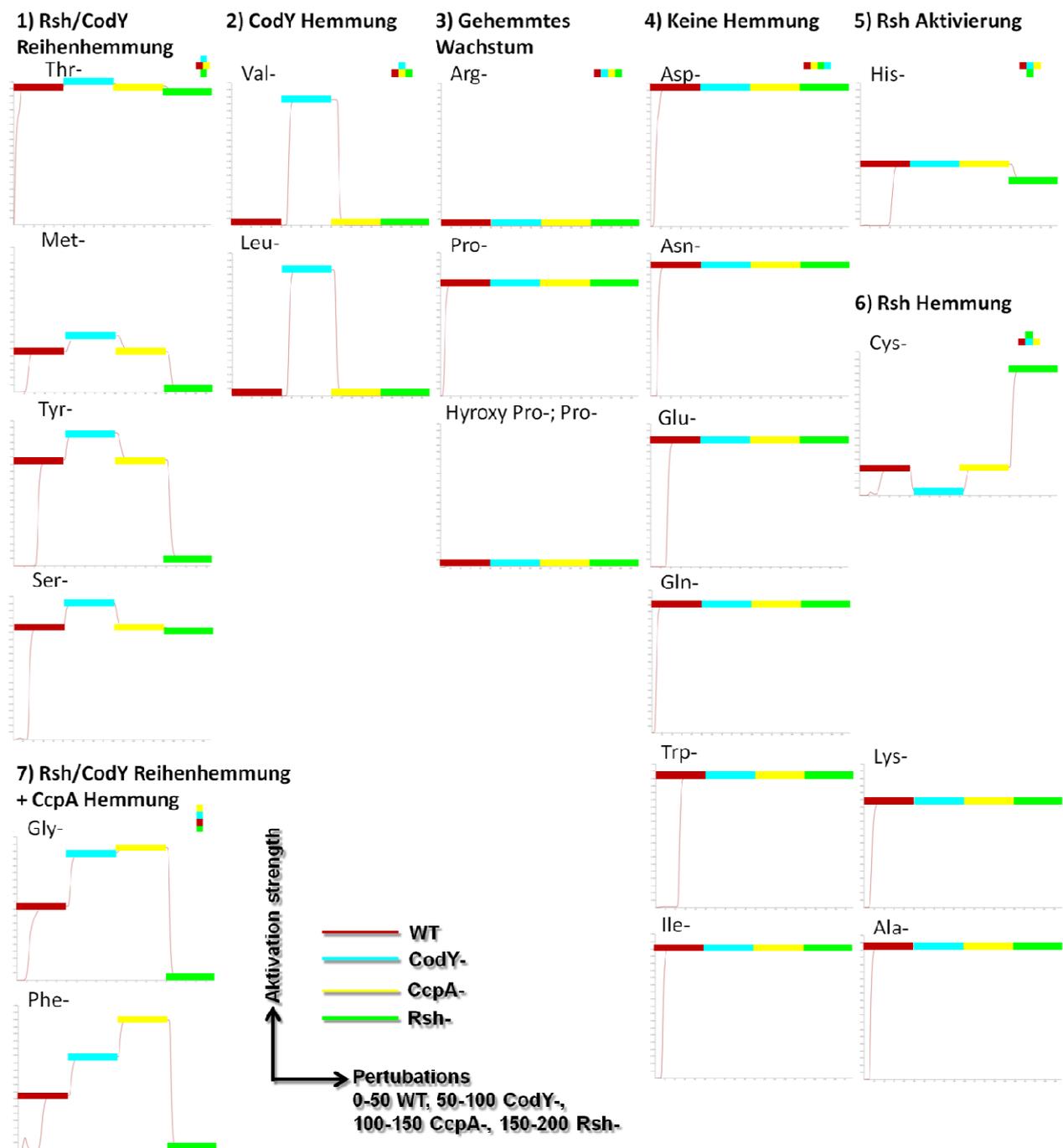


Abbildung 21: Sieben Abhängigkeitsmuster der AS-Synthese von zentralen Knoten: Hier sind die unterschiedlichen Wachstumsmuster der in-vitro Wachstumskurven (obere Abbildung) im Vergleich zu den in-silico Simulations-Ergebnissen gezeigt (untere Abbildung). Der Phänotyp des Wachstums in-vitro als Surrogatparameter für die Synthese der vorenthaltenen AS wird somit verglichen mit den in-silico simulierten AS-Synthesemustern jeweils eingeordnet in sieben Gruppen.

ESSENTIELLE AS

Arginin ist essentiell unter allen Bedingungen. Cystein ist essentiell in allen Stämmen, welche ein funktionsfähiges *rsh*-Gen exprimieren. Glycin ist essentiell im WT und sogar

noch eindrücklicher in der *rsh* knock-out-Mutante. Leucin und Valin sind in jedem *codY* exprimierenden Stamm essentiell. Prolin kann trotz des minimalen Restwachstums generell als essentiell betrachtet werden. Tyrosin genauso wie Methionin und Phenylalanin sind nur essentiell in *rsh* knock-out-Mutanten.

ANPASSUNG AN NAHRUNGSSTRESS

Unter einigen der Wachstumsbedingungen lässt sich anfangs kein Wachstum erkennen, was auf die Essentialität der jeweiligen AS unter den entsprechenden Bedingungen schließen lässt. Gegen Ende des Experiments zeigen die Bakterien jedoch plötzlich, nachdem sie anfangs kein Wachstum zeigten, ein exponentielles Wachstum. Eine solche Anpassung an Nahrungsstress konnte für die *rsh*-Mutante unter Glycin-, Methionin- und Leucinmangel, für den WT und die *ccpA* knock-out-Mutanten gefunden werden, wenn diesen Leucin entzogen wurde und ebenso für die ohne Hydroxyprolin angezüchteten *ccpA*- Stämme, aber auch für die WT Stämme, denen Valin entzogen wurde. Wurden dieselben Bakterien nach erneuter Verdünnung auf die Ausgangs OD600 von 0.05 einem erneuten Wachstumsversuch unterzogen, zeigten sie dieses exponentielle Wachstum direkt von Beginn des Experimentes an. Dies legt einen adaptiven Prozess nahe, welcher zu einer Bakterienpopulation führt, die nicht mehr essentiell für die jeweilige AS ist (siehe auch Abbildung 22).

Dieses Ergebnis kann durch viele verschiedene Mechanismen erklärt werden, eingeschlossen Anpassungen in Mechanismen wie Transport, Abbau oder Wiederverwertung, welche nicht Teil des eigentlichen AS -Synthese Netzwerkes sind. Aber die Anpassung an neue Umweltbedingungen durch Anpassung der Genexpression und damit auch des Proteoms für einen zeitlich verzögerten, bisher nicht gezeigten und beschriebenen Stoffwechselweg ist nur eine mögliche Erklärung. Auch epigenetische Prozesse könnten zu einer Art lamarckschen Evolution geführt haben und so einen echten evolutionären Prozess vortäuschen. Eine weitere mögliche Erklärung ist ein schneller evolutionärer Prozess. Stressinduzierte Instabilität des Genoms [77], in Kombination mit horizontalem Gentransfer und einer relativ kurzen Generationszeit, könnte zu einem evolutionären Prozess in sehr kurzer Zeit führen. Ob dieser adaptive Prozess nun also auf das Anschalten von Stoffwechselwegen durch Adaption in der Genexpression, auf epigenetische Effekte oder auf einen evolutionären Prozess mit

Mutation und Selektion zurückzuführen ist, muss in weiteren Experimenten gezeigt werden.

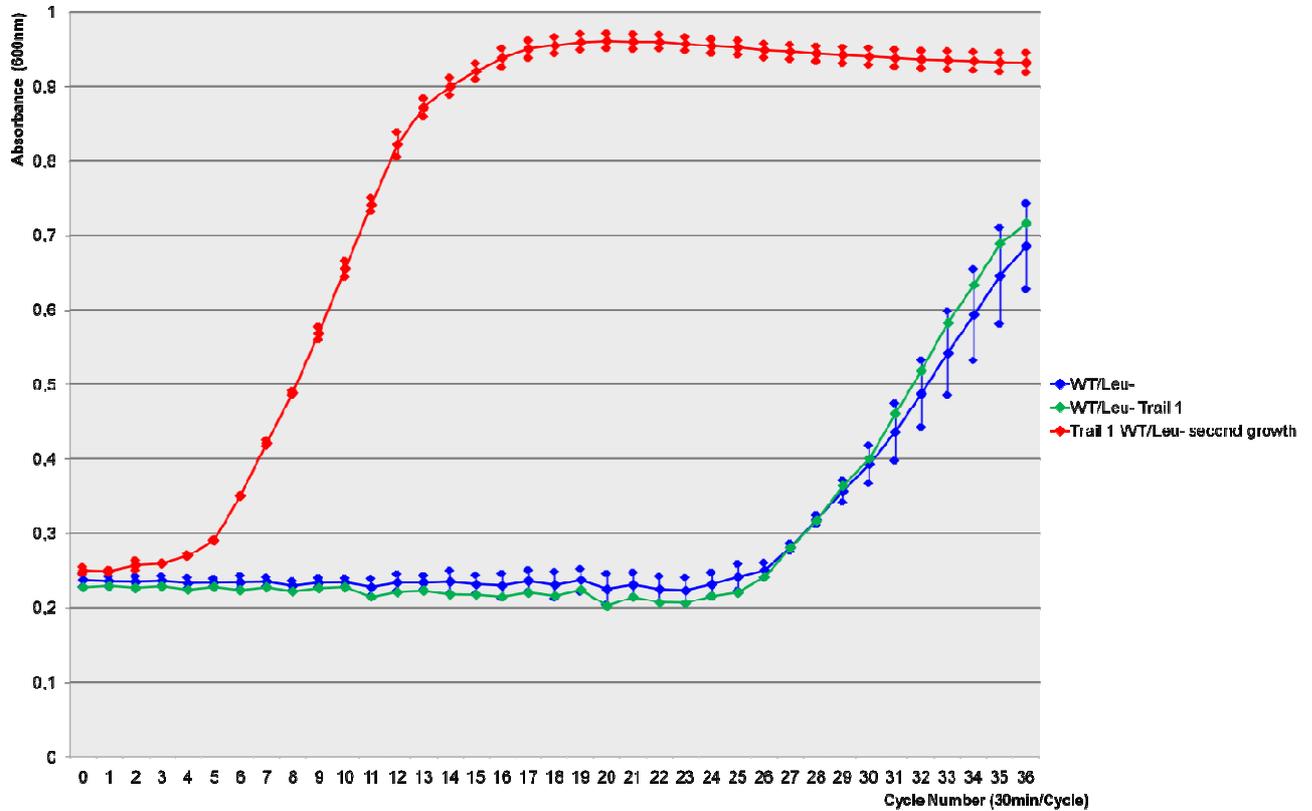


Abbildung 22: Sekundäres Wachstum: In Grün ist die Wachstumskurve der WT-Mutante im Leucin-Mangelmedium dargestellt. Wird der WT unter Leucinentzug das erste Mal angezchtet, zeigt sich in der Wachstumskurve am Ende des Experiments ein starker Anstieg des Wachstums. In Blau sind die Mittelwerte der experimentellen Durchgänge dargestellt. In Rot ist das Wachstum derselben Bakterien wie in der grünen Kurve in einem zweiten Wachstumsexperiment dargestellt. Hier zeigen die Bakterien ein starkes Wachstum von Beginn an, was einen adaptiven Prozess nahelegt. Siehe auch Abbildung 4 im Appendix für eine Darstellung dieses Effektes mit verschiedenen Mutanten und unter Entzug verschiedener AS.

DISKUSSION

Für die hohe Pathogenität von *S.aureus* und damit auch für die vielen medizinischen Probleme bei *S.aureus*-Infektionen ist die SR und die damit einhergehende Anpassungsfähigkeit von *S.aureus* offensichtlich ein bedeutender Faktor. Die SR bietet *S.aureus* mit ihrem Einfluss auf den AS-Metabolismus die Möglichkeit, die eigenen Stoffwechselwege an ein breites Spektrum unterschiedlicher Habitats und damit auch an eine große Bandbreite unterschiedlicher verfügbarer Ressourcen anzupassen und in ihnen zu wachsen [9, 25]. In dieser Arbeit wird der zentrale Schaltplan der AS-Synthese und ihrer Regulation durch die SR dargestellt. Auch durch die hieraus ableitbare Essentialität verschiedener AS stellt dies ein zentrales Element der Pathogenität von *S.aureus* dar. Diesen Schaltplan zu verstehen und regulieren zu können ist ein wichtiger Schritt und Ansatzpunkt in der Entwicklung von gegen *S.aureus* gerichteten Therapien.

IN-VITRO – IN-SILICO VERGLEICHE

Das in dieser Arbeit vorgestellte Netzwerk berücksichtigt Interaktionen von Knoten des dargestellten Stoffwechselweges, ohne jedoch die exakte Stärke der Interaktionen, zum Beispiel über Enzymkinetiken, zu berücksichtigen. Daten über die Interaktionsstärken liegen nahezu nicht vor, was eine flächendeckende quantitative Simulation unmöglich macht. Dessen ungeachtet zeigt sich bei semiquantitativer Betrachtung eine durchschnittliche Übereinstimmung zwischen den hier vorgestellten in-silico- und in-vitro-Daten von etwa 70%. Die daraus resultierenden ca. 30% nicht übereinstimmender Daten wären bei rein qualitativer Betrachtung jedoch nicht mehr als solche nachvollziehbar. Man kann zum Beispiel bei einem Vergleich der experimentellen Ergebnisse unter Threonin-, Cystein-, Glycin- oder Methioninmangel mit den entsprechenden NW2-Simulationsergebnissen eine gute qualitative Übereinstimmung finden (siehe auch Abbildung 21), die so durch Vergleichen von semiquantitativen oder quantitativen Werten nicht immer gefunden werden kann (siehe auch Tabelle 3). Weiteres Anpassen des Netzwerkes würde nicht die schon jetzt gute qualitative Übereinstimmung, sondern vielmehr die semiquantitative Übereinstimmung zwischen in-vitro und in-silico verbessern, was aber nicht unbedingt zu einer besseren in-silico-Darstellung der biologischen Vorgänge führt. Insbesondere für einen semiquantitativen

Vergleich zwischen in-vitro und in-silico müssen die Ergebnisse jeweils kategorisiert werden. Dies ist unverzichtbar, da es sich bei den Ergebnissen aus der Simulation und den Experimenten nicht um Messwerte in der gleichen Einheit und mit der gleichen Skala, sondern tatsächlich um nur qualitativ vergleichbare Ergebnisse handelt. Die AS-Synthese in den in-silico-Simulationen wurde also genauso wie das Wachstum in den in-vitro-Experimenten in drei Gruppen – schwach, mittel und stark – eingeteilt (siehe auch Tabelle 3). Natürlich ist die Definition der Spannbreite dieser Gruppen nicht offensichtlich und kann somit unterschiedlich interpretiert und dementsprechend verändert werden. Dies würde aber nicht unbedingt zu einer absoluten Verbesserung der Übereinstimmungen führen, sondern stattdessen eher andere Unstimmigkeiten zur Folge haben.

Genauso scheint auch das Einfügen kleiner lokaler Veränderungen im Netzwerk, ohne dabei die Zusammenhänge im gesamten Netzwerk zu bedenken, häufig zu einer großen Verbesserung in Bezug auf die lokale Übereinstimmung zu führen. Solche kleinen lokalen Veränderungen beeinflussen aber häufig andere Teile des Netzwerks, was dann im Endeffekt eine schlechtere gesamte Übereinstimmung zur Folge hat. Derartige Veränderungen sind überdies häufig nur eine, wenn auch oft wohl begründete, Vermutung und die Existenz der jeweilige Knoten oder Kanten ist bisher in den meisten Fällen experimentell noch nicht gezeigt. Ebenso ist häufig nicht bekannt, ob diese Veränderungen notwendig und hinreichend sind.

Durch das Einfügen postulierter Veränderungen kann, mit einiger Mühe das auf Literaturdaten basierende Netzwerk theoretisch in nahezu jedes andere Netzwerk umgewandelt werden, welches dann schlussendlich auch jedes Experiment genau widerspiegeln kann. Darum muss das Einfügen von nicht auf Literaturdaten basierenden Knoten und Kanten mit viel Bedacht und Überlegung erfolgen. Es muss aber andererseits in solch einer Simulation auch die Möglichkeit geben, neue phänotypische Ergebnisse, bei denen der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht bekannt, ist in das Netzwerk und damit in die Simulation aufzunehmen. Hierzu müssen solche Mechanismen vorgeschlagen, implementiert und dann zunächst in-silico und schlussendlich in-vitro getestet werden. Das Netzwerk muss also vom rein auf Literaturdaten basierenden Netzwerk zu einem Netzwerk umgewandelt werden können, welches all unser Wissen beinhaltet. NW2 zeigt mit nur wenigen eingefügten wichtigen Verbindungen eine deutlich verbesserte Übereinstimmung, ohne dass

grundlegende Strukturen und Eigenschaften von NW1 verändert wurden und stellt so einen guten Mittelweg innerhalb der oben erwähnten Grenzen dar. Die zusätzlichen hier vorgeschlagenen Kanten bedeuten nicht, dass eine direkte Verbindung zwischen den beiden entsprechenden Knoten vorgeschlagen wird und zum Beispiel RSH-Glycin direkt aktiviert, sondern dass eine Verbindung vorgeschlagen wird die den entsprechenden Effekt zufolge hat, unabhängig davon, ob dieser nun direkt oder indirekt über zahlreiche zwischengeschaltete Knoten oder eventuell sogar noch komplexere Mechanismen zustande kommt.

Tabelle 3: Ein Vergleich der in-vitro - in-silico-Ergebnisse

WT	Ala-	Arg-	Asn-	Asp-	Cys-	Gln-	Glu-	Gly-	His-	Ile-	Leu-	Lys-	Met-	Phe-	Pro-	Hydroxy-Pro-Pro-	Ser-	Thr-	Trp-	Tyr-	Val-
Zyklus 9	0,54	0,24	0,65	0,65	0,35	0,70	0,78	0,22	0,52	0,56	0,23	0,38	0,34	0,28	0,31	0,34	0,55	0,38	0,60	0,35	0,22
Zyklus 18	0,72	0,27	0,80	0,80	0,44	0,89	0,87	0,31	0,83	0,86	0,23	0,66	0,49	0,45	0,37	0,37	0,81	0,78	0,87	0,67	0,23
Zyklus 27	0,74	0,28	0,81	0,80	0,49	0,88	0,88	0,49	0,84	0,86	0,28	0,74	0,53	0,59	0,41	0,38	0,82	0,88	0,89	0,87	0,22
Zyklus 36	0,73	0,29	0,80	0,78	0,53	0,89	0,88	0,64	0,84	0,85	0,69	0,74	0,55	0,73	0,43	0,38	0,81	0,86	0,88	0,87	0,31
AUC	22	9	25	25	15	27	27	13	25	25	11	20	16	16	13	13	24	23	26	22	8
Simulation NW1	0,93	0,93	0,92	0,98	0,88	0,91	0,88	0,92	0,91	0,91	0,00	0,74	0,93	0,91	0,98	0,85	0,96	0,97	0,92	0,91	0,00
Simulation NW2	0,93	0,00	0,92	0,98	0,19	0,91	0,88	0,52	0,43	0,91	0,00	0,74	0,28	0,37	0,79	0,01	0,79	0,97	0,92	0,74	0,00

<i>codY-</i>	Ala-	Arg-	Asn-	Asp-	Cys-	Gln-	Glu-	Gly-	His-	Ile-	Leu-	Lys-	Met-	Phe-	Pro-	Hydroxy-Pro-Pro-	Ser-	Thr-	Trp-	Tyr-	Val-
Zyklus 9	0,63	0,25	0,63	0,65	0,37	0,59	0,68	0,31	0,59	0,58	0,55	0,41	0,49	0,34	0,32	0,34	0,64	0,59	0,57	0,51	0,48
Zyklus 18	0,84	0,27	0,83	0,84	0,41	0,87	0,90	0,48	0,83	0,86	0,90	0,73	0,60	0,53	0,36	0,36	0,87	0,86	0,84	0,87	0,88
Zyklus 27	0,81	0,28	0,80	0,81	0,44	0,87	0,89	0,68	0,82	0,86	0,89	0,77	0,63	0,67	0,39	0,37	0,85	0,87	0,83	0,92	0,88
Zyklus 36	0,81	0,29	0,80	0,79	0,48	0,86	0,88	0,78	0,81	0,86	0,88	0,76	0,66	0,79	0,42	0,37	0,85	0,86	0,83	0,91	0,87
AUC	25	10	25	25	14	26	27	18	25	26	26	22	20	18	13	13	26	26	25	26	25
Simulation NW1	0,93	0,93	0,92	0,98	0,88	0,91	0,88	0,92	0,91	0,91	0,89	0,74	0,93	0,91	0,98	0,85	0,96	0,99	0,92	0,91	0,89
Simulation NW2	0,93	0,00	0,92	0,98	0,01	0,91	0,88	0,89	0,43	0,91	0,89	0,74	0,39	0,65	0,79	0,01	0,96	0,99	0,92	0,91	0,89

<i>ccpA-</i>	Ala-	Arg-	Asn-	Asp-	Cys-	Gln-	Glu-	Gly-	His-	Ile-	Leu-	Lys-	Met-	Phe-	Pro-	Hydroxy-Pro-Pro-	Ser-	Thr-	Trp-	Tyr-	Val-
Zyklus 9	0,60	0,25	0,60	0,59	0,35	0,64	0,65	0,64	0,48	0,52	0,25	0,41	0,33	0,34	0,32	0,31	0,58	0,43	0,64	0,36	0,22
Zyklus 18	0,76	0,27	0,81	0,78	0,43	0,87	0,88	0,82	0,75	0,84	0,26	0,66	0,45	0,52	0,38	0,33	0,84	0,82	0,88	0,62	0,22
Zyklus 27	0,82	0,28	0,84	0,83	0,49	0,86	0,87	0,87	0,81	0,91	0,31	0,74	0,53	0,72	0,44	0,34	0,88	0,91	0,87	0,79	0,24
Zyklus 36	0,81	0,28	0,82	0,82	0,53	0,84	0,85	0,89	0,82	0,92	0,40	0,74	0,58	0,88	0,53	0,41	0,87	0,93	0,85	0,84	0,25
AUC	24	10	25	24	15	26	26	26	23	26	10	21	16	19	14	12	26	25	26	21	8
Simulation NW1	0,93	0,93	0,92	0,98	0,88	0,91	0,88	0,92	0,91	0,91	0,00	0,74	0,93	0,91	0,98	0,85	0,96	0,97	0,92	0,91	0,00
Simulation NW2	0,93	0,00	0,92	0,98	0,19	0,91	0,88	0,93	0,43	0,91	0,00	0,74	0,28	0,91	0,80	0,01	0,79	0,97	0,92	0,74	0,00

<i>rsh-</i>	Ala-	Arg-	Asn-	Asp-	Cys-	Gln-	Glu-	Gly-	His-	Ile-	Leu-	Lys-	Met-	Phe-	Pro-	Hydroxy-Pro-Pro-	Ser-	Thr-	Trp-	Tyr-	Val-
Zyklus 9	0,58	0,26	0,54	0,59	0,37	0,60	0,68	0,27	0,34	0,34	0,23	0,42	0,27	0,30	0,35	0,37	0,35	0,28	0,56	0,27	0,23
Zyklus 18	0,74	0,27	0,75	0,74	0,54	0,91	0,85	0,29	0,57	0,78	0,23	0,77	0,31	0,30	0,46	0,41	0,74	0,54	0,86	0,38	0,24
Zyklus 27	0,79	0,27	0,78	0,77	0,64	0,90	0,85	0,31	0,73	0,86	0,24	0,87	0,40	0,35	0,48	0,40	0,88	0,80	0,94	0,39	0,24
Zyklus 36	0,82	0,27	0,79	0,77	0,73	0,91	0,84	0,52	0,81	0,85	0,44	0,86	0,50	0,41	0,49	0,40	0,87	0,89	0,94	0,41	0,24
AUC	23	9	23	23	18	27	26	11	19	23	9	24	12	12	15	14	23	20	26	12	8
Simulation NW1	0,93	0,93	0,92	0,98	0,88	0,91	0,88	0,92	0,91	0,91	0,00	0,74	0,93	0,91	0,98	0,85	0,96	0,93	0,92	0,91	0,00
Simulation NW2	0,93	0,00	0,92	0,98	0,88	0,91	0,88	0,01	0,32	0,91	0,00	0,74	0,01	0	0,79	0,01	0,78	0,93	0,92	0,04	0,00

<i>relP/Q-; rsh-; codY-</i>	Ala-	Arg-	Asn-	Asp-	Cys-	Gln-	Glu-	Gly-	His-	Ile-	Leu-	Lys-	Met-	Phe-	Pro-	Hydroxy-Pro-Pro-	Ser-	Thr-	Trp-	Tyr-	Val-
Zyklus 9	0,57	0,26	0,71	0,74	0,43	0,68	0,75	0,26	0,70	0,65	0,58	0,42	0,46	0,30	0,35	0,36	0,69	0,68	0,65	0,51	0,47
Zyklus 18	0,92	0,27	0,93	0,92	0,56	0,92	0,90	0,27	0,94	0,89	0,91	0,76	0,64	0,41	0,42	0,37	0,90	0,91	0,91	0,88	0,90
Zyklus 27	0,88	0,28	0,90	0,88	0,61	0,89	0,87	0,24	0,99	0,86	0,87	0,79	0,74	0,43	0,43	0,35	0,87	0,87	0,88	0,92	0,86
Zyklus 36	0,88	0,28	0,91	0,88	0,64	0,90	0,89	0,25	0,98	0,87	0,87	0,77	0,80	0,44	0,43	0,33	0,87	0,87	0,87	0,91	0,85
AUC	27	10	28	28	18	27	27	9	29	27	26	22	21	13	14	12	27	27	27	26	25
Simulation NW1	0,93	0,93	0,92	0,98	0,88	0,91	0,88	0,92	0,91	0,91	0,89	0,74	0,93	0,91	0,98	0,85	0,96	0,99	0,92	0,91	0,89
Simulation NW2	0,93	0,00	0,92	0,98	0,88	0,91	0,88	0,01	0,92	0,91	0,89	0,74	0,93	0	0,79	0,01	0,96	0,99	0,92	0,91	0,89

In dieser Tabelle sind die Werte aller Wachstumskurven jeweils nach Zyklus 9,18,27 und 36 und außerdem das Integral der Wachstumskurven (AUC=Area under the curve) dargestellt. Die AUC spiegelt die Fähigkeit der Mutanten, in einem AS-Mangelmedium zu wachsen, am verlässlichsten wider und ist deswegen der beste Surrogat-Parameter für die AS-Synthese der mutierten Stämme. Die AUC wird dafür mit den in-silico gewonnenen AS-Synthese-Werten verglichen. Hierzu wurden sowohl die in-silico als auch die in-vitro-Werte kategorisiert (schwache Syntheseleistung: in-silico 0,00-0,29 / AUC 8-15; mittlere Syntheseleistung: in-silico 0,30-0,69 / AUC 16-21; hohe Syntheseleistung: in-silico 0,7-1,0 / AUC 22-29). Der Vergleich mit dem Netzwerk 1 ergab 62% Übereinstimmung (62% WT; 67% *codY-*; 62% *ccpA-*; 52% *rsh-*; 67% *relP/Q-*; *rsh-*; *codY-*). Der Vergleich mit dem Netzwerk 2 ergab 81% Übereinstimmung (76% WT; 86% *codY-*; 71% *ccpA-*; 86% *rsh-*; 86% *relP/Q-*; *rsh-*; *codY-*).

Tabelle 4: Unstimmige Ergebnisse im semiquantitativen in-vitro in-silico Vergleich

Fehlende AS	Stämme	Grund für Unstimmigkeit	Art der Unstimmigkeit	Mögliche Lösung	Warum nicht implementiert
Cys	<i>rsh-</i>	überreguliert~	quantitative Unstimmigkeit ^o	Einflussstärke regulieren	Keine kinetischen Daten
	<i>relP/Q-; rsh- codY-</i>				
Gly	WT	überreguliert~	quantitative Unstimmigkeit ^o	Einflussstärke regulieren	Keine kinetischen Daten
	<i>codY-</i>				
His	WT	unterreguliert^	quantitative Unstimmigkeit ^o	Einflussstärke regulieren	Keine kinetischen Daten
	<i>codY-</i>		Kategorisierungs-Effekt*	Kategorisierung optimieren	Entstehung anderer Unstimmigkeiten
	<i>ccpA-</i>				
Lys	WT	unterreguliert^	Kategorisierungs-Effekt*	Kategorisierung optimieren	Entstehung anderer Unstimmigkeiten
	<i>ccpA-</i>				
Met	WT	unterreguliert^	quantitative Unstimmigkeit ^o	Einflussstärke regulieren	Keine kinetischen Daten
	<i>ccpA-</i>				
	<i>relP/Q-; rsh- codY-</i>	überreguliert~			
Phe	<i>ccpA-</i>	überreguliert~	quantitative Unstimmigkeit ^o	Einflussstärke regulieren	Keine kinetischen Daten
Thr	<i>rsh-</i>	überreguliert~	quantitative Unstimmigkeit ^o	Einflussstärke regulieren	Keine kinetischen Daten
Tyr	<i>ccpA-</i>	überreguliert~	Kategorisierungs- Effekt*	Kategorisierung optimieren	Entstehung anderer Unstimmigkeiten

Diese Tabelle zeigt unstimmige Ergebnisse sowie Gründe für diese Unstimmigkeiten und schlägt weitere mögliche Anpassungen vor, die potentiell eine perfekte Übereinstimmung bewirken könnten. In der letzten Spalte werden aber auch daraus entstehende Probleme beschrieben, welche die Implementierung dieser Anpassungen unsinnig machen.

Um die Übereinstimmungen, damit aber auch die Unstimmigkeiten zwischen in-vitro und in-silico zu finden, genauer zu betrachten und erklären zu können, wurden die Ergebnisse zunächst nach der Wachstumsstärke, beziehungsweise der Stärke der AS-Produktion der unterschiedlichen Stämme unter Entzug einer AS im Rang geordnet. Für die aufgrund unterschiedlicher Skalen und Einheiten nicht direkt vergleichbaren Ergebnisse konnte so zumindest eine semiquantitative Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Ergebnisse erreicht werden. So auftretende Unstimmigkeiten wurden eingeteilt in zwei verschiedene Arten der Unstimmigkeit, die auf zwei verschiedene Gründe zurückzuführen sind (Tabelle 4

„Quantitative Unstimmigkeit“ wird in Tabelle 4 durch eine Markierung mit „°“ dargestellt, was bedeutet, dass, wenn die Ränge der simulierten AS Synthese und der experimentellen Wachstumsleistung verglichen werden, die Simulation und die in-vitro-Experimente qualitativ ein übereinstimmendes Ergebnis erbringen. Bei einem quantitativen oder semiquantitativen Vergleich der jeweils absoluten Ergebnisse können hingegen Unterschiede gefunden werden, die zu einer Einordnung in unterschiedliche Gruppen und so zu einer Überschätzung der Unstimmigkeiten führen können. Diese Ergebnisse mit den überschätzten quantitativen Unstimmigkeiten können so allerdings durch die nur qualitativ vergleichbaren Daten der Experimente nicht belegt werden.

Eine Markierung mit „*“ in Tabelle 4 repräsentiert „Kategorisierungseffekte“ und bedeutet, dass dieses simulierte Ergebnis mit dem Ergebnis des benachbarten Ranges übereinstimmt, sich also mit diesem den entsprechenden Rang teilt. Somit können diese Ergebnisse von NW2 nicht zufriedenstellend in eine Rangfolge gebracht werden. In den experimentellen Ergebnissen hingegen können kleinere Unterschiede zwischen den Stämmen gefunden werden und diese dementsprechend in eine Rangfolge gebracht werden. Daraus kann leicht eine Überschätzung eines eigentlich nur sehr geringen quantitativen Unterschiedes in den in-vitro-Experimenten resultieren, vor allem wenn diese geringen Unterschiede dazu noch zu einer Einordnung in eine andere Kategorie führen. Das auf der einen Seite für einen Vergleich zwischen AUC und NW2 unverzichtbare Kategorisieren der Ergebnisse täuscht auf der anderen Seite teilweise Unstimmigkeiten vor, die aufgrund der Kategorisierung in ihrem Ausmaß überschätzt werden und sich als irrelevant erweisen wenn die Ergebnisse qualitativ verglichen werden.

Wenn in-silico und in-vitro qualitativ die gleichen Ergebnisse beobachtet werden können, sich in der Simulation aber eine AS-Aktivierung zeigt, die quantitativ stärker ist als die in-vitro beobachteten Wachstumsergebnisse, ist dies in Tabelle 4 mit „~“ markiert und als „Übersteuerung“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu ist in Tabelle 4 als „Untersteuerung“ bezeichnet und mit „^“ markiert, wenn in-vitro und in-silico qualitativ die gleichen Effekte beobachtet werden können, die Simulation aber quantitativ eine schwächere AS-Aktivierung zeigt als die in-vitro beobachteten Wachstumsergebnisse. Da nur für eine vernachlässigbar kleine Anzahl an Interaktionen der Knoten kinetische Daten, zum Beispiel über die Wirkstärke der Kanten, verfügbar sind, werden hier die Kanten in ihren Eigenschaften und ihrer Gewichtung nicht manipuliert sondern der Focus auf ein semiquantitatives Netzwerk gerichtet.

