

„Kontrolle der bakteriellen Peptidoglykanbiosynthese durch  
Proteinphosphorylierung und regulierte Proteolyse“

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-  
Universität Magdeburg

von M.Sc. Patricia Rothe

geb. am 26.02.1996 in Höxter

Gutachter: Prof. Dr. Marc Bramkamp

Prof. Dr. Sven Halbedel

eingereicht am 26.07.2024

verteidigt am 22.01.2025



## I. Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| I. Inhaltsverzeichnis .....                                                                            | I   |
| II. Abkürzungsverzeichnis .....                                                                        | II  |
| III. Zusammenfassung .....                                                                             | III |
| IV. Summary .....                                                                                      | IV  |
| 1. Einleitung .....                                                                                    | 1   |
| 1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....                                                                | 1   |
| 1.1.1 Infektionszyklus .....                                                                           | 2   |
| 1.1.2 Therapie der Listeriose und Antibiotikaresistenz von<br><i>L. monocytogenes</i> .....            | 5   |
| 1.2 Aufbau der Zellhülle Gram-positiver Bakterien .....                                                | 6   |
| 1.2.1 Peptidoglykan ist der Hauptbestandteil der bakteriellen Zellwand ....                            | 7   |
| 1.2.2 Biosynthese des Peptidoglykans .....                                                             | 8   |
| 1.2.3 Polymerisierung, Quervernetzung und <i>Turnover</i> des<br>Peptidoglykans .....                  | 11  |
| 1.3 Das Divisom steuert die PG-Biosynthese während der Zellteilung .....                               | 13  |
| 1.3.1 Funktion von DivIVA .....                                                                        | 14  |
| 1.3.2 Funktion von GpsB .....                                                                          | 15  |
| 1.4 Das Elongasom steuert die PG-Biosynthese während des<br>Streckungswachstums .....                  | 17  |
| 1.5 Regulation der Peptidoglykanbiosynthese .....                                                      | 18  |
| 1.5.1 Regulation der PG-Biosynthese durch kontrollierte Proteolyse .....                               | 19  |
| 1.5.2 Regulation der PG-Biosynthese durch<br>“ <i>Eukaryotic-like serine/threonine</i> ”-Kinasen ..... | 21  |
| 1.5.3 Regulation der PG-Biosynthese durch den<br>PrkA/ReoM/MurA-Signalweg .....                        | 24  |
| 1.6 Zielsetzung der Arbeit .....                                                                       | 27  |
| 2. Material und Methoden .....                                                                         | 28  |
| 2.1 Bakterienstämme und Plasmide .....                                                                 | 28  |
| 2.2 Kultivierungsbedingungen .....                                                                     | 32  |
| 2.2.1 Nährmedien und Zusätze .....                                                                     | 32  |
| 2.2.2 Zellanzucht und Stammhaltung von <i>L. monocytogenes</i> .....                                   | 32  |
| 2.2.3 Zellanzucht und Stammhaltung von <i>E. coli</i> .....                                            | 33  |
| 2.2 Molekularbiologische Methoden .....                                                                | 34  |
| 2.2.1 Isolation von DNA .....                                                                          | 34  |
| 2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese .....                                                                 | 34  |
| 2.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....                                              | 35  |

|                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.4 Reinigung von PCR-Produkten .....                                                               | 36 |
| 2.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung .....                                                              | 36 |
| 2.2.6 Restriktionsenzymverdau .....                                                                   | 36 |
| 2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten .....                                                               | 36 |
| 2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....                                                            | 37 |
| 2.2.9 Sequenzierung .....                                                                             | 39 |
| 2.2.10 Herstellung rekombinanter <i>E. coli</i> -Stämme .....                                         | 40 |
| 2.2.11 Herstellung rekombinanter <i>L. monocytogenes</i> -Stämme<br>(Monk <i>et al.</i> , 2008) ..... | 41 |
| 2.3 Biochemische Methoden.....                                                                        | 43 |
| 2.3.1 Isolation zellulärer Proteine aus <i>L. monocytogenes</i> .....                                 | 43 |
| 2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung .....                                                           | 44 |
| 2.3.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese .....                                                     | 44 |
| 2.3.4 Eindimensionale SDS-PAGE (Laemmli, 1970).....                                                   | 46 |
| 2.3.5 Kolloidale Coomassiefärbung.....                                                                | 47 |
| 2.3.6 Western-Blot .....                                                                              | 47 |
| 2.3.7 Immundetektion.....                                                                             | 48 |
| 2.3.8 Formaldehyd-Crosslinking und Pulldown .....                                                     | 49 |
| 2.3.9 Reinigung Histidin-markierter Proteine aus <i>L. monocytogenes</i> .....                        | 51 |
| 2.3.10 Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....                                         | 52 |
| 2.3.11 <i>In vitro</i> -Aktivitätsmessung der Carboxyvinyltransferase MurA .....                      | 53 |
| 2.4 Proteomik.....                                                                                    | 54 |
| 2.4.1 Präparation intrazellulärer Proteine aus <i>L. monocytogenes</i> .....                          | 54 |
| 2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....                                                       | 55 |
| 2.4.3 Eindimensionale SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und kolloidale<br>Coomassie-Färbung.....               | 55 |
| 2.4.4 Tryptischer In-Gel-Verdau .....                                                                 | 58 |
| 2.4.5 Extraktion .....                                                                                | 59 |
| 2.4.6 Entsalzen mittels Zip-Tips .....                                                                | 59 |
| 2.4.7 Präparation der Proben für die Analyse .....                                                    | 60 |
| 2.4.8 Auswertung .....                                                                                | 61 |
| 2.5 Physiologische Methoden .....                                                                     | 63 |
| 2.5.1 Wachstumskurven.....                                                                            | 63 |
| 2.5.2 Bestimmung von Antibiotikaresistenzen.....                                                      | 63 |
| 2.5.3 Untersuchung der Lysozymresistenz .....                                                         | 63 |
| 2.5.4 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie .....                                                         | 63 |
| 3. Ergebnisse .....                                                                                   | 65 |
| 3.1 Nachweis der Phosphorylierung von ReoM <i>in vivo</i> .....                                       | 65 |

|                                                                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.1 Differenzierung der ReoM-Phosphorylierung anhand des Laufverhaltens in einer nativen PAGE .....                 | 65  |
| 3.1.2 Verifizierung der ReoM-Phosphorylierung.....                                                                    | 67  |
| 3.1.3 Auswirkung der ReoM-Phosphorylierung auf die Interaktion mit MurA und die MurA-Aktivität .....                  | 69  |
| 3.2 Die Akkumulation von MurA verringert die Phosphorylierung von ReoM .....                                          | 71  |
| 3.2.1 Änderung der ReoM-Phosphorylierung bei intrazellulärer Akkumulation von MurA .....                              | 72  |
| 3.2.2 Einfluss von MurZ auf die ReoM-Phosphorylierung .....                                                           | 75  |
| 3.2.3 Charakterisierung der <i>escape</i> Mutationen <i>murA N197D</i> und <i>murA S262L</i> .....                    | 76  |
| 3.2.4 Notwendigkeit der Interaktion zwischen MurA und ReoM für die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung .....          | 78  |
| 3.2.5 Notwendigkeit der Substratbindung und Enzymaktivität von MurA für die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung ..... | 79  |
| 3.3 Einfluss extrazellulärer Signale auf die Phosphorylierung von ReoM .....                                          | 81  |
| 3.3.1 Relevanz der PASTA-Domänen von PrkA für die Kinaseaktivität und Phosphorylierung von ReoM .....                 | 81  |
| 3.3.2 Einfluss von Lipid II auf die Phosphorylierung von ReoM.....                                                    | 83  |
| 3.4 Änderung der ReoM-Phosphorylierung durch Erhöhung der PG-Biosynthese .....                                        | 85  |
| 3.5 Einfluss des Elongasoms und Divisoms auf die ReoM-Phosphorylierung .....                                          | 86  |
| 3.6 Einfluss von GpsB auf die ReoM-Phosphorylierung .....                                                             | 88  |
| 3.7 Vergleich der Phänotypen von $\Delta$ <i>gpsB</i> - und <i>prkA</i> $\Delta$ <i>C</i> -Mutanten.....              | 91  |
| 3.8 Untersuchung der ReoM-Phosphorylierung bei veränderten Wachstumsbedingungen .....                                 | 94  |
| 3.8.1 Einfluss der Wachstumstemperatur und Wachstumsphase auf die ReoM-Phosphorylierung.....                          | 94  |
| 3.8.2 Abhängigkeit der verminderten ReoM-Phosphorylierung in der stationären Wachstumsphase von PrpC .....            | 96  |
| 3.9 Vergleich der Proteome von LMJR138 ( $\Delta$ <i>clpC</i> ) und LMSW30 ( $\Delta$ <i>reoM</i> )..                 | 97  |
| 3.9.1 Herstellung eines ReoY-Antiserums.....                                                                          | 104 |
| 4. Diskussion .....                                                                                                   | 106 |
| 4.1 ReoM liegt <i>in vivo</i> in drei Phosphorylierungszuständen vor.....                                             | 106 |
| 4.2 Die Phosphorylierung von ReoM an T7 beeinträchtigt die Interaktion mit MurA.....                                  | 108 |
| 4.3 Die ReoM-Phosphorylierung wird durch die Akkumulation von MurA beeinflusst .....                                  | 110 |

|                                                                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.1 Die intrazelluläre Akkumulation von MurA reduziert die Phosphorylierung von ReoM .....                           | 110 |
| 4.3.2 Die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung wird nicht durch die Steigerung der PG-Biosynthese verursacht .....      | 111 |
| 4.3.3 PrkA und MurA konkurrieren um den Bindungspartner ReoM .....                                                     | 113 |
| 4.5 Die Kontrolle der ReoM-Phosphorylierung ist an die Aktivität und Substratbindung von MurA gekoppelt.....           | 116 |
| 4.6 Die PASTA-Domänen sind für die vollständige Aktivität der Kinase PrkA notwendig.....                               | 118 |
| 4.7 Lipid II ist kein Signalmolekül von PrkA .....                                                                     | 119 |
| 4.8 Die Störung der Zellteilung oder der Zellverlängerung hat keine Auswirkung auf die Phosphorylierung von ReoM ..... | 121 |
| 4.9 GpsB ist ein Aktivator von PrkA.....                                                                               | 121 |
| 4.10 Für die Aktivierung von PrkA muss GpsB in der Lage sein, eine Hexamerstruktur zu bilden.....                      | 124 |
| 4.11 Die Wachstumsphasenabhängige Reduktion der PG-Biosynthese wird von PrpC kontrolliert.....                         | 126 |
| 4.12 ReoM steuert primär den Abbau von MurA.....                                                                       | 127 |
| Literaturverzeichnis .....                                                                                             | 131 |
| Anhang.....                                                                                                            | 160 |
| Ehrenerklärung.....                                                                                                    | 169 |

## II. Abkürzungsverzeichnis

|            |                                                                                      |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| °C         | Grad Celsius                                                                         |
| % (v/v)    | Volumenprozent                                                                       |
| % (w/v)    | Massenprozent                                                                        |
| A595       | Absorption bei 595 nm                                                                |
| ad.        | auffüllen auf                                                                        |
| APS        | Ammoniumpersulfat                                                                    |
| AS         | Aminosäure                                                                           |
| ATP        | Adenosintriphosphat                                                                  |
| ATPase     | Adenosintriphosphatase                                                               |
| BACTH      | <i>bacterial two hybrid</i>                                                          |
| BHI        | <i>Brain Heart Infusion</i>                                                          |
| bidest.    | doppelt destilliert                                                                  |
| bla        | β-Lactamase                                                                          |
| bp         | Basenpaare                                                                           |
| BSA        | Rinderserumalbumin                                                                   |
| CAP        | <i>covalently attached protein</i>                                                   |
| C-Terminus | Carboxyterminus                                                                      |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid                                                                     |
| DNA        | Desoxyribonukleinsäure                                                               |
| dNTP       | Desoxynukleosidtriphosphat                                                           |
| EDTA       | Ethylendiamintetraacetat                                                             |
| erm        | Erythromycin                                                                         |
| eSTK       | <i>eukaryotic-like serine and threonine kinases</i>                                  |
| fw         | <i>forward</i>                                                                       |
| g          | Gramm                                                                                |
| GlcNAc     | N-Acetylglucosamin                                                                   |
| GTase      | Transglykosylase                                                                     |
| h          | Stunde                                                                               |
| HADA       | 3-[[[(7-Hydroxy-2-oxo-2H-1-Benzopyran-3-yl)Carbonyl]Amino]-<br>D-Alanin-Hydrochlorid |
| HEPES      | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure                                |
| HMW        | Hohe molekulare Masse ( <i>high molecular weight</i> )                               |
| HRP        | <i>horseradish peroxidase</i>                                                        |
| i          | IPTG-induzierbar                                                                     |
| IgG        | Immunglobulin G                                                                      |

## II. Abkürzungsverzeichnis

|                   |                                                                          |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| IMP               | <i>integral membrane protein</i>                                         |
| InIA              | Internalin A                                                             |
| InIB              | Internalin B                                                             |
| kb                | Kilobasenpaare                                                           |
| l                 | Liter                                                                    |
| LB                | Luria Bertani                                                            |
| LC                | Flüssigchromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )                  |
| LLO               | Listeriolysin O                                                          |
| LMW               | niedrige molekulare Masse ( <i>low molecular weight</i> )                |
| LTA               | Lipoteichonsäure                                                         |
| kan               | Kanamycin                                                                |
| kDa               | Kilodalton                                                               |
| M                 | molar                                                                    |
| mg                | Milligramm                                                               |
| MHK               | minimale Hemmkonzentration                                               |
| mm                | Millimeter                                                               |
| mM                | millimolar                                                               |
| min               | Minute                                                                   |
| MurNAc            | <i>N</i> -Acetylmuraminsäure                                             |
| MS                | Massenspektrometrie ( <i>mass spectrometry</i> )                         |
| MW                | Molekulargewicht                                                         |
| N-Terminus        | Aminotерminus                                                            |
| <i>neo</i>        | Neomycin                                                                 |
| nm                | Nanometer                                                                |
| OD                | Optische Dichte                                                          |
| P                 | Phosphat (gebunden)                                                      |
| PAGE              | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                          |
| PASTA             | <i>penicillin-binding protein and serine/threonine kinase-associated</i> |
| PBP               | Penicillin-bindende Proteine                                             |
| PBS               | Phosphat-gepufferte Salzlösung                                           |
| PCR               | Polymerasekettenreaktion                                                 |
| PEP               | Phosphoenolpyruvat                                                       |
| $P_{\text{help}}$ | IPTG-induzierbarer Promotor                                              |
| PMSF              | Phenylmethylsulfonylfluorid                                              |
| PVDF              | Polyvinylidenfluorid                                                     |