DER AS-SYNTHESE-METABOLISMUS

BETRACHTUNG DER SYNTHESWEGE

Die in den unterschiedlichen AS-Mangelmedien angezüchteten knock-out-Mutanten zeigen teilweise vorhersehbare und schon beschriebene, teilweise aber auch neue und überraschende Wachstumskurven und Wachstumstypen. In diesem Abschnitt werden die unterschiedlichen schon bekannten Synthesewege, vermutlich zugrundeliegende Mechanismen, Unstimmigkeiten mit den Wachstumsexperimenten sowie daraus resultierende postulierte Veränderungen dargestellt und diskutiert. Siehe auch Abbildungen 3, 18a-f und 23 für einen Überblick der Synthesewege sowie Abbildung 10, 19a-d und 1a-t im Appendix für eine Darstellung der Wachstumskurven und eine Illustrierung der hier beschriebenen Mechanismen.

Die Synthese von Methionin aus Aspartat und Cystein geschieht über das aktivierende Met-Operon. Dieses wiederum wird durch das seinerseits von RSH gehemmte CodY gehemmt. RSH hat somit einen aktivierenden Einfluss auf das Met-Operon und damit auch auf die Methioninsynthese, wohingegen die Aktivierung von CodY im WT zu einer Hemmung der Methioninsynthese führt. Obwohl Cystein der Vorläufer von Methionin ist, zeigt es in den Wachstumsexperimenten ein zu Methionin genau entgegengesetztes Synthesemuster. Es muss also postuliert werden, dass Cystein durch RSH gehemmt und wenigstens in geringem Umfang durch CodY aktiviert wird. Möglicherweise ist der Effekt von RSH auch ein indirekter über CodY. Die geringe Cysteinproduktion im WT ist am ehesten mit der Kontrolle und Hemmung durch RSH/CodY erklärt. Das unter

Methioninmangel gefundene markante Muster aus Aktivierung durch RSH und Hemmung durch CodY, kann auch beim Wachstum unter Tyrosinmangel gefunden werden und legt auch hier die Regulation der Synthese über die RSH/CodY-Achse nahe.

Auch für die Serinsynthese kann aufgrund einer moderaten Aktivierung durch RSH und einer leichten Hemmung durch CodY ein Mechanismus entsprechend der RSH/CodY-Achse mit einer direkten Hemmung durch CodY sowie einer indirekten Aktivierung durch RSH angenommen werden. Serin wird außerdem grundsätzlich sowohl in-vitro als auch in-silico stark exprimiert, da es eine Position relativ am Anfang eines Syntheseweges einnimmt und daher eine gute Ressourcenverfügbarkeit anzunehmen ist. Serin und Glycin können ineinander umgewandelt werden. Im Gegensatz zu Serin zeigt Glycin interessanterweise eines der komplexesten AS-Synthesemuster, höchstwahrscheinlich auch bedingt durch Regulationsvorgänge in der Metabolisierung von Serin. Es muss also eine starke Hemmung von Glycin durch CcpA postuliert werden. Der milde von Serin übertragene RSH/CodY-Effekt kann auch in Glycin gefunden werden. Außerdem muss aufgrund der starken Aktivierung durch RSH, die in der RSH Mutante zu einem nahezu aufgehobenen Wachstum führt, von einer zusätzlichen aktivierenden Verbindung von RSH auf Glycin ausgegangen werden welche in der 4-fach-Mutante (*relP/Q-*, *rsh-*, *codY-*) die enthemmende Wirkung durch das Ausschalten von *codY* übertrifft.

Auch Threonin zeigt sowohl in den Wachstumsexperimenten als auch in der Simulation das klassische Aktivierungsmuster, welches auf eine Aktivierung durch RSH und eine Hemmung durch CodY zu erklären ist. Auch hier ist der aktivierende Effekt von RSH mit aller Wahrscheinlichkeit ein indirekter über eine Hemmung von CodY. Histidin zeigt hingegen keine Beeinflussbarkeit durch CodY, weswegen hier von einer CodY unabhängigen Aktivierung der Histidinsynthese durch RSH ausgegangen werden muss, zum Beispiel über Histidinol.

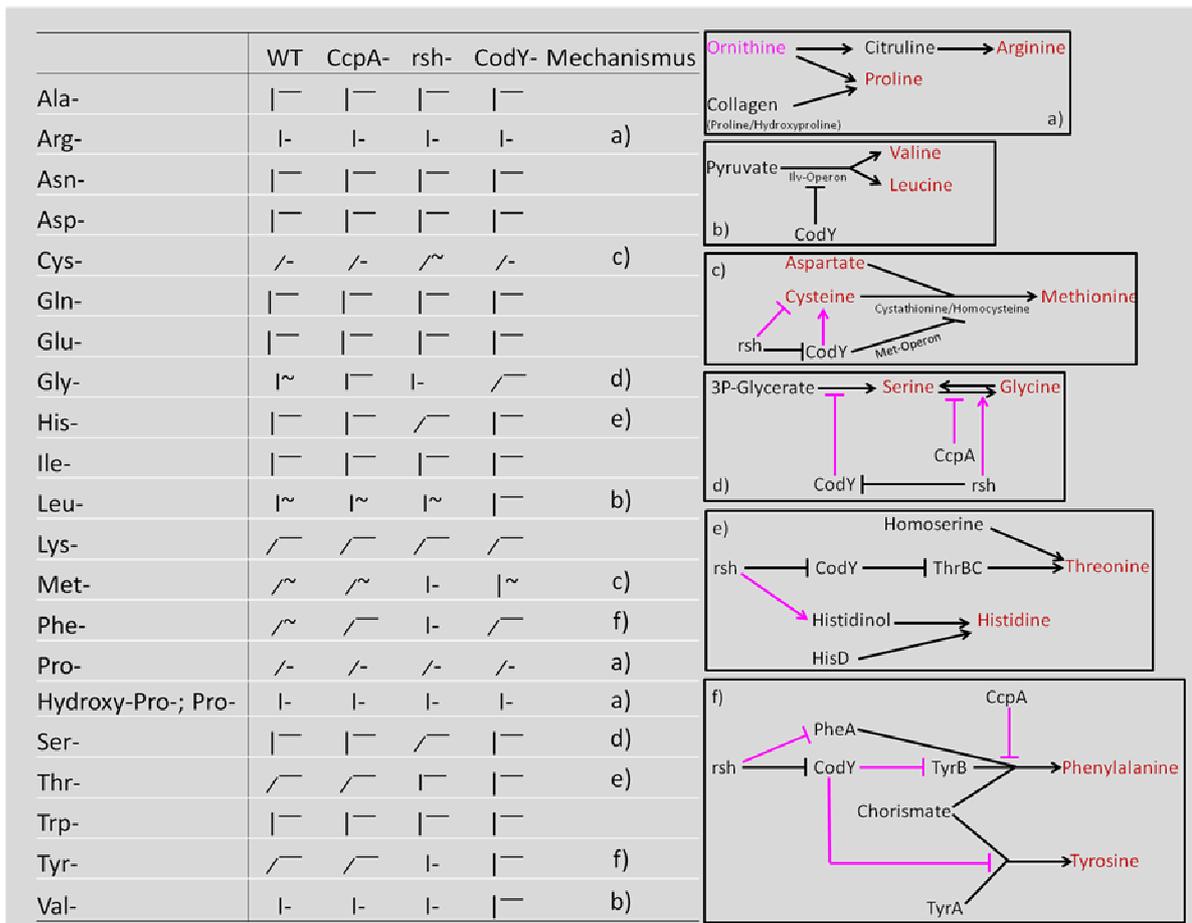


Abbildung 23: Subjektive Evaluation der Wachstumskurven im Vergleich mit WT/Vollmedium: Die Wachstumsphänotypen der knock-out-Mutanten in den verschiedenen Medien (vergleiche Abbildung 21) sind hinsichtlich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und -Stärke beschrieben. Die Kombination „|⁻“ zum Beispiel steht für volle Wachstumsleistung in Wachstumsgeschwindigkeit und Stärke. Die Kombination „/[~]“ steht für eine abgeschwächte Wachstumsgeschwindigkeit und -stärke. Die Kombination „|⁻“ steht für eine stark verminderte Wachstumsgeschwindigkeit und -stärke.

Der hemmende Effekt von CodY über das Ilv-Operon auf Leucin und Valin erlaubt Wachstum in den Leucin- und Valin-Mangelmedien nur in der Abwesenheit von CodY. Dieses einzigartige Synthesemuster von Leucin und Valin konnte sowohl in den Experimenten als auch in der Simulation gut und übereinstimmend gezeigt werden. In den Wachstumsexperimenten zeigte sich im WT unter Leucin- und noch deutlicher unter Valinmangel außerdem ein sehr spätes Wachstum, welches als sekundäres Wachstum bezeichnet wurde (siehe auch Abbildung 22 und Abbildung 4 im Appendix).

Die experimentellen Ergebnisse, hinsichtlich der Essentialität von Arginin und Prolin, welche sich bei Wachstum aller durch uns getesteten Stämme in den Arginin- und

Prolin-Mangelmedien zeigen können durch einen von uns postulierten Defekt in der Ornithin-Biosynthese in-silico erklärt und nachvollzogen werden. Collagen kann durch *S.aureus* in Prolin und Hydroxyprolin (ein Prolinvorläufer) abgebaut werden und stellt damit einen alternativen Weg der Prolinsynthese und -gewinnung dar. Die stärkere Prolinsynthese in den in-silico-Experimenten scheint durch die Übergewichtung dieses alternativen Weges in der Simulation gut erklärbar zu sein. Wird dem Medium neben Prolin nun auch noch Hydroxyprolin entzogen und entsprechend dazu Collagen in der Simulation ausgeschaltet führt dies sowohl in-vitro als auch in-silico zur Essentialität von Prolin in allen Stämmen.

RSH aktiviert die Phenylalaninsynthese in den Wachstumsexperimenten. Eine Möglichkeit dafür ist zum Beispiel die Aktivierung wichtiger Regulatoren wie PheA. Es muss jedoch auch zumindest eine milde Hemmung durch CcpA und CodY angenommen werden, da das Ausschalten dieser beiden Knoten im Vergleich zum WT zu einer leichten Entthemung der Phenylalaninsynthese führt. Der RSH-Effekt scheint jedoch den durch CodY ausgeübten Effekt deutlich zu übertreffen was an der Wachstumshemmung der 4-Fach Mutante (*relP/Q-*, *rsh-*, *codY-*) zu erkennen ist.

CODY ALS ZENTRALER REGULATOR

Durch Vergleichen der jeweiligen in-vitro Wachstumsergebnisse der entsprechenden knock-out Mutanten mit dem Wachstumsergebnis des WT, gewachsen in Vollmedium, kann der Einfluss und der Effekt der entsprechenden ausgeschalteten zentralen Knoten und der jeweiligen entzogenen AS beurteilt werden. Der Knoten mit dem tiefgreifendsten Einfluss auf das AS-Synthese-System in *S.aureus* ist CodY. Er hemmt die Synthese von Tyrosin, Valin, Glycin, Leucin und Methionin. Für die Wirkung von RSH ist CodY einer der zentralen Knoten. Die durch RSH bewirkte Verbesserung, zum Beispiel der Synthese von Methionin-, Glycin- und Tyrosinsynthese, ergibt sich mit großer Wahrscheinlichkeit aus der Hemmung von CodY durch RSH, was zu einer Entthemung der Synthese dieser AS führt. Direkt durch RSH gehemmt wird hingegen die Cysteinsynthese. Der phänotypische Effekt von CcpA ist auf die Hemmung der Glycinsynthese beschränkt. CodY ist also der zentrale regulatorische Knoten der AS Synthese in *S.aureus* und damit auch der bedeutendste Knoten der SR in *S.aureus*.

ESSENTIELLE AMINOSÄUREN

In vielen Untersuchungen über den AS-Metabolismus und die SR in *S.aureus* konnten bisher keine einheitlichen Ergebnisse darüber erzielt werden, welche der AS essentiell sind und welche durch *S.aureus* eigenständig synthetisiert werden können. Es scheint hier auch eine deutliche Abhängigkeit vom jeweils untersuchten *S.aureus*-Stamm zu geben. So gibt es unterschiedliche Stämme für welche in früheren Publikationen jeweils andere AS als essentiell beschrieben wurden [33, 34, 35, 78, 36]. *S.aureus* scheint aber, eine organische Stickstoffquelle vorausgesetzt, zumindest grundsätzlich die genetische Ausstattung für die eigenständige Produktion aller 20 Proteinogenen AS zu haben [28]. Dies unterstreicht wiederum die Fähigkeit von *S.aureus*, sich unterschiedlichsten Umweltbedingungen anpassen zu können und erklärt damit die hohe Diversität der verschiedenen *S.aureus*-Stämme. Dies wird noch verstärkt durch die in dieser Arbeit gezeigte Fähigkeit von *S.aureus* sich in sehr kurzer Zeit anzupassen und als Stamm, für den eigentlich eine der AS essentiell ist die Fähigkeit zu erwerben, diese AS nach kurzer Zeit dennoch selbständig synthetisieren zu können. Weiter erschwert wird diese Situation noch dadurch, dass nicht vorausgesetzt werden kann, dass ein *S.aureus*-Stamm, obwohl er theoretisch die Fähigkeit hat, eine AS von Grund auf synthetisieren zu können, diese AS auch wirklich in einer für das eigene Wachstum und Überleben ausreichenden Geschwindigkeit und Menge synthetisiert. Obwohl *S.aureus* zum Beispiel theoretisch in der Lage sein sollte, Serin aus Glycin und außerdem Cystein aus Serin zu synthetisieren, ist *S.aureus* vielleicht nicht in der Lage zu überleben und zu wachsen, wenn Cystein aus Glycin synthetisiert werden soll. Obwohl *S.aureus* also vermutlich zwar die genetische Ausstattung hat, eigenständig alle proteinogenen AS zu synthetisieren, werden die entsprechenden Gene wohl teilweise erst exprimiert, wenn sie für ein weiteres Überleben und Wachstum benötigt werden, und dann mitunter auch nur sehr verzögert und in einer Stärke, die teilweise nicht ausreicht, um den eigenen Bedarf durch die eigene Produktion abzudecken.

Wenn eine AS essentiell ist bedeutet dies, dass ein Lebewesen sie nicht selbständig synthetisieren kann und nicht ohne externe Zufuhr dieser AS überleben und wachsen kann. Eine klare Regel ab welchem Punkt diese eigenständige Synthese beginnen muss um eine AS als nicht essentiell zu bezeichnen existiert hingegen nicht. Muss zum Beispiel die AS-Synthese mit der Stickstofffixierung beginnen? Diese Uneinigkeit in der Frage der Definition von essentiell und damit auch der Uneinheitlichkeit in der Gestaltung der

Experimente ist ein weiterer Grund für die oben genannte Inkonsistenz in den Angaben über die essentiellen AS in der Literatur. In dieser Arbeit wird essentiell so definiert, dass die Abwesenheit einer AS, wenn sie einem davor zum Wachstum ausreichenden Medium entzogen wird, zur Wachstumshemmung von *S.aureus* führt. Es werden hier also die getesteten Stämme in einem Medium, dem jeweils eine einzige AS entzogen wurde, angezüchtet. Bleibt das Wachstum aus, ist die entsprechende AS für den getesteten Stamm essentiell.

In all den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurde also das Verhalten von *S.aureus* immer nur bei Entzug jeweils einer einzelnen AS untersucht. Somit hatte *S.aureus* die Möglichkeit, die fehlende AS verhältnismäßig einfach aus den anderen AS zu synthetisieren, ohne immer den kompletten Syntheseweg in Anspruch nehmen zu müssen.

In der Literatur hingegen können verschiedene Interpretationen von ‚essentiell‘ gefunden werden und damit auch verschiedene Herangehensweisen, um essentielle AS in *S.aureus* zu finden.

Kurode et al. [36] fanden heraus, dass zumindest N315 essentiell für Alanin, Glycin, Isoleucin, Arginin, Valin und Prolin ist, obwohl sie durch Sequenzierung des Genoms eines Methicillin-resistenten *S.aureus* (MRSA) zeigen konnten, dass *S.aureus* zumindest prinzipiell die genetische Ausstattung zur Synthese aller AS besitzt.

In [35] entziehen Mah et al. *S.aureus* bei jedem experimentellen Durchgang jeweils eine AS mehr und beobachtet dabei, welche AS *S.aureus* entzogen werden kann, ohne eine gewisse Wachstumsrate zu unterschreiten. Sie stellen fest, dass das Vorenthalten vieler AS (Asp, Ile, Ala, Lys, Ser, Trp, Met und Tyr) nicht zu einer Verminderung der Wachstumsleistung führt. Essentielle AS werden nicht explizit beschrieben, wohl aber, dass das Vorenthalten verschiedener AS wie z.B. Cystein, Valin, Arginin oder Prolin das Wachstum stark hemmt.

Laut Kloos et al. [37] benötigt *S.aureus* je nach Stamm fünf bis zwölf AS, vor allem als organische Stickstoffquelle. Die am häufigsten gefundenen essentiellen AS sind Arginin, Valin, Leucin, Cystein und Prolin.

Coutinho et al. [33] fanden Arginin, Valin und Cystein als essentiell in allen fünf vorgestellten und getesteten aus Patienten isolierten klinischen *S.aureus*-Stämmen. Drei dieser getesteten Stämme waren außerdem auch essentiell für Histidin.

Tabelle 5: Essentielle AS

	Coutinho et al 1963 [33]	Lincoln et al 1995 [34]	Mah et al 1967 [35]	Kuroda et al 2001 [36]	Kloos et al 1986 [37]	Gesamt	Diese Arbeit
Ala				✓		1	
Arg	✓	✓	✓	✓	✓	5	✓
Cys	✓	✓	✓		✓	4	✓
Gly		✓		✓		2	✓
His	✓					1	
Ile				✓		1	
Leu		✓			✓	2	✓
Pro		✓	✓	✓	✓	4	✓
Val	✓	✓	✓	✓	✓	5	✓

In dieser Tabelle sind die in unseren Experimenten essentiellen AS aufgelistet und mit den Angaben früherer Experimente verglichen.

Im Gegensatz zu den von Coutinho et al. [33] untersuchten aus menschlichen Patienten isolierten *S.aureus*-Stämmen, untersuchten Lincoln et al. [34] bei boviner Mastitis isolierte *S.aureus*-Stämme. Die Experimente wurden in einem chemisch definierten Vollmedium durchgeführt und bei jedem Durchgang wurde jeweils eine der AS entfernt. Arginin, Cystein, Glycin, Leucin, Prolin und Valin zeigten sich hier als essentiell.

In den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten und Simulationen werden nicht nur die metabolischen Prozesse und Stoffwechselwege der AS-Synthese untersucht oder nur die essentiellen AS gezeigt, sondern beides in dem simulierten Netzwerk kombiniert untersucht und bewertet. Es wird so nicht nur versucht zu zeigen, welche AS essentiell sind, sondern zu verstehen und zu erklären warum. AS, die aufgrund der hier vorgestellten Experimente im WT als essentiell eingestuft werden, sind Arginin, Cystein, Glycin, Leucin, Valin und Prolin (siehe auch Tabelle 5).

Beim Betrachten der Tabelle 5 lässt sich in einigen Fällen eine gute Übereinstimmung der Literaturdaten untereinander, aber auch der Literaturdaten mit den hier präsentierten Ergebnissen erkennen. Unter Berücksichtigung aller Daten können Arginin und Valin, aber auch Cystein und Prolin als essentielle AS in *S.aureus* bezeichnet werden. Andere AS werden hingegen nur in einzelnen Arbeiten als essentiell beschrieben. Vor allem wenn die Ergebnisse genauer betrachtet werden, können zwischen den Datensätzen Unterschiede gefunden werden. So zeigte sich in den Experimenten von Coutinho et al [33] Histidin zum Beispiel nur in drei der fünf getesteten Stämme als essentiell. Die mitunter hohe Diversität der essentiellen AS zwischen den einzelnen *S.aureus*-Stämmen ist laut Gale et al. [78] zumindest in Teilen durch Veränderungen in den Transporteigenschaften über die Zellmembranen zu erklären. Veränderungen der Zellwandkonfiguration und damit auch der Transportmoleküle aufgrund von Anpassungsvorgängen bei der Resistenzentwicklung gegen verschiedene Antibiotika können für diese veränderten Transporteigenschaften über die Zellwand hinweg verantwortlich sein. Laut Gale et al. [78] führt zum Beispiel eine verbesserte Resistenz gegen Penicillin zu einer Verminderung der Fähigkeit Glutamat einzuschleusen. Dies wiederum führt zu einem erhöhten evolutionären Druck, Glutamat selber zu synthetisieren. Ein multiresistenter Stamm ohne die Möglichkeit AS einzuschleusen, müsste dann schlussendlich in der Lage sein, alle AS eigenständig zu synthetisieren. Dies würde letztlich zu einer Diversität in der Essentialität von AS in *S.aureus* führen, die der Diversität in der Antibiotikaresistenz entspricht.

ERKLÄRUNG FÜR DIE ESSENTIALITÄT

Die sechs in dieser Arbeit gefundenen essentiellen AS (Arginin, Cystin, Glycin, Leucin, Prolin, Valin) decken sich gut mit den in Zusammenschau der bisherigen Literaturdaten gefundenen essentiellen AS (siehe auch Tabelle 5). Auch in der bisherigen Literatur ist Arginin bereits als eine der essentiellen AS von *S.aureus* beschrieben. Trotzdem gibt es bisher keine mechanistischen Erklärungen für die Ursachen dieser Essentialität. Ähnliches gilt auch für Prolin: Ebenfalls gut als essentiell beschrieben, fehlen aber auch hier gute Erklärungen für diese Essentialität. Die Simulation von NW1 zeigt darum Arginin und Prolin nicht als essentiell. In dem durch einen iterativen Prozess gefundenen NW2 (siehe auch Material und Methoden: "Einbeziehung der in-vitro Resultate in die Simulation") stellt sich ein Defekt in der Ornithinsynthese als naheliegendste Option zur Erklärung beider Essentialitäten dar. NW2 zeigt bei ausgeschaltetem Ornithin in der

Simulation eine Essentialität sowohl von Prolin als auch von Arginin, weswegen ein Defekt in der Ornithinsynthese in *S.aureus* postuliert werden muss.

Auch die Essentialität von Cystein ist, obwohl häufig beschrieben, mechanistisch noch nicht erklärt und darum in NW1 nicht nachzuvollziehen. Die zu NW2 führenden in – vitro-Experimente legen eine Hemmung durch RSH nahe. Am wahrscheinlichsten ist hier eine Beeinflussung des Stoffwechselweges von Serin nach Cystein, da in Serin, dem Vorläufer in der Synthese des Cystein, diese RSH Abhängigkeit noch nicht gefunden werden kann. Der entscheidende Unterschied zwischen Serin und Cystein ist die durch eine Sulphydrylgruppe ausgetauschte Hydroxylgruppe am C-Atom der Seitenkette. Zu postulieren ist also, dass ein Defizit in der Schwefelfixierung oder der Übertragung die Essentialität von Cystein bedingt.

Glycin ist eine weitere in den hier vorgestellten Experimenten als essentiell gefundene AS. Auch für Glycin ist eine Essentialität teilweise schon vorbeschrieben jedoch ebenfalls ohne mechanistische Erklärung. Die Experimente legen eine Hemmung durch CcpA nahe, genauso wie eine indirekte Aktivierung durch RSH über eine Hemmung der durch CodY vermittelten direkten Hemmung. Serin als Vorläufer von Glycin im Stoffwechselweg zeigt diese Regulationen nicht. NW2 legt in den in-vitro Experimenten also eine, in dieser Arbeit schon für zahlreiche andere AS beschriebene, RSH/CodY-Reihenhemmung sowie vor allem auch eine Hemmung durch CcpA und damit eine klare Abhängigkeit der Glycinsynthese vom Glucosestoffwechsel nahe. Eine wichtige Rolle scheint hier auch der Prozess der Bereitstellung und Übertragung von Methylgruppen über Tetrahydrofolsäure zu spielen.

All die in der Simulation NW2 gefundenen Erklärungen für die Essentialitäten der AS stellen anhand sorgfältig durchgeführter in-vitro-Experimente aufgestellte und postulierte Hypothesen dar und müssen darum in weiteren in-vitro-Experimenten überprüft und gegebenenfalls nochmals angepasst werden.

Leucin und Valin hingegen sind nicht nur gut als essentielle AS von *S.aureus* beschrieben, sondern es ist auch der zugrundeliegende Stoffwechselweg bekannt, nämlich eine Hemmung durch CodY. Somit ist diese Essentialität auch in NW1 gut dargestellt.

WACHSTUM ALS SURROGATPARAMETER DER AS-SYNTHESE

Weil ein *S.aureus* Stamm, welcher zwar genug AS produziert um zu überleben, nicht auch einen Überschuss produzieren muss, der groß genug ist, um ihn im Medium zu detektieren, ist es nahezu unmöglich, direkt die AS-Syntheseleistung von *S.aureus* experimentell sicher nachzuweisen; nur ein in das Medium sezernierter Überschuss könnte dargestellt werden. Wachstum ist hingegen nur möglich, wenn die entzogene AS durch *S.aureus* selbständig ersetzt wird. Hier kann über das Wachstum auch eine minimale gerade so für das Wachstum ausreichende, sich noch nicht im Medium widerspiegelnde Synthese dargestellt werden. Dies dann allerdings mit dem Nachteil, die Synthese nur über den Surrogatparameter Wachstum bewerten und darum hier keine absoluten Synthesemengen darstellen zu können. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit also, anstelle der tatsächlich produzierten AS Mengen, Überleben und Wachstum der *S.aureus* Stämme als Surrogatparameter für die AS Synthese genutzt. Die hier gezeigten experimentellen Daten geben somit die AS-Produktion nicht quantitativ wieder, zeigen aber qualitativ recht gut die Fähigkeit der verschiedenen *S.aureus*-Stämme unterschiedliche AS zu synthetisieren und so zu überleben, wenn sie AS-Mangelmedien ausgesetzt sind.

Das hier vorgestellte Netzwerk hingegen simuliert die AS-Syntheseleistung von *S.aureus* im Falle eines AS-Mangels und damit, wenn auch nicht direkt, so doch in zweiter Linie, die Fähigkeit von *S.aureus* in verschiedenen AS-Mangelmedien zu überleben und zu wachsen. In dieser Arbeit können also keine absoluten und keine identischen Werte, sondern jeweils nur zwar eng miteinander verknüpfte, aber dennoch Ersatzparameter verglichen werden

PRAKTISCHE BEDEUTUNG DIESER ARBEIT

Das hier vorgestellte Netzwerk konzentriert sich auf wichtige Knoten für die SR in *S.aureus* genauso wie auf wichtige Knoten für den AS-Metabolismus von *S.aureus*; zusammengefasst also auf zentrale regulatorische Knoten mit großem Einfluss auf die Nahrungsstress-Antwort von *S.aureus*. Beispiele hierfür sind unter anderem das Met- und das Ilv-Operon aber auch Knoten wie CodY, RSH und CcpA. Hierbei wurde aber darauf geachtet, dass das Netzwerk eine allumfassende Darstellung unseres Wissens über SR und AS-Metabolismus in *S.aureus* widerspiegelt. Wichtig hierfür sind einerseits all die mit dargestellten peripheren Knoten und Interaktionen, genauso aber auch die

teilweise sehr detaillierte Darstellung innerhalb des Netzwerkes. Die detaillierte Darstellung der Glykolyse, welche unverzichtbare Zwischenprodukte des AS-Stoffwechsels liefert, ist ein gutes Beispiel hierfür. Ein weiteres Beispiel für diese detaillierte Darstellung des AS-Metabolismus in diesem Netzwerk ist die Glycin- und Serin-Synthese und deren Interaktion mit dem externen Einfluss durch Cotrimoxazol. Die exakten Interaktionsmechanismen hingegen wurden bei der Erstellung des Netzwerkes nicht berücksichtigt, sondern nur die Frage, ob ein Knoten durch einen anderen gehemmt oder gestärkt wird und nicht, ob dieser Effekt durch einen Einfluss auf die Transkription, die Translation oder direkt auf die Effizienz des schlussendlichen Genprodukts bedingt ist. Somit repräsentiert diese Simulation nicht die exakten Interaktionsmechanismen der verschiedenen Knoten auf einer molekularen Ebene, und das Netzwerk bleibt so trotz der häufig detaillierten Darstellung eine vereinfachte Abbildung der Realität. Diese Simulation arbeitet also ohne detaillierte kinetische Daten, da sie meist experimentell nur sehr schwer zu ermitteln und darum häufig nicht verfügbar sind. Trotzdem zeigt der Vergleich zwischen in-vitro und in-silico eine gute Übereinstimmung mit dem auf Basis von Literaturdaten konstruierten Netzwerk (NW1). Im nächsten Schritt wurden Vorhersagen über weitere noch nicht etablierte Interaktionen und Knoten getroffen und diese in das Netzwerk integriert. Das so erstellte Netzwerk (NW2) (siehe auch NW2 in Abbildung 17b) wurde wiederum mit den experimentellen Daten verglichen und zeigt nun eine noch bessere Übereinstimmung zwischen in-vitro und in-silico und unterstützt somit unsere Vorhersagen. Dieses Model bietet also nicht nur eine Plattform zur Simulation der SR und des AS-Metabolismus in *S.aureus*, sondern hilft uns, in Kombination mit den publizierten Daten und unseren eigenen experimentellen Ergebnissen, die Mechanismen und Interaktionen rund um zentrale regulatorische Knoten aufzuklären.

Cotrimoxazol ist ein Beispiel für ein Antibiotikum, das direkten Einfluss auf den AS-Metabolismus aber auch auf die SR in *S.aureus* nimmt [11]. Die Mechanismen hinter der Stressreaktion und der Regulation des AS-Metabolismus zu kennen, diese simulieren und im Endeffekt vielleicht auch kontrollieren zu können, bietet unzählige Möglichkeiten zur Entwicklung zukünftiger Antibiotika gegen multiresistente Keime und damit auch zur Bekämpfung von *S.aureus*-Infektionen. Durch Verbinden der hier vorgestellten Simulation mit der in der letzten Arbeit dargestellten Simulation über das QS und die Biofilmbildung in *S.aureus* [6] lässt sich erkennen, dass der Nahrungsstress

in *S.aureus* auch einen großen Einfluss auf das QS und die Biofilmbildung und damit auch auf die Virulenz von *S.aureus* hat. Nahrungsmangel führt zur Hemmung von CodY [7], was wiederum zur Enthemmung des eigentlich von CodY inhibierten Agr führt. Agr ist der zentrale Regulator des QS und damit auch, wie in Audretsch et al. [6] gezeigt, von zentraler Bedeutung für die Hemmung und damit die Regulation der Biofilmbildung in *S.aureus*. Die hier und in der letzten Arbeit vorgestellten Simulationen über SR und AS Metabolismus sowie über QS und Biofilmbildung legen also nahe, dass Nahrungsstress ein weiterer wichtiger Faktor für die Biofilmbildung ist und zu einer verminderten Fähigkeit von *S.aureus* führt, Biofilme auszubilden. Es scheint also, dass *S.aureus* ohne die notwendigen Ressourcen den planktonischen Zustand und damit die Möglichkeit zur Erschließung neuer Ressourcen anstrebt, es aber auf der anderen Seite für *S.aureus* von Vorteil ist, so lange in einem geschützten Biofilm zu bleiben, wie die benötigten Ressourcen in ausreichender Menge vorhanden sind. Diese Arbeit stellt somit auch eine logische und in-silico überprüfte Verbindung zwischen dem Nahrungsstress und der Biofilmbildung vor, welche natürlich in Zukunft noch durch in-vitro-Experimente validiert und überprüft werden muss. Die Nahrungsverfügbarkeit von *S.aureus* zu kontrollieren und zu regulieren kann ein weiteres Werkzeug zur Manipulierung der Biofilmbildung in *S.aureus* sein. Die richtige Handhabung vorausgesetzt, kann *S.aureus* so zugänglicher für die Bekämpfung durch das Immunsystem, aber auch für eine medikamentöse Therapie, zum Beispiel über Antibiotika, gemacht werden.

Heute bekannte und teilweise auch gefürchtete unerwünschte Arzneimittelwirkungen einer aggressiven Antibiotikatherapie könnten mit einer selektiveren Therapie vermindert oder sogar vermieden werden. Ein Beispiel hierfür ist die pseudomembranöse Colitis, eine Infektion des Colons aufgrund eines durch die Antibiotikatherapie hervorgerufenen Ungleichgewichts in der Bakterienflora des Dickdarms [79]. Eines der möglichen zukünftigen Ziele in der Nutzung der hier vorgestellten Simulation könnte also die Entwicklung einer Therapie gegen die SR oder den AS-Metabolismus von *S.aureus* oder sogar eine gezielte antibiotischen Therapie sein. Eine effektive und gleichzeitig selektive antibiotische Therapie, welche das Wissen dieser Arbeit nutzt, sollte somit die bei Infektion der verschiedenen Körperregionen und Geweben sowie die für *S.aureus* in jeder speziellen Infektion verfügbaren Ressourcen berücksichtigen. Dieses Antibiotikum sollte dann sehr selektiv *S.aureus* die Möglichkeit zur Synthese exakt der AS nehmen, die auch schon im Milieu fehlen. Eine weitere

Möglichkeit wäre es, Substanzen zu entwickeln und zu nutzen, welche der infizierten Region gezielt die AS entzieht, die für den infizierenden *S.aureus*-Stamm in dieser speziellen Situation essentiell sind.