## II. Abkürzungsverzeichnis

|            |                                                         |
|------------|---------------------------------------------------------|
| RNA        | Ribonukleinsäure                                        |
| rpm        | Umdrehungen pro Minute                                  |
| RT         | Raumtemperatur                                          |
| s          | Sekunde                                                 |
| SDS        | Natriumdodecylsulfat                                    |
| SEDS       | <i>shape, elongation, division and sporulation</i>      |
| SGWB       | Sucrose-Glycerol-Waschpuffer                            |
| <i>shg</i> | <i>suppression of heat sensitive growth</i>             |
| t          | Zeit                                                    |
| TAE        | Tris-Acetate-EDTA                                       |
| TCS        | Zweikomponentensystemen ( <i>two component system</i> ) |
| TE         | Tris-EDTA                                               |
| TEMED      | Tetramethylethyldiamin                                  |
| TPase      | Transpeptidase                                          |
| Tris       | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                         |
| TRITC      | Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat                       |
| UDP        | Uridindiphosphat                                        |
| ULC        | <i>ultra liquid chromatography</i>                      |
| UPLC       | <i>ultra performance liquid chromatography</i>          |
| UPR        | <i>unfolded protein response</i>                        |
| UTP        | Uridintriphosphat                                       |
| UV         | Ultraviolett                                            |
| V          | Volt                                                    |
| WT         | Wildtyp                                                 |
| WTA        | Wandteichonsäure                                        |
| X-Gal      | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid   |
| x g        | relative Zentrifugalkraft                               |
| $\mu$ F    | Mikrofarad                                              |
| $\mu$ g    | Mikrogramm                                              |
| $\mu$ l    | Mikroliter                                              |
| $\mu$ M    | mikromolar                                              |
| $\mu$ m    | Mikrometer                                              |
| $\lambda$  | Wellenlänge                                             |
| $\Omega$   | Ohm                                                     |

### Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

|   |     |                |   |     |            |
|---|-----|----------------|---|-----|------------|
| A | Ala | Alanin         | M | Met | Methionin  |
| C | Cys | Cystein        | N | Asn | Asparagin  |
| D | Asp | Asparaginsäure | P | Pro | Prolin     |
| E | Glu | Glutaminsäure  | Q | Gln | Glutamin   |
| F | Phe | Phenylalanin   | R | Arg | Arginin    |
| G | Gly | Glycin         | S | Ser | Serin      |
| H | His | Histidin       | T | Thr | Threonin   |
| I | Ile | Isoleucin      | V | Val | Valin      |
| K | Lys | Lysin          | W | Trp | Tryptophan |
| L | Leu | Leucin         | Y | Tyr | Tyrosin    |

### III. Zusammenfassung

Die zentrale Komponente der Zellhülle von Gram-positiven Bakterien ist die Zellwand, die durch eine dicke Peptidoglykanschicht gekennzeichnet ist. Der Peptidoglykansacculus verleiht der Zelle Stabilität und Form und schützt sie vor Umwelteinflüssen. Damit die Bakterienzelle in der Lage ist zu wachsen und sich zu teilen, findet ein ständiger Umbau des Peptidoglykannetzwerks statt. Zu diesem Zweck ist die Biosynthese neuer Peptidoglykanbausteine erforderlich. Um zu verhindern, dass die Biosynthese zu viele Ressourcen verbraucht, wird sie auf verschiedenen Ebenen streng reguliert. Eine Form der Regulation betrifft den proteolytischen Abbau von MurA, dem ersten Enzym des Biosyntheseweges. MurA wird durch die Protease ClpCP in Gegenwart von nicht-phosphoryliertem ReoM abgebaut, was zur Verringerung der Peptidoglykanbiosynthese führt. Wird ReoM jedoch durch die PASTA-eSTK PrkA phosphoryliert, ist die Interaktion von ReoM mit MurA gehemmt, der Abbau von MurA wird verhindert und die Peptidoglykanbiosynthese stabilisiert sich. Durch die Phosphatase PrpC kann die Phosphorylierung von ReoM rückgängig gemacht werden. Um herauszufinden, ob die Peptidoglykanbiosynthese stattfindet oder nicht, wurde der Phosphorylierungszustand von ReoM *in vivo* untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Peptidoglykanbiosynthese in der späten stationären Wachstumsphase durch die PrpC-abhängige Abnahme der ReoM-Phosphorylierung heruntergefahren wird. Die intrazelluläre Anreicherung von MurA führte ebenfalls zur Abnahme der Phosphorylierung von ReoM. Dies erforderte einen direkten Kontakt zwischen ReoM und MurA, sowie die enzymatische Aktivität von MurA und die Bindung der Substrate. Weitere Faktoren, die die ReoM-Phosphorylierung steuern, sind GpsB als Aktivator von PrkA und die PASTA-Domänen von PrkA, die ebenfalls für die volle Kinaseaktivität erforderlich sind. Proteomdaten legen außerdem nahe, dass ReoM spezifisch die ClpCP-abhängige Proteolyse von MurA steuert.

## IV. Summary

The central component of the cell envelope of Gram-positive bacteria is the cell wall, which is characterised by a thick peptidoglycan layer. The peptidoglycan sacculus ensures the stability and shape of the cell and protects it against harsh environmental conditions. In order to be able to grow and divide, a constant remodelling of the peptidoglycan network takes place. This requires the biosynthesis of new peptidoglycan building blocks. However, in order to prevent the excessive consumption of resources during peptidoglycan biosynthesis, it is strictly regulated at various levels. One form of regulation concerns the proteolytic degradation of MurA, the first enzyme in the biosynthetic pathway. In the presence of non-phosphorylated ReoM, MurA is degraded by the protease ClpCP, which leads to a reduction in peptidoglycan biosynthesis. However, ReoM can be phosphorylated by the PASTA-eSTK PrkA. This phosphorylation inhibits the interaction between ReoM and MurA and prevents the degradation of MurA. As a result, the biosynthesis of peptidoglycan is maintained. The phosphatase PrpC can reverse the phosphorylation of ReoM. To see under which conditions peptidoglycan biosynthesis takes place or not, the phosphorylation state of ReoM was analysed *in vivo*. The results show that peptidoglycan biosynthesis is down-regulated in the late stationary phase of growth by the PrpC-dependent decrease in ReoM phosphorylation. The intracellular accumulation of MurA also led to a decrease in the phosphorylation of ReoM. For this direct contact between ReoM and MurA. This required direct contact between ReoM and MurA. MurA also had to be enzymatically active and able to bind its substrates. Other factors controlling ReoM phosphorylation were GpsB, which acts as an activator of PrkA, and the PASTA domains of PrkA, which are also required for full kinase activity. Proteomic data also suggest that ReoM specifically controls ClpCP-dependent proteolysis of MurA.

# 1. Einleitung

## 1.1 *Listeria monocytogenes*

Der Organismus *Listeria monocytogenes* wurde erstmals 1926 von Murray *et al.* beschrieben. Er isolierte das Bakterium aus kranken Laborkaninchen und -Meerschweinchen (Murray *et al.*, 1926). Im Jahr 1983 wurde es dann als lebensmittelassoziiertes Humanpathogen identifiziert (Schlech *et al.*, 1983). *Listeria monocytogenes* wird dem Phylum *Bacillota* (ehemals *Firmicutes*) zugeordnet (Oren & Garrity, 2021). Darin gehört es zur Klasse der *Bacilli* und zur Familie der *Listeriaceae*, welche die Gattungen *Listeria* und *Brochothrix* umfasst (Ludwig *et al.*, 2009). Insgesamt gibt es 28 *Listeria*-Arten (Stand 2023), von denen aber nur *Listeria monocytogenes* und *Listeria ivanovii* als Humanpathogene auftreten (Orsi *et al.*, 2023). Einmalig wurde auch die Infektion eines Menschen mit *L. seeligeri* nachgewiesen (McLauchlin *et al.*, 2004). Die 28 *Listeria*-Arten lassen sich in vier Kladen einteilen: *Listeria*, *Mesolisteria*, *Paenilisteria* und *Murraya* (Orsi *et al.*, 2023). Die Klade *Listeria* umfasst 10 Arten, die durch ihre enge Verwandtschaft mit *L. monocytogenes* auch der Gruppe *Listeria sensu stricto* zugeordnet werden (Orsi *et al.*, 2023). Die 18 anderen *Listeria*-Arten, die eine geringere phylogenetische Verwandtschaft mit *L. monocytogenes* aufweisen, werden der Gruppe *Listeria sensu lato* zugewiesen (Orsi *et al.*, 2023). Auf Basis der somatischen und flagellaren Antigene kann die Art *L. monocytogenes* in 13 verschiedene Serotypen eingeteilt werden (Orsi *et al.*, 2011). Trotz dieser Vielfalt sind jedoch die meisten registrierten *L. monocytogenes*-Infektionen auf die Serotypen 1/2a, 1/2b oder 4b zurückzuführen (im Vereinigten Königreich) (McLauchlin *et al.*, 2004).

*Listeria spp.* werden allgemein als Gram-positive Bakterien mit einem niedrigen G+C-Gehalt beschrieben. Sie besitzen eine stäbchenförmige Morphologie und bilden weder Kapseln noch Sporen aus. Weiterhin können sie unter aeroben und anaeroben Bedingungen leben (Collins *et al.*, 1991, Khelef *et al.*, 2006, Ludwig *et al.*, 2009). Die Art *L. monocytogenes* ist ubiquitär verbreitet. Man findet das Bakterium in Gewässern und dem Boden, aber auch in Nahrungsmitteln, sowie in Tieren und im Menschen (Hamon *et al.*, 2006). Bei Temperaturen von 20-25 °C ist das Bakterium motil (Orsi *et al.*, 2023). Als *L. monocytogenes*-Laborstämme

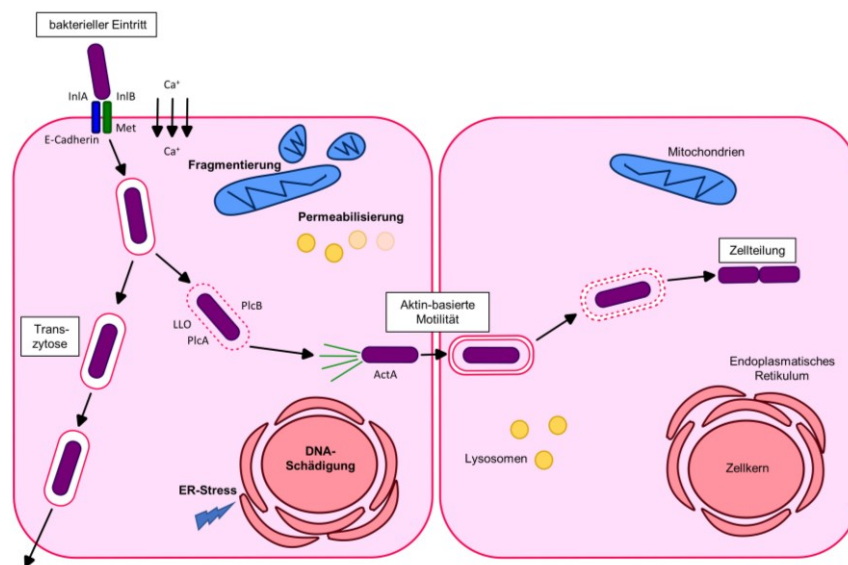
haben sich drei Stämme des Serotyps 1/2a etabliert: EGD, EGD-e und 10403S. Dabei unterscheidet sich EGD-e genetisch deutlich von den anderen beiden Stämmen und ist näher mit dem Serotyp 1/2c verwandt (Ragon *et al.*, 2008, Bécavin *et al.*, 2014). Da *L. monocytogenes* Umweltstressoren wie einem niedrigeren pH-Wert oder einer hohen Salzkonzentration standhalten kann und auch bei niedrigen Temperaturen von 2–4 °C wächst, stellt das Bakterium ein Risiko für die Nahrungsmittelindustrie dar (Tasara & Stephan, 2006, Gandhi & Chikindas, 2007). Von dort aus kann es durch die Aufnahme kontaminierter Nahrung in den Menschen gelangen und die Infektionskrankheit Listeriose verursachen (Schlech *et al.*, 1983, Schlech, 2019). Als nicht-invasive Form der Infektion mit *Listeria monocytogenes* bildet sich eine fiebrige Gastroenteritis aus (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007). Auch von kutanen Infektionen, die durch direkten Hautkontakt mit *L. monocytogenes* entstehen, wurde berichtet (McLauchlin & Low, 1994). Invasive Formen der Listeriose umfassen die schwangerschaftsassozierte und neonatale Listeriose, die Bakteriämie oder septische Listeriose und Infektionen des zentralen Nervensystems, wie eine Meningitis oder Meningoenzephalitis (McLauchlin, 1990, Mylonakis *et al.*, 1998, Mylonakis *et al.*, 2002, Koopmans *et al.*, 2023). Risiken für eine Bakteriämie und Neurolisteriose sind unter anderem ein höheres Alter, bestehende schwere Erkrankungen, angeborene Immundefekte oder eine Immunschwäche z.B. durch immunsuppressive Therapien (Goulet *et al.*, 2011, Charlier *et al.*, 2017). Entscheidend für die Infektion des zentralen Nervensystems sowie des Fötus, ist die Fähigkeit von *L. monocytogenes* die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta-Schranke überwinden zu können (Drevets *et al.*, 1995, Bakardjiev *et al.*, 2006, Koopmans *et al.*, 2023). Aus diesen Faktoren ergibt sich trotz geringer jährlicher Inzidenz von 0,1 bis 11,3 Fällen pro Million Einwohnern eine hohe Fallsterblichkeit der Listeriose von 20-30 % (Swaminathan & Gerner-Smidt, 2007).

### 1.1.1 Infektionszyklus

Nach der oralen Aufnahme von *L. monocytogenes* kann das Pathogen über den Darm in den Blutkreislauf gelangen. Über das Blut erreicht es die primären Zielgewebe Leber und Milz, in denen es sich vermehrt (Radoshevich & Cossart, 2018). Bei vulnerablen Personen kann es außerdem sekundär über das Blut zum

Gehirn oder der Plazenta gelangen (Drevets *et al.*, 1995, Bakardjiev *et al.*, 2006, Radoshevich & Cossart, 2018). Auf zellulärer Ebene wird *L. monocytogenes* entweder durch phagozytäre Zellen aufgenommen oder gelangt in nicht-phagozytäre Zellen, wie Epithelzellen, über rezeptorvermittelte Endozytose (vgl. Abb.: 1) (Radoshevich & Cossart, 2018). Dazu binden Internalin A (InlA) oder Internalin B (InlB) von *L. monocytogenes* an die eukaryontischen Zellmembran-Rezeptoren E-Cadherin oder *hepatocyte growth factor receptor* (Met), wodurch die Aufnahme des Bakteriums seitens der Wirtszelle ausgelöst wird (Gaillard *et al.*, 1991, Mengaud *et al.*, 1996, Shen *et al.*, 2000, Radoshevich & Cossart, 2018). Zusätzlich fördert die Exkretion des porenbildenden Toxins Listeriolysin O (LLO) die Invasion des Pathogens durch die Induktion eines Einstroms von Kalziumionen (Dramsı & Cossart, 2003, Vadia *et al.*, 2011). Durch die Aufnahme in die eukaryontische Zelle ist das Bakterium zunächst von einer weiteren Membran umgeben und befindet sich in der sogenannten Internalisierungsvakuole aus der es herausgelangen muss (Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018). Dazu werden Listeriolysin O (LLO) und die Phospholipasen A (PlcA) und B (PlcB) sekretiert, welche die Membran aufbrechen (Mengaud *et al.*, 1987, Tilney & Portnoy, 1989, Camilli *et al.*, 1991, Vazquez-Boland *et al.*, 1992, Marquis *et al.*, 1995). In Makrophagen kann *L. monocytogenes* sich auch innerhalb der Phagosomen, also der Organellen, die endozytotisch aufgenommenes Material enthalten, vermehren (Birmingham *et al.*, 2008). Und auch in Hepatocyten und Trophoblasten konnten Listerien persistierend in Lysosomen-ähnlichen Vakuolen gefunden werden (Kortebi *et al.*, 2017). Um die Darmbarriere zu überwinden, bleibt das Bakterium ebenfalls in der Internalisierungsvakuole mit der die Transzytose durch die Becherzellen ermöglicht wird (Nikitas *et al.*, 2011). Nach dem Aufbrechen der Internalisierungsvakuole kann sich *L. monocytogenes* im Zytosol der Wirtszelle vermehren und verursacht diverse Veränderung der Wirtszellenmorphologie um die Infektion zu fördern (Jones & Portnoy, 1994, Glomski *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2017). Auch dabei spielt die Ausschüttung von LLO eine Rolle. LLO verursacht unter anderem eine Veränderung der Mitochondrienmorphologie, welche die Vermehrung von *L. monocytogenes* durch einen noch unbekannten Mechanismus fördert (Stavru *et al.*, 2011, Radoshevich & Cossart, 2018). Des Weiteren führt LLO zu einer Erhöhung der *unfolded protein response* (UPR) des

Endoplasmatischen Retikulums (ER), einer Signalkaskade, welche die Funktionsfähigkeit des Organelles unter Stress sicherstellt (Pillich *et al.*, 2012). Zusätzlich wird die Membranintegrität der Lysosomen durch LLO beeinträchtigt (Malet *et al.*, 2017). Wie diese Veränderungen der Wirtszelle die Infektion mit *L. monocytogenes* fördern, ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt (Pillich *et al.*, 2012, Malet *et al.*, 2017, Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018). *L. monocytogenes* kann auch die DNA-Stabilität und Genexpression der Wirtszelle modulieren oder epigenetische Veränderungen hervorrufen, welche die Infektion unterstützen (Hamon *et al.*, 2007, Lebreton *et al.*, 2011, Samba-Louaka *et al.*, 2012, Eskandarian *et al.*, 2013, Leitão *et al.*, 2014, Samba-Louaka *et al.*, 2014, Prokop *et al.*, 2017, Pizarro-Cerdá & Cossart, 2018). Die Ausbreitung von *L. monocytogenes* in benachbarte Zellen findet durch die ActA-abhängige Polymerisation von Aktin statt mit der das Bakterium direkt vom Zytosol der primär infizierten Zelle in das Zytosol der angrenzenden Zelle gelangen kann (Tilney & Portnoy, 1989, Kocks *et al.*, 1992).



**Abbildung 1: Infektionszyklus von *L. monocytogenes* in eukaryontischen, nicht-phagozytierenden Zellen. Adaptiert von Radoshevich & Cossart, 2018.**

Der bakterielle Eintritt findet über rezeptorvermittelte Endozytose statt. Das Bakterium kann innerhalb der Internalisierungsvakuole in Form von Transzytose durch Becherzellen wandern. In anderen Wirtszellen entkommt *L. monocytogenes* der Vakuole durch die Ausschüttung von Listeriolysin (LLO), Phospholipase A (PlcA) und PlcB. Anschließend kann das Bakterium durch die Polymerisation von Aktin in benachbarte Zellen gelangen. Innerhalb des Zytosols findet die Vermehrung statt. Hervorgehoben sind die möglichen zellulären Veränderungen der Wirtszelle durch die Infektion, wie mitochondrialer- und ER-Stress, sowie DNA- und Lysosomschädigungen (Radoshevich & Cossart, 2018).

### 1.1.2 Therapie der Listeriose und Antibiotikaresistenz von *L. monocytogenes*

Um die Ausbreitung von *L. monocytogenes* im menschlichen Körper einzudämmen und Komplikationen, Langzeitfolgen, sowie Sterblichkeit durch die Listeriose zu vermeiden, ist eine rasche antimikrobielle Behandlung notwendig (Pelegrín *et al.*, 2014, Arslan *et al.*, 2015, Thønnings *et al.*, 2016, Charlier *et al.*, 2017, Lim *et al.*, 2017, Koopmans *et al.*, 2023). Häufig werden die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika Penicillin, Ampicillin oder Amoxicillin zur ersten Behandlung der Listeriose eingesetzt (Hof *et al.*, 1997, Temple & Nahata, 2000, van de Beek *et al.*, 2012, Charlier *et al.*, 2017, Koopmans *et al.*, 2023). Da diese Antibiotika nur einen bakteriostatischen Effekt gegen intrazelluläre *L. monocytogenes* haben, werden sie oft in Kombination mit einem Aminoglykosid verabreicht (Merle-Melet *et al.*, 1996, Hof *et al.*, 1997, Charlier *et al.*, 2017). Eine Alternative bildet die Behandlung der Listeriose mit Cotrimoxazol. Dieses Antibiotikum ist ein Gemisch aus Trimethoprim und Sulfamethoxazol und hat sich als effektiv gegenüber extra- und intrazelluläre *L. monocytogenes* erwiesen (Winslow & Pankey, 1982, Minkowski *et al.*, 2001, van de Beek *et al.*, 2012, van de Beek *et al.*, 2016).

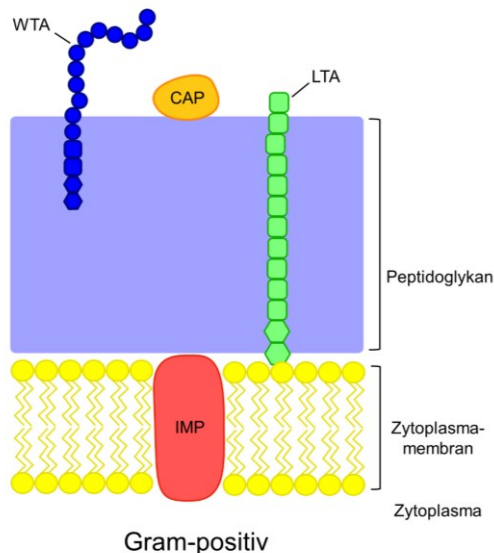
Als Besonderheit besitzen fast alle *Listeria*-Arten eine natürliche Resistenz gegenüber den Zellwandantibiotika der Gruppe der (modernen) Cephalosporine und Fosfomycin (Espaze & Reynaud, 1988, Hof *et al.*, 1997, Troxler *et al.*, 2000, Scortti *et al.*, 2006). Cephalosporine gehören zur Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Newton & Abraham, 1955, Marshall & Blair, 1999). Diese Gruppe von Antibiotika stört die bakterielle Zellwandbiosynthese durch die Bindung an sogenannte Penicillin-bindende Proteine (PBP), die als Transpeptidasen und Carboxypeptidasen für die Quervernetzung der Zellwand notwendig sind. Die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika beeinträchtigen somit die Funktionsfähigkeit der PBPs, was die bakterielle Zelllyse zur Folge haben kann (Spratt, 1975, Heesemann, 1993). Die Ursache für die intrinsische Resistenz von *L. monocytogenes* gegenüber dieser Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist multifaktoriell. Dazu tragen PBPs, aber auch *multidrug resistance transporter* (MDR), Proteine der Peptidoglykanbiosynthese und -modifikation, Zellhüllenproteine mit Entgiftungsfunktion, regulatorische Proteine, sowie zytoplasmatische Proteine mit noch unbekannter Funktion bei (Mata *et al.*, 2000, Guinane *et al.*, 2006, Zawadzka-Skomiał *et al.*, 2006, Gottschalk *et al.*, 2008, van de Velde *et al.*, 2009,

Collins *et al.*, 2010a, Collins *et al.*, 2010b, Aubry *et al.*, 2011, Rae *et al.*, 2011, Nielsen *et al.*, 2012, Rismondo *et al.*, 2015, Krawczyk-Balska & Markiewicz, 2016). Das andere Antibiotikum, gegenüber dem *L. monocytogenes* eine natürliche Resistenz besitzt, ist Fosfomycin. Fosfomycin inhibiert die Peptidoglykanbiosynthese (PG-Biosynthese) durch die Inaktivierung der UDP-*N*-Acetylglukosamin-3-Enolpyruvattransferase MurA, welche den ersten Schritt der PG-Biosynthese katalysiert (vgl. Abb.: 3) (Marquardt *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 1996). MurA bildet UDP-*N*-Acetylglukosaminolpyruvat aus UDP-*N*-Acetylglukosamin (GlcNAc) und Phosphoenolpyruvat (PEP) (Gunetileke & Anwar, 1968, Marquardt *et al.*, 1992). Diese Reaktion wird durch Fosfomycin verhindert, indem es als Phosphoenolpyruvat-Analogon kovalent an das katalytisch relevante Cystein von MurA bindet (Kahan *et al.*, 1974, Marquardt *et al.*, 1994). In *E. coli* befindet sich dieses Cystein an Position 115 der Aminosäurekette von MurA (Marquardt *et al.*, 1992, Kim *et al.*, 1996). Die Resistenz von *L. monocytogenes* gegenüber Fosfomycin ist auf die Anwesenheit des Gens *fosX* (*lmo1702*) zurückzuführen. Es codiert das gleichnamige Enzym, welches die Hydratation von Fosfomycin katalysiert und damit die Resistenz verursacht (Fillgrove *et al.*, 2003, Fillgrove *et al.*, 2007). Weitere Determinanten der Fosfomycinresistenz sind die Aufnahmesysteme Opp und Hpt, welche das Antibiotikum in die Bakterienzelle transportieren können (Scotti *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2022).

### 1.2 Aufbau der Zellhülle Gram-positiver Bakterien

Sowohl Fosfomycin als auch Cephalosporine wirken antimikrobiell, indem sie die bakterielle Zellwandbiosynthese stören (Marquardt *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 1996, Marshall & Blair, 1999). Die Zellhülle Gram-positiver Bakterien zeichnet sich durch eine besonders dicke Zellwand aus (vgl. Abb.: 2) (Rohde, 2019). Sie besteht aus vielen Schichten von Peptidoglykansträngen. In Zahlen ausgedrückt, besitzt die Zellwand von Gram-positiven Bakterien eine Dicke von 30-100 nm und dient dazu die Zellform zu erhalten und das Bakterium gegen widrige Umweltbedingungen abzuschirmen (Rohde, 2019). Die Peptidoglykanschicht wird von langen anionischen Polymeren durchzogen, den sogenannten Teichonsäuren. Diese bestehen größtenteils aus Glycerinphosphat oder Ribitolphosphat und sind an Glykosyl- und D-Alanylesterreste gebunden. Dabei ist die Klasse der

Wandteichonsäuren kovalent an das Peptidoglykan gebunden, während die Lipoteichonsäuren an den Kopfgruppen der Membranlipide verankert sind (Armstrong *et al.*, 1958, Armstrong *et al.*, 1959, Rohde, 2019)



**Abbildung 2: Aufbau der Zellhülle von Gram-positiven Bakterien (Silhavy *et al.*, 2010).**

CAP = *covalently attached protein*; IMP = *integral membrane protein*; LTA = Lipoteichonsäure; WTA = Wandteichonsäure. (modifiziert nach Silhavy *et al.* 2010)

### 1.2.1 Peptidoglykan ist der Hauptbestandteil der bakteriellen Zellwand

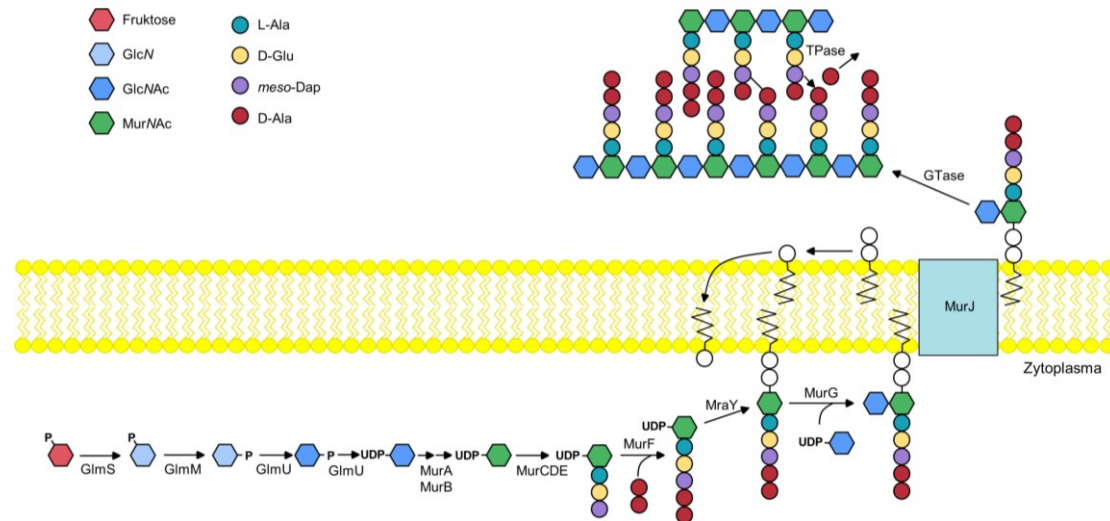
Peptidoglykan ist, wie der Name schon andeutet, aus Glykansträngen aufgebaut, die über Pentapeptidseitenketten quervernetzt sind (Vollmer *et al.*, 2008a). Die Glykanstränge bestehen aus den alternierend auftretenden Zuckern *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc). Diese sind durch  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4-Bindungen miteinander verknüpft (Vollmer *et al.*, 2008a). Das Pentapeptid besteht häufig aus L-Alanin-D-Glutaminsäure-*meso*-2,6-Diaminopimelinsäure (oder L-Lysin)-D-Alanin-D-Alanin und ist an die D-Laktylgruppe von MurNAc gebunden (Vollmer *et al.*, 2008a). Es können aber auch andere Aminosäuren in dem Pentapeptid vorhanden sein (Schleifer & Kandler, 1972, Vollmer *et al.*, 2008a). In *L. monocytogenes* besteht das Pentapeptid aus L-Alanin-D-Glutaminsäure-*meso*-2,6-Diaminopimelinsäure-D-Alanin-D-Alanin (Kamisango *et al.*, 1982). Die Quervernetzung der Glykanstränge mittels der Peptidseitenkette erfolgt im Allgemeinen zwischen der Carboxylgruppe vom D-Alanin an Position vier und der Aminogruppe der Diaminopimelinsäure an Position drei eines anderen Glykanstranges. Dabei wird das letzte D-Alanin der Peptidkette abgespalten und es entsteht eine direkte

Verbindung zwischen den beiden Peptiden (Alanin und *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure) (Vollmer *et al.*, 2008a).