Ein fast um 24 Stunden verzögertes exponentielles Wachstum, wie es auch in dieser Arbeit in einigen der Experimente ganz am Schluss der Wachstumskurve gefunden werden kann, wurde schon durch Coutinho et al. [33] entdeckt und beschrieben. Sie bezeichneten die entsprechenden AS als „semi essentiell“, ohne aber eine Erklärung über den Mechanismus zu geben und ohne festzustellen, dass in einem zweiten Wachstumsversuch diese Essentialität nicht mehr besteht. Wenn jedoch, wie hier dargestellt, genau dieselben Bakterien einem zweiten Wachstumsversuch unterzogen wurden, zeigte sich ein exponentielles Wachstum von Beginn an. Diese experimentellen Ergebnisse legen Bakterien nahe, die sich in weniger als 24 Stunden an die neuen Umweltbedingungen angepasst haben. Eine mögliche Erklärung ist, dass der gezielte Nährstoffentzug nach einiger Zeit zu einer Änderung des Expressionsmusters und damit auch zu einem anderen Proteom und schlussendlich zu einem veränderten und angepassten AS-Metabolismus führt. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass dies auf einen evolutionären selektiven Prozess zurückzuführen ist, welcher nur Bakterien mit der Fähigkeit in diesen neuen, Nährstoff geminderten Umweltbedingungen zu überleben, zurücklässt

Systembiologie ist das Studium und die Definition aller biologischer Komponenten, Prozesse und deren Interaktionen in einem definierten biologischen System. Synthetische Biologie ist ein technischer Versuch, neue biologische Komponenten oder Prozesse zu konstruieren und zu designen oder bestehende Systeme und Komponenten zu verwenden, um sie umzubauen oder neu zu arrangieren. Die Systembiologie liefert häufig und so auch in diesem Falle, einen guten Einblick in grundlegende Systeme und Prozesse, die Später von großem Nutzen in der Synthetische Biologie sein können. Die Synthese der verschiedenen AS spielt aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für jedes Lebewesen natürlich auch in der Synthetischen Biologie eine Schlüsselrolle. Die hier vorgestellten Ergebnisse, die Simulationsergebnisse mit eingeschlossen, sind ein erster Schritt in Richtung eines AS-Metabolismus-Bausteins, welcher für die Synthetische Biologie naheliegenderweise von großem Wert ist.

FAZIT

Das in dieser Arbeit vorgestellte Netzwerk bietet einen umfassenden Überblick über unser aktuelles Wissen in Bezug auf den AS-Metabolismus in *S.aureus* sowie seine Steuerung durch SR. Es stellt das erste umfassende booleansche Netzwerk rund um SR in *S.aureus* inklusive aller wichtigen regulatorischen Knoten wie CodY, RSH, und CcpA dar. Dieses Netzwerk beinhaltet außerdem den gesamten AS- Synthese-Metabolismus und zeigt so nicht nur den SR-Mechanismus sondern kann, und das ist noch viel wichtiger, auch die Effekte der SR auf den AS-Metabolismus von *S.aureus* im Falle von Nahrungsstress simulieren. Das Netzwerk wurde mit den Wachstumskurven, also den experimentellen Daten der Wachstumsexperimente, verglichen. Diese Wachstumskurven zeigen, unter welchen Bedingungen es zur Synthese einer bestimmten AS und damit auch zum Wachstum des getesteten *S.aureus*-Stammes kommt. Somit zeigen diese Wachstumskurven auch, welche AS essenziell für die unterschiedlichen getesteten *S.aureus*-Stämme sind. Diese experimentellen Ergebnisse wurden also mit der Simulation verglichen und für die Validierung des Netzwerkes verwendet. Darüber hinaus wurden Vorhersagen getroffen und zusätzliche postulierte regulatorische Verknüpfungen zwischen den Knoten eingefügt und so die Simulation für eine noch bessere Übereinstimmung und zur besseren Erklärung der experimentellen Ergebnisse weiter modifiziert. Diese Vorhersagen wurden dann wiederum mit den experimentellen Daten verglichen. Es ergibt sich nun eine sehr gute Übereinstimmung mit den Vorhersagen und die neue Simulation zeigt somit eine verbesserte in-vitro - in-silico-Übereinstimmung. Mit diesem Netzwerk wird hier also ein umfassender Überblick über das Wissen rund um Interaktions- und Regulations-Mechanismen in der AS-Synthese und insbesondere auch rund um die Einflüsse und Mechanismen der SR in *S.aureus* präsentiert. All dies ist implementiert in eine validierte Simulation, bereit zur Anwendung und Testung von Theorien über SR und AS-Metabolismus in *S.aureus*.

Diese Arbeit beinhaltet sowohl eine experimentelle als auch eine simulierte Analyse der Auswirkungen verschiedener bedeutender regulatorischer Knoten wie zum Beispiel CodY, RSH, CcpA, das Ilv- und das Met-Operon auf die SR und den AS-Metabolismus von *S.aureus*. Neben der Möglichkeit das Netzwerk anhand der Wachstumskurven zu validieren und zu testen, zeigen die hier durchgeführten Wachstumsexperimente also

nicht nur eine umfassende experimentelle Analyse der AS-Synthese-Fähigkeiten von *S.aureus*, sondern auch die für *S.aureus* essentiellen AS. Die hier vorgestellte Simulation erlaubt uns die SR genauso wie den AS-Metabolismus in *S.aureus* zu studieren, sie ist getestet und validiert und stimmt sehr gut mit den Literaturdaten, aber auch mit den experimentellen Daten überein. Außerdem kann das Netzwerk schnell und leicht ohne viel technisches Wissen und große technische Ausstattung für Simulationen verwendet werden und wurde darum öffentlich zugänglich gemacht. Die Bedeutung des regulatorischen Einflusses auf das Netzwerk durch verschiedene regulatorisch bedeutende Knoten sowie die Essentialität verschiedener AS wie zum Beispiel Arginin und Prolin in manchen knock-out-Mutanten, aber zum Beispiel auch Cystein und Leucin, wird durch die Simulation nahegelegt und durch die experimentellen Ergebnisse gut unterstützt.

Die essentiellen Ressourcen von *S.aureus* unter verschiedenen Umständen, aber auch die essentiellen regulatorischen Knoten und damit die Stellschrauben des AS-Metabolismus in *S.aureus* zu kennen und die Möglichkeit zu haben, die Auswirkungen von Manipulationen und Veränderungen an diesem System in einer einfachen und kosteneffizienten Art und Weise zu simulieren, kann ein erster Schritt in der Erfindung, Entwicklung und Untersuchung neuer Medikamente und Antibiotika sein und damit bei der Bekämpfung von *S.aureus*-Infektionen helfen. Mit der zuvor erwähnten Verbindung zu meiner vorangegangenen Arbeit und dem Netzwerk über QS und Biofilmbildung könnten die Schlussfolgerungen aus dieser Simulation darüber hinaus auch dabei helfen, *S.aureus* von der Bildung von Biofilmen, zum Beispiel bei der Besiedlung medizinischer Implantate, wie etwa Katheter, abzuhalten. Eine verbesserte Erreichbarkeit der Bakterien durch Antibiotika, durch das Immunsystem, aber auch durch mechanische Einflüsse wäre die Folge, was eine leichtere Bekämpfung der Infektion und Eradikation der Erreger zur Folge haben würde.

ZUSAMMENFASSUNG

Staphylococcus aureus ist einer der bedeutendsten Verursacher nosokomialer Infektionen und kann ein breites Spektrum verschiedener Erkrankungen auslösen. Das Bakterium kann unter verschiedensten Umweltbedingungen mit einer breiten Ressourcenvariabilität überleben. Dafür hat es eine Vielzahl von regulativen Mechanismen zur Verfügung. Die sogenannte „Stringente Antwort“ ist wesentlich für die metabolische Anpassung insbesondere hinsichtlich des Aminosäuremetabolismus. Sie erlaubt die Expression von Biosynthese-Genclustern und wird durch Aminosäuremangel mittels der (p)ppGpp Synthetase RSH aktiviert. Die führt zur Verringerung der intrazellulären GTP-Konzentration und nachfolgend zur De-Reprimierung des Transkriptionsfaktors CodY. CodY reprimiert unter nicht limitierenden Bedingungen viele Aminosäure-Biosynthese-Gene. CcpA ist ein weiterer zentraler metabolischer Regulator, welcher ebenfalls einen Effekt auf die Expression metabolischer Gencluster zeigt. Die Genomsequenzen von *S. aureus* Isolaten sind gut annotiert und die RSH, CodY und CcpA abhängigen Regulons publiziert. Daneben gibt es eine Vielzahl von Publikationen, die Aufschluss über einzelne metabolische Mechanismen der Aminosäure-Synthese erlauben.

Ziel dieser Arbeit war es auf Grund dieser Erkenntnisse einen integrierten Einblick hinsichtlich des metabolischen Netzwerks von *S. aureus* zu erlangen. Hierzu wurde eine in silico Analyse gewählt bei der die Interaktion der zentralen Knoten CodY, RSH und CcpA in einem semiquantitativen Boolesches Netzwerk (195 Knoten und 320 Kanten) der „Stringenten Antwort“ und des Aminosäure Metabolismus dargestellt wurden. Jeder Knoten repräsentiert die Aktivität einer logischen Einheit also z.B. eines Gens aber auch seiner Produkte (mRNA und Proteine). Von mir entwickelte Logikgatter erlauben es AND-Bedingungen korrekt darzustellen. Anhand von in-vitro Wachstumsexperimenten von knockout Mutanten in Aminosäure Mangelmedien wurde das aus Literaturdaten erstellte Netzwerk getestet und validiert. Es zeigte sich semiquantitativ eine sehr gute in-vitro - in-silico Übereinstimmung von durchschnittlich 62%. Durch Postulieren und Überprüfen zusätzliche Kanten wurde eine Übereinstimmung von 81% erreicht. Diese Kanten stellen in silico erfolgreiche Erklärungen von in-vitro Phänomenen dar und müssen in weiteren Experimenten validiert werden.

Einige *S.aureus*-Stämme zeigen Wachstum erst nach 24h, bei erneuter Anzucht derselben Probe jedoch von Anfang an. Dies legt einen Anpassungsprozess nahe der innerhalb der 24h des Experimentes stattgefunden haben muss. Ob diese Anpassung genetisch oder regulatorisch vermittelt ist müssen weitere Experimente zeigen.

Das hier vorgestellte, validierte und getestete Netzwerk zeigt zusammen mit den Wachstumskurven neben den essentiellen Aminosäuren der verschiedenen Stämme die Bedeutung der zentralen Knoten CodY, RSH und CcpA, vor allem in der Feinregulation von Stringent Response und Aminosäure Metabolismus in *S. aureus*. Das Netzwerk stellt ein gut passendes theoretisches Modell der Signalkaskaden dar, es liefert Vorhersagen über Mutationen für jeden Knoten im Netzwerk und bietet damit die Möglichkeit zur schnellen und kostengünstigen Analyse. So erlaubt es ein besseres Verständnis metabolischer Anpassungsstrategien sowie essentieller Aminosäuren von *S.aureus*.

LITERATUR

- [1] G. Y. Liu, A. Essex, J. T. Buchanan, V. Datta, H. M. Hoffman, J. F. Bastian, J. Fierer, and V. Nizet, "Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 202, pp. 209–215, jul 2005.
- [2] F. D. Lowy, "Staphylococcus aureus Infections," *New England Journal of Medicine*, vol. 339, pp. 520–532, aug 1998.
- [3] M. O. Clements and S. J. Foster, "Stress resistance in staphylococcus aureus," *Trends in Microbiology*, vol. 7, pp. 458–462, nov 1999.
- [4] A. L. Cheung, A. S. Bayer, G. Zhang, H. Gresham, and Y.-Q. Xiong, "Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in Staphylococcus aureus," *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, vol. 40, pp. 1–9, jan 2004.
- [5] R. N. Zadoks, J. R. Middleton, S. McDougall, J. Katholm, and Y. H. Schukken, "Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 16, pp. 357–372, oct 2011.
- [6] C. Audretsch, D. Lopez, M. Srivastava, C. Wolz, and T. Dandekar, "A semi-quantitative model of quorum-sensing in staphylococcus aureus, approved by microarray meta-analyses and tested by mutation studies," *Molecular BioSystems*, vol. 9, no. 11, p. 2665, 2013.
- [7] C. D. Majerczyk, P. M. Dunman, T. T. Luong, C. Y. Lee, M. R. Sadykov, G. A. Somerville, K. Bodi, and A. L. Sonenshein, "Direct targets of CodY in staphylococcus aureus," *Journal of Bacteriology*, vol. 192, pp. 2861–2877, apr 2010.
- [8] K. Seidl, S. Müller, P. François, C. Kriebitzsch, J. Schrenzel, S. Engelmann, M. Bischoff, and B. Berger-Bächi, "Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in staphylococcus aureus," *BMC Microbiology*, vol. 9, no. 1, p. 95, 2009.
- [9] T. Geiger, C. Goerke, M. Fritz, T. Schafer, K. Ohlsen, M. Liebeke, M. Lalk, and C. Wolz, "Role of the (p)ppGpp synthase RSH, a RelA/SpoT homolog, in stringent response and virulence of staphylococcus aureus," *Infection and Immunity*, vol. 78, pp. 1873–1883, mar 2010.
- [10] K. Hiramatsu, H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, and F. Tenover, "Methicillin-resistant staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility," *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 40, no. 1, pp. 135–136, 1997.
- [11] E. J. C. Goldstein and R. A. Proctor, "Role of folate antagonists in the treatment of methicillin-resistant staphylococcus aureus infection," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 46, pp. 584–593, feb 2008.
- [12] R. Cassels, B. Oliva, and D. Knowles, "Occurrence of the regulatory nucleotides ppGpp and pppGpp following induction of the stringent response in staphylococci," *Journal of Bacteriology*, vol. 177, pp. 5161–5165, sep 1995.
- [13] G. S. Stent and S. Brenner, "A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 47, pp. 2005–2014, dec 1961.
- [14] H. Xiao, M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser, and M. Cashel, "Residual guanosine 3', 5'-bispyrophosphate synthetic activity of rela null mutants can be

- eliminated by spot null mutations.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 9, pp. 5980–5990, 1991.
- [15] J. Eichel, Y.-Y. Chang, D. Riesenber, and J. E. Cronan, "Effect of ppgpp on escherichia coli cyclopropane fatty acid synthesis is mediated through the rpos sigma factor," *Journal of bacteriology*, vol. 181, no. 2, pp. 572–576, 1999.
- [16] R. J. Heath, S. Jackowski, and C. O. Rock, "Guanosine tetraphosphate inhibition of fatty acid and phospholipid synthesis in escherichia coli is relieved by overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsB)," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 42, pp. 26584–26590, 1994.
- [17] A. E. Chiaramello and J. W. Zyskind, "Coupling of DNA replication to growth rate in escherichia coli: a possible role for guanosine tetraphosphate.," *Journal of Bacteriology*, vol. 172, pp. 2013–2019, apr 1990.
- [18] V. J. Hernandez and H. Bremer, "Characterization of rna and dna synthesis in escherichia coli strains devoid of ppgpp.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, no. 15, pp. 10851–10862, 1993.
- [19] A. Aberg, V. Shingler, and C. Balsalobre, "(p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of escherichia coli by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB," *Molecular Microbiology*, vol. 60, pp. 1520–1533, jun 2006.
- [20] L. U. Magnusson, A. Farewell, and T. Nyström, "ppGpp: a global regulator in escherichia coli," *Trends in Microbiology*, vol. 13, pp. 236–242, may 2005.
- [21] L. U. Magnusson, B. Gummesson, P. Joksimovic, A. Farewell, and T. Nystrom, "Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in escherichia coli," *Journal of Bacteriology*, vol. 189, pp. 5193–5202, may 2007.
- [22] M. Gropp, Y. Strausz, M. Gross, and G. Glaser, "Regulation of escherichia coli RelA requires oligomerization of the c-terminal domain," *Journal of Bacteriology*, vol. 183, pp. 570–579, jan 2001.
- [23] M. Kuroda, H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori, and K. Hiramatsu, "Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in staphylococcus aureus," *Molecular Microbiology*, vol. 49, pp. 807–821, jan 2004.
- [24] T. Geiger, P. Francois, M. Liebeke, M. Fraunholz, C. Goerke, B. Krismer, J. Schrenzel, M. Lalk, and C. Wolz, "The stringent response of staphylococcus aureus and its impact on survival after phagocytosis through the induction of intracellular PSMs expression," *PLoS Pathogens*, vol. 8, p. e1003016, nov 2012.
- [25] S. Reiß, J. Pané-Farré, S. Fuchs, P. François, M. Liebeke, J. Schrenzel, U. Lindequist, M. Lalk, C. Wolz, M. Hecker, and S. Engelmann, "Global analysis of the staphylococcus aureus response to mupirocin," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 56, pp. 787–804, nov 2011.
- [26] R. U. Rymer, F. A. Solorio, A. K. Tehranchi, C. Chu, J. E. Corn, J. L. Keck, J. D. Wang, and J. M. Berger, "Binding mechanism of metal-NTP substrates and stringent-response alarmones to bacterial DnaG-type primases," *Structure*, vol. 20, pp. 1478–1489, sep 2012.
- [27] T. Geiger, B. Kastle, F. L. Gratani, C. Goerke, and C. Wolz, "Two small (p)ppGpp synthases in staphylococcus aureus mediate tolerance against cell envelope stress conditions," *Journal of Bacteriology*, vol. 196, pp. 894–902, Feb. 2014.
- [28] K. Pohl, P. Francois, L. Stenz, F. Schlink, T. Geiger, S. Herbert, C. Goerke, J. Schrenzel, and C. Wolz, "CodY in staphylococcus aureus: a regulatory link between metabolism and virulence gene expression," *Journal of Bacteriology*, vol. 191, pp. 2953–2963, feb 2009.

- [29] C. Wolz, T. Geiger, and C. Goerke, "The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 300, pp. 142–147, feb 2004.
- [30] B. R. Belitsky and A. L. Sonenshein, "Genetic and biochemical analysis of CodY-binding sites in bacillus subtilis," *Journal of Bacteriology*, vol. 190, pp. 1224–1236, dec 2007.
- [31] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemie, 5. Auflage ed.* Spektrum akademischer Verlag GmbH Heidelberg/Berlin, 2003.
- [32] A. G. Moat, J. W. Foster, and M. P. Spector, *Microbial Physiology, Fourth Edition*, ch. Chapter 15 - Biosynthesis and Metabolism of Amino Acids, pp. 503–544. John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [33] C. B. Coutinho and L. G. Nutini, "Correlation between the essential amino-acid requirements of staphylococcus aureus, their phage types and antibiotic patterns," *Nature*, vol. 198, no. 4882, p. 812, 1963.
- [34] R. A. Lincoln, J. A. Leigh, and N. C. Jones, "The amino acid requirements of staphylococcus aureus isolated from cases of bovine mastitis," *Veterinary Microbiology*, vol. 45, pp. 275–279, jul 1995.
- [35] R. A. Mah, D. Y. Fung, and S. A. Morse, "Nutritional requirements of staphylococcus aureus s-6," *Applied microbiology*, vol. 15, no. 4, pp. 866–870, 1967.
- [36] M. Kuroda, T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K.-i. Aoki, Y. Nagai, *et al.*, "Whole genome sequencing of meticillin-resistant staphylococcus aureus," *The Lancet*, vol. 357, no. 9264, pp. 1225–1240, 2001.
- [37] W. E. Kloos and K. H. Schleifer, *Bergey's manual of systematic bacteriology. First edition*, vol. 2, ch. Genus IV. Staphylococcus Rosenbach 1884, p. 1013–1035. The Williams & Wilkins Co., 1986.
- [38] W. E. Consultation, "Protein and amino acid requirements in human nutrition: Report of a joint fao/who/unu expert consultation," *World health organization technical report series*, 2007.
- [39] A. S. Nuxoll, S. M. Halouska, M. R. Sadykov, M. L. Hanke, K. W. Bayles, T. Kielian, R. Powers, and P. D. Fey, "CcpA regulates arginine biosynthesis in staphylococcus aureus through repression of proline catabolism," *PLoS Pathogens*, vol. 8, p. e1003033, nov 2012.
- [40] H. Kitano, "Systems biology: a brief overview," *Science*, vol. 295, no. 5560, pp. 1662–1664, 2002.
- [41] H. Kitano, "Computational systems biology," *Nature*, vol. 420, no. 6912, pp. 206–210, 2002.
- [42] M. Hucka, A. Finney, H. M. Sauro, H. Bolouri, J. C. Doyle, H. Kitano, , the rest of the SBML Forum:, A. P. Arkin, B. J. Bornstein, D. Bray, A. Cornish-Bowden, A. A. Cuellar, S. Dronov, E. D. Gilles, M. Ginkel, V. Gor, I. I. Goryanin, W. J. Hedley, T. C. Hodgman, J.-H. Hofmeyr, P. J. Hunter, N. S. Juty, J. L. Kasberger, A. Kremling, U. Kummer, N. L. Novere, L. M. Loew, D. Lucio, P. Mendes, E. Minch, E. D. Mjolsness, Y. Nakayama, M. R. Nelson, P. F. Nielsen, T. Sakurada, J. C. Schaff, B. E. Shapiro, T. S. Shimizu, H. D. Spence, J. Stelling, K. Takahashi, M. Tomita, J. Wagner, and J. Wang, "The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models," *Bioinformatics*, vol. 19, pp. 524–531, mar 2003.
- [43] A. D. Cara, A. Garg, G. D. Micheli, I. Xenarios, and L. Mendoza, "Dynamic simulation of regulatory networks using SQUAD," *BMC Bioinformatics*, vol. 8, no. 1, p. 462, 2007.
- [44] E. M. Priscilla, Purnick, and R. Weiss, "The second wave of synthetic biology: from modules to systems," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, pp. 410–422, jun 2009.

- [45] S. A. Benner and A. M. Sismour, "Synthetic biology," *Nature Reviews Genetics*, vol. 6, pp. 533–543, jul 2005.
- [46] P. Chopra and A. Kamma, "Engineering life through synthetic biology," *In silico biology*, vol. 6, no. 5, pp. 401–410, 2006.
- [47] B. C. Turton, "Extending quine-mccluskey for exclusive-or logic synthesis," *IEEE Transactions on Education*, vol. 39, no. 1, pp. 81–85, 1996.
- [48] M. N. Stojanovic, T. E. Mitchell, and D. Stefanovic, "Deoxyribozyme-based logic gates," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 124, pp. 3555–3561, apr 2002.
- [49] L. Wang and B. Li, "Thermal logic gates: Computation with phonons," *Physical Review Letters*, vol. 99, oct 2007.
- [50] R. Rojas, "Die architektur der rechenmaschinen z1 und z3 von konrad zuse," *Informatik-Spektrum*, vol. 19, no. 6, pp. 303–315, 1996.
- [51] L. Mendoza and I. Xenarios, "A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks," *Theoretical Biology and Medical Modelling*, vol. 3, no. 1, p. 13, 2006.
- [52] S. Bornholdt, "Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations," *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 5, pp. S85–S94, aug 2008.
- [53] I. Albert, J. Thakar, S. Li, R. Zhang, and R. Albert, "Boolean network simulations for life scientists," *Source Code for Biology and Medicine*, vol. 3, no. 1, p. 16, 2008.
- [54] S. Huang, "Genomics, complexity and drug discovery: insights from boolean network models of cellular regulation," *Pharmacogenomics*, vol. 2, no. 3, pp. 203–222, 2001.
- [55] R. Schlatter, N. Philippi, G. Wangorsch, R. Pick, O. Sawodny, C. Borner, J. Timmer, M. Ederer, and T. Dandekar, "Integration of boolean models exemplified on hepatocyte signal transduction," *Briefings in Bioinformatics*, vol. 13, pp. 365–376, oct 2011.
- [56] C. Audretsch, *Analysing Quorum Sensing and Biofilm formation in Staphylococcus aureus*. PhD thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2013.
- [57] S. Karl and T. Dandekar, "Jimena: efficient computing and system state identification for genetic regulatory networks," *BMC Bioinformatics*, vol. 14, no. 1, p. 306, 2013.
- [58] S. Klamt, J. Saez-Rodriguez, J. A. Lindquist, L. Simeoni, and E. D. Gilles, "A methodology for the structural and functional analysis of signalling and regulatory networks," *BMC Bioinformatics*, vol. 7, no. 1, p. 56, 2006.
- [59] J. Krumsiek, S. Pölsterl, D. M. Wittmann, and F. J. Theis, "Odefy – from discrete to continuous models," *BMC Bioinformatics*, vol. 11, no. 233, pp. 1–10, 2010.
- [60] J. Abranches, A. R. Martinez, J. K. Kajfasz, V. Chavez, D. A. Garsin, and J. A. Lemos, "The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in enterococcus faecalis," *Journal of Bacteriology*, vol. 191, pp. 2248–2256, jan 2009.
- [61] T. M. Wendrich and M. A. Marahiel, "Cloning and characterization of a rela/spot homologue from bacillus subtilis," *Molecular microbiology*, vol. 26, no. 1, pp. 65–79, 1997.
- [62] J. A. C. Lemos, T. A. Brown, and R. A. Burne, "Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of streptococcus mutans," *Infection and Immunity*, vol. 72, pp. 1431–1440, feb 2004.
- [63] H. J. Bennett, D. M. Pearce, S. Glenn, C. M. Taylor, M. Kuhn, A. L. Sonenshein, P. W. Andrew, and I. S. Roberts, "Characterization of rela and codY mutants of listeria monocytogenes: identification of the CodY regulon and its role in virulence," *Molecular Microbiology*, vol. 63, pp. 1453–1467, mar 2007.

- [64] K. Steiner and H. Malke, "Life in protein-rich environments: the relA-independent response of streptococcus pyogenes to amino acid starvation," *Molecular Microbiology*, vol. 38, pp. 1004–1016, jan 2002.
- [65] K. M. Kazmierczak, K. J. Wayne, A. Rechtsteiner, and M. E. Winkler, "Roles of relspn in stringent response, global regulation and virulence of serotype 2 streptococcus pneumoniae d39," *Molecular microbiology*, vol. 72, no. 3, pp. 590–611, 2009.
- [66] U. Mechold, M. Cashel, K. Steiner, D. Gentry, and H. Malke, "Functional analysis of a rela/spot gene homolog from streptococcus equisimilis.," *Journal of bacteriology*, vol. 178, no. 5, pp. 1401–1411, 1996.
- [67] J. A. Lemos, M. M. Nascimento, V. K. Lin, J. Abranches, and R. A. Burne, "Global regulation by (p)ppGpp and CodY in streptococcus mutans," *Journal of Bacteriology*, vol. 190, pp. 5291–5299, jun 2008.
- [68] T. Inaoka and K. Ochi, "Rela protein is involved in induction of genetic competence in certain bacillus subtilis strains by moderating the level of intracellular gtp," *Journal of bacteriology*, vol. 184, no. 14, pp. 3923–3930, 2002.
- [69] M. Naseem, M. Kunz, N. Ahmed, and T. Dandekar, "Integration of boolean models on hormonal interactions and prospects of cytokinin-auxin crosstalk in plant immunity," *Plant Signaling & Behavior*, vol. 8, p. e23890, apr 2013.
- [70] C. R. Halsey, S. Lei, J. K. Wax, M. K. Lehman, A. S. Nuxoll, L. Steinke, M. Sadykov, R. Powers, and P. D. Fey, "Amino acid catabolism in staphylococcus aureus and the function of carbon catabolite repression," *mBio*, vol. 8, pp. e01434–16, feb 2017.
- [71] S. Jabbari, J. R. King, A. J. Koerber, and P. Williams, "Mathematical modelling of the agr operon in staphylococcus aureus," *Journal of Mathematical Biology*, vol. 61, pp. 17–54, aug 2009.
- [72] N. Philippi, D. Walter, R. Schlatter, K. Ferreira, M. Ederer, O. Sawodny, J. Timmer, C. Borner, and T. Dandekar, "Modeling system states in liver cells: Survival, apoptosis and their modifications in response to viral infection," *BMC Systems Biology*, vol. 3, no. 1, p. 97, 2009.
- [73] C. D. Majerczyk, M. R. Sadykov, T. T. Luong, C. Lee, G. A. Somerville, and A. L. Sonenshein, "Staphylococcus aureus CodY negatively regulates virulence gene expression," *Journal of Bacteriology*, vol. 190, pp. 2257–2265, dec 2007.
- [74] S. M. K. Schoenfelder, G. Marincola, T. Geiger, C. Goerke, C. Wolz, and W. Ziebuhr, "Methionine biosynthesis in staphylococcus aureus is tightly controlled by a hierarchical network involving an initiator tRNA-specific t-box riboswitch," *PLoS Pathogens*, vol. 9, p. e1003606, sep 2013.
- [75] T. Lei, *Characterization of a novel essential protein Gcp in Staphylococcus aureus*. PhD thesis, University of Minesota, 2012.
- [76] C. Kohler, C. von Eiff, M. Liebeke, P. J. McNamara, M. Lalk, R. A. Proctor, M. Hecker, and S. Engelmann, "A defect in menadione biosynthesis induces global changes in gene expression in staphylococcus aureus," *Journal of Bacteriology*, vol. 190, pp. 6351–6364, aug 2008.
- [77] M. A. Marra, "The genome sequence of the SARS-associated coronavirus," *Science*, vol. 300, pp. 1399–1404, may 2003.
- [78] E. F. Gale and A. W. Rodwell, "The assimilation of amino-acids by bacteria: 7. the nature of resistance to penicillin in staphylococcus aureus," *Journal of General Microbiology*, vol. 3, pp. 127–142, jan 1948.
- [79] J. G. Bartlett, T. W. Chang, M. Gurwith, S. L. Gorbach, and A. B. Onderdonk, "Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia," *New England Journal of Medicine*, vol. 298, pp. 531–534, mar 1978.

- [80] S. Fuchs, J. Pane-Farre, C. Kohler, M. Hecker, and S. Engelmann, "Anaerobic gene expression in staphylococcus aureus," *Journal of Bacteriology*, vol. 189, pp. 4275–4289, mar 2007.
- [81] M. J. Pucci, J. A. Thanassi, H. T. Ho, P. J. Falk, and T. J. Dougherty, "Staphylococcus haemolyticus contains two d-glutamic acid biosynthetic activities, a glutamate racemase and a d-amino acid transaminase," *Journal of Bacteriology*, vol. 177, pp. 336–342, jan 1995.
- [82] M. J. Kobylarz, *Siderophore-mediated iron metabolism in Staphylococcus aureus*. PhD thesis, The University of British Columbia, 2016.
- [83] E. Bore, S. Langsrud, O. Langsrud, T. M. Rode, and A. Holck, "Acid-shock responses in staphylococcus aureus investigated by global gene expression analysis," *Microbiology*, vol. 153, pp. 2289–2303, jul 2007.
- [84] K. Strasters and K. Winkler, "Carbohydrate metabolism of staphylococcus aureus," *Microbiology*, vol. 33, no. 2, pp. 213–229, 1963.
- [85] Y. Tanaka, K. Morikawa, Y. Ohki, M. Yao, K. Tsumoto, N. Watanabe, T. Ohta, and I. Tanaka, "Structural and mutational analyses of drp35 from Staphylococcus aureus," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 5770–5780, dec 2006.
- [86] C. Smith and P. Pattee, "Biochemical and genetic analysis of isoleucine and valine, biosynthesis in staphylococcus aureus," *Journal of bacteriology*, vol. 93, no. 6, pp. 1832–1838, 1967.
- [87] E. M. Panina, A. G. Vitreschak, A. A. Mironov, and M. S. Gelfand, "Regulation of biosynthesis and transport of aromatic amino acids in low-GC gram-positive bacteria," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 222, pp. 211–220, may 2003.
- [88] M. D. Valentino, L. Foulston, A. Sadaka, V. N. Kos, R. A. Villet, J. S. Maria, D. W. Lazinski, A. Camilli, S. Walker, D. C. Hooper, and M. S. Gilmore, "Genes contributing to staphylococcus aureus fitness in abscess- and infection-related ecologies," *mBio*, vol. 5, pp. 1–10, sep 2014.
- [89] B. M. Benton, J. P. Zhang, S. Bond, C. Pope, T. Christian, L. Lee, K. M. Winterberg, M. B. Schmid, and J. M. Buysse, "Large-scale identification of genes required for full virulence of staphylococcus aureus," *Journal of Bacteriology*, vol. 186, pp. 8478–8489, dec 2004.
- [90] D. A. Rodionov, "Regulation of lysine biosynthesis and transport genes in bacteria: yet another RNA riboswitch?," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, pp. 6748–6757, dec 2003.
- [91] A. Nakamura, "Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB," *Science*, vol. 312, pp. 1954–1958, jun 2006.
- [92] S. R. Mladenova, K. R. Stein, L. Bartlett, and K. Sheppard, "Relaxed tRNA specificity of the Staphylococcus aureus aspartyl-tRNA synthetase enables RNA-dependent asparagine biosynthesis," *FEBS Letters*, vol. 588, pp. 1808–1812, mar 2014.
- [93] R. M. Corrigan, J. C. Abbott, H. Burhenne, V. Kaever, and A. Gründling, "c-di-AMP is a new second messenger in staphylococcus aureus with a role in controlling cell size and envelope stress," *PLoS Pathogens*, vol. 7, p. e1002217, sep 2011.
- [94] R. M. Corrigan, L. Bowman, A. R. Willis, V. Kaever, and A. Gründling, "Cross-talk between two nucleotide-signaling pathways in Staphylococcus aureus," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, pp. 5826–5839, jan 2015.
- [95] A. R. Proctor and W. E. Kloos, "Tryptophan biosynthetic enzymes of staphylococcus aureus," *Journal of bacteriology*, vol. 114, no. 1, pp. 169–177, 1973.
- [96] C. O'Connell, P. A. Pattee, and T. J. Foster, "Sequence and mapping of the aroA gene of staphylococcus aureus 8325-4," *Journal of General Microbiology*, vol. 139, pp. 1449–1460, jul 1993.