Weitere Vielfalt in der Struktur des Peptidoglykans entstehen durch sekundäre Modifikationen an den Glykansträngen, wie zum Beispiel *N*-Deacetylierungen, *O*-Acetylierungen und *N*-Glykosylierungen (Abrams, 1958, Brumfitt *et al.*, 1958, Adam *et al.*, 1969, Araki *et al.*, 1971, Vollmer, 2008). Diese Modifikationen haben einen Einfluss auf die Hydrolyse und die Vergrößerung des Peptidoglykans während des Zellwachstums (Payie *et al.*, 1996, Vollmer, 2008). Außerdem tragen Acetylierungen und Deacetylierungen bei pathogenen Spezies zur Resistenz gegenüber Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus bei (Bera *et al.*, 2006, Boneca *et al.*, 2007, Vollmer, 2008). Bei *L. monocytogenes* ist die *N*-Deacetylierung von Muropeptiden ein wichtiger Virulenzfaktor, der dazu dient der angeborenen Immunantwort des Wirtes zu entgehen (Boneca *et al.*, 2007). Das Fehlen der *N*-Deacetylase PgdA führt zu einer ausgeprägten Sensitivität des Bakteriums gegenüber Lysozym, sowie einer verringerten Überlebensfähigkeit in Makrophagen und im Gastrointestinaltrakt von Mäusen (Boneca *et al.*, 2007). Auch die *O*-Acetylierung von Muraminsäureresten ist für die Resistenz gegenüber Lysozym von Bedeutung (Aubry *et al.*, 2011). Weiterhin vermittelt die Modifikation eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und ist für das Wachstum in Makrophagen notwendig (Aubry *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Biosynthese des Peptidoglykans

Um das beschriebene Peptidoglykannetz zu synthetisieren, sind zahlreiche Reaktionen notwendig (vgl. Abb.: 3). Verkürzt lässt sich die Biosynthese von Peptidoglykan in drei Stadien einteilen: Zunächst werden die aktivierten Vorläufermoleküle UDP-*N*-Acetylglukosamin und UDP-*N*-Acetylmuraminsäure im Zytoplasma synthetisiert (Barreteau *et al.*, 2008, Typas *et al.*, 2012). Danach werden an der Innenseite der Zytoplasmamembran diese Vorläufermoleküle mit den Peptiden bestückt und zu einem lipidverankerten Disaccharid-Pentapeptid (Lipid II) zusammengesetzt, welches über die Zytoplasmamembran transprotiert wird (Bouhss *et al.*, 2007, Typas *et al.*, 2012, Sham *et al.*, 2014, Meeske *et al.*, 2015). An der äußeren Seite der Zytoplasmamembran wird die Glykankette des Lipid II in das Peptidoglykangeflecht eingebaut (Typas *et al.*, 2012).



**Abbildung 3: Skizzierung des Peptidoglykanbiosyntheseweges nach Schulz *et al.* 2022.**

Fructose-6-Phosphat wird in vier Stufen durch GlmS, GlmM, GlmU zu UDP-*N*-Acetylglukosamin umgewandelt. MurA und MurB synthetisieren daraus das zweite Vorläufermolekül UDP-*N*-Acetylmuraminsäure. In weiteren Schritten wird Lipid II mithilfe von MurCDEF, MraY und MurG produziert. Anschließend transferiert MurJ das Lipid II auf die Außenseite der Zytoplasmamembran, wo es durch Transglykosylasen (GTase) und Transpeptidasen (TPase) in das bestehende Peptidoglykannetz eingebaut wird. GlcN = Glukosamin; GlcNAc = UDP-*N*-Acetylglukosamin; MurNAc = UDP-*N*-Acetylmuraminsäure; L-Ala = L-Alanin; D-Glu = D-Glutaminsäure; *meso*-Dap = *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure; D-Ala = D-Alanin (Schulz *et al.*, 2022).

Das erste Vorläufermolekül UDP-*N*-Acetylglukosamin wird aus Fructose-6-Phosphat synthetisiert. Zunächst wandelt die Glukosamin-6-Phosphat-Synthase (GlmS) Fructose-6-Phosphat zu Glukosamin-6-Phosphat um (Badet *et al.*, 1987, Badet *et al.*, 1988, Badet-Denisot *et al.*, 1997, Barreateau *et al.*, 2008). Das Glukosamin-6-Phosphat wird anschließend durch GlmM, einer Mutase, zu Glukosamin-1-Phosphat umgesetzt (Mengin-Lecreulx & van Heijenoort, 1996, Jolly *et al.*, 1999, Barreateau *et al.*, 2008). Zuletzt finden die Acetylierung und Uridylierung statt, die beide durch das bifunktionelle Enzym GlmU katalysiert werden (Hove-Jensen, 1992, Mengin-Lecreulx & van Heijenoort, 1993, Mengin-Lecreulx & van Heijenoort, 1994, Barreateau *et al.*, 2008). Das zweite Vorläuferprotein UDP-*N*-Acetylmuraminsäure wird aus UDP-*N*-Acetylglukosamin gebildet. Dafür wird Enolpyruvat aus Phosphoenolpyruvat an das UDP-*N*-Acetylglukosamin transferiert (Marquardt *et al.*, 1993, Barreateau *et al.*, 2008). Diese Reaktion wird von der Transferase MurA durchgeführt (Marquardt *et al.*, 1992, Wanke *et al.*, 1992, Barreateau *et al.*, 2008). Danach wird durch das Enzym MurB der Enolpyruvyl-Rest zu D-Laktyl reduziert, was in der Bildung von UDP-

*N*-Acetylmuraminsäure resultiert (Benson *et al.*, 1993, Tayeh *et al.*, 1995, Barreteau *et al.*, 2008). Bakterien, die dem Phylum *Firmicutes* angehören, können bis zu vier MurA-Paraloge besitzen, die sich in drei Kladen einteilen lassen: MurAA, MurAB und MurAC (Chan *et al.*, 2022). *L. monocytogenes* codiert zwei UDP-*N*-Acetylglukosamin-Enolpyruvat-Transferasen, MurA und MurZ, von denen MurA essentiell ist. Daraus lässt sich schließen, dass MurZ keine primäre Rolle in der Peptidoglykanbiosynthese zukommt (Rismondo *et al.*, 2016a, Fischer *et al.*, 2022). Nach der Synthese von UDP-*N*-Acetylmuraminsäure werden schrittweise die fünf Peptide an dessen D-Laktyl-Gruppe angefügt. Jeder Schritt wird dabei von einer Substrat-spezifischen ATP-verbrauchenden Synthese katalysiert. Namentlich heißen diese Synthasen MurC, MurD, MurE und MurF (Lutkenhaus *et al.*, 1980, Maruyama *et al.*, 1988, Mengin-Lecreux *et al.*, 1989, Liger *et al.*, 1996, Emanuele *et al.*, 1997, Barreteau *et al.*, 2008). Die Transferase MraY katalysiert dann den Transfer des UDP-*N*-Acetylmuraminsäure-Pentapeptids an den Membranakzeptor Undecaprenylphosphat. Das Produkt wird als Lipid I bezeichnet (Taku & Fan, 1976, Brandish *et al.*, 1996, van Heijenoort, 1998). Anschließend fügt die Transferase MurG das UDP-*N*-Acetylglukosamin an, wodurch Lipid II entsteht (Bachmann, 1983, van Heijenoort, 1998). Für den Transport von Lipid II an die Außenseite der Zytoplasmamembran, sind membranintegrale Translokasen, sogenannte Flippasen verantwortlich (Kuk *et al.*, 2022). In *Escherichia coli* wurde die Flippase MurJ erstmals entdeckt und beschrieben (Inoue *et al.*, 2008, Ruiz, 2008, Sham *et al.*, 2014). Es handelt sich um eine ATP-unabhängige Flippase, die zur Superfamilie der „Multidrug/Oligosaccharidyl-Lipid/Polysaccharid (MOP) Exporter“ gehört (Hvorup *et al.*, 2003, Kuk *et al.*, 2022). Die Funktionsweise ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass der Mechanismus auf dem Membranpotenzial, sowie dem Austausch von Lipid II mit Natrium- und Chlorid-Ionen beruht (Rubino *et al.*, 2018, Kumar *et al.*, 2019, Kuk *et al.*, 2022). In *Bacillus subtilis* konnte neben MurJ noch die Flippase Amj identifiziert werden (Meeske *et al.*, 2015). Sie bildet zusammen mit MurJ ein synthetisch lethales Paar (Meeske *et al.*, 2015). Amj kann in einigen Gram-negativen und -positiven Organismen gefunden werden. Darunter ist *Firmicutes* das Phylum mit der größten Anzahl sequenzierter Genome, die Amj-Orthologe enthalten (Meeske *et al.*, 2015).

### 1.2.3 Polymerisierung, Quervernetzung und *Turnover* des Peptidoglykans

Den Einbau des Disaccharid-Pentapeptids Lipid II in das bestehende Peptidoglykangeflecht übernehmen Peptidoglykansynthasen. Man unterscheidet zwischen monofunktionalen Transglykosylasen (GTasen), monofunktionalen DD-Transpeptidasen (TPasen) und bifunktionalen Transglykosylasen-DD-Transpeptidasen (Vollmer & Bertsche, 2008). GTasen polymerisieren die Glykanketten während TPasen die Peptide vernetzen (Typas *et al.*, 2012).

DD-Transpeptidasen und andere Peptidasen gehören zusammen mit den meisten  $\beta$ -Laktamasen zur Proteinfamilie „Penicilloyl-Serin-Transferasen“. Vertreter dieser Familie katalysieren die Spaltung der zyklischen Amidbindung von Penicillin durch deren Bindung an das Serin im aktiven Zentrum des Enzyms (Ghuysen, 1994). Bei Peptidasen bleibt das gespaltene Substrat an das Enzym gebunden, wohingegen die  $\beta$ -Laktamasen Penicilloat freisetzen (Ghuysen, 1994). Peptidasen bilden somit einen stabilen Enzym-Inhibitor-Komplex mit  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, der die Funktion des Enzyms stört (Waxman & Strominger, 1980, Bycroft & Shute, 1985). Die Bindung von Penicillin und anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika an die Enzyme ist aufgrund der strukturellen Analogie zum eigentlichen Substrat, den D-Ala-D-Ala-Termini der Pentapeptid-Seitenkette des Peptidoglykans, möglich (Tipper & Strominger, 1965, Bycroft & Shute, 1985, Vollmer & Bertsche, 2008).

Penicilloyl-Serin-Transferasen werden unter der Bezeichnung Penicillin-bindende Proteine (PBPs) nach Goffin & Ghuysen (1998) in zwei Hauptkategorien eingeteilt: PBPs mit hoher molekularer Masse (HMW) und PBPs mit niedriger molekularer Masse (LMW) (Goffin & Ghuysen, 1998). HMW-PBPs sind für die Peptidoglykanpolymerisation in die bereits bestehende Zellwand verantwortlich (Goffin & Ghuysen, 1998, Born *et al.*, 2006, Sauvage *et al.*, 2008). Je nach Struktur und katalytischer Aktivität ihrer N-terminalen Domäne können sie dann weiter der Klasse A oder B zugeordnet werden. In der Klasse A ist die N-terminale Domäne des Enzyms für die Transglykosylaseaktivität verantwortlich. Es handelt sich also um bifunktionale Peptidoglykansynthasen (Goffin & Ghuysen, 1998, Sauvage *et al.*, 2008). Bei der Klasse B besitzt die N-terminale Domäne keine katalytische Aktivität, sondern spielt vermutlich eine Rolle bei der Zellmorphogenese, indem sie mit anderen Proteinen interagiert, die

am Zellzyklus beteiligt sind (Adam *et al.*, 1997, Goffin & Ghuyssen, 1998, Nanninga, 1998, Sauvage *et al.*, 2008). Die C-terminale Domäne beider Klassen besitzt die Transpeptidaseaktivität (Goffin & Ghuyssen, 1998, Sauvage *et al.*, 2008). LMW-PBPs katalysieren ebenfalls die Quervernetzung zwischen den Peptiden, besitzen aber eine DD-Carboxypeptidase-Aktivität, Endopeptidase-Aktivität oder  $\beta$ -Laktamase-Aktivität. Sie sind an der Regulation des Vernetzungsgrades des Peptidoglykans beteiligt (Goffin & Ghuyssen, 1998, Krawczyk-Balska & Markiewicz, 2016). *L. monocytogenes* besitzt insgesamt 10 PBPs, von denen 5 der Gruppe, der LMW zugeordnet werden können (Krawczyk-Balska & Markiewicz, 2016).

Als letzte Gruppe der Peptidoglykansynthasen gibt es die monofunktionellen GTasen (Typas *et al.*, 2012). Dazu zählt beispielsweise MtgA aus *E. coli* (Hara & Suzuki, 1984). Auch die Proteine FtsW und RodA, die als Teil des Divisoms oder Elongasoms zusammen mit Klasse B PBPs die Polymerisation des Peptidoglykans koordinieren, besitzen eine Transglykosylase- (GTase-) Aktivität und werden der Proteinfamilie *Shape, Elongation, Division and Sporulation* (SEDS) zugeordnet (Ishino *et al.*, 1986, Henriques *et al.*, 1998, Mercer & Weiss, 2002, Gamba *et al.*, 2009, Fraipont *et al.*, 2011, Meeske *et al.*, 2016, Emami *et al.*, 2017).