- [97] T. T. Luong, K. Sau, C. Roux, S. Sau, P. M. Dunman, and C. Y. Lee, "Staphylococcus aureus ClpC divergently regulates capsule via *sae* and *codY* in strain newman but activates capsule via *codY* in strain UAMS-1 and in strain newman with repaired *saeS*," *Journal of Bacteriology*, vol. 193, pp. 686–694, dec 2010.
- [98] J. K. Lithgow, E. J. Hayhurst, G. Cohen, Y. Aharonowitz, and S. J. Foster, "Role of a cysteine synthase in staphylococcus aureus," *Journal of bacteriology*, vol. 186, no. 6, pp. 1579–1590, 2004.
- [99] B. Krismer, M. Liebeke, D. Janek, M. Nega, M. Rautenberg, G. Hornig, C. Unger, C. Weidenmaier, M. Lalk, and A. Peschel, "Nutrient limitation governs staphylococcus aureus metabolism and niche adaptation in the human nose," *PLoS Pathogens*, vol. 10, p. e1003862, jan 2014.
- [100] D. A. Rodionov, "Comparative genomics of the methionine metabolism in gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems," *Nucleic Acids Research*, vol. 32, pp. 3340–3353, jun 2004.
- [101] G. A. Somerville and R. A. Proctor, "At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in staphylococci," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 73, pp. 233–248, jun 2009.
- [102] M. Liebeke, K. Dörries, D. Zühlke, J. Bernhardt, S. Fuchs, J. Pané-Farré, S. Engelmann, U. Völker, R. Bode, T. Dandekar, U. Lindequist, M. Hecker, and M. Lalk, "A metabolomics and proteomics study of the adaptation of staphylococcus aureus to glucose starvation," *Molecular BioSystems*, vol. 7, no. 4, p. 1241, 2011.
- [103] Y. Zhu, R. Nandakumar, M. R. Sadykov, N. Madayiputhiya, T. T. Luong, R. Gaupp, C. Y. Lee, and G. A. Somerville, "RpiR homologues may link staphylococcus aureus RNAPIII synthesis and pentose phosphate pathway regulation," *Journal of Bacteriology*, vol. 193, pp. 6187–6196, sep 2011.
- [104] W. E. Kloos and P. Pattee, "A biochemical characterization of histidine-dependent mutants of staphylococcus aureus," *Microbiology*, vol. 39, no. 2, pp. 185–194, 1965.
- [105] J. Leiba, T. Hartmann, M.-E. Cluzel, M. Cohen-Gonsaud, F. Delolme, M. Bischoff, and V. Molle, "A novel mode of regulation of the Staphylococcus aureus Catabolite control protein a (CcpA) mediated by *stk1* protein phosphorylation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, pp. 43607–43619, nov 2012.
- [106] B. R. Boles and A. R. Horswill, "agr-mediated dispersal of staphylococcus aureus biofilms," *PLoS Pathogens*, vol. 4, p. e1000052, apr 2008.
- [107] T. L. Campbell, J. Henderson, D. E. Heinrichs, and E. D. Brown, "The *yjeQ* gene is required for virulence of staphylococcus aureus," *Infection and Immunity*, vol. 74, pp. 4918–4921, jul 2006.
- [108] V. Dengler, N. McCallum, P. Kiefer, P. Christen, A. Patrignani, J. A. Vorholt, B. Berger-Bächi, and M. M. Senn, "Mutation in the c-di-AMP cyclase *dacA* affects fitness and resistance of methicillin resistant staphylococcus aureus," *PLoS ONE*, vol. 8, p. e73512, aug 2013.

APPENDIX

Tabelle 1: Knoten und Kanten

Knoten	Aktivierende Efferenz zu:	Inhibierende Efferenz zu:
(p)ppGpp	psm α 1-4 [24] psm β 1,2 [24]	Tsf [9] rpsL [9] rpsB [24] infB [9] guaC [9] DnaG [26]
2-Oxoglutarate	Glutamate [76, 8, 80, 81]	
3-Phosphoglycerat	Phosphoenolpyruvat [76, 8] Serin [32, 82]	
6-P-Gluconat	Ribulose-5-Phosphat [83]	
6-P-Gluconolacton	6-P-Gluconat [84, 85]	
ABC Transporter	-	-
acetyl-CoA	Citrat [76, 8, 80]	
AcnA	2-Oxoglutarate [76, 80]	
Agr	-	-
AHB	Isoleucin [32, 86, 25, 7]	
Alanine	AS-loaded tRNAs [31] Pyruvat [76]	tRNA [31]
Ald1	Alanine [76] Pyruvat [76]	
Ald2	Alanine [76] Pyruvat [76]	
alpha-Ketobutytrat	AHB [32, 86, 25, 7]	
alpha-Ketoglutarat	-	-
alpha-Ketoisovalerat	Valin [32, 86, 25, 7] Leucin [32, 25, 7]	
ArcB1/ArgF	Citrulline [39, 32]	
ArgGH	Arginine [39, 32]	
Arginine	Ornithin [39] AS-loaded tRNAs [31]	tRNA [31]
ArgJBCD	Ornithin [39, 32]	
AroACL	Chorismate [32, 87]	
AroBDEF	Shikimat [32, 87]	
ASAT	Aspartat [88, 89]	
Asd	Asp. Semialdehyde [32, 90]	
AS-loaded tRNAs	Translation [31]	
asnA	Aspartat [88, 89]	

Asparagin-tRNA-Asn	Translation [31] Aspartat [88, 89]	
Aspartat	Aspartat Semialdehyde [32, 90] Aspartat-tRNA-Asn [91, 92]	
Aspartat Semialdehyde	Lysine [32, 90] Homoserin [32, 90]	
Aspartat-tRNA-Asn	Asparagin-tRNA-Asn [91, 92] Translation [31]	
Asp-tRNA-Synthetase	Aspartat-tRNA-Asn [91, 92]	
ATP	c-di-AMP [93]	
brnQ1	-	-
capA-P	-	-
CcpA	Tpi [8] Pgk [8] ilvDBC-leuABC-ilvA [75]	ArgGH [39] RocD [39] RocF [39] ProC [39] PutA [39] arcB1/ArgF [39] gnd [8] ald1 [8] ald2 [8]
c-di-AMP	RSH [94]	
Chorismat	Indolglycerol-P [32, 87, 95] Tyrosin [32, 87, 96] Phenylalanine [32, 87, 96]	
Citrat	2-Oxoglutarate [76, 80]	
Citrulline	Arginine [39, 32]	
clpC		CodY [97]
CodY		IlvCD [9] IlvB [9] ThrBC [28] hla [73] icaABCD [73] brnQ1 [9] sodA [7] capA-P [7] KatA [7] sasG [7] LeuA-C [9] metICFE-mdh [74] Agr [73] ThrA [7] Hom [7]
Collagen	Prolin [39]	
CysEKM	Cystein [32, 98]	

Cystathionin	Homocystein [32, 99, 100] Pyruvat [32, 99, 100]	
Cystein	Cystathionin [32, 99, 100] AS-loaded tRNAs [31]	tRNA [31]
DacA	c-di-AMP [93]	
DapABCDEX	Lysine [32, 90]	
Dat	Alanine [76, 101] Pyruvat [76, 101] Glutamate [76, 8, 80, 81]	
DHAP	GA3P [76, 8, 80]	
Diaminopyrimidin		folA [11]
DnaG	Replikation [26]	
drp35	6-P-Gluconat [84, 85]	
Eno	Phosphoenolpyruvat [76, 8]	
Erythrose-4-Phosphat	Sedoheptulose-7-Phosphat [84, 102] GA3P [84, 102] Shikimat [32, 87]	
FbaA	DHAP [76, 8, 80] GA3P [76, 8, 80]	
FemC	Glutamine [76]	
folA	THF [11]	
folP	THF [11]	
Fructose-6-Phosphate	DHAP [76, 8, 80] GA3P [76, 8, 80] Xylose-5-Phosphat [83] Erythrose-4-Phosphat [83] Sedoheptulose-7-Phosphat [84, 102]	
GA3P	3-Phosphoglycerat [76, 8, 80] Xylose-5-Phosphat [83] Erythrose-4-Phosphat [83] Ribose-5-Phosphat [83]	
GapA1	3-Phosphoglycerat [76, 8, 80]	
GatCAB	Asparagin-tRNA-Asn [91, 92] Glutamine-tRNA-Gln [91, 92]	
GdpP		c-di-AMP [93]
Glk	Glucose-6-Phosphate [76, 8, 80]	
Gln-tRNA-Synthetase	Glutamine-tRNA-Gln [91, 92]	
GltA	Citrat [76, 8, 80]	
Glucose	CcpA [8] Glucos-6-Phosphate [76, 8, 80]	
Glucose-6-Phosphat	6-P-Gluconolacton [83, 103] Fructose-6-6Phosphat [76, 8, 80]	

Glutamate	Ornithin [39, 32] Glutamine [76, 32] Glutamate-tRNA-Gln [91, 92] alpha-Ketoglutarat [32, 104] Histidinol-P [32, 104]	
Glutamate-tRNA-Gln	Glutamine-tRNA-Gln [91, 92] Translation [31]	
Glutamine	Glutamine-tRNA-Gln [91, 92]	
Glutamine-tRNA-Gln	Translation [31]	
Glu-tRNA-Synthetase	Glutamate-tRNA-Gln [91, 92]	
GlyA	Serin [76, 32] THF [76, 32] Glycerin [76, 32]	
Glycin	Serin [76, 32] N5-N10-Met-THF [76, 32] AS-loaded tRNAs [31] THF [76, 32]	TRNA [31]
gnd	Ribulose-5-Phosphat [83]	
GTP	CodY [25]	
guaC	-	-
HisAEGHI	IG3P [32, 89]	
HisB	Imidazolacetal-P [32, 104] Histidinol [32, 104]	
HisC	alpha-Ketoglutarat [32, 104] Histidinol-P [32, 104]	
HisD	Histidin [32, 89]	
Histidin	AS-loaded tRNAs [31]	TRNA [31]
Histidinol	Histidin [32, 89]	
Histidinol-P	Histidinol [32, 104]	
hla	-	-
Hom	Homoserin [90, 99, 74]	
Homocystein	Methionin [32, 99, 100]	
Homoserin	Threonin [76, 32] Cystathionin [99, 100]	
Hpr	CcpA [105]	
icaABCD	PIA [106]	
Icd	2-Oxoglutarate [76, 80]	
IG3P	Imidazolacetal-P [32, 104]	
Ile-tRNA	Translation [31]	ABC Transporter [25]
Ile-tRNA-Synthetase	Ile-tRNA [9]	TRNA [9]
IlvA	Pyruvat [76] alpha-Ketobutytrat [32, 25, 7]	
IlvB	AHB [32, 86, 25, 7] alpha-Ketoisovalerat [32, 86, 25, 7]	

IlvCD	Isoleucin [32, 86, 25, 7] alpha-Ketoisovalerat [32, 86, 25, 7]	
ilvDBC-leuABC-ilvA	LeuA-C [28] ILVCD [28] IlvB [28]	
IlvE	Isoleucin [32, 86, 25, 7] Valin [32, 86, 25, 7] Leucin [32, 25, 7]	
Imidazolacetal-P	alpha-Ketoglutarat [32, 104] Histidinol-P [32, 104]	
Indolglycerol-P	Tryptophan [32, 87, 95] GA3P [32, 87, 95]	
Indolmycin		trp-tRNA Synthetase [12]
infB	Translation [9]	
Isoleucin	Ile-tRNA [9] CodY [7]	tRNA [9]
KatA	-	-
LeuA-C	Leucin [32, 25, 7]	
Leucin	AS-loaded tRNAs [31]	tRNA [31]
LysA	Lysine [32, 90]	
LysC	Aspartat Semialdehyde [32, 90]	
Lysine	AS-loaded tRNAs [31]	tRNA [31]
MetC	Homocystein [32, 99, 100] Pyruvat [32, 99, 100]	
MetEH	Methionin [32, 99, 100]	
MetF	N5-Met-THF [76, 100]	
Methionin	met-tRNA [74] SAM [32, 99, 100]	tRNA [74]
metICFE-mdh	MetL [74] MetX,I [74] MetC [74] MetEH [74] MetK [74] MetF [74]	
MetK	SAM [32, 99, 100]	
MetL	Aspartat Semialdehyde [32, 90] Homoserin [32, 90]	
met-tRNA	Translation [31]	
Met-tRNA-Synthetase	met-tRNA [74]	tRNA [74]
MetX,I	Cystathionin [99, 100]	
Mupirocin		Ile-tRNA Synthetase [12]
N5-Met-THF	Methionin [32, 100]	
N5-N10-Met-THF	THF [76, 32] Serin [76, 32] N5-Met-THF [76, 32]	

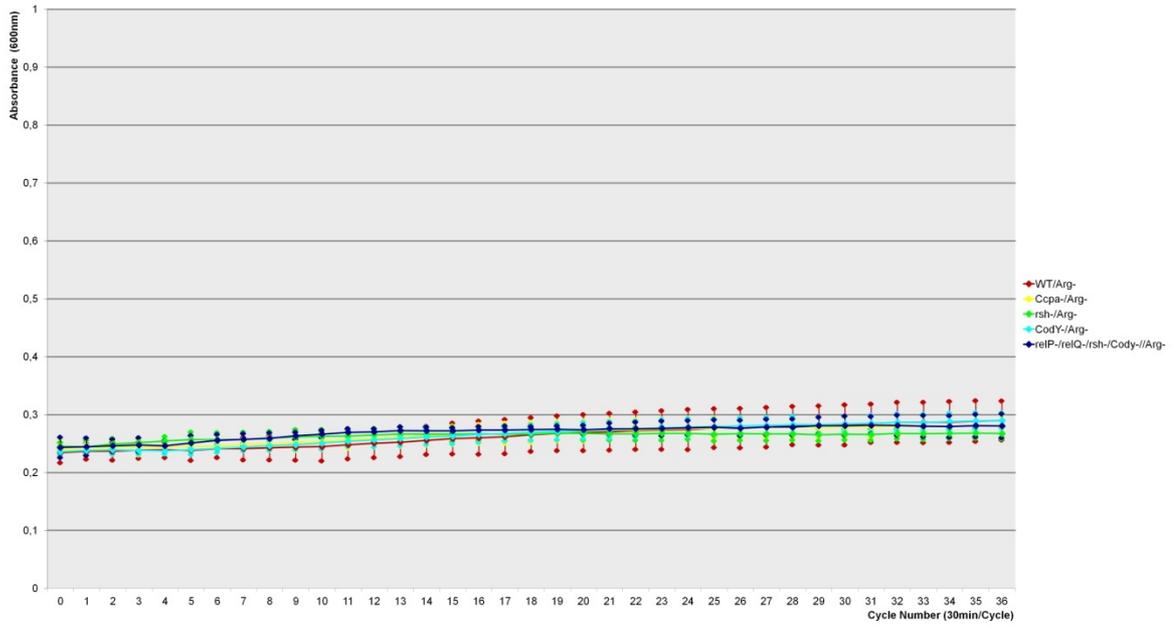
Ornithin	Citrulline [39, 32] Prolin [39, 32]	
Oxalacetat	Citrat [76, 8, 80] Aspartat [88, 89]	
PABA	THF [11]	
PdhABCD	acetylCoA [76, 8, 80]	
PfkA	DHAP [8, 80] GA3P [8, 80]	
Pgi	Fructose-6-Phosphate [76, 8, 80]	
Pgk	3-Phosphoglycerat [76, 8, 80]	
Pgm	Phosphoenolpyruvat [76, 8]	
PheA	Phenylalanine [32, 87]	
Phenylalanine	AS-loaded tRNAs [31]	tRNA [31]
Phosphoenolpyruvat	Pyruvat [76, 8] Shikimat [32, 87] Chorismat [32, 87]	
PIA	-	-
ProC	Prolin [39]	
Prolin	AS-loaded tRNAs [31] Ornithin [39]	tRNA [31]
PRPP	Indolglycerol-P [32, 87, 95] IG3P [32, 89]	
prsA	PRPP [83]	
psmALPHA1-4	-	-
psmBETA1,2	-	-
PutA	Ornithin [39]	
Pyc	Oxalacetat [76, 8, 80]	
Pyk	Pyruvat [76, 8]	
Pyruvat	Alanine [76] AHB [32, 86, 25, 7] acetylCoA [76, 8, 80] Oxalacetat [76, 8, 80] alpha-Ketoisovalerat [32, 86, 25, 7]	
RelP/Q	(p)ppGpp [27]	GTP [27]
Replikation	-	-
Ribose-5-Phosphat	PRPP [83]	
Ribosom	Translation [31]	
Ribulose-5-Phosphat	Ribose-5-Phosphat [103]	
RocD	Prolin [39] Ornithin [39]	
RocF	Ornithin [39]	
rpe	Ribulose-5-Phosphat [107]	
rpiA	Ribose-5-Phosphat [103]	
rpsB	Ribosom [24]	
rpsL	Ribosom [9]	

RSH	(p)ppGpp[9]	GTP [9]
SAM	-	-
sasG	-	-
ScpA	Prolin [39]	
Sedoheptulose-7-Phosphat	Ribose-5-Phosphat [83] Xylose-5-Phosphat [83]	
SerABC	Serin [32, 82]	
Serin	Cystein [32, 98] Glycin [76, 32] Pyruvat[76] Tryptophan [32, 87, 95] GA3P [32, 87, 95] AS-loaded tRNAs [31]	tRNA [31]
Shikimat	Chorismat [32, 87]	
sodA	-	-
SspB	Prolin [39]	
Stk1		CcpA [105]
Sulfonamide		folP [11]
tal	Sedoheptulose-7-Phosphat [84, 102] GA3P [84, 102]	
THF	Glycin [76, 32, 100]	
ThrA	Aspartat Semialdehyde [32, 90] Homoserin [32, 90]	
ThrBC	Threonin [76, 32, 7]	
Threonin	AS-loaded tRNAs [31] alpha-Ketobutytrat [32, 25, 7]	tRNA [31]
tkt	Xylose-5-Phosphat [83] Erythrose-4-Phosphat [83] Ribose-5-Phosphat [83]	
Tpi	GA3P [76, 8, 80]	
Translation	-	-
tRNA	RSH [24, 9, 12]	
tRNA Synthetase	AS-loaded tRNAs [31]	tRNA [31]
tRNA-Asn	Aspartat-tRNA-Asn [91, 92]	
tRNA-Gln	Glutamate-tRNA-Gln [91, 92]	
TrpAB	Tryptophan [32, 87, 95] GA3P [32, 87, 95]	
TrpCDEF	Indolglycerol-P [32, 87, 95]	
trp-tRNA	Translation [31]	
Trp-tRNA-Synthetase	trp-tRNA [12]	tRNA [12]
Tryptophan	trp-tRNA [12]	tRNA [12]
tsf	Translation [31]	
TyrA	Auszuschließen [32, 87]	
TyrB	Auszuschließen [32, 96]	
Auszuschließen	AS-loaded tRNAs [31]	tRNA [31]

Auszuschließende	AS-loaded tRNAs [31]	tRNA [31]
VitB12	Methionin [32, 100]	
Xylose-5-Phosphat	Ribulose-5-Phosphat [107]	
YbbR	c-di-AMP [108]	
zwf	6-P-Gluconolacton [83, 103]	

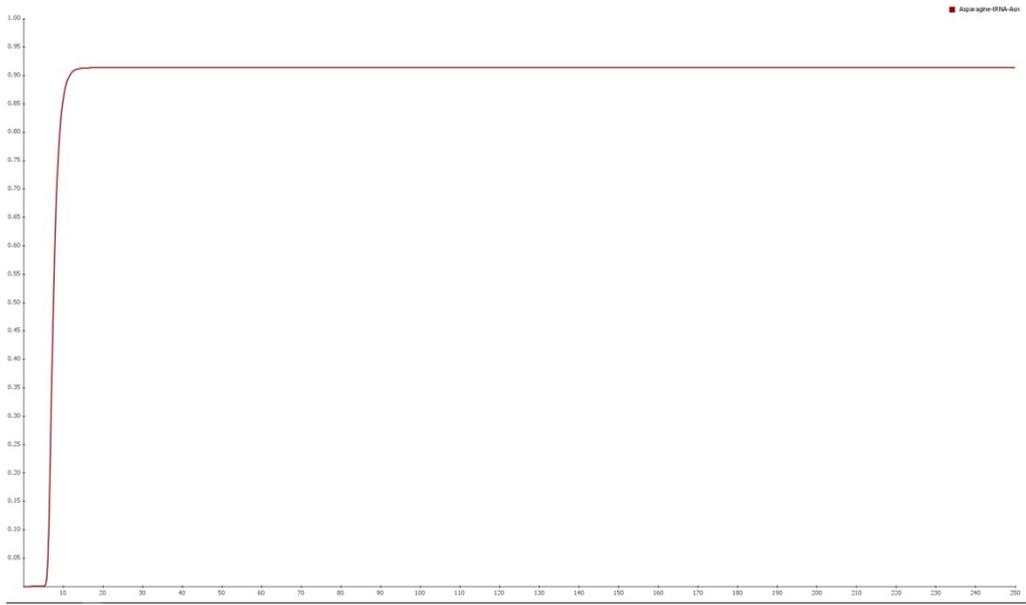
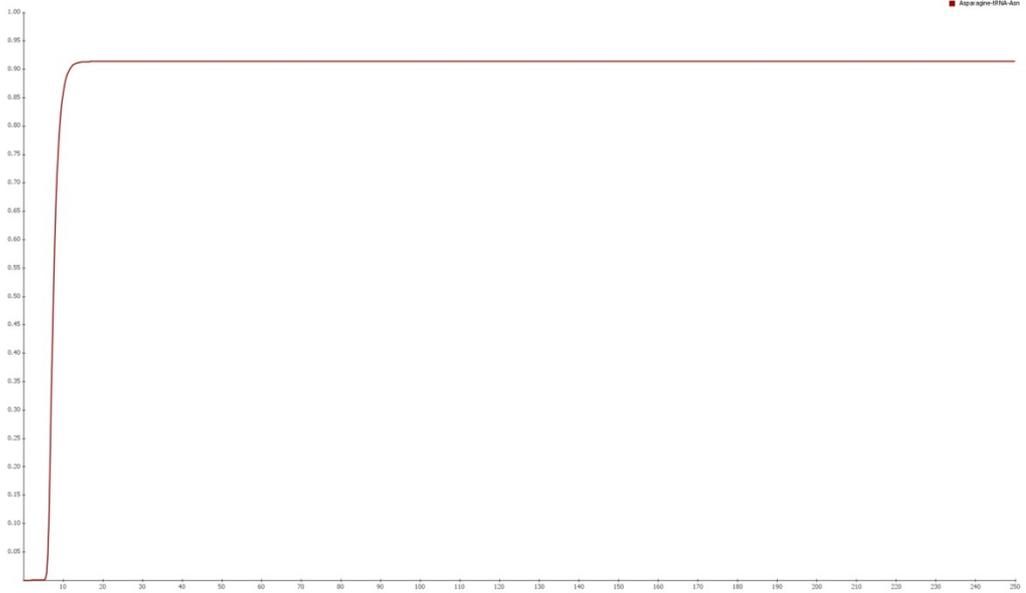
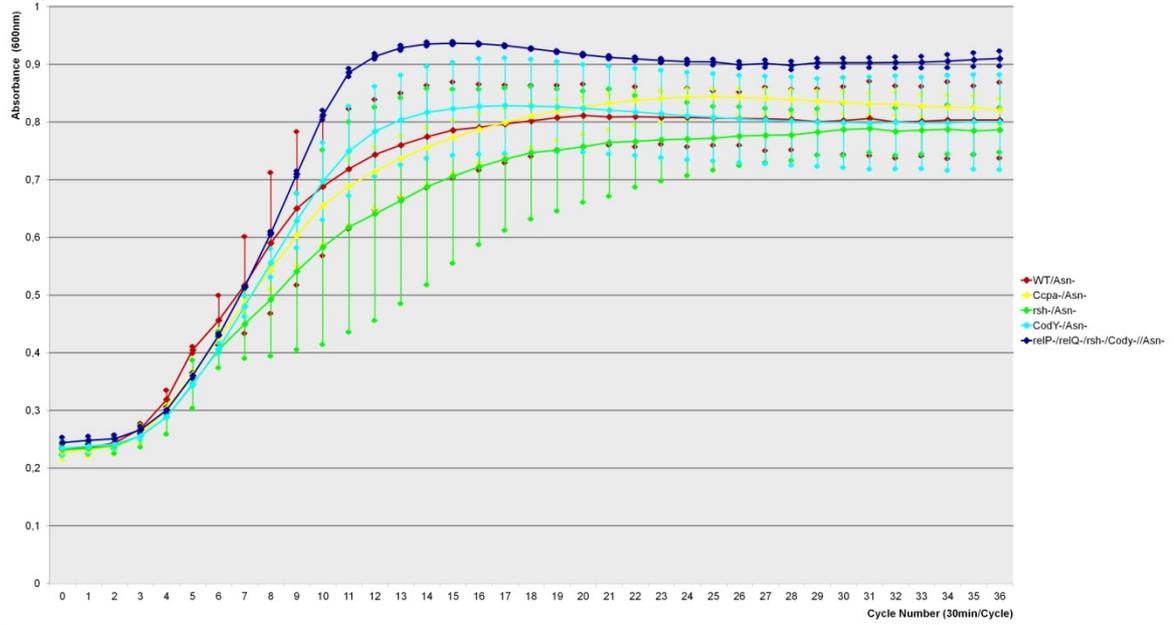
Diese Tabelle zeigt in der ersten Spalte alle Knoten des simulierten Netzwerks. In der zweiten Spalte sind die aktivierenden und in der dritten Spalte die inhibierenden Efferenzen dargestellt; jeweils mit der zugehörigen Referenz.

1a) Arg-



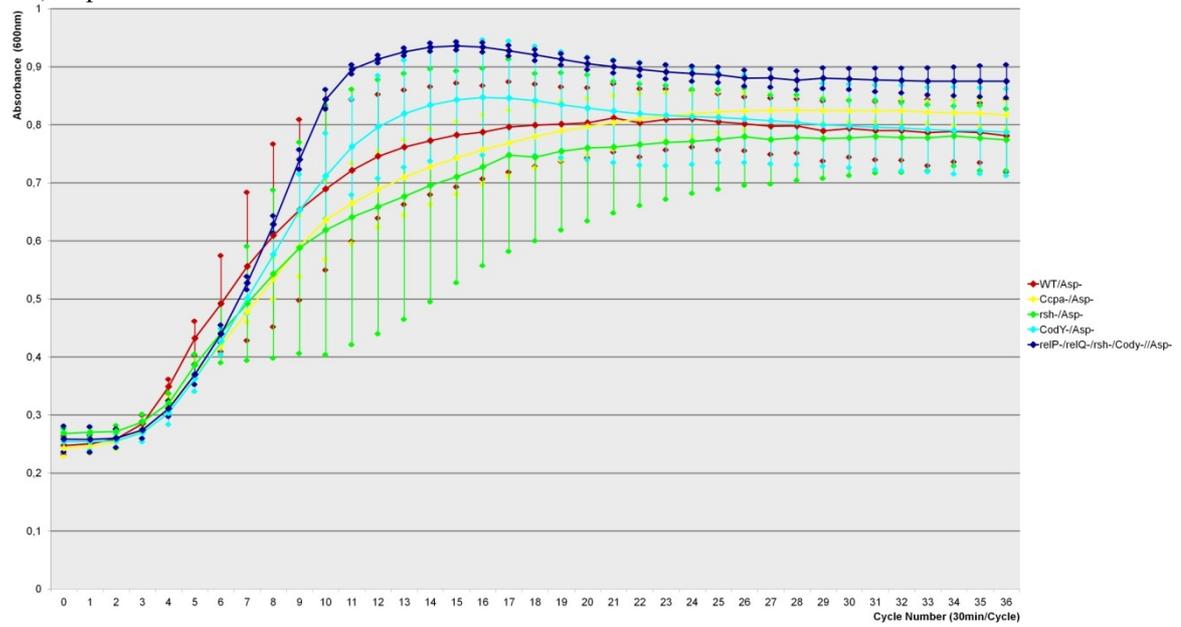
CodY- CcpA- Rsh- RelP/Q-, CodY-, Rsh-

1b) Asn-



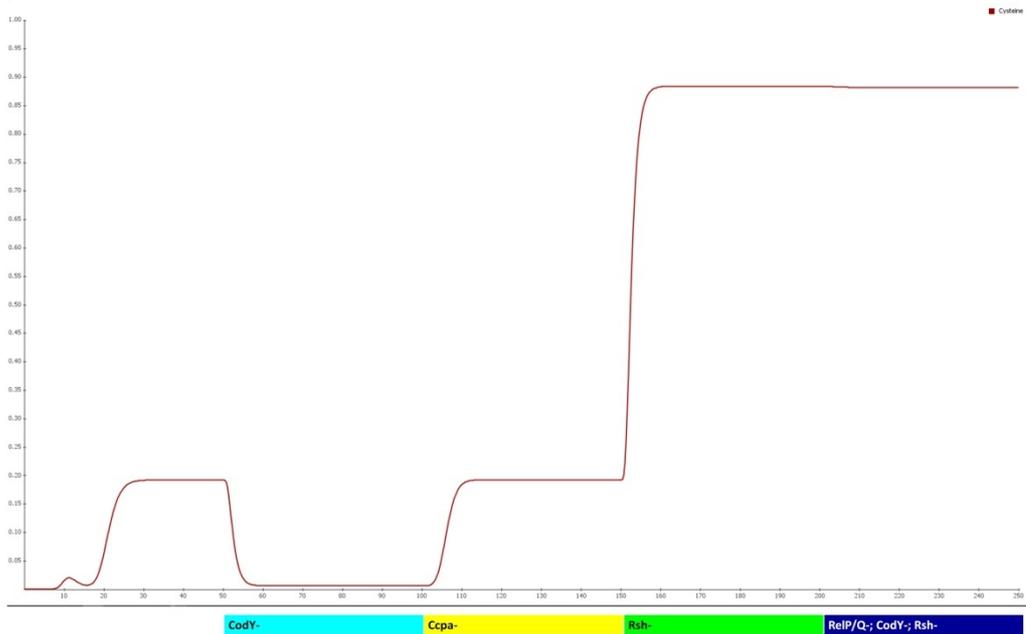
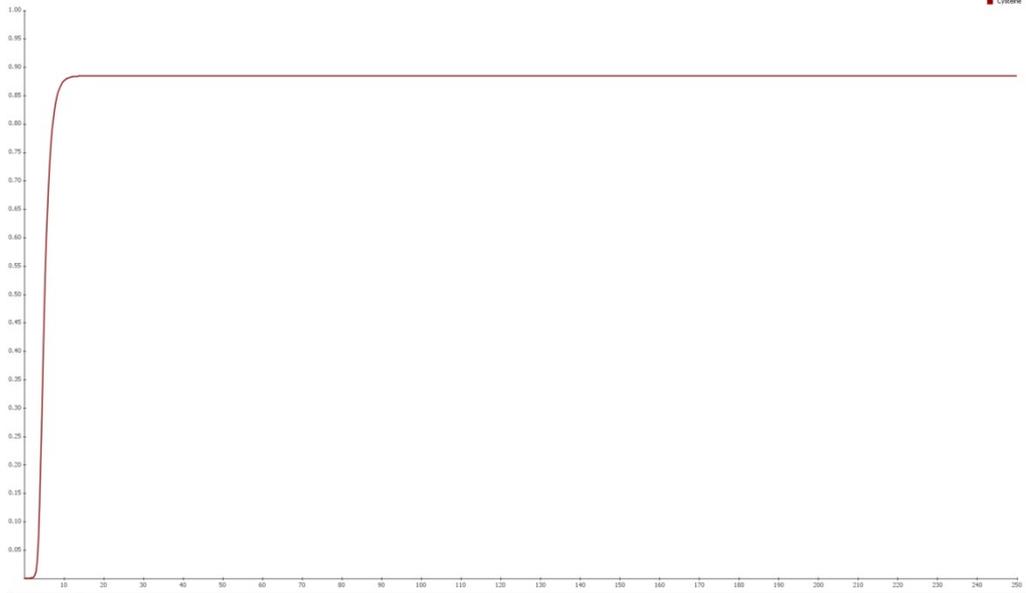
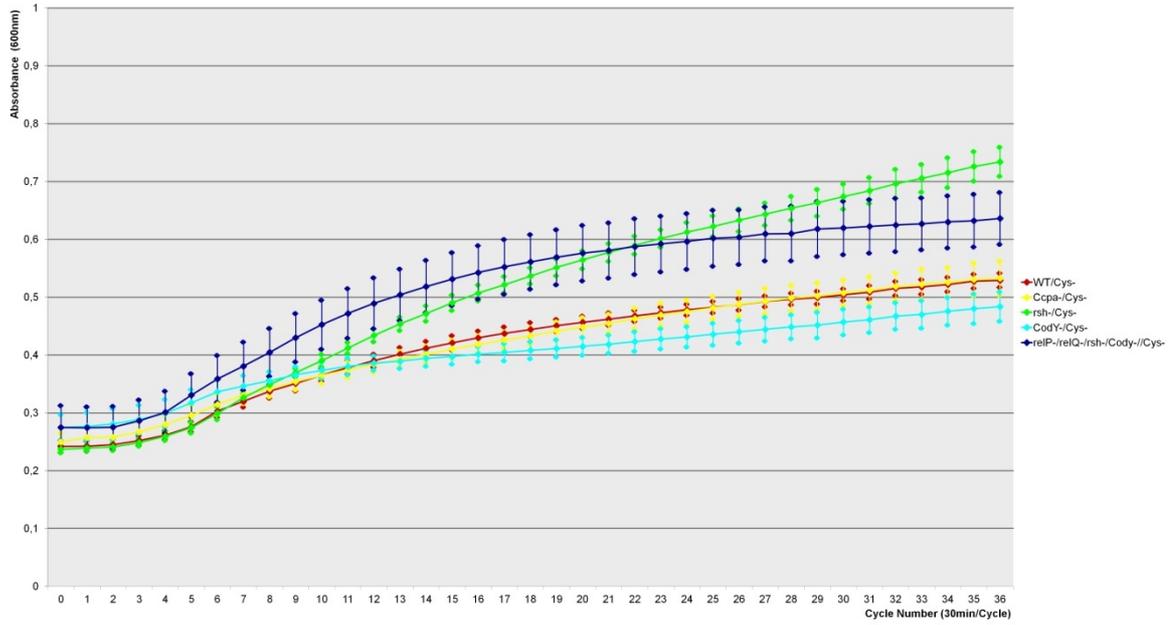
CodY- CcpA- Rsh- RelP/Q-, CodY-, Rsh-