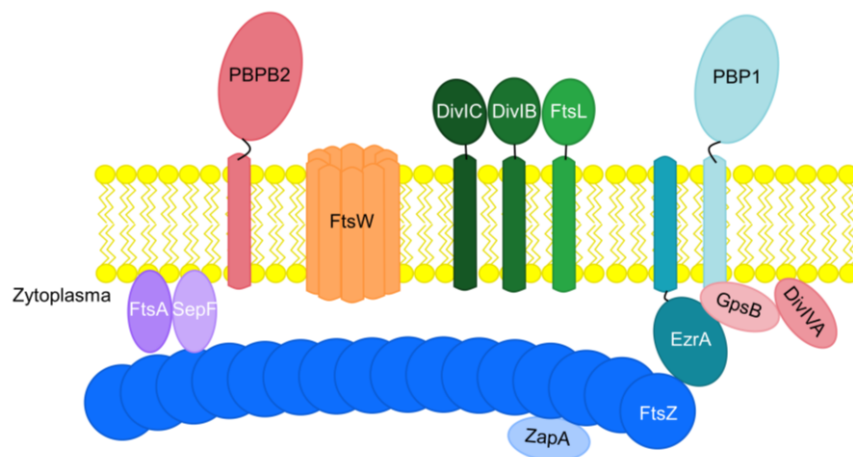
Damit überhaupt neue Peptidoglykanbausteine in das bestehende Netzwerk eingebaut werden können, müssen vorhandene Bindungen aufgebrochen werden. Andernfalls würde die Zellwand nur dicker werden, ohne, dass sich die Zellen verlängern (Typas *et al.*, 2012). Diese Funktion übernehmen die Peptidoglykanhydrolasen (Autolysine). Es handelt sich um eine diverse Enzymgruppe, deren Mitglieder alle in der Lage sind, Bindungen im polymeren Peptidoglykan oder den löslichen Peptidoglykanfragmenten zu spalten (Shockman *et al.*, 1996, Vollmer *et al.*, 2008b). Bakterien besitzen eine große Anzahl an Hydrolasen mit sich überschneidenden Funktionen (Höltje & Tuomanen, 1991, Smith *et al.*, 2000, Vollmer *et al.*, 2008b). Es gibt für jede glykosidische Bindung und Peptidbindung im Peptidoglykan eine Hydrolase, wobei nicht in jeder Spezies jede dieser Hydrolasen vorkommt (Vollmer *et al.*, 2008b). Neben der Beteiligung am Zellwachstum oder der Zellteilung, dienen die Hydrolyseprodukte auch als Signalmoleküle für die Erkennung von Bakterien

durch andere Organismen oder für die Induktion von  $\beta$ -Laktamasen (Jacobs *et al.*, 1997, Heidrich *et al.*, 2001, Vollmer *et al.*, 2008b).

### 1.3 Das Divisom steuert die PG-Biosynthese während der Zellteilung

Die PG-Biosynthese ist durch spezifische Multiproteinkomplexe, Divisom und Elongasom, an die Zellteilung und das laterale Wachstum gekoppelt (Lovering *et al.*, 2012). Sie dienen dazu die PG-Biosynthese zu koordinieren und geben die Zellform vor (Young, 2003). Die bakterielle Zellteilung erfolgt durch das Einwachsen („*ingrowth*“) von Membran und Zellwand zu einem Septum, das die Zelle in zwei Kompartimente trennt (Harry *et al.*, 2006). Bei stäbchenförmigen Bakterien bildet sich das Septum exakt in der Mitte der Zelle zwischen den zwei replizierten und segregierten Chromosomen (Bi & Lutkenhaus, 1991, Harry *et al.*, 2006). Der Prozess der Zellteilung beginnt mit der Polymerisation des Z-Ringes, dessen zentrale Komponente das Protein FtsZ ist (Addinall *et al.*, 1996, Buddelmeijer & Beckwith, 2002). Interessanterweise besitzt FtsZ strukturelle Ähnlichkeit mit dem eukaryontischen Tubulin, welches zu Mikrotubuli polymerisiert, die beispielsweise an der Mitose und Meiose beteiligt sind (Cleveland & Sullivan, 1985, Mukherjee *et al.*, 1993, Löwe & Amos, 1998). Auch FtsZ polymerisiert zu dynamischen Filamenten, wofür die Anwesenheit von GTP erforderlich ist (Mukherjee & Lutkenhaus, 1998, Lutkenhaus *et al.*, 2012). Diese Filamente bilden eine Ring-Struktur direkt unter der Zytoplasmamembran, den bereits erwähnten Z-Ring (Bi & Lutkenhaus, 1991, Lutkenhaus *et al.*, 2012). Er befindet sich an der Teilungsstelle, genau in der Mitte der Zelle und bildet das Gerüst zur Rekrutierung weiterer Teilungsproteine, die zusammen das Divisom bilden (Bi & Lutkenhaus, 1991, Addinall *et al.*, 1996, Harry *et al.*, 2006). Im Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* sind das zunächst FtsA und SepF, durch die FtsZ an die Membran gebunden wird (Jensen *et al.*, 2005, Pichoff & Lutkenhaus, 2005, Duman *et al.*, 2013). Weitere Divisomproteine wie ZapA und EzrA modulieren die FtsZ-Polymerisation (Levin *et al.*, 1999, Gueiros-Filho & Losick, 2002, Cleverley *et al.*, 2014, Cleverley & Lewis, 2015). Mit etwas zeitlicher Verzögerung werden dann die späten Divisomproteine rekrutiert. Dazu gehören in *B. subtilis* GpsB, FtsL, DivIB, DivIC, DivIVA und Enzyme der Peptidoglykanbiosynthese, wie FtsW, PBP1 und PBP2B (vgl. Abb.: 4) (Varley & Stewart, 1992, Yanouri *et al.*, 1993, Levin & Losick, 1994, Daniel *et al.*, 1996,

Edwards & Errington, 1997, Katis *et al.*, 1997, Daniel *et al.*, 1998, Claessen *et al.*, 2008, Tavares *et al.*, 2008, Gamba *et al.*, 2016, Errington & Wu, 2017). Die Zellteilung wird von zwei Regulationssystemen kontrolliert. Das Min-System stellt sicher, dass der Z-Ring in der Zellmitte gebildet wird. Ohne das Min-System entstehen die namensgebenden Minizellen, da der Z-Ring an den Zellpolen aufgebaut wird (Adler *et al.*, 1967, Rothfield *et al.*, 2005). In *B. subtilis* besteht dieser Komplex aus MinCDJ und DivIVA (Marston *et al.*, 1998, Marston & Errington, 1999, Bramkamp *et al.*, 2008, Patrick & Kearns, 2008). Das zweite Regulationssystem, das NO-System, verhindert die Bildung des Z-Ringes über dem Nukleoid, um die Trennung des Chromosoms bei Segregationsstress zu verhindern (Wu & Errington, 2004).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Divisoms von *B. subtilis* (Halbedel & Lewis, 2019).**

Abgebildet ist die mögliche Anordnung der Zellteilungsproteine des Divisoms von *B. subtilis* (modifiziert nach Halbedel & Lewis, 2019).

### 1.3.1 Funktion von DivIVA

DivIVA-Proteine kommen nur in Gram-positiven Bakterien vor. Homologe konnten in *Actinobacteria* und *Firmicutes*, aber auch in einigen Arten der Gattungen *Deinococcus*, *Deltaproteobacteria*, *Nitrospira* und *Synergistaceae* und in den Gruppen *Fibrobacter*, *Bacteroidetes* und *Chlorobi* gefunden werden (Halbedel & Lewis, 2019). Das Protein übernimmt verschiedene Aufgaben z.B. bei der Auswahl der Teilungsstelle, der Chromosomensegregation oder der Kontrolle der Peptidoglykan-Homöostase (Marston *et al.*, 1998, Marston & Errington, 1999, Thomaidis *et al.*, 2001, Halbedel *et al.*, 2012, Hammond *et al.*,

2019). Es sind diverse Interaktionspartner des Proteins bekannt. In *B. subtilis* gehören MinJ (Zellteilung), Spo0J (Chromosomensegregation), ComN und Maf (Kompetenz), SecA (Proteinsekretion) und RacA (Sporulation) dazu (Perry & Edwards, 2004, Bramkamp *et al.*, 2008, Briley Jr *et al.*, 2011, Santos *et al.*, 2012, Halbedel *et al.*, 2014, Schumacher *et al.*, 2016). Bekannt ist außerdem, dass DivIVA erst durch Erzeugung einer negativen Zellmembrankrümmung, die bei der Membraninvagination während der Septumbildung entsteht, zum Divisom rekrutiert wird (Lenarcic *et al.*, 2009, Ramamurthi & Losick, 2009, Eswaramoorthy *et al.*, 2011, Halbedel & Lewis, 2019). In *L. monocytogenes* konnte die Beteiligung von DivIVA an der Zellteilung genauer aufgedeckt werden (Halbedel *et al.*, 2012, Kaval *et al.*, 2014). DivIVA ist dort für die SecA2-abhängige Sekretion der Autolysine p60 (CwhA) und MurA (NamA) notwendig. Weiterhin fungiert das Protein bei der Zytokinese als topologischer Regulator der Zellteilungsstelle (Halbedel *et al.*, 2012, Kaval *et al.*, 2014). Ein Stamm, der kein DivIVA synthetisieren kann, bildet daher lange Zellketten aus, die zwar septiert sind, sich aber nicht voneinander abtrennen (Halbedel *et al.*, 2012, Kaval *et al.*, 2014).

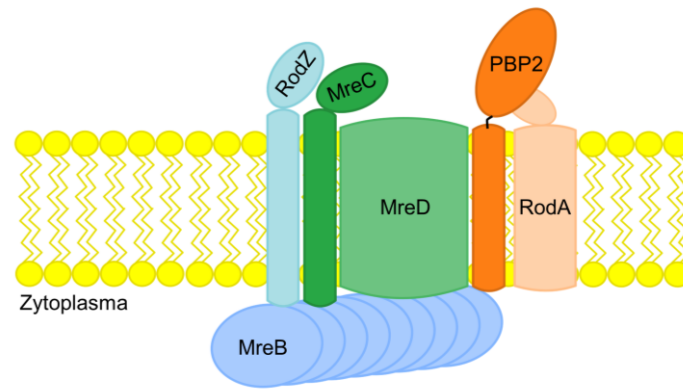
### 1.3.2 Funktion von GpsB

Ein Protein, das vermutlich aus einer Duplikation des *divIVA*-Gens entstand, ist GpsB (Claessen *et al.*, 2008, Tavares *et al.*, 2008, Brzozowski *et al.*, 2019). Es findet sich nur in der *Bacillus*-Gruppe, einschließlich Staphylokokken, Streptokokken, Enterokokken, Laktobazillen, Bazillen und Pänibazillen und ähnelt in der Struktur DivIVA (Brzozowski *et al.*, 2019, Halbedel & Lewis, 2019). Beide Proteine besitzen zwei Domänen: Eine hoch konservierte N-terminale Domäne, die durch eine nicht-konservierte Verbindungssequenz („*linker*“) mit einer C-terminalen Domäne von verschiedener Größe und Sequenz verbunden ist (Cleverley *et al.*, 2016, Rismondo *et al.*, 2016b, Halbedel & Lewis, 2019). Die N-terminalen Domänen beider Proteine binden an die Membran, während die C-terminalen Domänen für die Oligomerisierung verantwortlich sind (Muchová *et al.*, 2002, Lenarcic *et al.*, 2009, Rismondo *et al.*, 2016b, Halbedel & Lewis, 2019). Dabei oligomerisiert DivIVA zu einem Tetramer, während GpsB ein Hexamer bildet (Oliva *et al.*, 2010, Rismondo *et al.*, 2016b, Halbedel & Lewis, 2019). Die Rekrutierung von GpsB zum Septum erfolgt erst nachdem das Divisom vollständig assembliert ist. Die genauen Bedingungen sind aber noch nicht

bekannt (Tavares *et al.*, 2008, Halbedel & Lewis, 2019). In *B. subtilis* und *L. monocytogenes* konnte GpsB aber nicht nur am Septum sich teilender Zellen gefunden werden, sondern auch an den lateralen Seitenwänden neuer, wachsender Zellen (Claessen *et al.*, 2008, Rismondo *et al.*, 2016b, Cleverley *et al.*, 2019). Die Interaktionspartner von GpsB sind weniger divers im Vergleich zu DivIVA (Halbedel & Lewis, 2019). GpsB interagiert in den Organismen *B. subtilis*, *L. monocytogenes* und *S. pneumoniae* mit jeweils einer Klasse A PBP (*BsPBP1*, *LmPBPA1* und *SpPBP2a*) und mit der Zellform-Determinante MreC (Claessen *et al.*, 2008, Rismondo *et al.*, 2016b, Rued *et al.*, 2017, Cleverley *et al.*, 2019, Halbedel & Lewis, 2019). In *B. subtilis* und *S. pneumoniae* konnte außerdem eine Interaktion zwischen GpsB und EzrA, sowie einer Serin/Threonin-Protein Kinase (*B. subtilis* PrkC und *S. pneumoniae* StkP) nachgewiesen werden (Claessen *et al.*, 2008, Pompeo *et al.*, 2015, Rued *et al.*, 2017, Halbedel & Lewis, 2019). In *S. aureus* wurde sogar eine direkte Interaktion von GpsB mit FtsZ, welche die Bildung von FtsZ-Bündeln stimuliert, gefunden (Eswara *et al.*, 2018, Halbedel & Lewis, 2019). In *L. monocytogenes* wurde bisher nur SepF als weiterer Interaktionspartner von GpsB bestimmt (Cleverley *et al.*, 2019, Halbedel & Lewis, 2019). Phosphoproteomdaten zeigen weiterhin, dass GpsB ein Substrat der Serin/Threonin-Protein Kinase PrkA in *L. monocytogenes* ist (Kelliher *et al.*, 2021). All diese Interaktionen deuten darauf hin, dass GpsB die Funktion eines Adapterproteins im bakteriellen Zellzyklus einnimmt (Cleverley *et al.*, 2019). Das Protein verbindet PG-Synthasen mit anderen Zellwandenzymen, Gerüstproteinen und Formdeterminanten. Und dies geschieht in Proteinkomplexen für die Teilung (Divisom) und für das periphere Wachstum (Elongasom) (Cleverley *et al.*, 2019). Phänotypisch verursacht das Fehlen von GpsB in *L. monocytogenes* ausgeprägte Wachstums- und Teilungsstörungen bei 37 °C Wachstumstemperatur und ist bei 42 °C tödlich (Rismondo *et al.*, 2016b). Weiterhin konnte eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und Fosfomycin festgestellt werden, sowie Veränderungen der Peptidoglykanstruktur (Rismondo *et al.*, 2016a, Rismondo *et al.*, 2016b, Rismondo *et al.*, 2018).

### 1.4 Das Elongasom steuert die PG-Biosynthese während des Streckungswachstums

Ähnlich zu den FtsZ-Filamenten beim Divisom, bilden sich auch beim Elongasom Filamente aus, die das laterale Wachstum stäbchenförmiger Bakterien kontrollieren (Jones *et al.*, 2001, Carballido-López & Formstone, 2007). Diese Filamente bestehen aus Proteinen der MreB-Familie und sind Aktin-Homologe (Jones *et al.*, 2001, Carballido-López & Formstone, 2007). In *E. coli* polymerisiert MreB ATP-abhängig zu kurzen Filamenten, die um den zylindrischen Teil der Zelle rotieren. Diese Rotation wird durch die Peptidoglykanbiosynthese angetrieben (van Teeffelen *et al.*, 2011). *B. subtilis* besitzt drei Aktin-Isoformen: MreB, Mbl und MreBH, die alle in einer Helixstruktur kolokalisieren (Jones *et al.*, 2001, Carballido-López *et al.*, 2006, Carballido-López & Formstone, 2007). Weitere bekannte Proteine des Elongasoms in *E. coli* sind die Transmembranproteine RodZ, MreC und PBP2, sowie die integralen Membranproteine MreD und RodA (vgl. Abb.: 5) (Matsuzawa *et al.*, 1973, Spratt, 1975, Curtis & Strominger, 1981, Stoker *et al.*, 1983, Wachi *et al.*, 1989, Den Blaauwen *et al.*, 2003, Bendezú *et al.*, 2009). In *B. subtilis* wurden eine ganze Reihe von weiteren Proteinen identifiziert, die mit MreB möglicherweise interagieren und Teil des Elongasoms sein könnten (Errington & Wu, 2017). Dazu gehören Proteine der Teichonsäurebiosynthese, verschiedene PBPs und auch GpsB (Claessen *et al.*, 2008, Formstone *et al.*, 2008, Kawai *et al.*, 2009, Errington & Wu, 2017). Die Interaktion des Divisomproteins GpsB mit Proteinen des Elongasoms zeigt, dass der Zellteilungsprozess nicht klar vom Streckungswachstum abgegrenzt ist (Carballido-López & Formstone, 2007). Dies wird beispielsweise auch dadurch deutlich, dass *E. coli* mit dysfunktionalem MreB ebenfalls einen Teilungsdefekt zeigt (Kruse *et al.*, 2003, Young, 2006).



**Abbildung 5: Möglicher Aufbau des Elongasoms von *E. coli* nach (Liu *et al.*, 2021).**

Abgebildet ist die mögliche Anordnung der Proteine des Elongasoms von *E. coli* (modifiziert nach Liu *et al.*, 2021).

### 1.5 Regulation der Peptidoglykanbiosynthese

Während des Zellzyklus und bei schwankenden Umweltbedingungen muss der Grad der Peptidoglykanbiosynthese kontinuierlich angepasst werden. Dafür gibt es verschiedene Mechanismen, die von der Transkription bis zur Aktivität einzelner Enzyme reichen. Auf Ebene der Transkription wird beispielsweise die Promotorspezifität der RNA-Polymerase durch alternative Sigmafaktoren (Sigmafaktoren mit extrazytoplasmatischer Funktion (ECF)) in Zusammenhang mit Stressoren der Zellhülle reguliert (Lonetto *et al.*, 1994, Helmann, 2016). Ein Beispiel für einen solchen Sigmafaktor ist Sigma M. Zum SigM-Regulon gehören in *B. subtilis* Gene wie *mreB*, *minCD*, *divIC*, *rodA* und *amj*, die in Anwesenheit von zellhüllenwirksamen Antibiotika induziert werden (Horsburgh & Moir, 1999, Jervis *et al.*, 2007, Eiamphungporn & Helmann, 2008, Helmann, 2016). Eine weitere Form der Genexpressionskontrolle wird von Zweikomponentensystemen (TCS) vermittelt. Diese reagieren auf extrazelluläre Signale mit der Autophosphorylierung einer Histidinkinase, gefolgt von der Phosphorylierung des dazugehörigen *response regulator* Proteins. Dabei handelt es sich meist um einen Transkriptionsregulator, der die Genexpression in geeigneter Weise anpasst (Groisman, 2016). In Gram-positiven Bakterien ist das TCS Walk/WalR hoch konserviert und reguliert beispielsweise die Expression von Genen, die an der Zellwandhomöostase beteiligt sind (Fabret & Hoch James, 1998, Fukuchi *et al.*, 2000, Dubrac *et al.*, 2007, Dubrac *et al.*, 2008, Takada & Yoshikawa, 2018). In *Enterococcus faecalis* oder *Enterococcus faecium* finden sich unter anderem

die TCS CroRS, VanRS und DdcRS, die ebenfalls die Zellwandhomöostase und antimikrobielle Toleranz regulieren (Arthur *et al.*, 1992, Comenge *et al.*, 2003, Sacco *et al.*, 2010, Guffey & Loll, 2021, Todd Rose *et al.*, 2023). Ein weiteres Beispiel für die Kontrolle der PG-Biosynthese auf translationeller Ebene findet sich bei GlmS aus *B. subtilis*. Die Synthese des Enzyms wird durch einen Riboswitch reguliert, der auf den Metaboliten Glukosamin-6-Phosphat reagiert (Badet *et al.*, 1987, Winkler *et al.*, 2004, Foulquier *et al.*, 2020). Gleichzeitig wird auch die Aktivität von GlmS indirekt durch UDP-GlcNAc negativ kontrolliert (Patel *et al.*, 2018, Foulquier *et al.*, 2020). Auch in *E. coli* wird die GlmS-Synthese streng reguliert. Dafür ist das RNA-bindende Protein RapZ von Bedeutung, welches die GlmS-Menge in Abhängigkeit von verfügbarem Glukosamin-6-Phosphat und durch die Interaktion mit dem TCS QseE/QseF, sowie den kleinen RNAs GlmY und GlmZ reguliert (Kalamorz *et al.*, 2007, Reichenbach *et al.*, 2008, Urban & Vogel, 2008, Göpel *et al.*, 2010, Göpel *et al.*, 2013, Khan *et al.*, 2020). Eine durch den Metaboliten entstehende Hemmung der Enzymaktivität wurde bei MurA aus *E. coli* nachgewiesen. Das Enzym wird durch die Akkumulation von UDP-MurNAc gehemmt (Mizyed *et al.*, 2005, Garde *et al.*, 2021).

Die Regulation von Enzymaktivitäten kann außerdem durch Proteininteraktionen vermittelt werden. Diese Form der Kontrolle spielt bei der Aktivität der Peptidoglykansynthasen im extrazellulären Raum eine wichtige Rolle (Egan *et al.*, 2020). In *E. coli* werden beispielsweise PBP1A und PBP1B durch die Bindung der Lipoproteine LpoA und LpoB aktiviert (Paradis-Bleau *et al.*, 2010, Typas *et al.*, 2010). Auch die SEDS-Proteine FtsW und RodA benötigen für ihre Aktivität die Interaktion mit den dazugehörigen Klasse B PBPs (Rohs *et al.*, 2018, Taguchi *et al.*, 2019).

### 1.5.1 Regulation der PG-Biosynthese durch kontrollierte Proteolyse

Bakterien sind Umweltstressoren wie Hitze oder oxidativem Stress ausgesetzt, die die Proteinintegrität beeinträchtigen. Die Proteolyse von geschädigten Proteinen stellt in diesem Zusammenhang eine effektive Möglichkeit für die schnelle Entsorgung dar (Gottesman, 2003, Konovalova *et al.*, 2014, Mahmoud & Chien, 2018). Durch den Abbau von regulatorischen Proteinen können aber auch verschiedene andere Prozesse wie Zellwachstum, Zellteilung, Zellzykluskontrolle und Virulenz gesteuert werden (Mahmoud & Chien, 2018,

Kahne & Darwin, 2021). Die bakterielle Proteolyse wird unter anderem von Proteasekomplexen bestehend aus einer kaseinolytischen Protease ClpP und einem AAA+ Chaperon (*ATPases associated with cellular activities*) ausgeführt (Mahmoud & Chien, 2018). Diese Proteasekomplexe nutzen die Energie aus der ATP-Hydrolyse, um Substrate zu erkennen, zu entfalten und abzubauen (Konovalova *et al.*, 2014, Mahmoud & Chien, 2018). *L. monocytogenes* codiert zwei ClpP-Isoformen, ClpP1 und ClpP2, die bei erhöhten Temperaturen einen hetero-oligomeren Komplex bilden (Zeiler *et al.*, 2013, Balogh *et al.*, 2022). Dieser besteht aus den zwei gestapelten ClpP1- und ClpP2-Heptameren, also 14 ClpP-Serin-Peptidaseuntereinheiten, die eine proteolytische Kammer bilden. Die aktiven Zentren sind vom Zytoplasma abgeschirmt und werden von axialen Poren flankiert durch die die Proteinsubstrate in die Hydrolysekammer gelangen (Zeiler *et al.*, 2011, Zeiler *et al.*, 2013). Der Proteasekomplex bindet AAA+ Proteine, wie ClpC, ClpE oder ClpX in *L. monocytogenes* (Gottesman *et al.*, 1993, Wojtkowiak *et al.*, 1993, Rouquette *et al.*, 1996, Horwich *et al.*, 1999, Nair *et al.*, 1999, Zeiler *et al.*, 2013). Für die Auswahl und Erkennung von Substratproteinen durch die AAA+ Proteasekomplexe sind spezifische Sequenzmarker und/oder Adapterproteine notwendig (Kirstein *et al.*, 2009, Konovalova *et al.*, 2014, Elsholz *et al.*, 2017). In *B. subtilis* sind beispielsweise die ClpC-Adapterproteine MecA, YpbH und McsB bekannt (Turgay *et al.*, 1998, Persuh *et al.*, 2002, Kirstein *et al.*, 2007). Die Synthese und Aktivität von Adapterproteinen kann zusätzlich durch Sequestrierung, Proteolyse, posttranslationale Modifikationen oder Anti-Adaptoren kontrolliert werden (Kirstein *et al.*, 2009, Sauer & Baker, 2011, Battesti & Gottesman, 2013, Elsholz *et al.*, 2017, Kuhlmann & Chien, 2017, Yeom *et al.*, 2017). Die Adapterproteine von ClpC sind zusätzlich für die Aktivierung des ClpC-Hexamers notwendig, was anschließend die Bildung des Proteasekomplexes ermöglicht (Kirstein *et al.*, 2006). Wenn keine Substrate vorhanden sind, werden die ClpC-Adapterproteine selbst abgebaut, wodurch die ClpCP-Protease inaktiviert wird. Durch diesen Regulationsmechanismus wird die Aktivität von ClpCP eingeschränkt, wenn keine Substrate zur Verfügung stehen (Kirstein *et al.*, 2006, Elsholz *et al.*, 2017). Die Transkription von *clpC* aus *L. monocytogenes* wird unter Stressbedingungen, wie bei Temperaturen von 42 °C oder hohen Salzkonzentrationen CtsR-abhängig hochreguliert (Rouquette *et al.*, 1996, Nair *et al.*, 2000). Der ClpCP-

Proteasekomplex ist somit an der Stressantwort des Bakteriums beteiligt und wird außerdem für das intrazelluläre Überleben des Pathogens benötigt (Rouquette *et al.*, 1996, Rouquette *et al.*, 1998). Zudem konnte erstmals in *B. subtilis* gezeigt werden, dass MurAA ein Substrat von ClpCP ist und vor allem in der stationären Wachstumsphase durch den Proteasekomplex abgebaut wird. Dies erlaubt die Anpassung der Peptidoglykanbiosynthese an das Zellwachstum (Kock *et al.*, 2004). Auch in *L. monocytogenes* wird MurA ClpCP-abhängig proteolysiert, um die Peptidoglykanbiosynthese zu regulieren (Wamp *et al.*, 2020, Birk *et al.*, 2021). Gerth *et al.* waren in der Lage, eine Vielzahl weiterer möglicher Substrate der ClpCP-Protease in *B. subtilis* zu identifizieren. Viele davon sind als Enzyme an zentralen Biosynthesewegen beteiligt. Dazu gehört ein weiteres Protein der Peptidoglykanbiosynthese, GlmS, das bei Glukosemangel durch ClpCP proteolysiert wird (Gerth *et al.*, 2008). Ein weiteres Beispiel für die Regulation der Zellwandbiosynthese durch kontrollierte Proteolyse ist der Abbau von FtsZ in *E. coli* durch den Proteasekomplex ClpXP. Die Protease moduliert vermutlich das Gleichgewicht zwischen freiem und polymerem FtsZ durch den Abbau von FtsZ-Filamenten und Protomeren (Camberg *et al.*, 2009, Camberg *et al.*, 2011, Mahmoud & Chien, 2018).

### 1.5.2 Regulation der PG-Biosynthese durch „*Eukaryotic-like serine/threonine*“-Kinasen

Wichtige regulatorische Funktionen bei der PG-Biosynthese und anderen physiologischen Prozessen wie der Zellteilung, der Virulenz und zentralen und sekundären Stoffwechselwegen werden auch von sogenannten eSTKs („*eukaryotic-like serine and threonine kinases*“) ausgeübt (Galyov *et al.*, 1993, Atsushi *et al.*, 1994, Cowley *et al.*, 2004, Kang *et al.*, 2005, Fiuza *et al.*, 2008a, Fiuza *et al.*, 2008b, Pereira Sandro *et al.*, 2011). Der Name leitet sich von der strukturellen Homologie der katalytischen Domäne zu eukaryotischen Serin/Threonin/Tyrosin-Kinasen ab (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991, Manuse *et al.*, 2015). Die Proteinmodifikationen in Form von Phosphorylierungen, die durch eSTKs katalysiert werden, sind stabil und benötigen eine Dephosphorylierungsreaktion, um wieder entfernt werden zu können. Daher besitzen Bakterien ein Repertoire an Phosphoprotein-Phosphatasen als Gegenspieler (Shi *et al.*, 1998, Kennelly, 2002). „*Eukaryotic-like serine and*