1c) Asp-

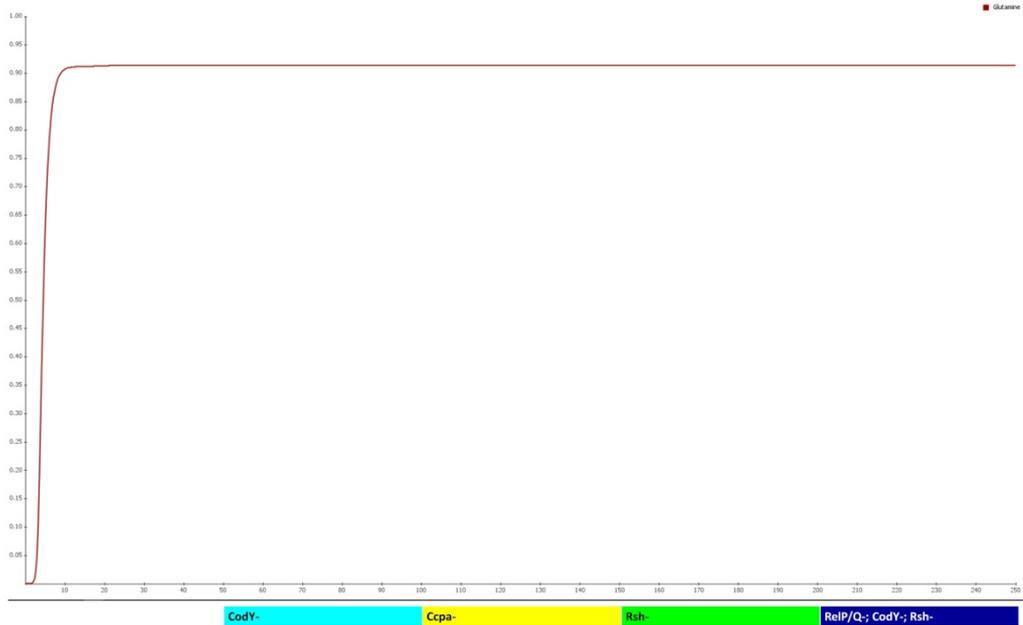
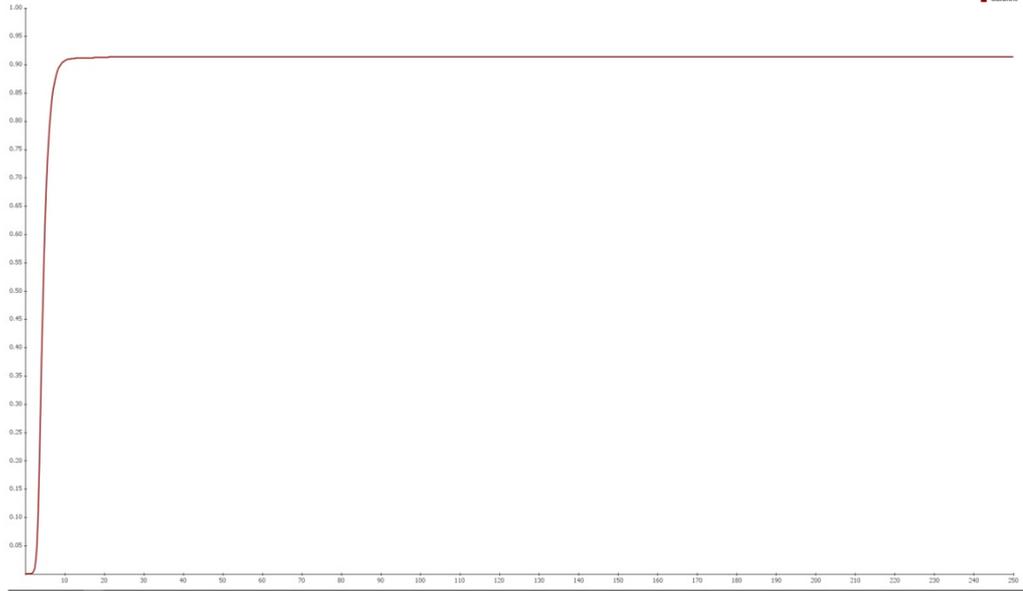
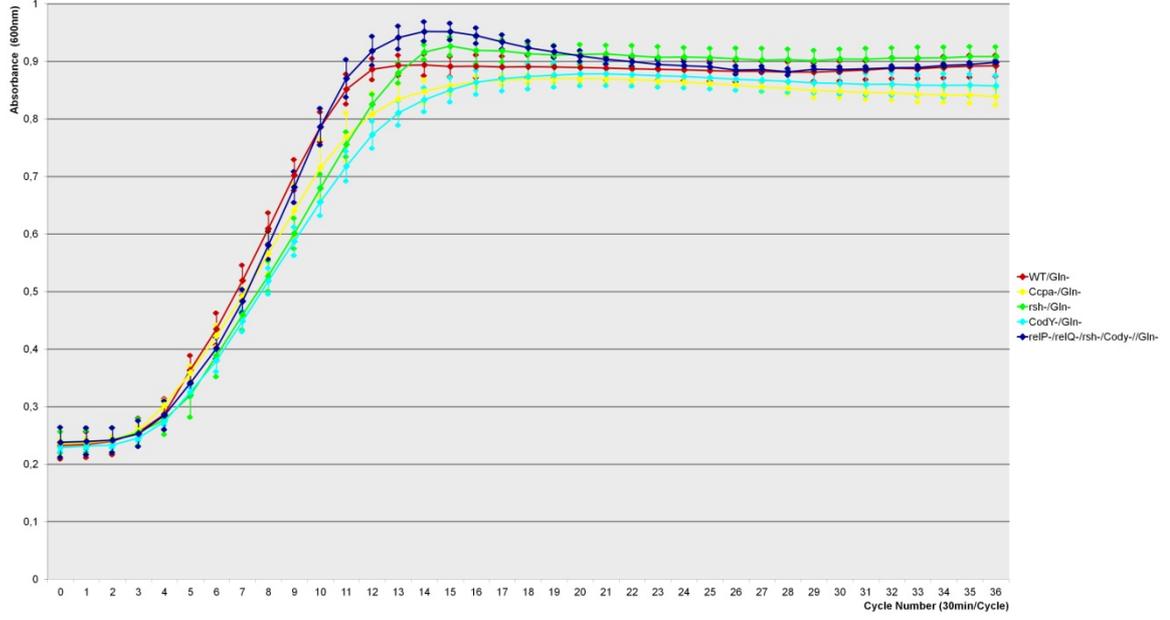


CodY- CcpA- Rsh- RelP/Q-, CodY-, Rsh-

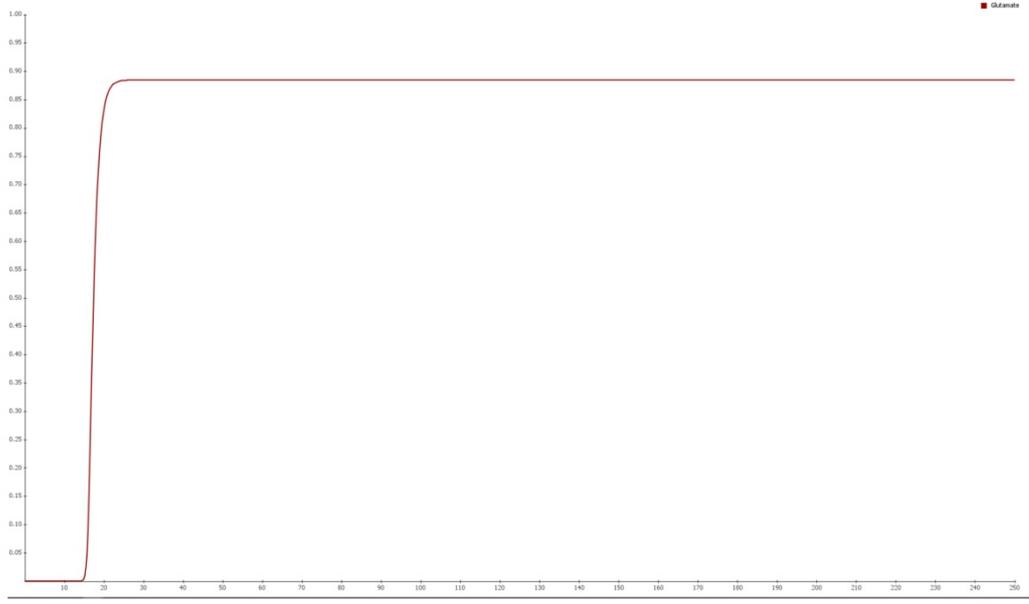
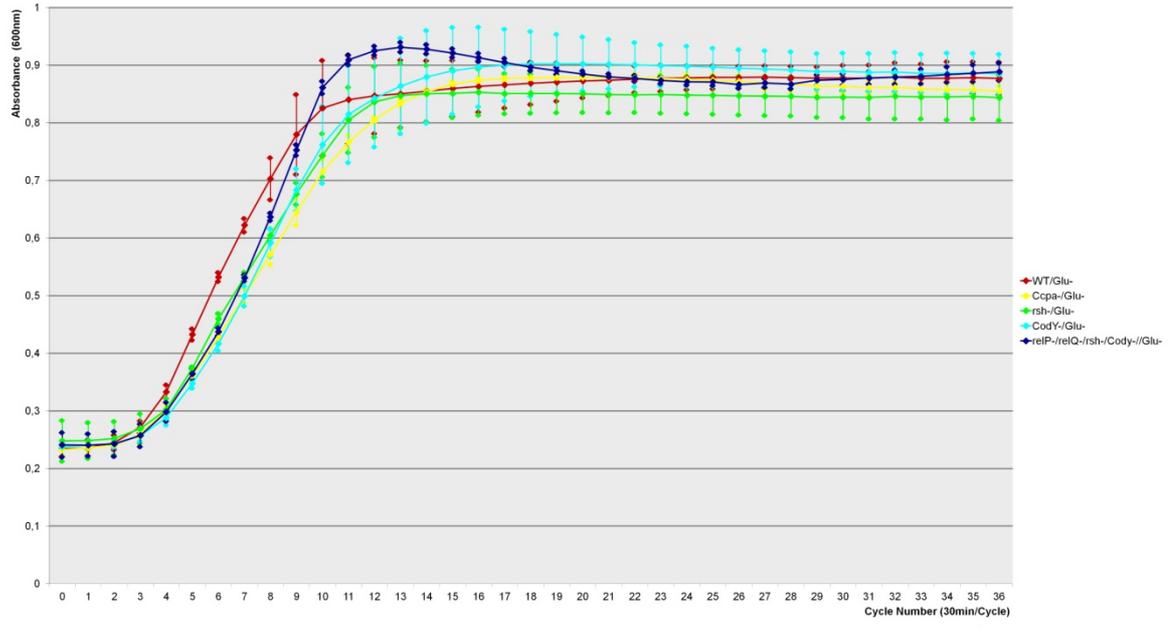
1d) Cys-



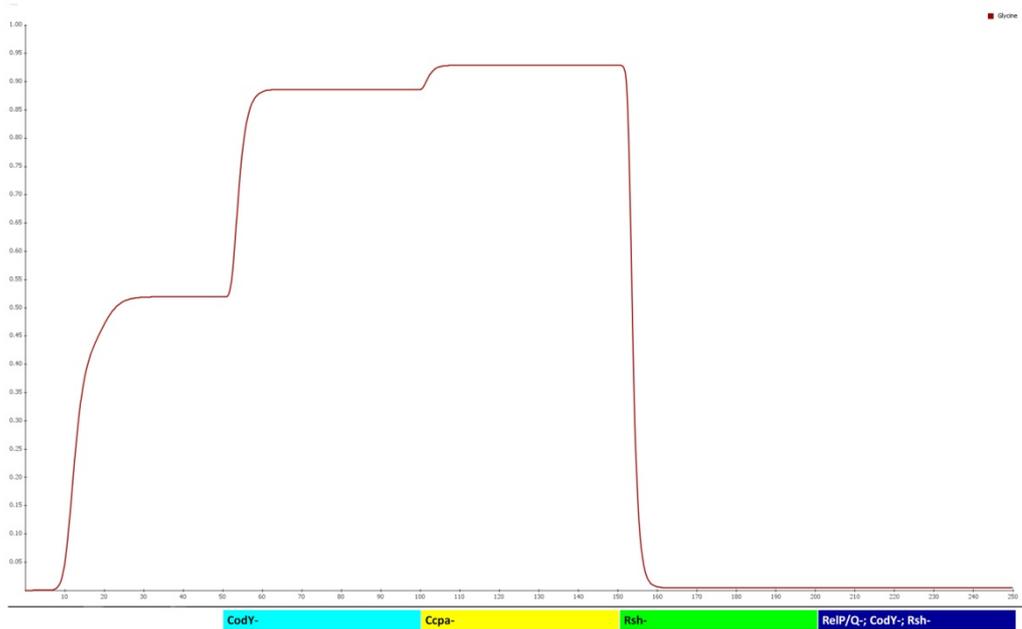
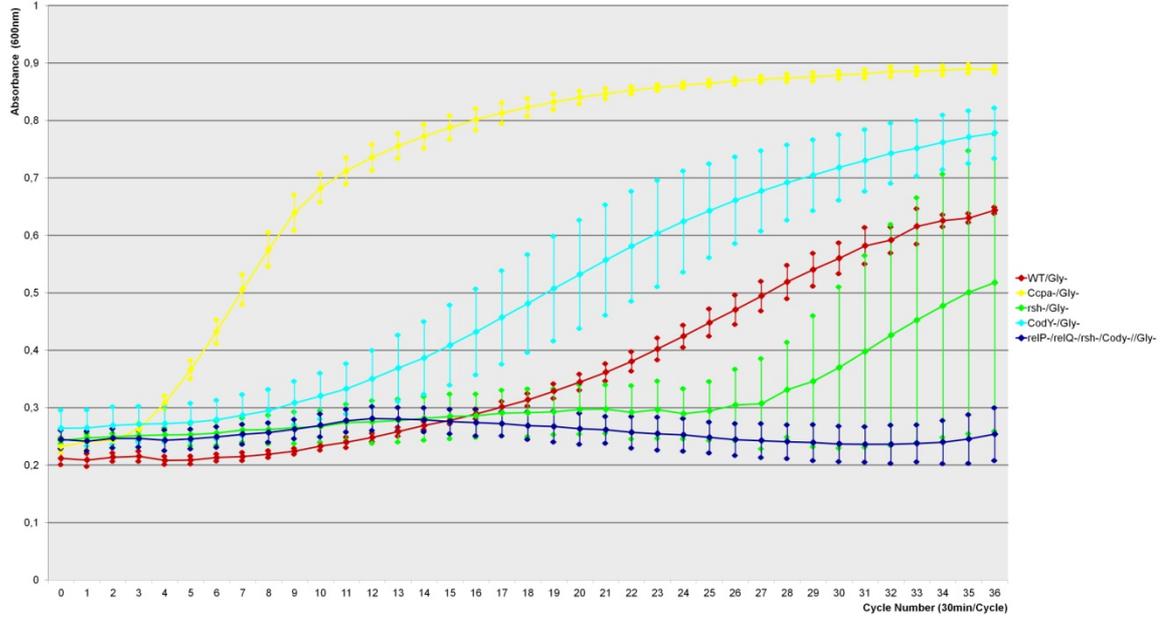
1e) Gln-



1f) Glu-

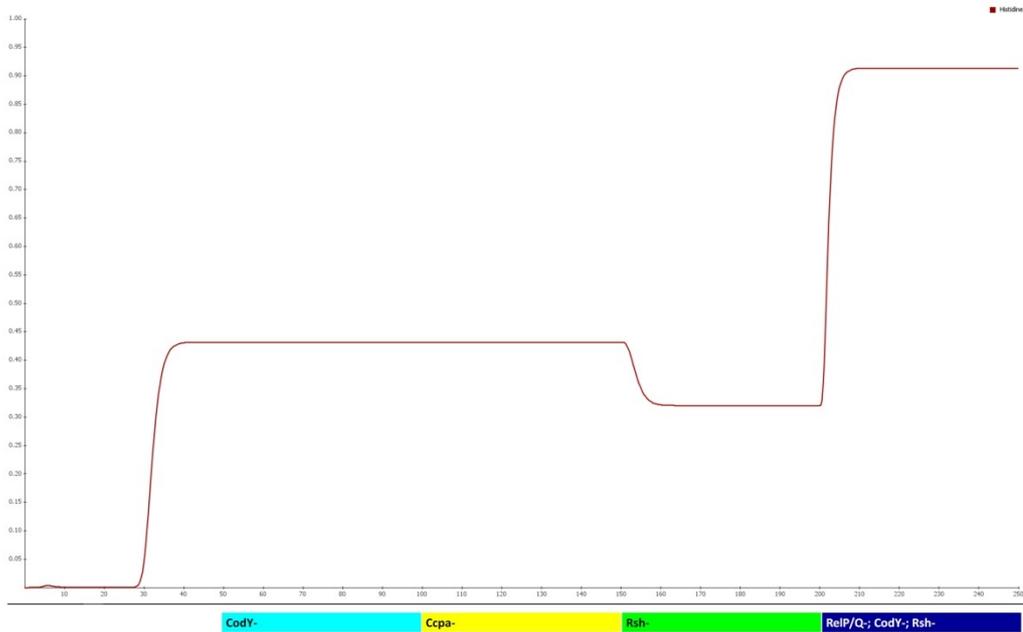
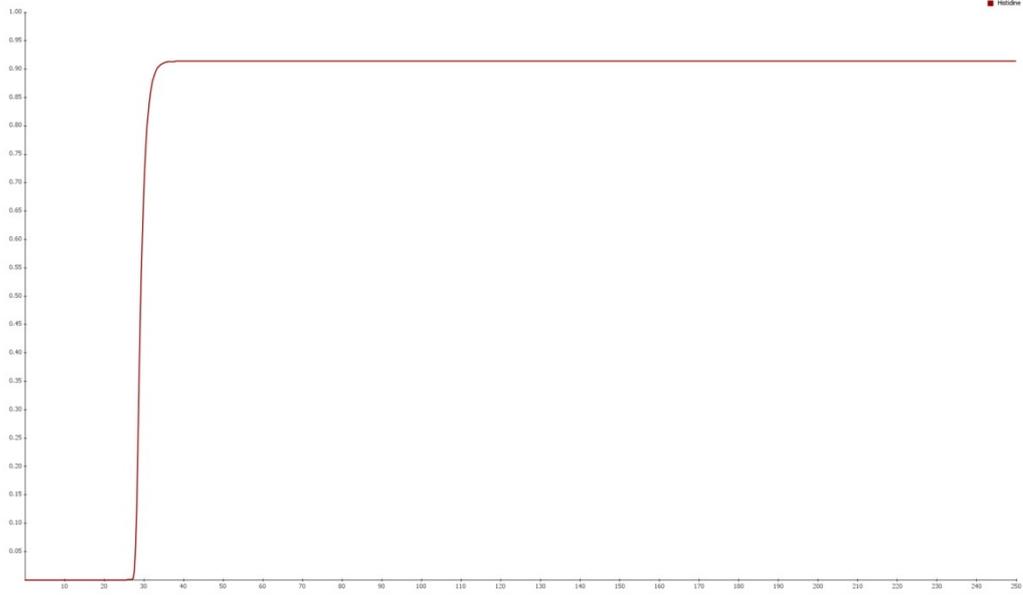
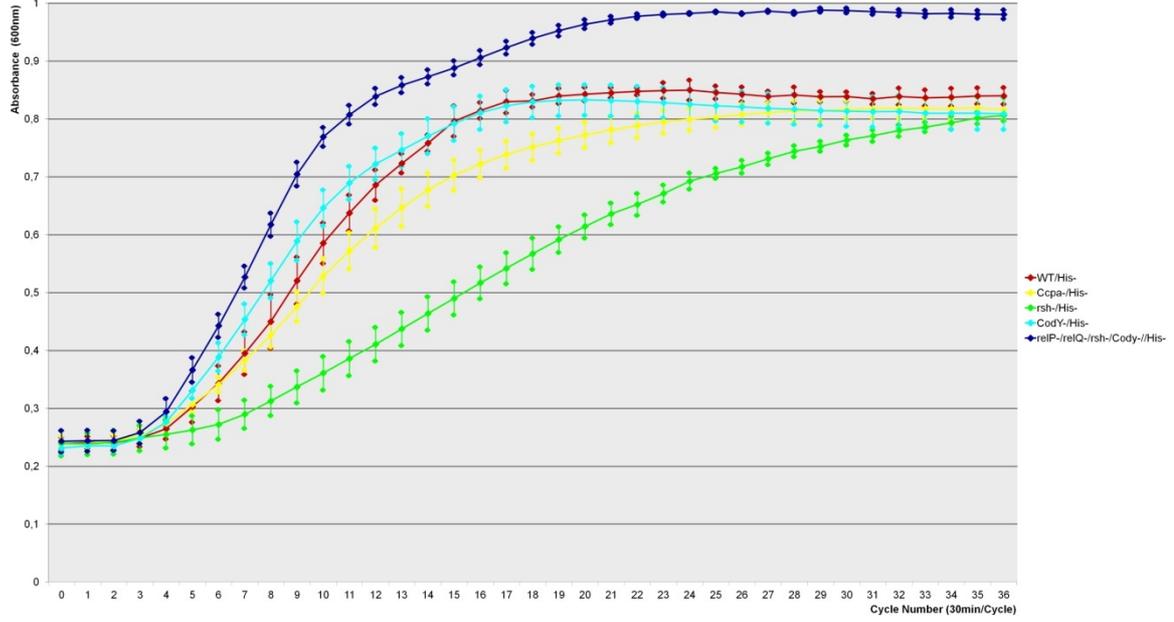


1g) Gly-

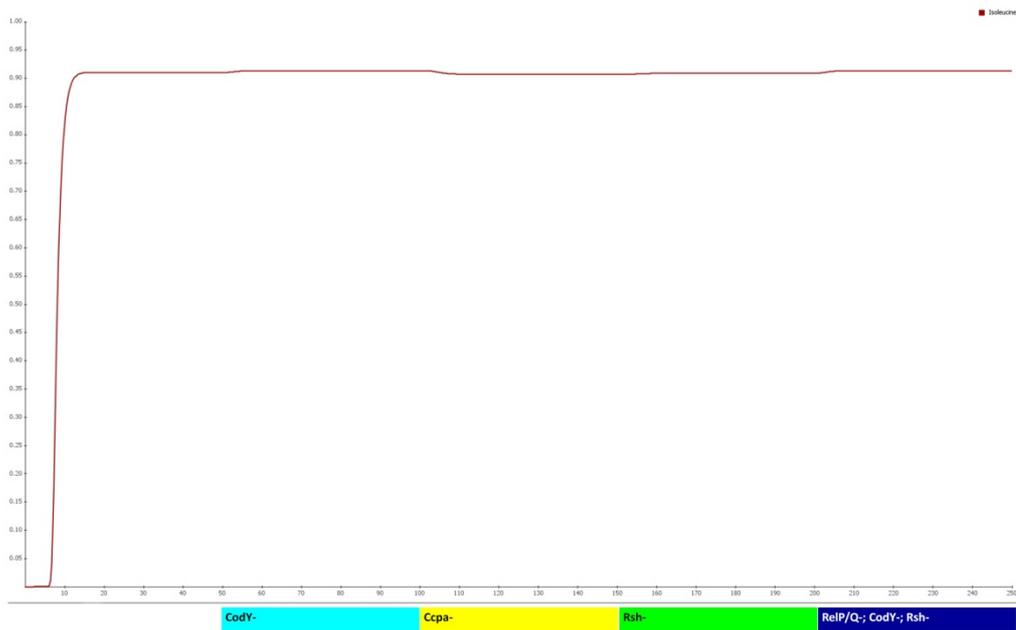
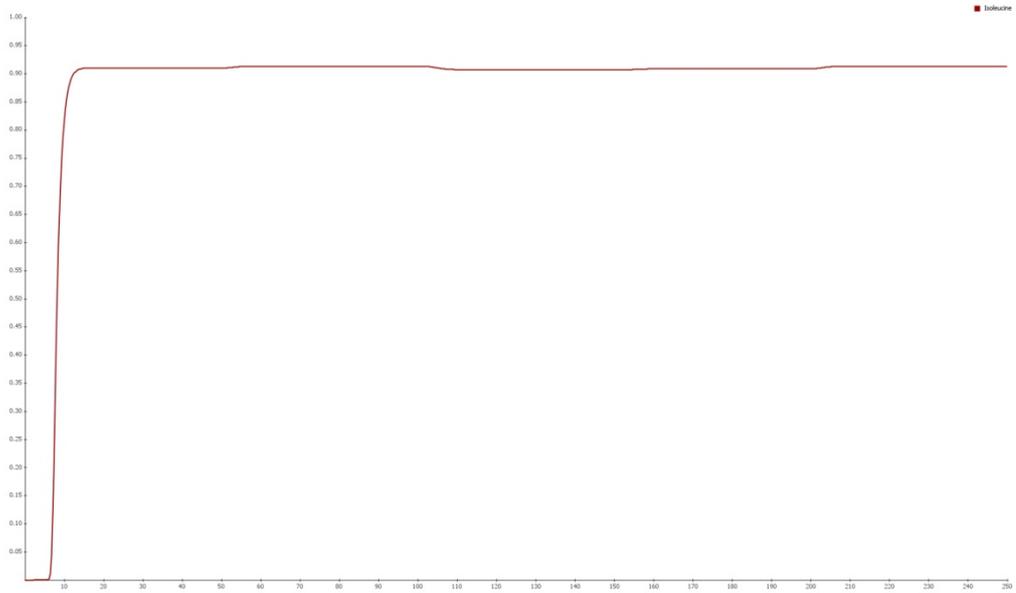
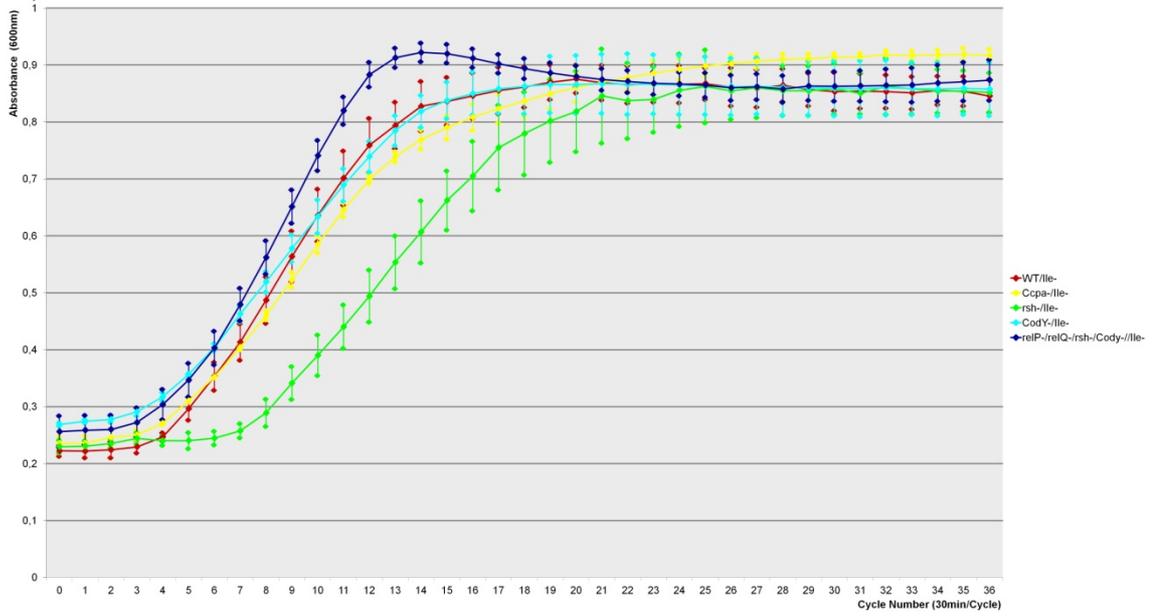


CodY- CcpA- Rsh- RelP/Q-, CodY-, Rsh-

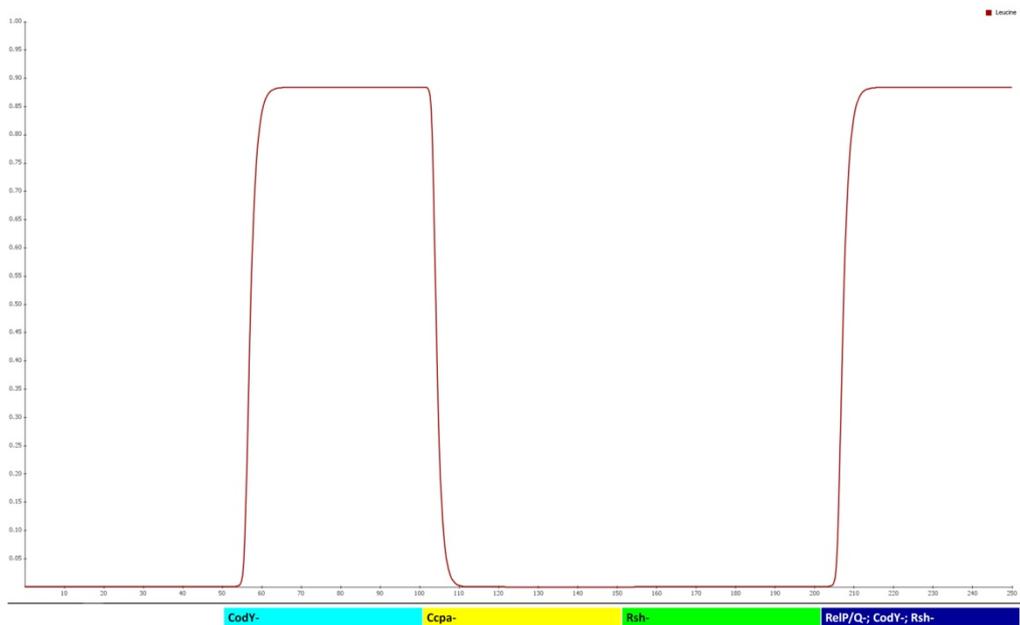
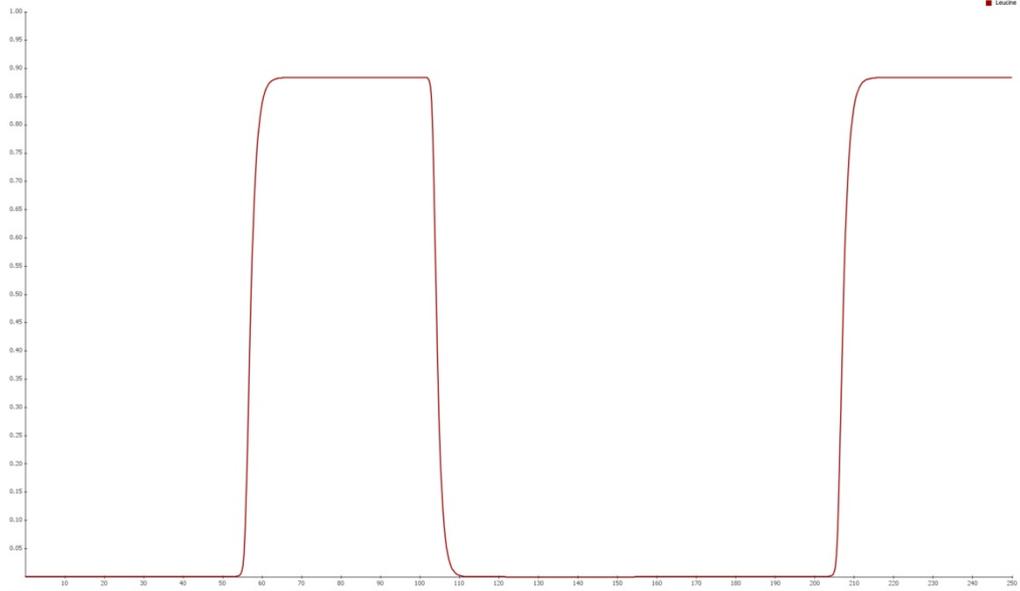
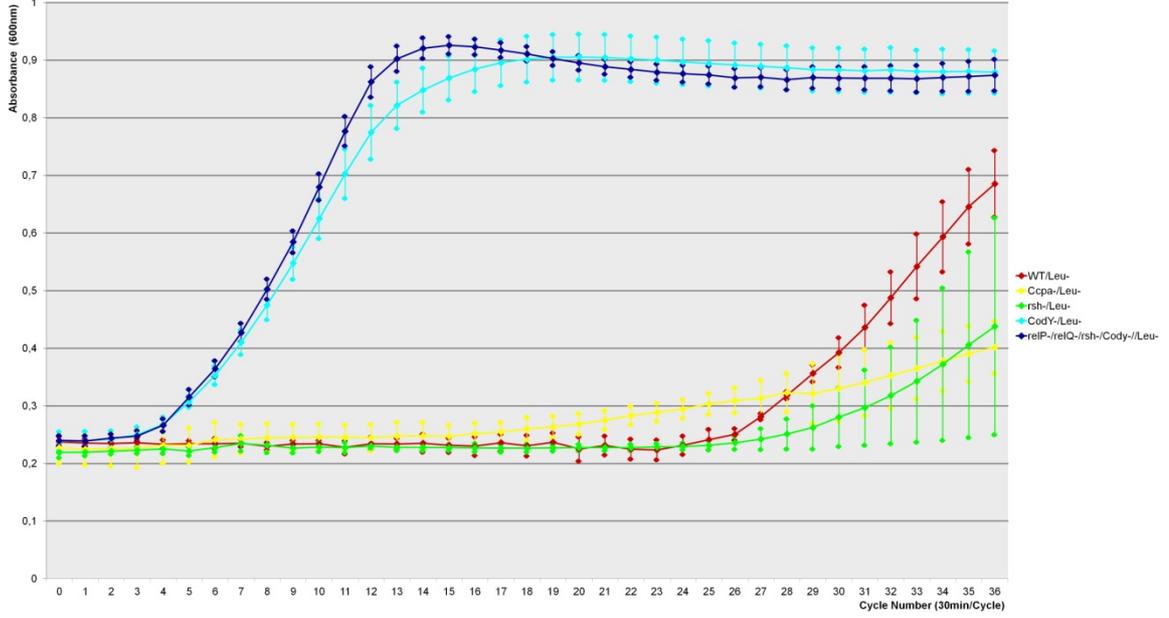
1h) His-



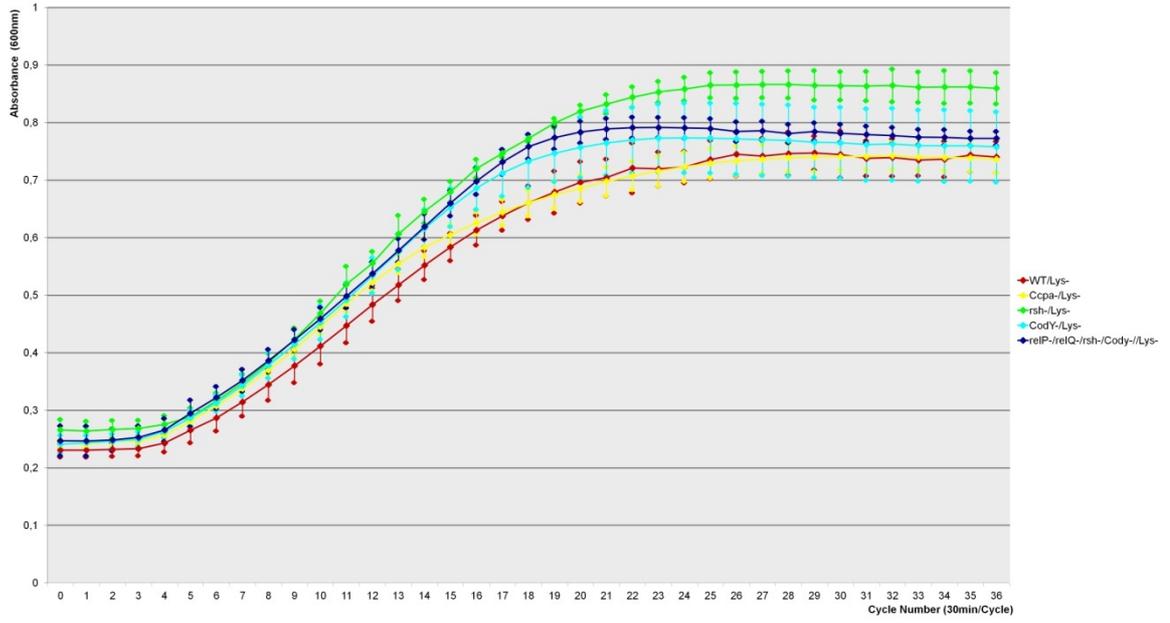
1i) Ile-



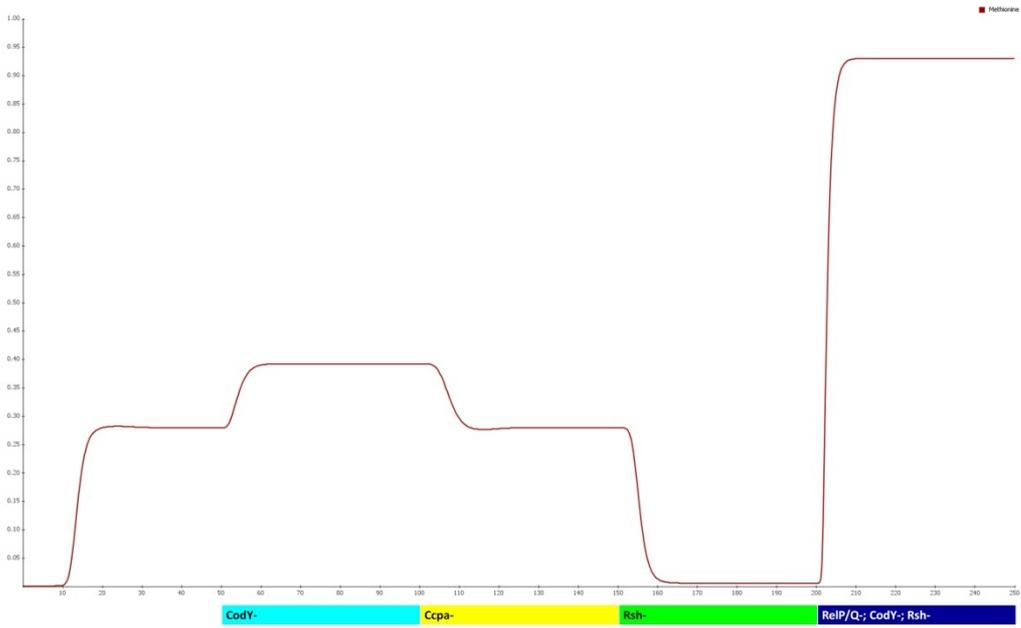
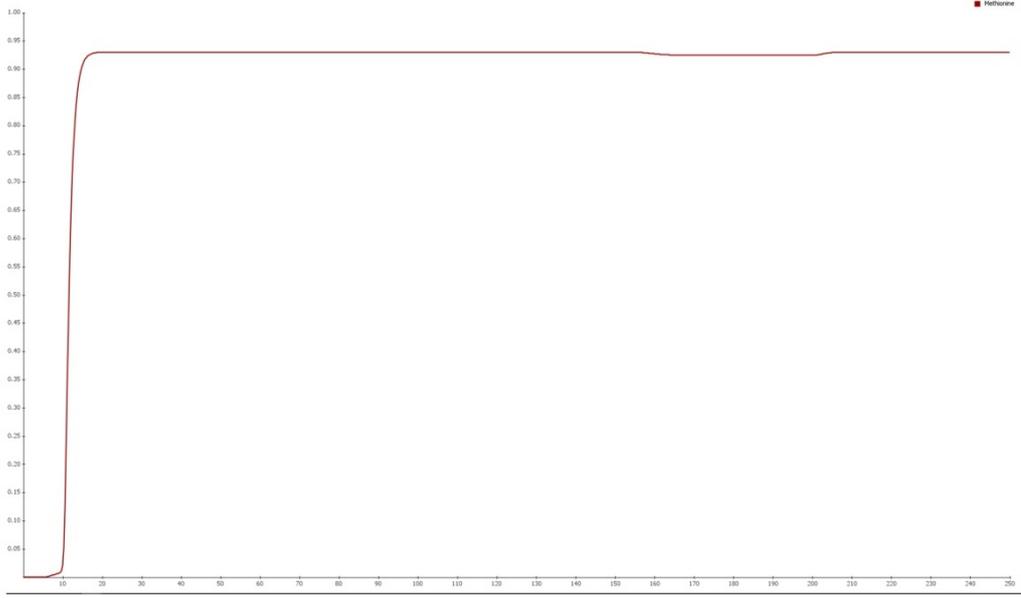
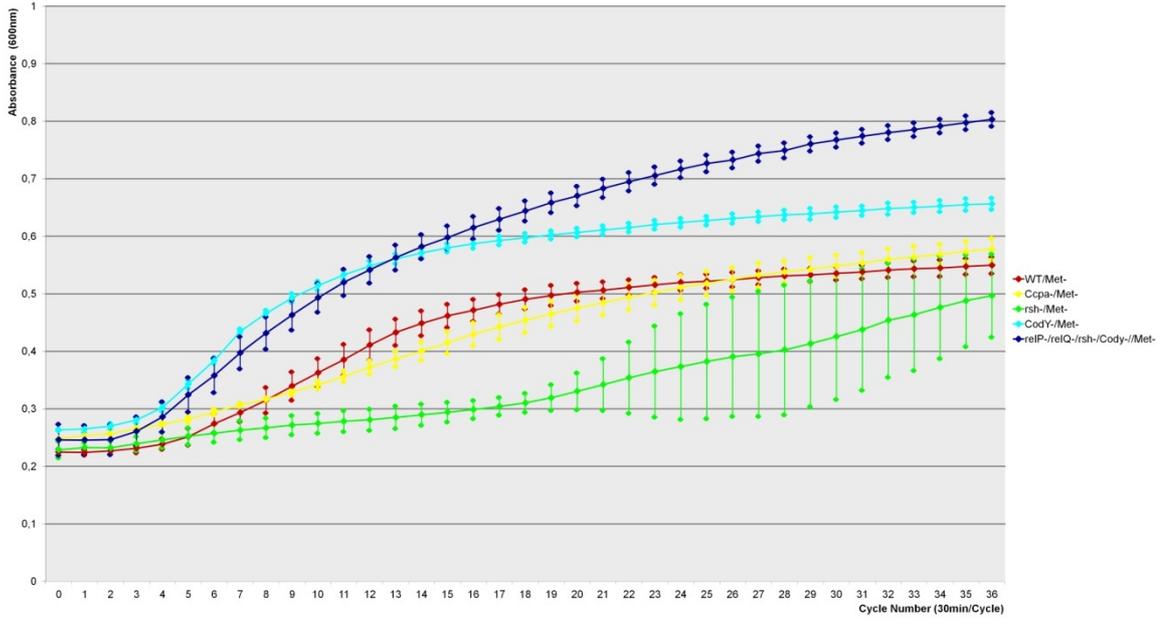
1j) Leu-



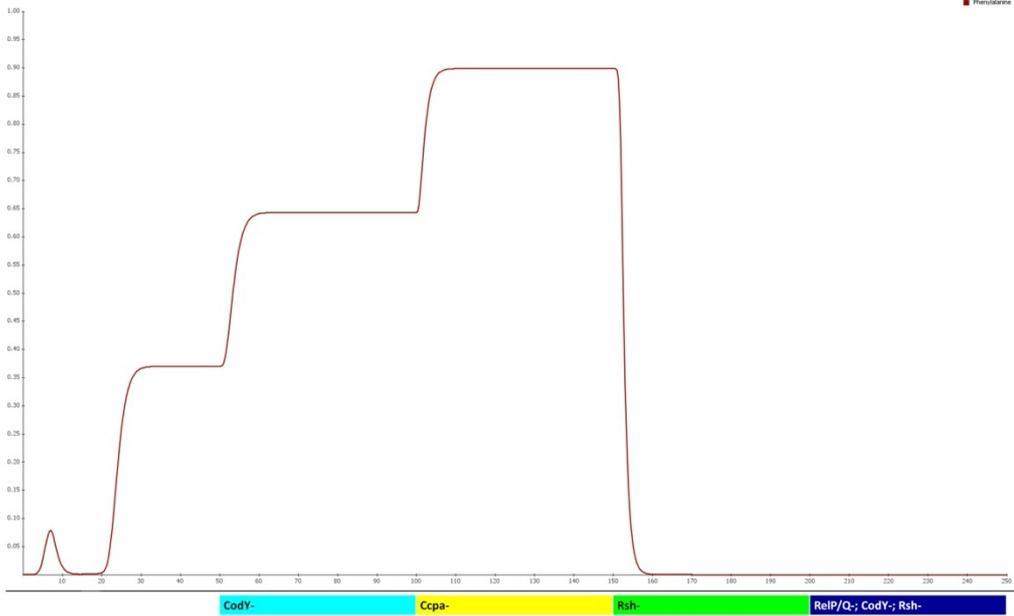
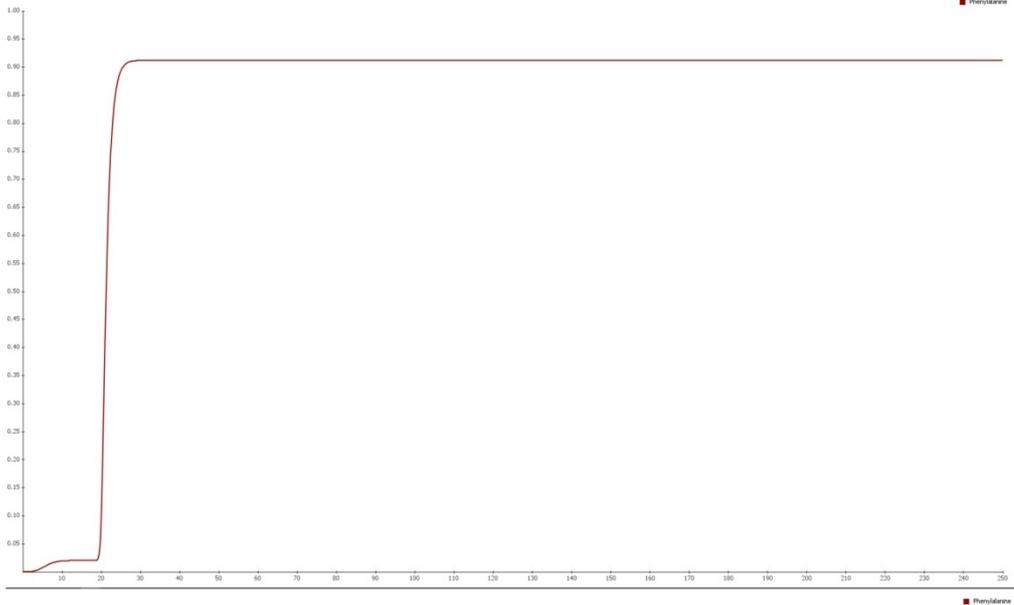
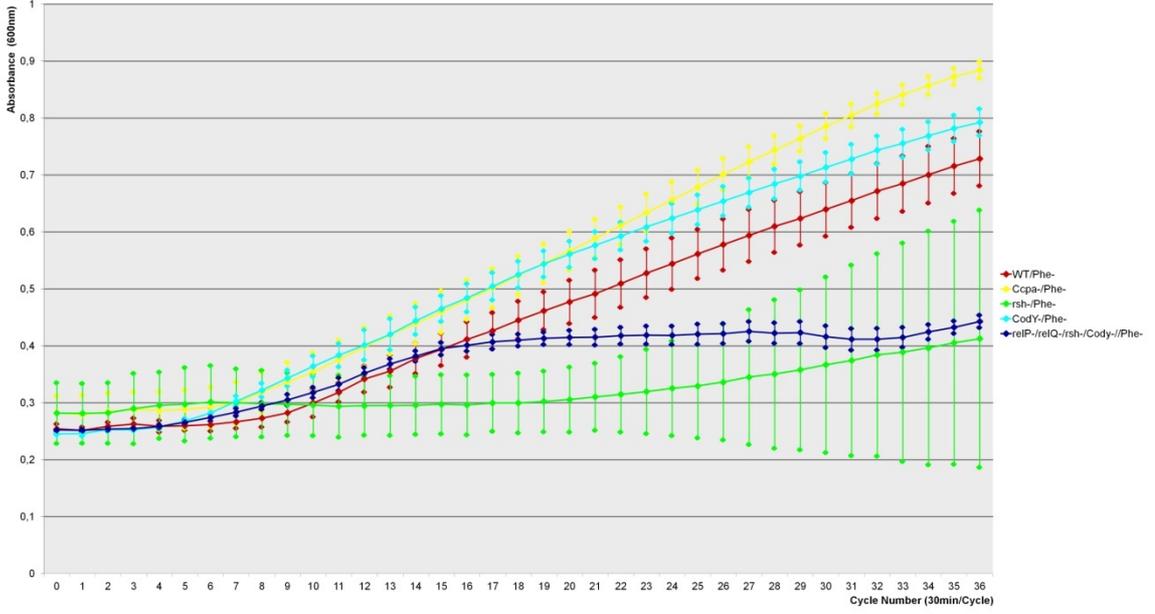
1k) Lys-



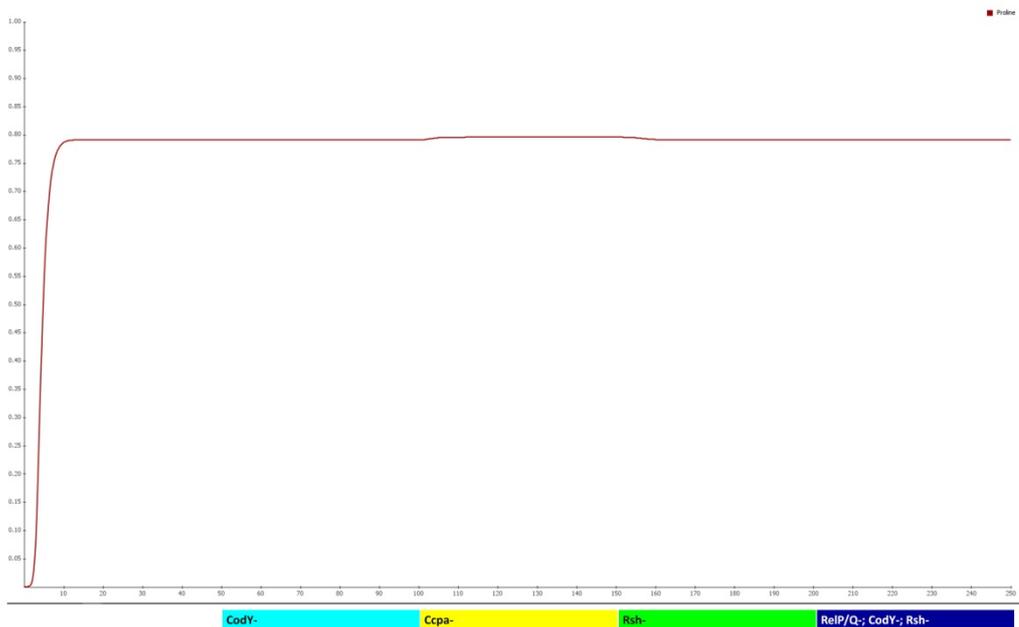
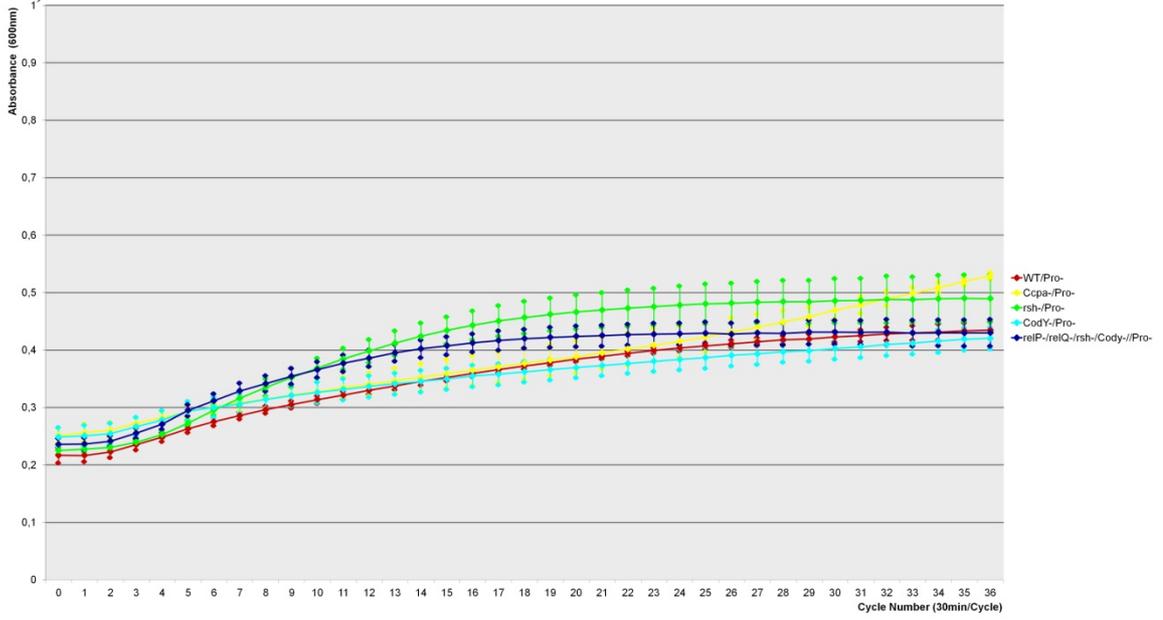
11) Met-



1m) Phe-

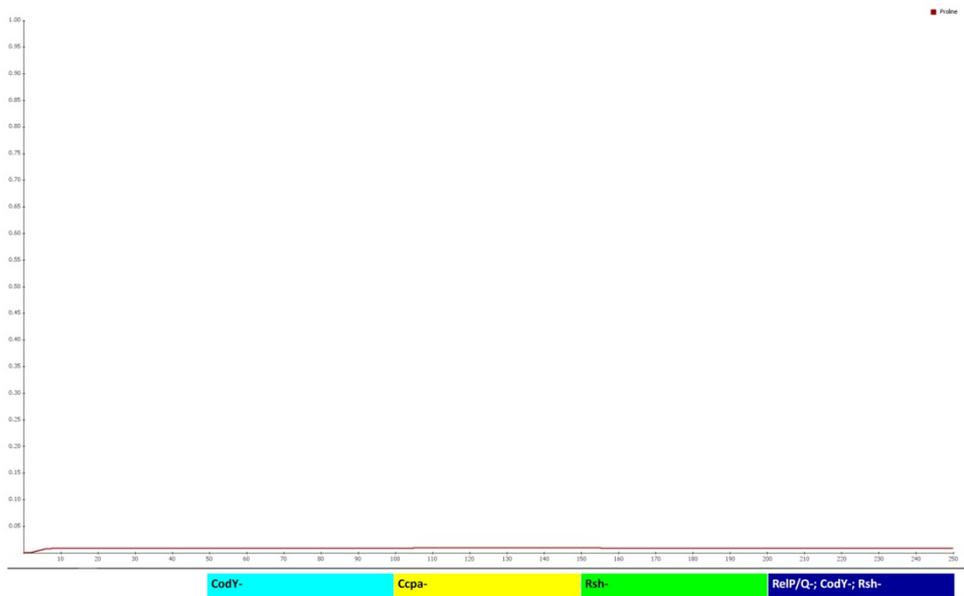
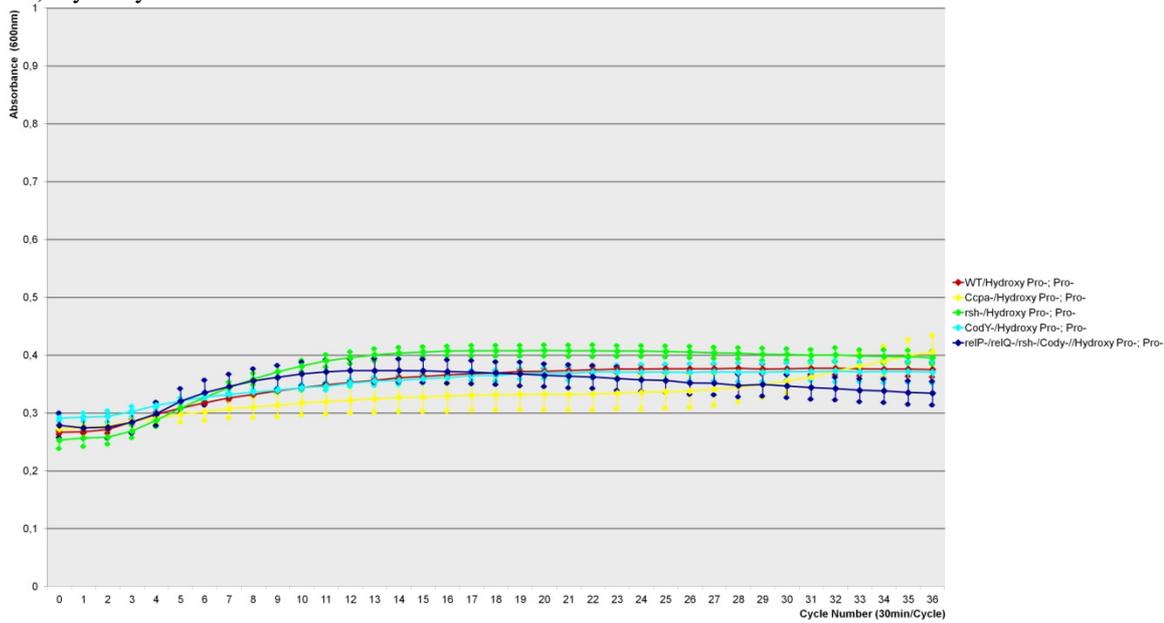


1n) Pro-

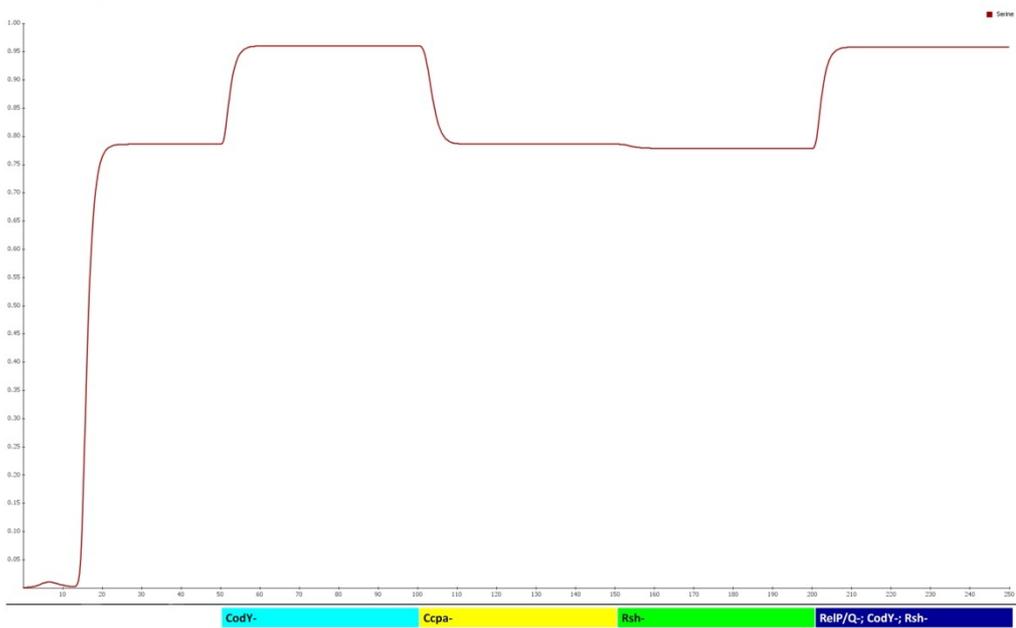
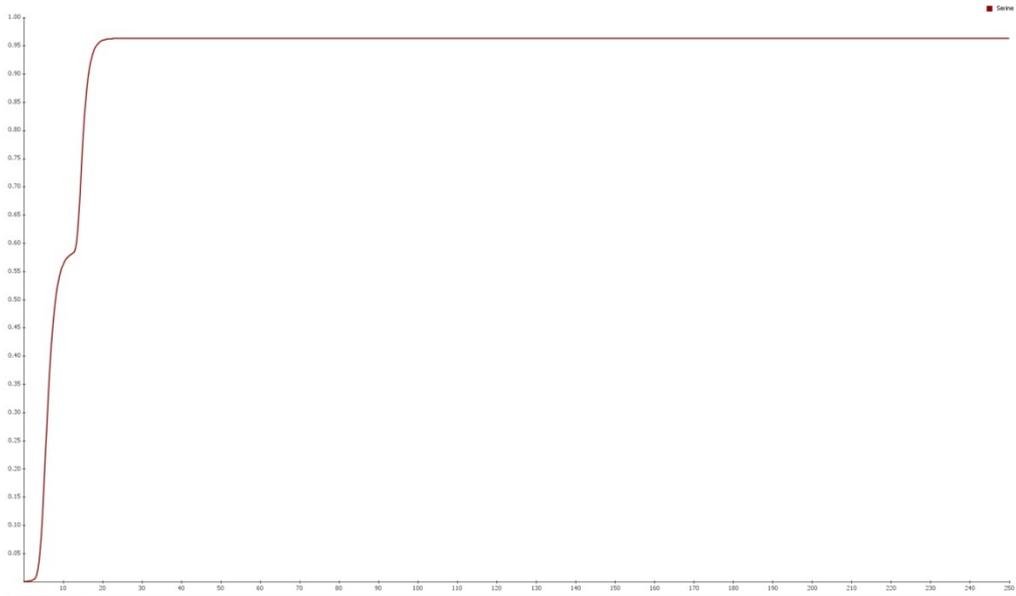
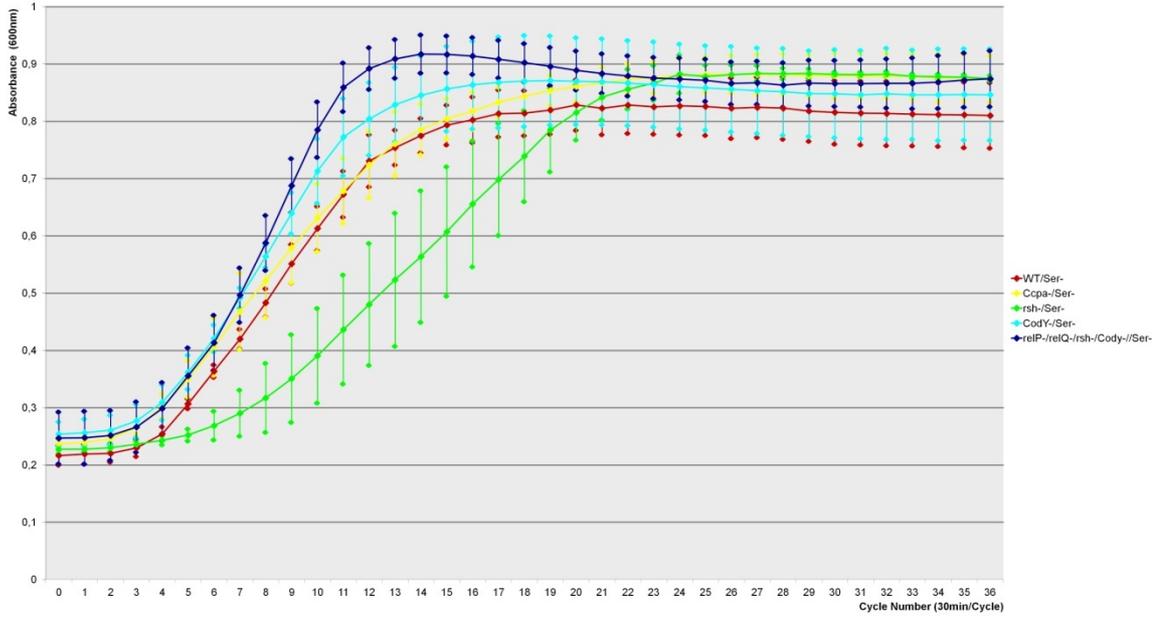