*threonine kinases*“ können in *Firmicutes* und *Actinobacteria* als transmembrane Proteine auftreten und besitzen dann neben ihrer katalytischen Domäne im Zytoplasma auch extrazelluläre PASTA-Domänen („*penicillin-binding protein and serine/threonine kinase-associated domains*“) (Jones & Dyson, 2006, Manuse *et al.*, 2015). Die Namensgebung basiert auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den C-Termini einiger PBPs (Yeats *et al.*, 2002, Jones & Dyson, 2006, Manuse *et al.*, 2015). PASTA-Domänen wurden nämlich erstmals im C-Terminus des Penicillin-bindenden Proteins PBP2x aus *Streptococcus pneumoniae* gefunden, dessen Kristallstruktur eine Bindung zwischen einer der beiden PASTA-Domänen und dem  $\beta$ -Lactamring von Cefuroxim zeigte (Pares *et al.*, 1996, Gordon *et al.*, 2000). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des  $\beta$ -Lactamrings von Cefuroxim mit den D-Alanyl-D-Alanin-Resten des Pentapeptids von Peptidoglykaneinheiten entstand die Idee, dass PASTA-Domänen unvernetztes Peptidoglykan (Muropeptide/Lipid II) binden (Yeats *et al.*, 2002). Die Anzahl der PASTA-Motive unterscheidet sich zwischen den Kinasen (Manuse *et al.*, 2015). PknB aus *M. tuberculosis* und StkP aus *S. pneumoniae* weisen vier PASTA-Motive auf (Nováková *et al.*, 2005, Barthe *et al.*, 2010). PrkA aus *L. monocytogenes* besitzt, wie PrkC aus *Bacillus subtilis* und Stk1 in *S. aureus*, drei PASTA-Domänen (Paracuellos *et al.*, 2010, Lima *et al.*, 2011, Ruggiero *et al.*, 2011, Manuse *et al.*, 2015). PrkC und Stk1 weisen zusätzlich eine C-terminale Verlängerung von 80 Aminosäuren auf, die strukturelle Ähnlichkeit mit Ig-Domänen bzw. TypIII-Domänen des menschlichen Fibronectins hat. Es wird angenommen, dass diese Domäne adhäsive Eigenschaften hat und bei Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle spielen könnte (Paracuellos *et al.*, 2010, Ruggiero *et al.*, 2011, Squeglia *et al.*, 2011, Manuse *et al.*, 2015). Die PASTA-Domänen sollen auch an der Aktivierung der Kinase beteiligt sein. Anhand von Untersuchungen der PASTA-eSTK PknB in *M. tuberculosis* wurde ein Modell der Funktionsweise entwickelt (Lombana *et al.*, 2010). Es wird angenommen, dass eine Dimerisierung der Proteine für eine allosterische Aktivierung der Kinase notwendig ist. Dies führt zunächst zu einer Autophosphorylierung der Kinasedomäne und anschließend zur Phosphorylierung eines Zielproteins durch eines der PASTA-eSTK Monomere (Lombana *et al.*, 2010, Manuse *et al.*, 2015). Für diese Dimerisierung sollen die PASTA-Domänen notwendig sein. Sie sollen in Folge der Bindung von Muropeptiden oder Lipid II die Dimerbildung des Proteins verursachen (Barthe *et*

*al.*, 2010). *In vitro*-Studien haben auch gezeigt, dass die PASTA-Motive von PknB (*M. tuberculosis*), PrkC (*B. subtilis*), Stk1 (*S. aureus*) und StkP (*S. pneumoniae*) in der Lage sind,  $\beta$ -Laktame oder Peptidoglykanfragmente zu binden (Paracuellos *et al.*, 2010, Maestro *et al.*, 2011, Mir *et al.*, 2011, Squeglia *et al.*, 2011, Manuse *et al.*, 2015). Es gibt bisher allerdings keine atomaren Strukturen von eSTK-PASTA-Motiven im Komplex mit Muropeptiden oder  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Manuse *et al.*, 2015). Andere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die PASTA-Domänen für die korrekte zelluläre Lokalisierung der Proteine verantwortlich sein könnten. In *S. pneumoniae* beispielsweise sind die PASTA-Domänen von StkP notwendig, damit das Protein am Septum aufzufinden ist. Und auch PknB (*M. tuberculosis*) lokalisiert ohne PASTA-Motive nicht am Septum und den Zellpolen (Mir *et al.*, 2011, Fleurie *et al.*, 2012, Manuse *et al.*, 2015, Kaur *et al.*, 2019).

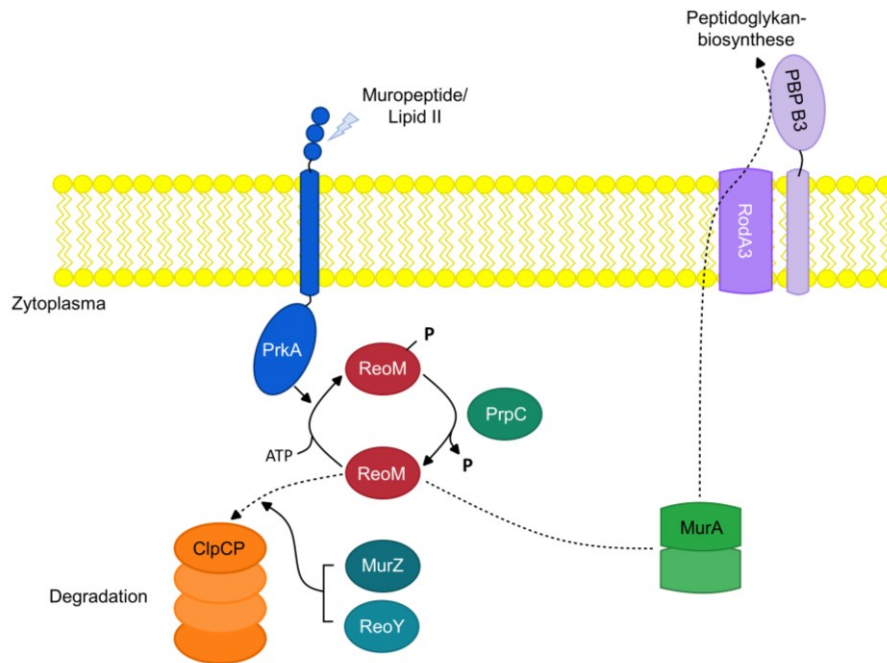
Wie bereits zu Beginn des Abschnitts erwähnt, übernehmen PASTA-eSTKS regulatorische Funktionen in der PG-Biosynthese. In *M. tuberculosis* wurde die Beteiligung von PknB an einer Signalkaskade identifiziert, welche als homöostatischer Regulator des Zellwandstoffwechsels fungiert. PknB phosphoryliert in diesem Signalweg das Transmembranprotein MviN, welches essentiell für das Zellwachstum und die PG-Biosynthese ist (Gee *et al.*, 2012). Ein weiteres Phosphorylierungsziel von PknB ist das Amidase-ähnliche Protein CwlM, das in Folge der Phosphorylierung mit MurA assoziiert und die Aktivität des Enzyms erhöht. Unter Hungerbedingungen wird CwlM dephosphoryliert, wodurch die MurA-Aktivität verringert und die PG-Biosynthese reduziert wird (Boutte *et al.*, 2016). In *B. subtilis* wird die GTase RodZ durch PrkC phosphoryliert, wodurch sich die Dichte der MreB-Filamente und damit einhergehend die Wachstumsrate erhöht (Sun *et al.*, 2023). Durch Phosphoproteomanalysen konnten außerdem zahlreiche weitere Phosphorylierungstargets von PASTA-eSTKS identifiziert werden. In den Organismen *S. pneumoniae*, *B. subtilis* und *M. tuberculosis* konnten unter anderem DivIVA, GpsB und FtsZ als Substrate gefunden werden (Kang *et al.*, 2005, Thakur & Chakraborti, 2006, Sun *et al.*, 2010, Pompeo *et al.*, 2015). Für die PASTA-eSTK PrkA aus *L. monocytogenes* konnten mittels Phosphoproteomanalysen 23 Substrate identifiziert werden (Kelliher *et al.*, 2021).

Zusätzlich konnte Yvck (GlmR), eine Uridyltransferase, die UDP-GlcNAc aus GlcNAc-1P und UTP synthetisieren kann, als Phosphorylierungsziel von PrkA bestimmt werden (Pensinger *et al.*, 2016, Pensinger *et al.*, 2023). Die Regulation der Phosphorylierung von GlmR ist wichtig für das intrazelluläre Überleben und die Virulenz des Bakteriums (Pensinger *et al.*, 2016).

### 1.5.3 Regulation der PG-Biosynthese durch den PrkA/ReoM/MurA-Signalweg

Ein weiterer Regulationsweg der Zellwandbiosynthese in *L. monocytogenes*, in dem die PASTA-eSTK PrkA involviert ist, wurde 2020 entdeckt und betrifft das erste Enzym der Peptidoglykanbiosynthese MurA (Brown *et al.*, 1995, Wamp *et al.*, 2020). Ausgangspunkt für die Aufdeckung des Signalweges war eine  $\Delta$ *gpsB*-Mutante, der das späte Zellteilungsprotein GpsB fehlt. Dieser Stamm zeigt kein Wachstum bei 42 °C, wie bereits in Abschnitt 1.3.2 erwähnt und bildet stattdessen in hoher Frequenz Suppressoren (Rismondo *et al.*, 2016a, Rismondo *et al.*, 2016b). Die Analyse der Suppressoren, die das Wachstumsdefizit teilweise oder ganz ausgleichen konnten, zeigte, dass die MurA-Aktivität über den kontrollierten Abbau von MurA durch die ClpCP-Protease reguliert wird (vgl. Abb.: 6) (Rismondo *et al.*, 2016a, Wamp *et al.*, 2020). Der ClpCP-Proteasekomplex besteht aus der Protease ClpP und der ATPase ClpC und wirkt an der Proteindegradation bei Hitzestress mit (Rouquette *et al.*, 1996, Rismondo *et al.*, 2016a, Elsholz *et al.*, 2017) (vgl. Absch.: 1.5.1). Damit MurA von der Protease degradiert werden kann, ist die Anwesenheit der Proteine MurZ (MurA-Paralog), ReoY und ReoM notwendig. Stämme, denen eines dieser Proteine oder ClpC fehlt, akkumulieren MurA (Rismondo *et al.*, 2016a, Wamp *et al.*, 2020). Welche Funktion ReoY oder MurZ bei der Degradation von MurA einnehmen ist jedoch noch nicht bekannt (Wamp *et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022). Zu ReoM finden sich homologe Proteine im gesamten Phylum der *Firmicutes*. Eines ist IreB aus *Enterococcus faecalis*, welches durch die PASTA-eSTK IreK phosphoryliert und durch die dazugehörige Phosphatase IreP dephosphoryliert wird (Hall *et al.*, 2013, Wamp *et al.*, 2020). Den gleichen Mechanismus findet man auch in *L. monocytogenes*. ReoM wird durch die IreK/IreP-Homologe PrkA und PrpC an Threonin 7 der Aminosäuresequenz phosphoryliert bzw. dephosphoryliert (Wamp *et al.*, 2020). Im phosphorylierten Zustand interagiert ReoM nicht mit MurA und daraus resultiert, dass MurA nicht proteolysiert werden kann (Wamp

*et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022). Erst wenn ReoM durch PrpC dephosphoryliert wurde, ist eine Interaktion wieder möglich und MurA wird abgebaut (vgl. Abb.: 6) (Wamp *et al.*, 2020). Durch die Identifikation von Suppressormutationen in *murA* (*murA* S262L und *murA* N197D), die ebenfalls eine Akkumulation von MurA verursachen und gleichzeitig eine verringerte Interaktionsfähigkeit mit ReoM zeigen, wird die Aussage unterstützt, dass eine Interaktion zwischen ReoM und MurA stattfinden muss, um die Degradation von MurA einzuleiten (Wamp *et al.*, 2022). Durch welches Signal die Phosphorylierung von ReoM ausgelöst wird, ist noch nicht sicher geklärt. Wie bereits in Abschnitt 1.5.2 erwähnt, wird angenommen, dass PASTA-eSTKs wie PrkA mit ihren extrazellulären PASTA-Domänen Zellwandstress in Form von akkumulierendem Lipid II oder Muropeptiden wahrnehmen und in Folge dessen Substrate, wie in diesem Fall ReoM phosphorylieren (Mir *et al.*, 2011, Hardt *et al.*, 2017, Kaur *et al.*, 2019, Wamp *et al.*, 2020). Nachgewiesen ist, dass die Phosphorylierung von ReoM essentiell für die Lebensfähigkeit vom *L. monocytogenes*-Laborstamm EGD-e ist (Wamp *et al.*, 2020). Und ebenso essentiell sind die Kinase PrkA und die Phosphatase PrpC (Wamp *et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022). Wenn der Abbau von MurA verhindert wird und MurA akkumuliert, wirkt sich das auch auf die Morphologie und Physiologie von *L. monocytogenes* aus. In Stämmen, in denen sich MurA anreichert, bilden die Zellen an den Zellpolen, dickere Zellwände aus. Außerdem besitzen solche Stämme eine gesteigerte Resistenz gegenüber dem Cephalosporin-Antibiotikum Ceftriaxon, die abhängig von der Anwesenheit der Enzyme PBPB3 und RodA3 ist (Wamp *et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022).



**Abbildung 6: Regulation der Peptidoglykanbiosynthese mittels kontrollierter Degradation von MurA nach (Wamp *et al.*, 2022).**

PrkA phosphoryliert ReoM in Anwesenheit von Zellwandstress. P-ReoM unterstützt nicht mehr den ClpCP-abhängigen MurA-Abbau, so dass sich MurA ansammeln und die PG-Biosynthese stattfinden kann. Die Steigerung der PG-Biosynthese durch die MurA-Akkumulation, erfordert RodA3 und PBPB3 (Wamp *et al.*, 2022).

Die Regulationen der Peptidoglykanbiosynthese mittels der kontrollierten Proteolyse von MurA wurde in ähnlicher Form auch in den Organismen *B. subtilis*, *S. aureus* und *E. faecalis* gefunden (Kelliher *et al.*, 2021, Mascari *et al.*, 2023, Sun *et al.*, 2023). Eine interessante Ausnahme bildet *S. pneumoniae*. In diesem Organismus fungiert das ReoM-Homolog IreB als Regulator der MurA- und MurZ-Aktivität. IreB wird ebenfalls phosphoryliert. Da noch nicht geklärt ist, ob phosphoryliertes oder unphosphoryliertes IreB mit MurZ/MurA in *S. pneumoniae* interagiert, besteht die Möglichkeit, dass entweder phosphoryliertes IreB die Aktivität beider Enzyme erhöht oder dass unphosphoryliertes IreB ihre Aktivität verringert. Die zellulären Mengen von MurA oder MurZ werden jedoch nicht beeinflusst und sind auch nicht abhängig von ClpCP (Tsui *et al.*, 2023, Winkler *et al.*, 2023). Dies könnte daran liegen, dass *S. pneumoniae* kein Homolog zu ReoY besitzt, das in *L. monocytogenes* für die Degradation von MurA notwendig ist (Wamp *et al.*, 2020, Tsui *et al.*, 2023).