CodY- CcpA- Rsh- RelP/Q; CodY; Rsh-

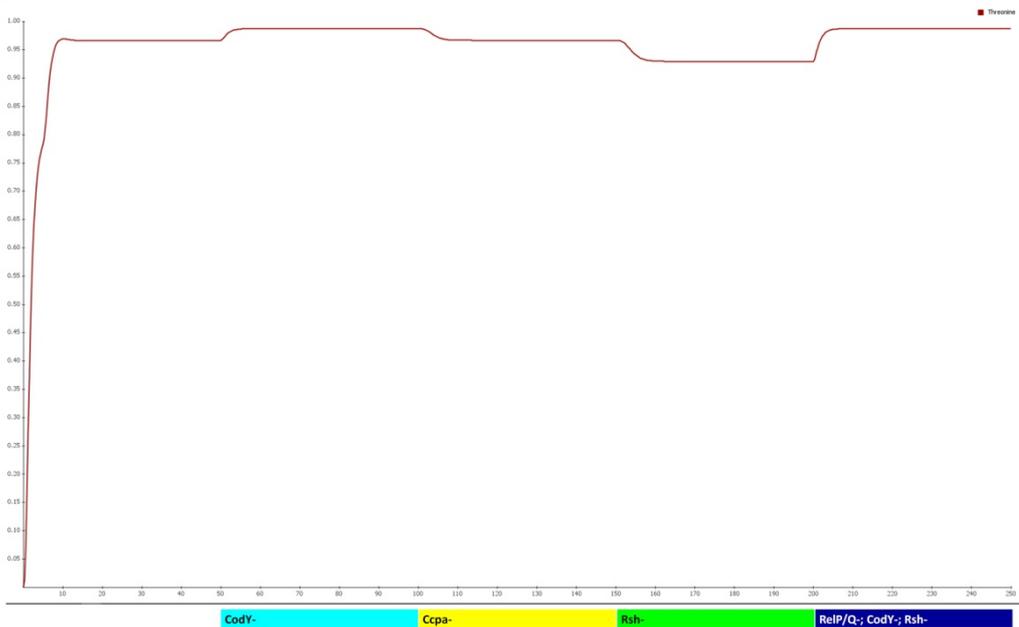
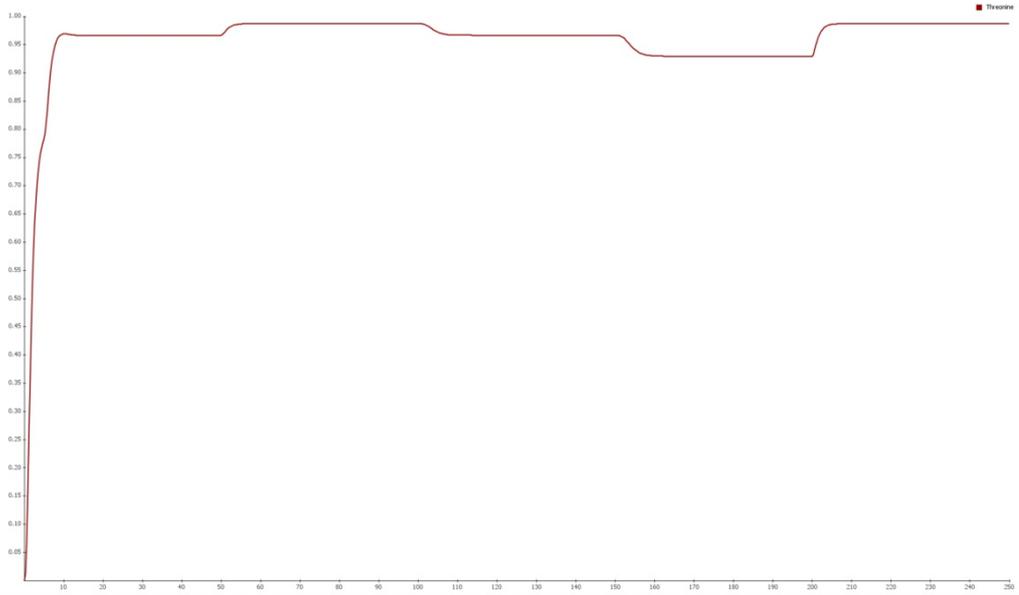
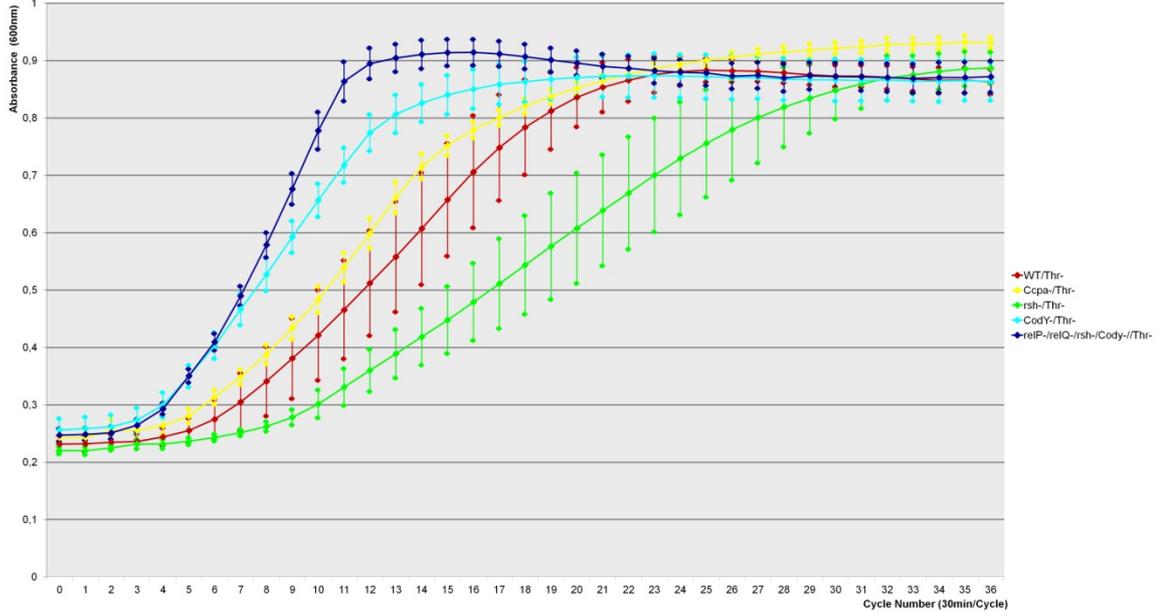
1o) Hydroxy Pro-/Pro-



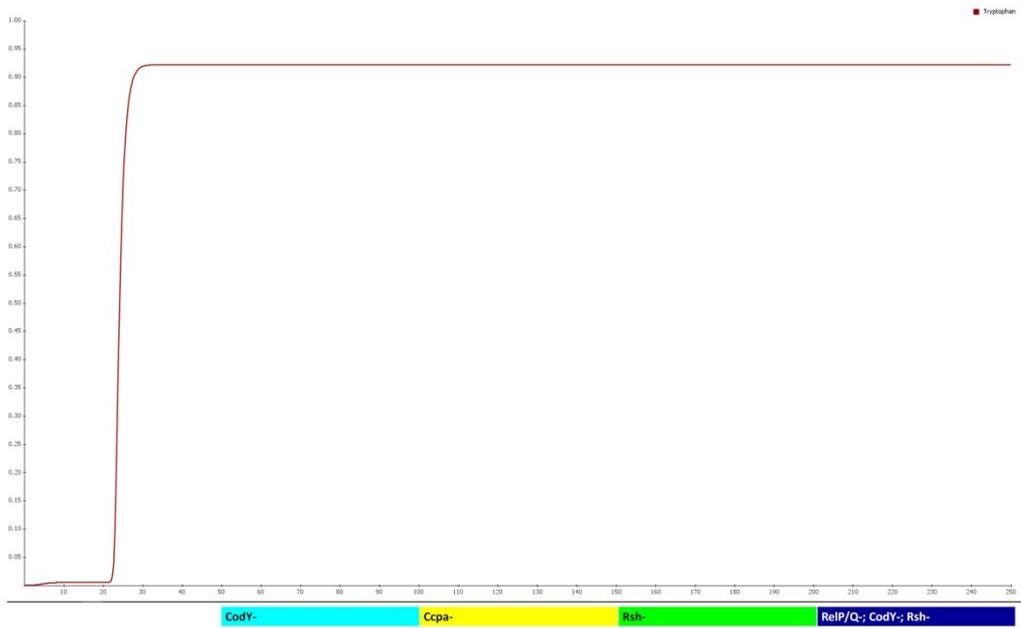
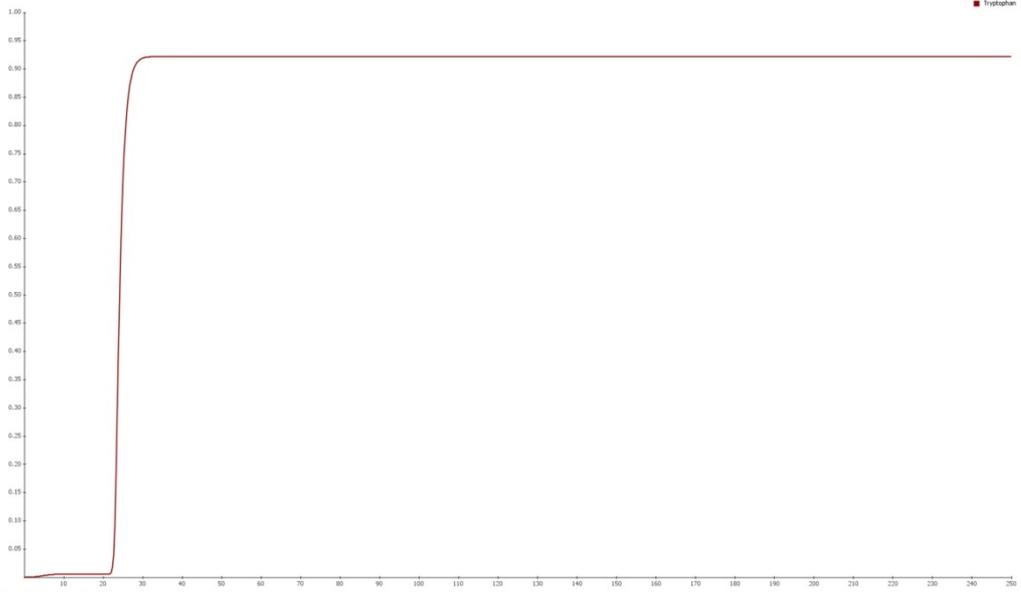
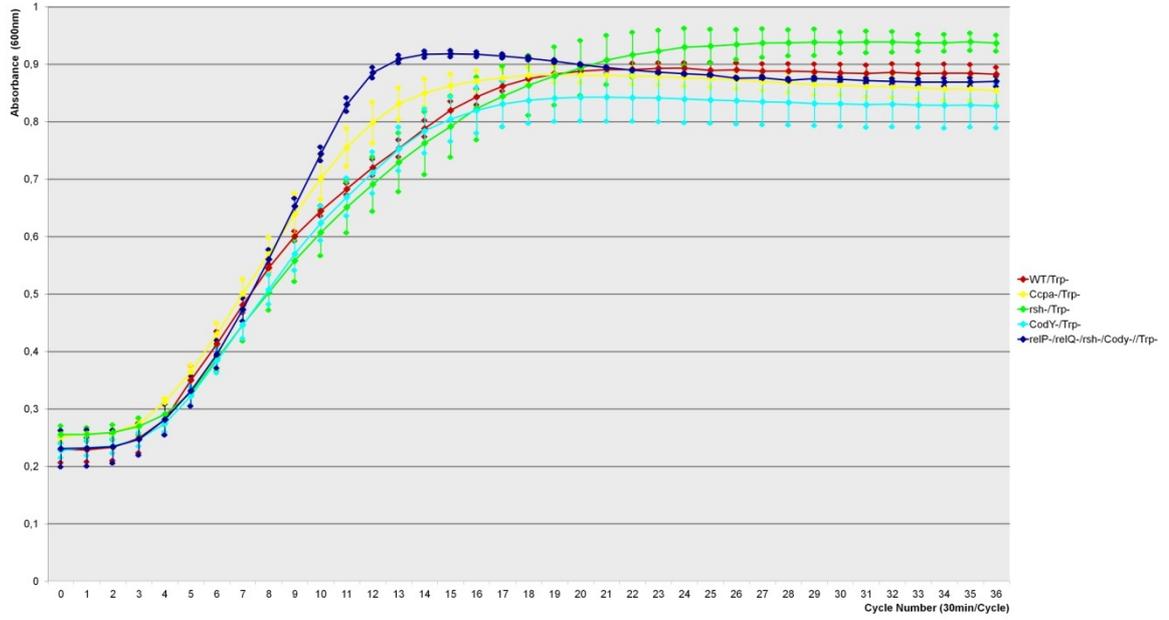
1p) Ser-



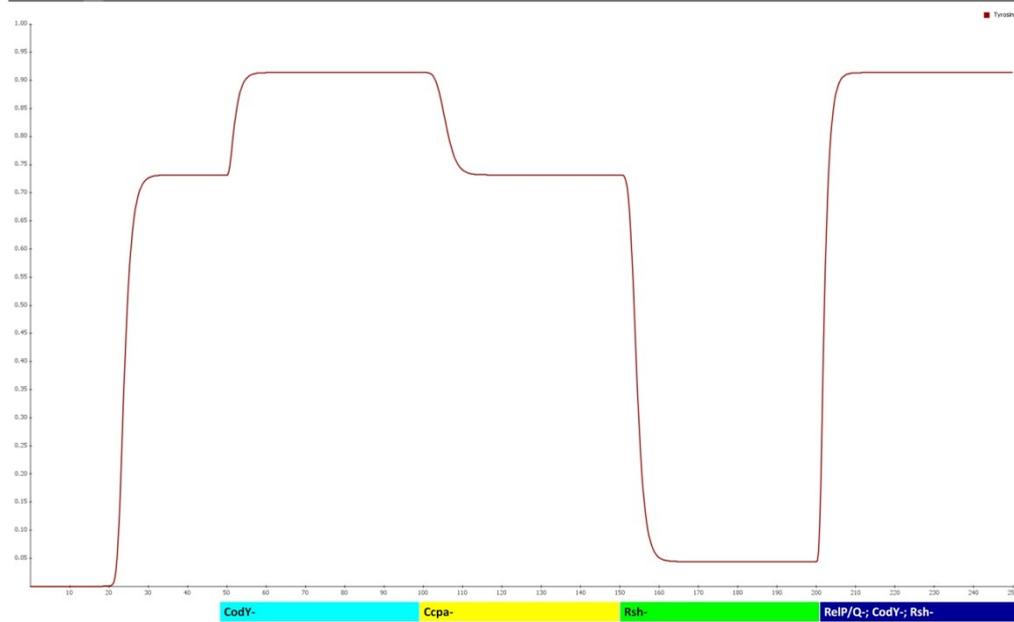
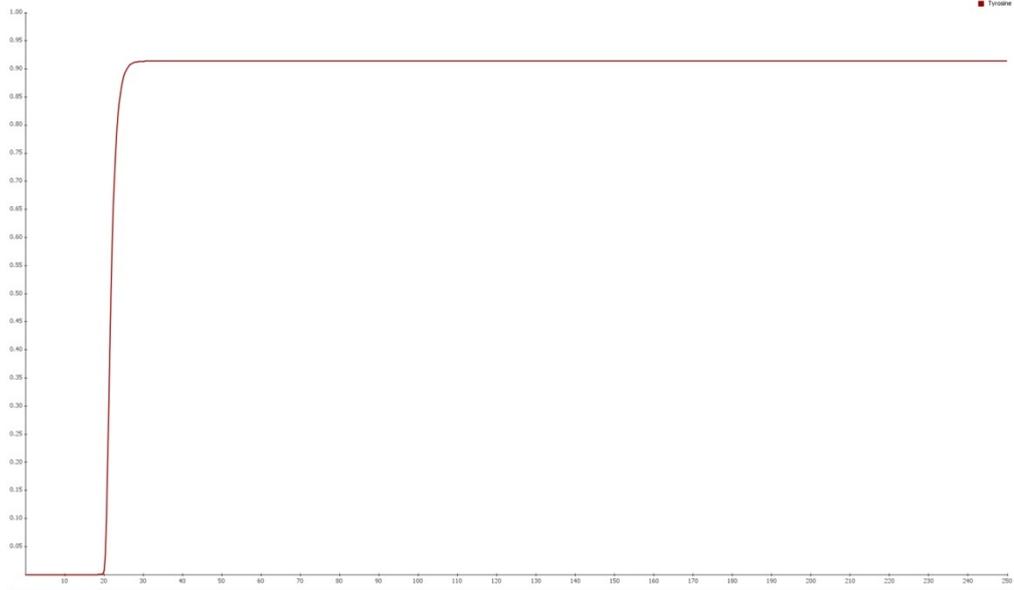
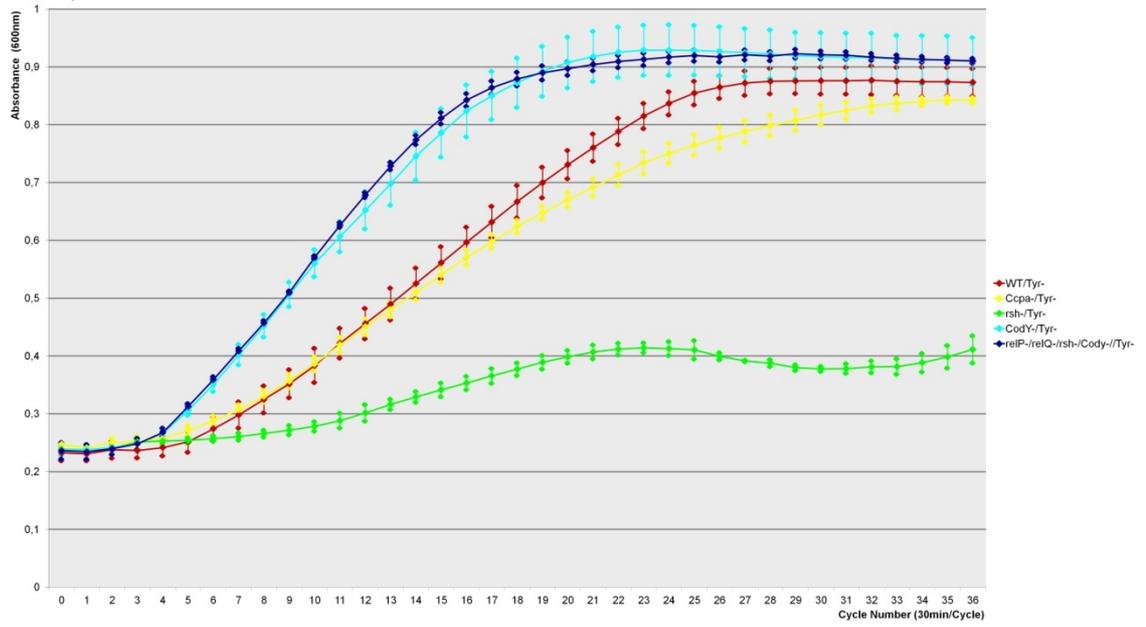
1q) Thr-



1r) Trp-



1s) Tyr-



1t) Val-

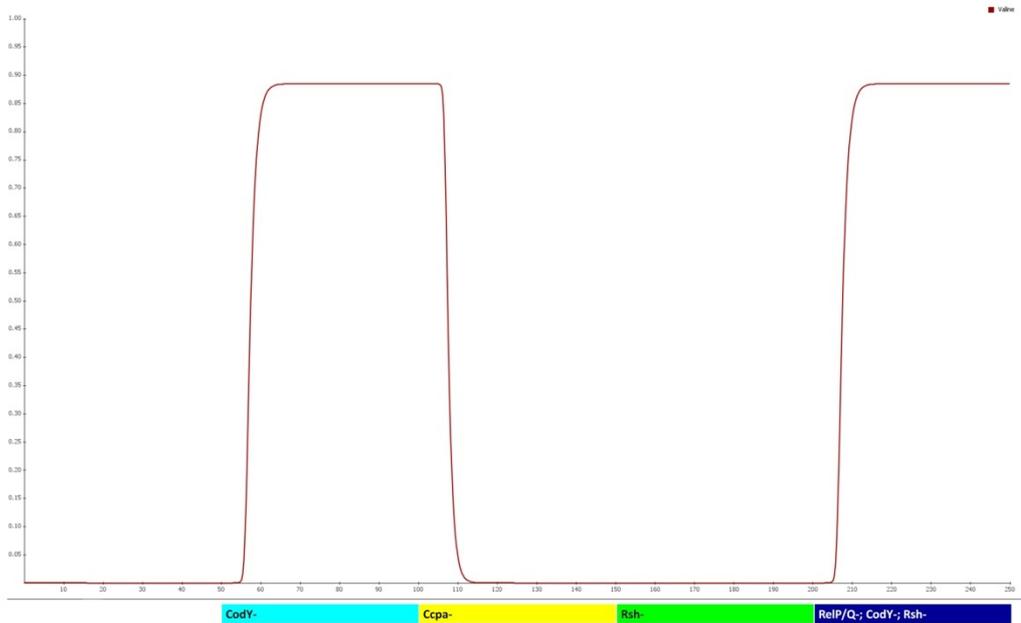
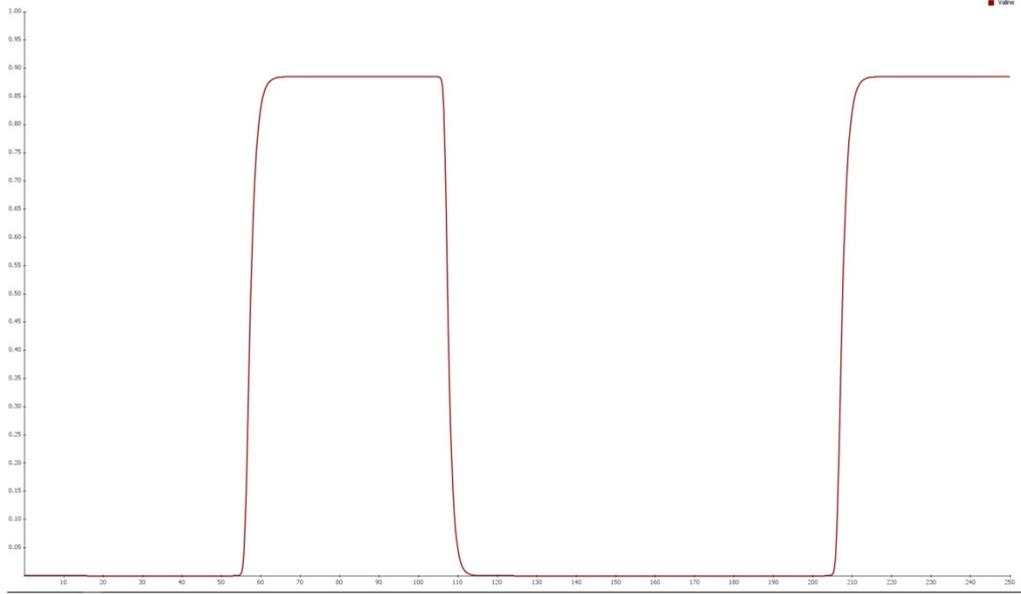
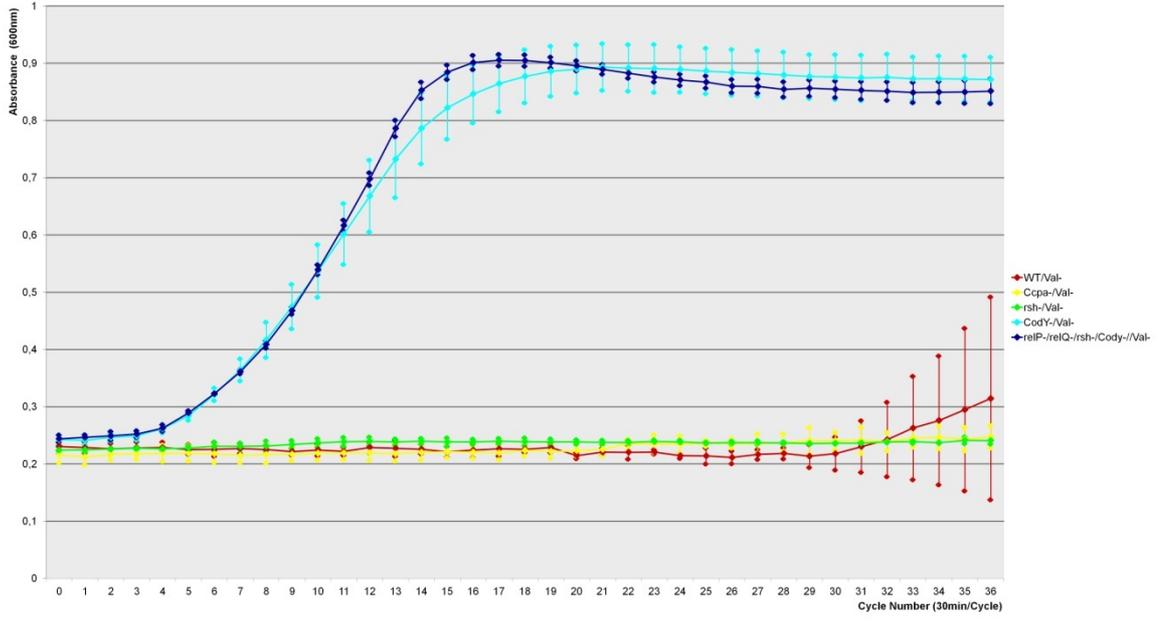
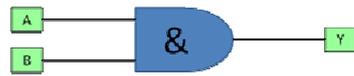


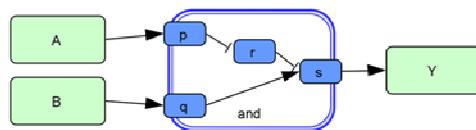
Abbildung 1: In-vitro - in-silico Vergleich: Im oberen Teil jeder Abbildung sind die Daten der Wachstumsexperimente in den Mangelmedien ohne die jeweilige AS aufgetragen. Die verschiedenen knock-out Mutanten sind hier anhand der verschiedenfarbigen Kurven dargestellt. Im mittleren und unteren Teil jeder Abbildung ist die in-silico Syntheseleistung der jeweiligen AS unter den verschiedenen knock-out Bedingungen dargestellt. Die mittlere Grafik zeigt die Simulationsergebnisse von Netzwerk 1; die untere Abbildung zeigt die Simulationsergebnisse von Netzwerk 2.

AND Gate:

Boolesche Darstellung $Y = A \wedge B$

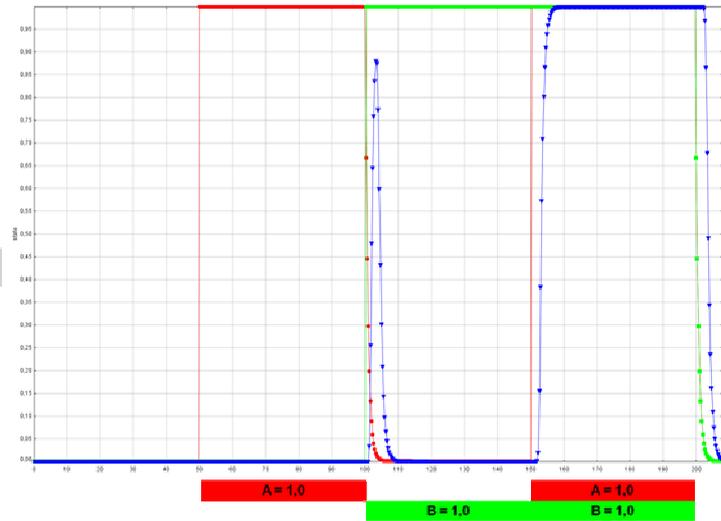


Konstruktion:



Wahrheitstabelle:

A	B	Y
0	0	0
1	0	0
0	1	0
1	1	1

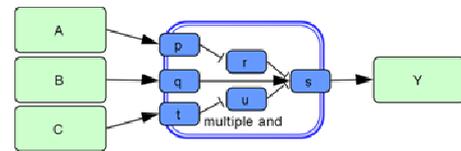


3 Input AND Gate:

Boolesche Darstellung $Y = A \wedge B \wedge C$



Konstruktion:



Wahrheitstabelle:

A	B	C	Y
0	0	0	0
1	0	0	0
0	1	0	0
0	0	1	0
1	1	0	0
1	0	1	0
0	1	1	0
1	1	1	1

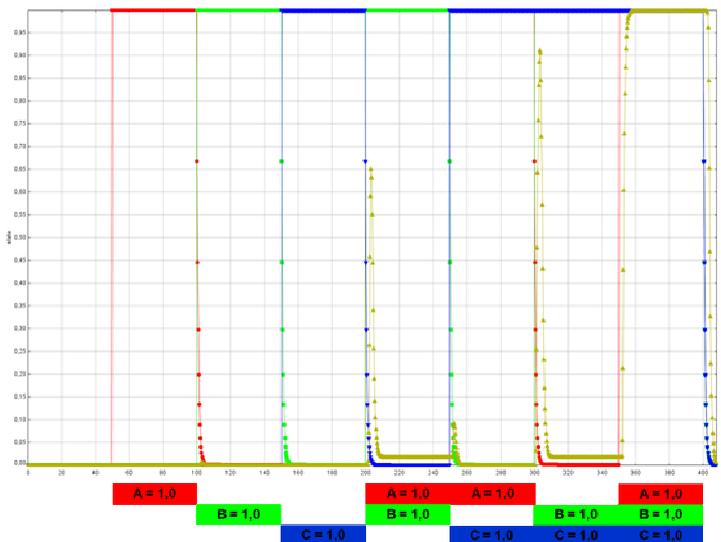
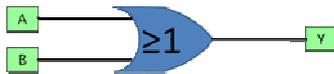


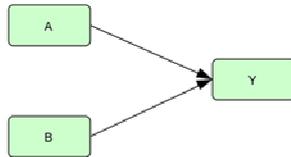
Abbildung 2a: AND Gatter

OR Gate:

Boolesche Darstellung: $Y = A \vee B$



Konstruktion:



Wahrheitstabelle:

A	B	Y
0	0	0
1	0	1
0	1	1
1	1	1

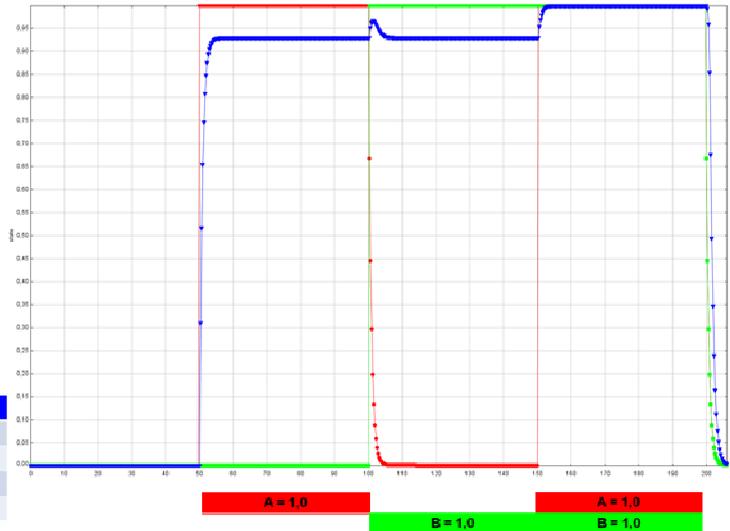


Abbildung 2b: OR Gatter

NOT Gate:

Boolesche Darstellung: $Y = A'$



Konstruktion:



Wahrheitstabelle:

A	Y
0	1
1	0

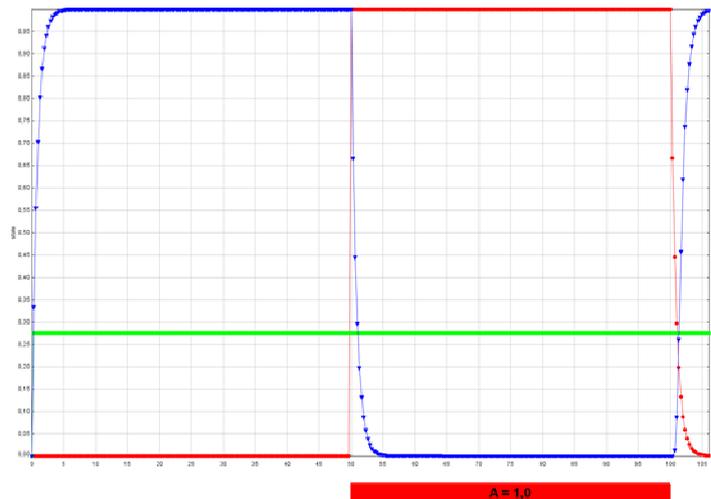


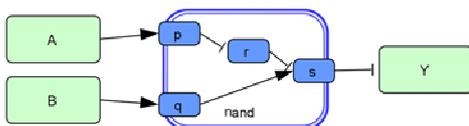
Abbildung 2c: NOT Gatter

NAND Gate:

Boolesche Darstellung: $Y = (A \wedge B)'$



Konstruktion:



Wahrheitstabelle:

A	B	Y
0	0	1
1	0	1
0	1	1
1	1	0

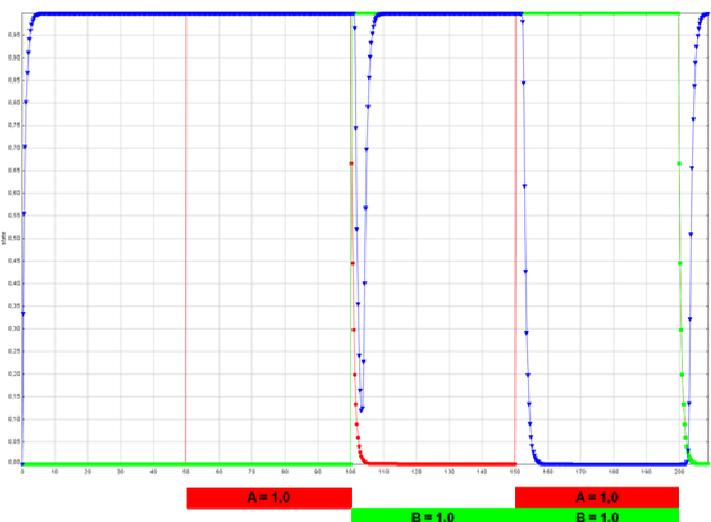


Abbildung 2d: NAND Gatter

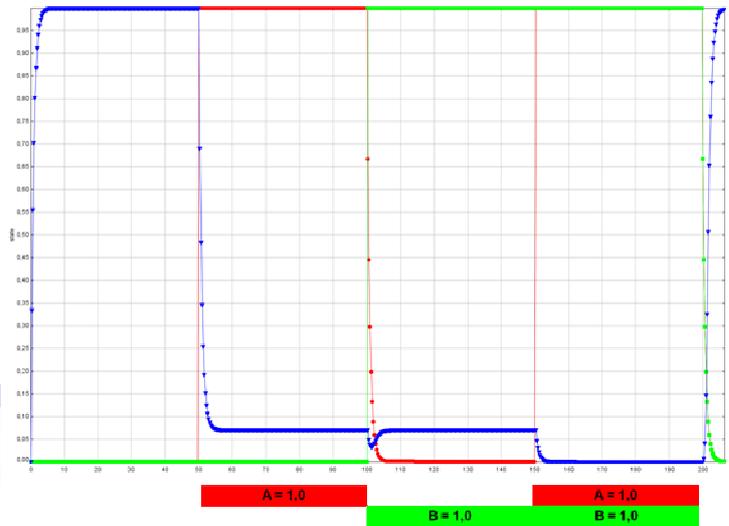
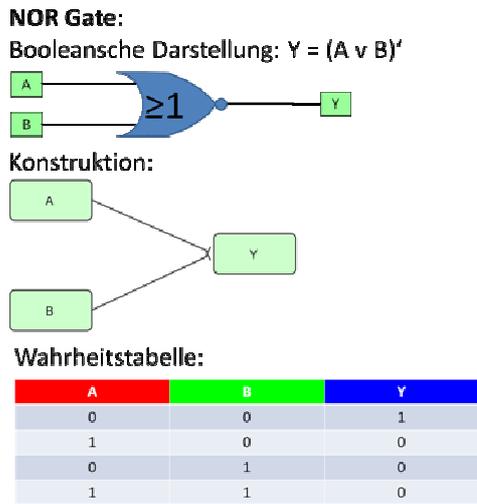


Abbildung 2e: NOR Gatter

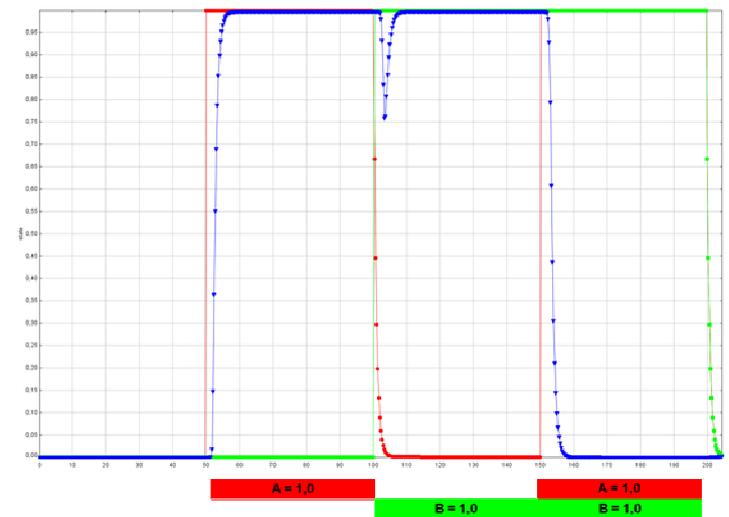
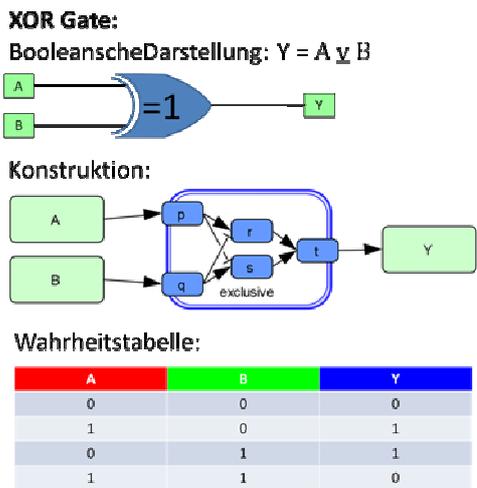


Abbildung 2f: XOR Gatter

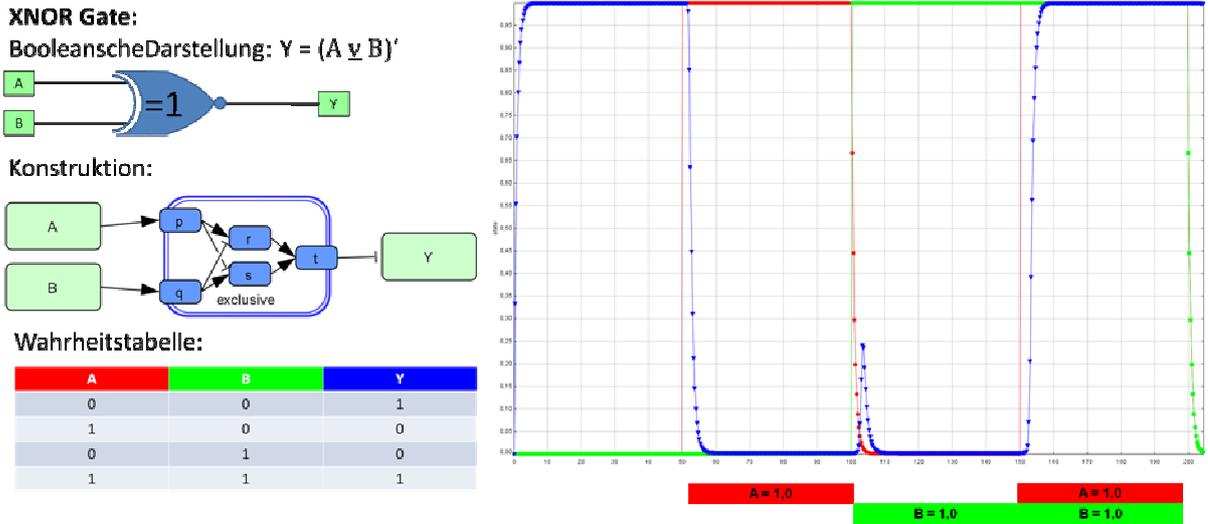


Abbildung 2g: XNOR Gatter

Abbildung 2a-e: Boolesche Logikgatter: Hier dargestellt sind die verschiedenen Logikgatter, inklusive der jeweiligen Wahrheitstabellen, der in-silico Konstruktionen, der booleschen Schreibweisen und Darstellungen sowie der Reaktion der Knoten in der Simulation. Unterhalb der Simulationsgrafik sind die jeweiligen Perturbationen dargestellt.

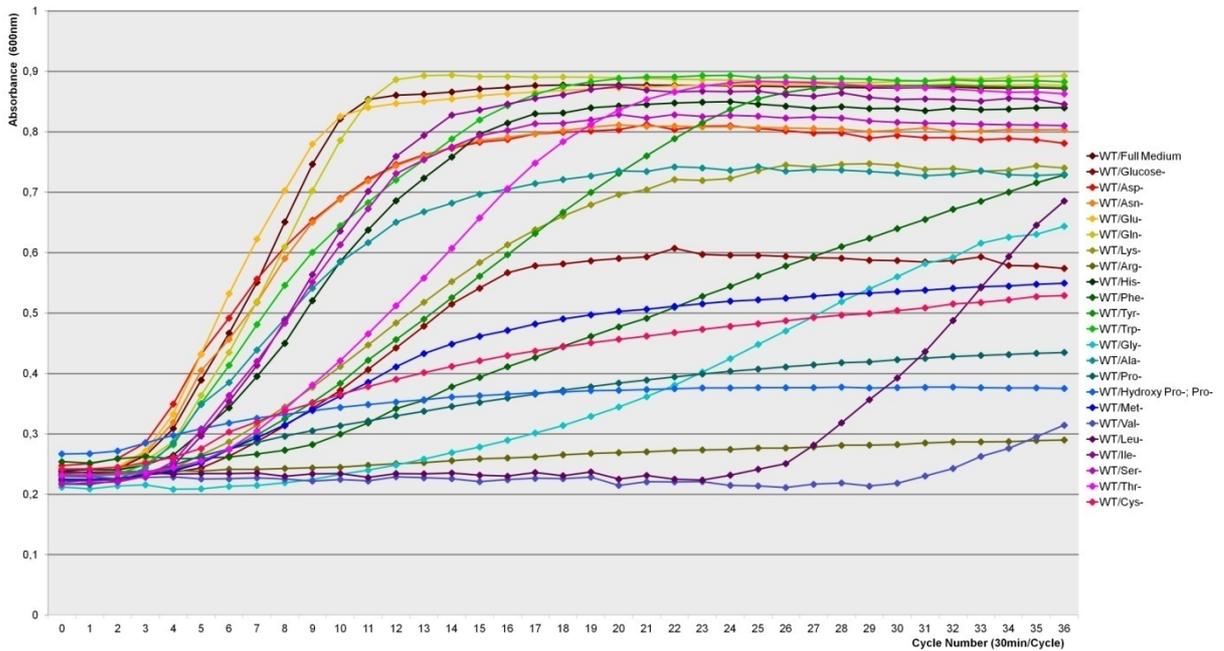


Abbildung 3a:

WT

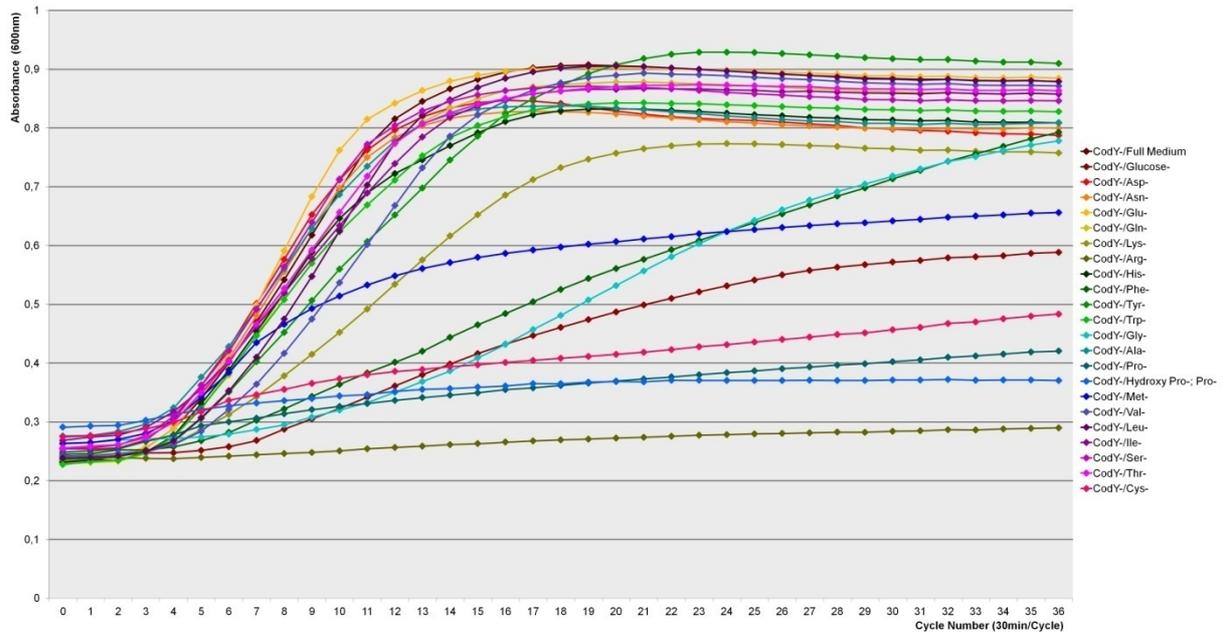


Abbildung 3b: *codY*-

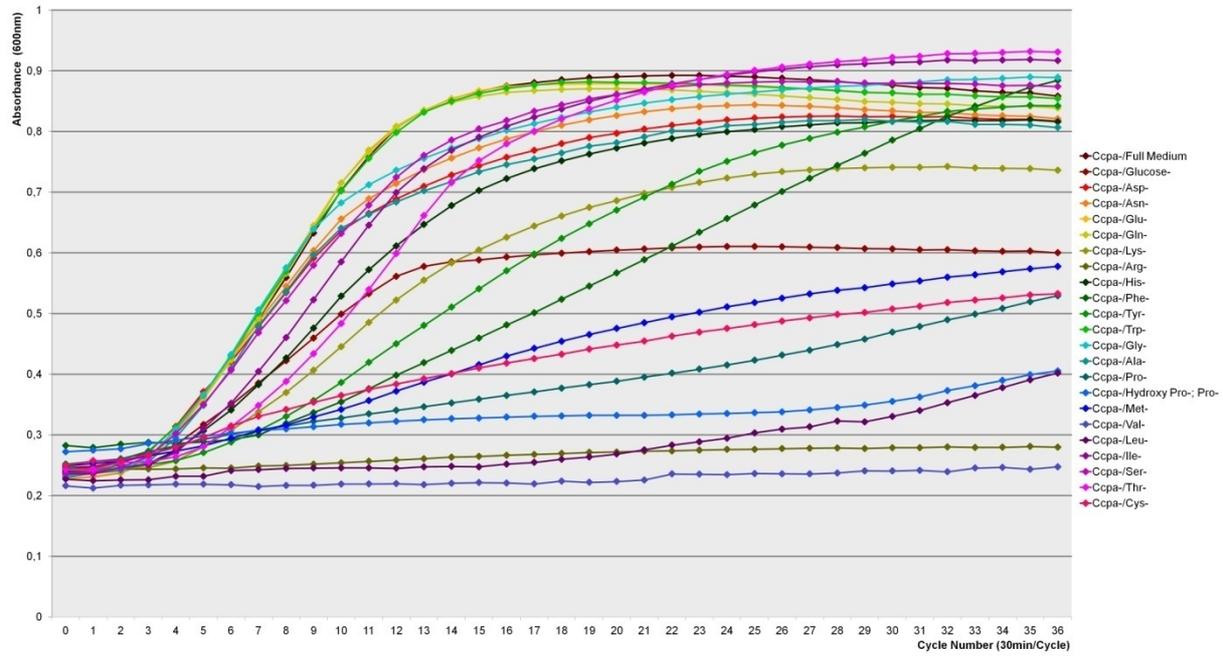


Abbildung 3c: *ccpA*-

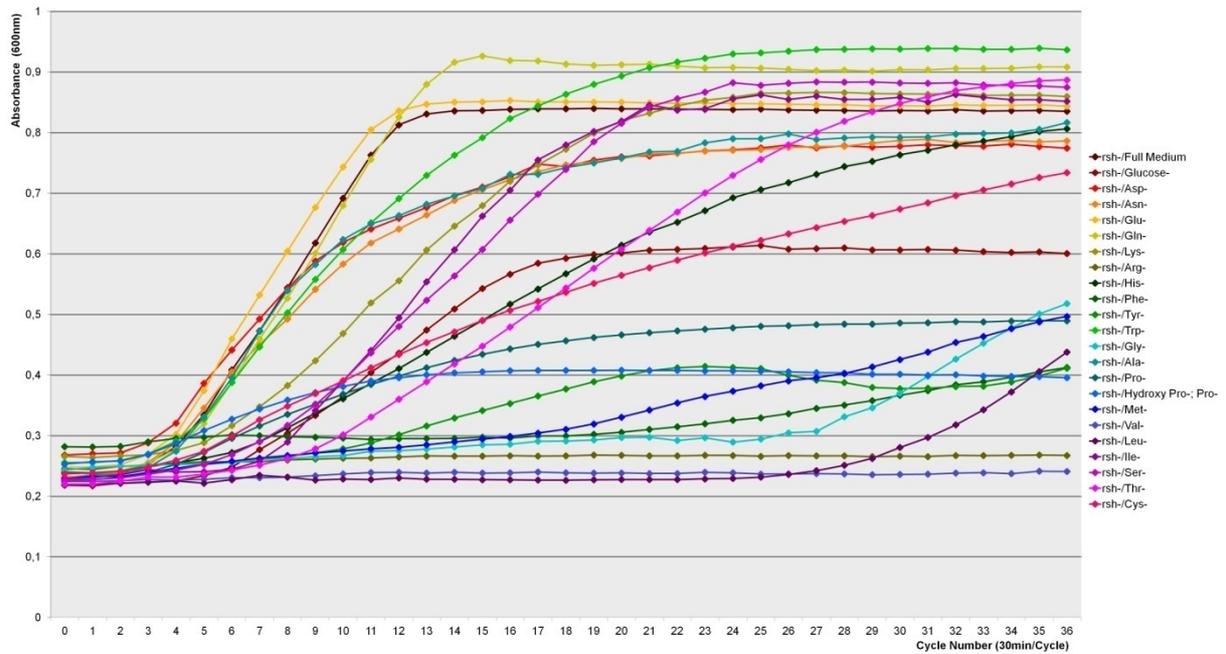


Abbildung 3d: *rsh-*

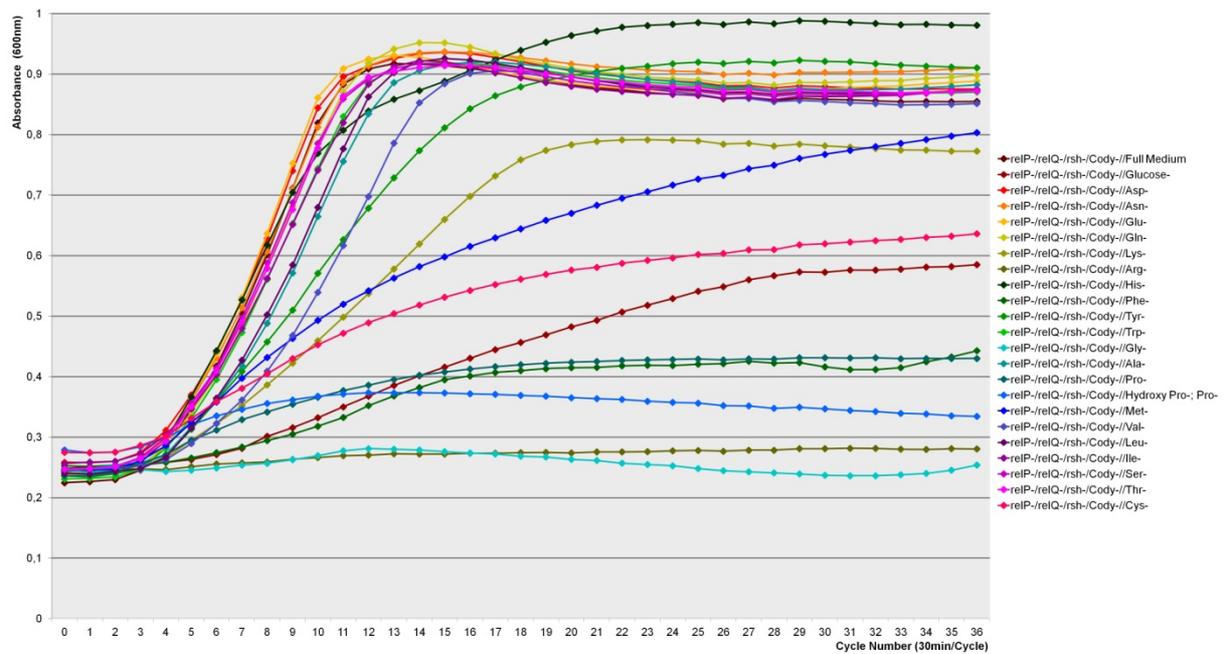


Abbildung 3e: *relP/Q-*; *rsh-*; *codY-*

Abbildung 3a-e: Wachstumskurven: Wachstumskurven der verschiedenen Mutanten (a:WT; b: *codY-*; c: *ccpA-*; d: *rsh-*; e: *relP/Q-*, *codY-*, *rsh-*) in unterschiedlichen AS Minimalmedien.

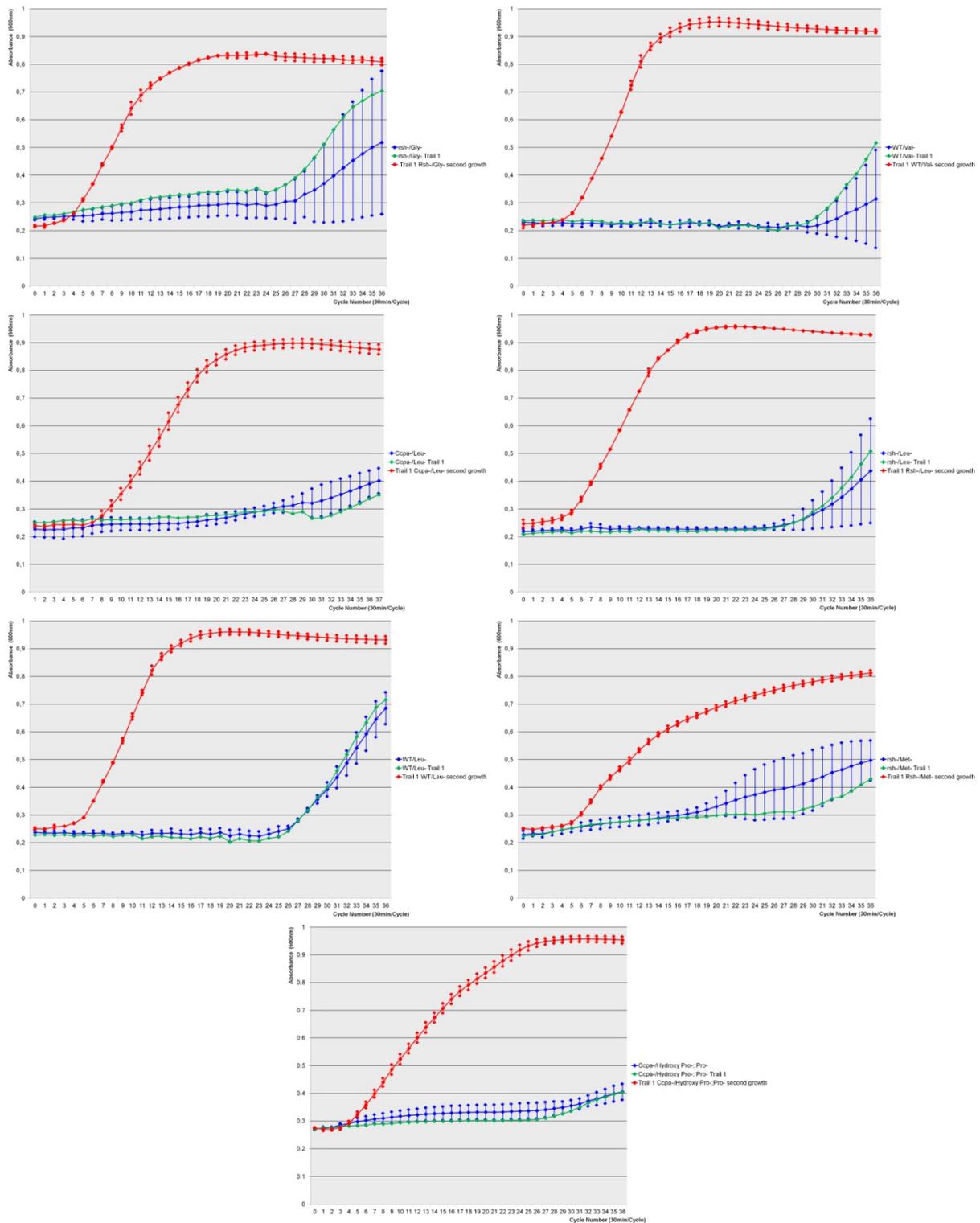


Abbildung 4: Sekundäres Wachstum: In Grün ist die Wachstumskurve der jeweiligen Mutante im jeweiligen AS-Mangelmedium dargestellt. Am Ende des Experiments zeigen alle hier dargestellten Wachstumskurven einen starken Anstieg des Wachstums. In Blau sind die jeweiligen Mittelwerte der experimentellen Durchgänge dargestellt. In Rot ist das Wachstum derselben Bakterien wie in der grünen Kurve in einem zweiten Wachstumsexperiment dargestellt. Hier zeigen die Bakterien ein starkes Wachstum von Beginn an, was einen adaptiven Prozess nahelegt.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Wachstumsmedien

Chemikalien und Medien			
Name	Zusammensetzung/Typ	Menge	Firma/Ort
CDM	A-G werden gemischt und in den B-Gruppen jeweils eine der AS weggelassen		
A	auflösen in Aqua Bidest	10ml	Eigene Herstellung
	Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	100mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	500mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
B I	auf lösen in Aqua Bidest	100ml	Eigene Herstellung
	L-Tryptophan	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	L-Tyrosin	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	L-Phenylalanin	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
B II	auf lösen in Aqua Bidest	100ml	Eigene Herstellung
	L-Cystein	50mg	Sigma-Aldrich(Fluka); St. Louis, Missouri; USA
	L-Histidin	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	L-Methionin	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
B III	auf lösen in Aqua Bidest	10ml	Eigene Herstellung
	L-Glutamin	200mg	Serva Feinbiochemica; Heidelberg; Deutschland
	L-Glutamat	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	Glycin	100mg	Sigma-Aldrich(Fluka); St. Louis, Missouri; USA
	L-Prolin	100mg	Sigma-Aldrich(Fluka); St. Louis, Missouri; USA
B IVa	auf lösen in Aqua Bidest	10ml	Eigene Herstellung
	L-Isoleucin	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	L-Leucin	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	L-Threonin	200mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
	L-Valin	100mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
B IVb	auf lösen in Aqua Bidest	10ml	Eigene Herstellung
	D/L-Alanin	100mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
	L-Arginin	100mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
	L-Aspartat	100mg	Sigma-Aldrich(Fluka); St. Louis, Missouri; USA
	L-Lysin	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	Hydroxy L-Prolin	100mg	Sigma-Aldrich(Fluka); St. Louis, Missouri; USA
	L-Serin	100mg	Sigma-Aldrich(Fluka); St. Louis, Missouri; USA
	L-Asparagin	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
C	auf lösen in Aqua Bidest	200ml	Eigene Herstellung
	p-Aminobenzolsäure	2mg	Sigma-Aldrich(Fluka); St. Louis, Missouri; USA
	Biotin	2mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	Folsäure	8mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
	Niacinamid	10mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	β-Nicotinamid Adenin Dinucleotid	25mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	Panthothenat Calcium Salz	20mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	Pyridoxal/Pyridoxinsäure B6	10mg	Sigma-Aldrich(Fluka); St. Louis, Missouri; USA
	Pyridoxamin Dihydrochlorid	10mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	Riboflavin	20mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	Thiamin Hydrochlorid	10mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	Vitamin B12	1mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
D	auf lösen in Aqua Bidest	100ml	Eigene Herstellung
	Glucose	20g	AppliChem; Darmstadt; Deutschland
E	auf lösen in Aqua Bidest	40ml	Eigene Herstellung
	HCL (2N)	10ml	Merck; Darmstadt; Deutschland
	Adenin	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
	Uracil	100mg	Sigma-Aldrich(Fluka); St. Louis, Missouri; USA
	Guanin Hydrochlorid	100mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA
F	auf lösen in Aqua Bidest	10ml	Eigene Herstellung
	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	4607mg	Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri; USA

G	auflösen in Aqua Bidest	20ml	Eigene Herstellung
	Natriumhydrogenphosphat * 2 H ₂ O	3195mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
	Magnesiumsulfat * 7 H ₂ O	700mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
	Calciumhydrochlorid * 2 H ₂ O	10mg	Merck; Darmstadt; Deutschland
10xPBS	(Phosphate buffered saline)		
	NaCl	170g	Merck; Darmstadt; Deutschland
	Na ₂ HPO ₄ * 12 H ₂ O	28.46g	Merck; Darmstadt; Deutschland
	KH ₂ PO ₄	2.7g	Merck; Darmstadt; Deutschland
	H ₂ O	2000ml	

Tabelle 3: Verwendete Software, Geräte und Materialien

Software, Geräte und Materialien		
Gerät/Material	Type	Firma/Ort
Petrischalen		Greiner Bio-One; Frickenhausen; Deutschland
Test-tubes		Schott; Mainz; Deutschland
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience/GE-Healthcare; Fairfield, Connecticut; USA
37°C Shaker	HT-Infors	Infors; Bottmingen; Schweiz
One-way pipette		Corning Incorporated; Corning, New York; USA
Pipettor	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte; Herrenberg; Deutschland
Pipette		Eppendorf; Hamburg; Deutschland
Pipettenspitzen		Greiner Bio-One; Frickenhausen; Deutschland
1.5ml Cups		Eppendorf; Hamburg; Deutschland
1.5ml Crew Cups		Eppendorf; Hamburg; Deutschland
Plastic tubes 50ml; 20ml		Becton Dickinson; Franklin Lakes, New Jersey; USA
Zentrifuge	Multifuge 3 SR	ThermoScientific; Waltham, Massachusetts; USA
Vortexer	Julabo Paramix 3	Julabo Labortechnik; Seelbach; Deutschland
96 well Platte	Cellstar 96 well, sterile, U-bottom	Greiner Bio-One; Frickenhausen; Deutschland
Tecan Reader	Tecan infinite M200 Pro	Tecan Group Ltd.; Männedorf; Schweiz
Waage	Kern 510	Kern und Sohn; Balingen-Frommern; Deutschland
Magnetrührer	Ikamag RCT	Ika; Staufen; Deutschland
Sterile Filter 0.22µm	Millex-HA, Syringe driven Filter	Merck, Millipore; Billerica; MA, USA
Tecan Software	Tecan I-Control Version 3.7.4.0	Tecan Group Ltd.; Männedorf; Schweiz
yEd-Designer (v3.14.1)	Network construction Software	yWorks GmbH Tübingen; Deutschland
Jimena	Network simulation Software	[57]

ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die vorliegende Arbeit wurde von mir im Zeitraum von Mai 2014 bis April 2019 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Christiane Wolz sowie am Biozentrum am Lehrstuhl für Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Betreuung von Prof. Dr. Thomas Dandekar angefertigt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Christiane Wolz sowie Prof. Dr. Thomas Dandekar. Die Datenrecherche sowie sämtliche Versuche und Experimente und deren Auswertung wurden von mir eigenständig durchgeführt

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde bisher weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Stuttgart, den 27.02.2020

.....
Dr. Christof Audretsch

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Christiane Wolz und Prof. Dr. Thomas Dandekar für die Möglichkeit danken, diese Arbeit anfertigen zu können. Genauso will ich mich aber auch für die Unterstützung, die Hilfe in der Konzeptionierung der Arbeit und bei der praktischen Durchführung der Experimente bedanken. Hier geht auch ein ganz besonderer Dank an das Team im Labor von Prof. Wolz für die Hilfe und Unterstützung.

Danke außerdem allen Menschen, die mich in dieser Zeit begleitet, mich bei der Doktorarbeit, in meiner Ausbildung und bei privaten Herausforderungen unterstützt und so diese Arbeit erst ermöglicht haben. Vielen Dank auch für das Verständnis, aber auch für die Ablenkung und Entspannung, die mir dann eine konzentrierte Rückkehr zur Arbeit ermöglicht haben. Ein besonderer Dank geht hier also insbesondere an meine Familie, meine Freunde, und vor allem an meine Frau Deborah.