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die zentrale Komponente der Regulation der Peptidoglykanbiosynthese durch die Proteolyse von MurA in *L. monocytogenes* ist jedoch ReoM (Wamp *et al.*, 2020). Durch die reversible posttranslationale Modifikation in Form einer Phosphorylierung des Proteins wird der Abbau von MurA gesteuert (Wamp *et al.*, 2020). Eine genauere Untersuchung dieses zentralen Proteins des Regulationsweges und vor allem die Untersuchung des Phosphorylierungszustands von ReoM sollten Aufschluss über die Anpassung der Peptidoglykanbiosynthese an Umweltbedingungen liefern, für ein besseres Verständnis der Funktionsweise des PrkA/ReoM/MurA-Regulationsweges sorgen und Aufschluss darüber geben ob weitere Proteine oder Proteinkomplexe Teil des Regulationsweges sind. Zusätzlich sollte durch Proteomanalysen geklärt werden, ob MurA das einzige Substrat der ReoM-vermittelten Proteolyse durch den ClpCP-Proteasekomplex ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt. Alle generierten *L. monocytogenes*-Mutanten sind Abkömmlinge der Wildtypstämme EGD-e und 10403S (Serovar 1/2a). Als Standardwirt für die verwendeten Plasmide diente *E. coli* TOP10.

**Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme**

| Name    | Genotyp                                                                                                     | Referenz/Konstruktion            |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| EGD-e   | Wildtyp, Serovar 1/2a                                                                                       | (Glaser <i>et al.</i> , 2001)    |
| 10403S  | Wildtyp, Serovar 1/2a                                                                                       | (Bécavin <i>et al.</i> , 2014)   |
| ANG4314 | 10403S $\Delta$ ftsW1 ( <i>Imo1071</i> ) attB::P <sub>help</sub> -lacO-ftsW1 lacI neo                       | (Rismondo <i>et al.</i> , 2019)  |
| ANG5192 | 10403S $\Delta$ rodA1-3 ( <i>Imo2427-28</i> , <i>Imo2687</i> ) attB::P <sub>help</sub> -lacO-rodA1 lacI neo | (Rismondo <i>et al.</i> , 2019)  |
| LMJR4   | $\Delta$ gpsB attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB R25A lacI neo                                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR18  | $\Delta$ pbpB2 ( <i>Imo2039</i> ) attB::P <sub>help</sub> -lacO-pbpB2 lacI neo                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2015)  |
| LMJR19  | $\Delta$ gpsB ( <i>Imo1888</i> )                                                                            | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR27  | $\Delta$ pbpB1 ( <i>Imo1438</i> ) attB::P <sub>help</sub> -lacO-pbpB1 lacI neo                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2015)  |
| LMJR28  | $\Delta$ gpsB $\Delta$ divIVA                                                                               | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR68  | $\Delta$ gpsB attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB L24A lacI neo                                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR104 | $\Delta$ murZ ( <i>Imo2552</i> )                                                                            | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a) |
| LMJR116 | attB::P <sub>help</sub> -lacO-murA lacI neo                                                                 | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a) |
| LMJR123 | $\Delta$ murA ( <i>Imo2526</i> ) attB::P <sub>help</sub> -lacO-murA lacI neo                                | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a) |
| LMJR130 | $\Delta$ gpsB attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB Y27A lacI neo                                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR131 | $\Delta$ gpsB attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB V32A lacI neo                                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR132 | $\Delta$ gpsB attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB L36A lacI neo                                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR133 | $\Delta$ gpsB attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB D37A lacI neo                                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR134 | $\Delta$ gpsB attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB I40A lacI neo                                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |

| Name    | Genotyp                                                               | Referenz/Konstruktion            |
|---------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| LMJR135 | $\Delta gpsB$ attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB D33A lacI neo        | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR138 | $\Delta clpC$ (Imo0232)                                               | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a) |
| LMJR156 | $\Delta Imo2550$                                                      | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a) |
| LMJR161 | $\Delta gpsB$ attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB T88A lacI neo        | (Cleverley <i>et al.</i> , 2016) |
| LMJR162 | $\Delta gpsB$ attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB T88D lacI neo        | (Cleverley <i>et al.</i> , 2016) |
| LMJR163 | $\Delta gpsB$ attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB R96A lacI neo        | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR164 | $\Delta gpsB$ attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB E101A lacI neo       | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016b) |
| LMJR174 | $\Delta gtcA$ (Imo2549)                                               | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a) |
| LMKK35  | $\Delta minCD$ (Imo1545-1544)                                         | (Kaval <i>et al.</i> , 2014)     |
| LMPR1   | $\Delta clpC$ attB::P <sub>help</sub> -reoM-his neo                   | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)      |
| LMPR9   | <i>murA</i> N197D attB::P <sub>help</sub> -reoM-his neo               | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)      |
| LMPR13  | $\Delta clpC$ <i>murA</i> S262L attB::P <sub>help</sub> -reoM-his neo | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)      |
| LMPR14  | $\Delta clpC$ <i>murA</i> N197D attB::P <sub>help</sub> -reoM-his neo | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)      |
| LMS2    | $\Delta divIVA$ (Imo2020)                                             | (Halbedel <i>et al.</i> , 2012)  |
| LMS57   | $\Delta pbpA1$ (Imo1892)                                              | (Rismondo <i>et al.</i> , 2015)  |
| LMS148  | $\Delta minC$ (Imo1545)                                               | (Kaval <i>et al.</i> , 2014)     |
| LMS163  | $\Delta pgdA$ (Imo0415)                                               | (Rismondo <i>et al.</i> , 2018)  |
| LMS185  | $\Delta gpsB$ attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB F91A lacI neo        | (Cleverley <i>et al.</i> , 2016) |
| LMS186  | $\Delta gpsB$ attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB L94A lacI neo        | (Cleverley <i>et al.</i> , 2016) |
| LMS187  | $\Delta gpsB$ attB::P <sub>help</sub> -lacO-gpsB F105A lacI neo       | (Cleverley <i>et al.</i> , 2016) |
| LMS201  | $\Delta Imo2550$ - $\Delta gtcA$                                      | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a) |
| LMS266  | $\Delta prkA$ (Imo1820) <i>murA</i> N197D                             | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)      |
| LMS271  | $\Delta reoM$ (Imo1503) <i>murA</i> N197D                             | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)      |
| LMSW30  | $\Delta reoM$ (Imo1503)                                               | (Wamp <i>et al.</i> , 2020)      |
| LMSW32  | $\Delta reoY$ (Imo1921)                                               | (Wamp <i>et al.</i> , 2020)      |
| LMSW83  | $\Delta prpC$ (Imo1821) attB::P <sub>help</sub> -lacO-prpC lacI neo   | (Wamp <i>et al.</i> , 2020)      |
| LMSW84  | $\Delta prkA$ attB::P <sub>help</sub> -lacO-prkA lacI neo             | (Wamp <i>et al.</i> , 2020)      |
| LMSW136 | attB::P <sub>help</sub> -lacO- <i>murA</i> S262L lacI neo             | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)      |
| LMSW137 | attB::P <sub>help</sub> -lacO- <i>murA</i> N197D lacI neo             | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)      |

| Name         | Genotyp                                                                    | Referenz/Konstruktion                   |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| LMSW145      | $\Delta prkA \Delta murZ$                                                  | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)             |
| LMSW156      | $murA N197D$                                                               | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)             |
| <i>shg21</i> | $\Delta gpsB murA N197D$                                                   | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)             |
| ANG5140      | 10403S $\Delta Imo1625-4 attB::P_{help-lacO-Imo1625 lacI neo}$             | Jeanine Rismondo,<br>Angelika Gründling |
| LMJD22       | $attB::P_{help-reoM-his neo}$                                              | Janina Döhling                          |
| LMKK61       | $\Delta minJ (Imo2502)$                                                    | Karan Kaval                             |
| LMLR8        | $\Delta sepF (Imo2030)$                                                    | Lisa Rosemeyer                          |
| LMLR9        | $\Delta zapA (Imo1229)$                                                    | Lisa Rosemeyer                          |
| LMS278       | $prkA\Delta C (Imo1820^{1-355})$                                           | Sven Halbedel                           |
| LMS315       | $\Delta clpC attB::P_{help-lacO-murA lacI neo}$                            | Sven Halbedel                           |
| LMPR5        | $\Delta prkA murA N197D attB::P_{help-reoM-his neo}$                       | pJD16 → LMS266                          |
| LMPR10       | $\Delta gpsB murA N197D attB::P_{help-reoM-his neo}$                       | pJD16 → <i>shg21</i>                    |
| LMPR25       | $\Delta murZ attB::P_{help-reoM-his neo}$                                  | pJD16 → LMJR104                         |
| LMPR26       | $\Delta reoY attB::P_{help-reoM-his neo}$                                  | pJD16 → LMSW32                          |
| LMPR27       | $prkA\Delta C \Delta divIVA$                                               | pSH186 ↔ LMS278                         |
| LMPR29       | $\Delta murZ \Delta prkA attB::P_{help-reoM-his neo}$                      | pJD16 → LMSW145                         |
| LMPR30       | $prkA\Delta C attB::P_{help-reoM-his neo}$                                 | pJD16 → LMS278                          |
| LMPR34       | $\Delta gpsB \Delta prpC murA N197D attB::P_{help-reoM-his neo}$           | pSW34 → LMPR10                          |
| LMPR42       | $murA N197D attB::P_{help-reoM T7A-his neo}$                               | pPR24 → LMSW156                         |
| LMPR48       | $\Delta reoM murA N197D attB::P_{help-reoM T7A-his neo}$                   | pPR24 → LMS271                          |
| LMPR49       | $prkA\Delta C attB::P_{help-lacO-murA lacI neo}$                           | pJR82 → LMS278                          |
| LMPR50       | $attB::P_{help-lacO-murZ lacI neo}$                                        | pJR71 → EGD-e                           |
| LMPR51       | $attB::P_{help-lacO-murA C117A lacI neo}$                                  | pPR30 → EGD-e                           |
| LMPR52       | $\Delta clpC \Delta murA attB::P_{help-lacO-murA lacI neo}$                | pJR67 → LMS315                          |
| LMPR54       | 10403S $\Delta clpC \Delta Imo1625-4 attB::P_{help-lacO-Imo1625 lacI neo}$ | pPR31 ↔ ANG5149                         |
| LMPR56       | $attB::P_{help-lacO-murA N23A lacI neo}$                                   | pPR40 → EGD-e                           |

| Name   | Genotyp                                               | Referenz/Konstruktion |
|--------|-------------------------------------------------------|-----------------------|
| LMPR57 | <i>attB::P<sub>help</sub>-lacO-murA K22V lacI neo</i> | pPR42 → EGD-e         |

Der Pfeil (→) steht für ein Transformationsereignis und der Doppelpfeil (↔) zeigt Gendeletionen an, die durch chromosomale Insertion und anschließende Exzision von pMAD-Plasmidderivaten erhalten wurden.

Tabelle 2: Verwendete Plasmide

| Name   | Genotyp                                          | Referenz/Konstruktion                                                                                                                       |
|--------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pET11a | <i>bla P<sub>T7</sub> lacI</i>                   | Novagen                                                                                                                                     |
| pIMK2  | <i>P<sub>help</sub> neo</i>                      | (Monk <i>et al.</i> , 2008)                                                                                                                 |
| pIMK3  | <i>P<sub>help</sub>-lacO lacI neo</i>            | (Monk <i>et al.</i> , 2008)                                                                                                                 |
| pMAD   | <i>bla erm bgaB</i>                              | (Arnaud <i>et al.</i> , 2004)                                                                                                               |
| pJD16  | <i>P<sub>help</sub>-reoM-his neo</i>             | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)                                                                                                                 |
| pJR67  | <i>bla erm bgaB ΔmurA</i>                        | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a)                                                                                                            |
| pJR71  | <i>P<sub>help</sub>-lacO-murZ lacI neo</i>       | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a)                                                                                                            |
| pJR82  | <i>P<sub>help</sub>-lacO-murA lacI neo</i>       | (Rismondo <i>et al.</i> , 2016a)                                                                                                            |
| pSH186 | <i>bla erm bgaB ΔdivIVA</i>                      | (Halbedel <i>et al.</i> , 2012)                                                                                                             |
| pSW37  | <i>bla erm bgaB ΔprpC</i>                        | (Wamp <i>et al.</i> , 2020)                                                                                                                 |
| pSW52  | <i>bla P<sub>T7</sub>-murA-strep lacI</i>        | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)                                                                                                                 |
| pSW61  | <i>bla P<sub>T7</sub>-murA S262L-strep lacI</i>  | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)                                                                                                                 |
| pSW62  | <i>bla P<sub>T7</sub>-murA N197D-strep lacI</i>  | (Wamp <i>et al.</i> , 2022)                                                                                                                 |
| pPR24  | <i>P<sub>help</sub>-reoM T7A-his neo</i>         | Basenaustausch mittels SW77/78 in pJD16                                                                                                     |
| pPR30  | <i>P<sub>help</sub>-lacO-murA C117A lacI neo</i> | Basenaustausch mittels PR90/91 in pJR82                                                                                                     |
| pPR31  | <i>bla erm bgaB ΔclpC</i>                        | Amplifikation <i>up-</i> und <i>downstream</i> Region von <i>clpC</i> mittels PR86/87 und PR88/89, Fusion und Ligation in pMAD (NcoI/BamHI) |
| pPR40  | <i>P<sub>help</sub>-lacO-murA N23A lacI neo</i>  | Basenaustausch mittels PR118/119 in pJR82                                                                                                   |
| pPR42  | <i>P<sub>help</sub>-lacO-murA K22V lacI neo</i>  | Amplifikation von <i>murA K22V</i> mittels JR189/PR123 und JR190/PR122, Fusion und Ligation in pIMK3                                        |
| pSW51  | <i>bla P<sub>T7</sub>-reoM-strep lacI</i>        | Sabrina Wamp                                                                                                                                |

| Name                      | Genotyp                | Referenz/Konstruktion |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| pETM11-<br><i>lmo1921</i> | <i>lmo1921-tev-his</i> | Zoe J. Rutter         |

## 2.2 Kultivierungsbedingungen

### 2.2.1 Nährmedien und Zusätze

Die verwendeten Nährmedien, Puffer und Nährmedienzusätze wurden bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert. Thermoinstabile Lösungen wurden mithilfe von Steritop-GV-Filtern (Merck KGaA) mit einer Porengröße von 0,22 µm oder mit Minisart™ Spritzenvorsatzfiltern (Sartorius) mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. In Tabelle 3 sind die optional eingesetzten Nährmedienzusätze aufgeführt.

**Tabelle 3: Nährmedienzusätze**

| Antibiotikum/<br>Medienzusatz | Stammkonzentration                                             | Endkonzentration        |                         |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                               |                                                                | <i>E. coli</i>          | <i>L. monocytogenes</i> |
| Ampicillin                    | 100 mg ml <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | 100 µg ml <sup>-1</sup> | -                       |
| Kanamycin                     | 50 mg ml <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>  | 50 µg ml <sup>-1</sup>  | 50 µg ml <sup>-1</sup>  |
| Erythromycin                  | 5 mg ml <sup>-1</sup> in Ethanol                               | -                       | 5 µg ml <sup>-1</sup>   |
| X-Gal                         | 50 mg ml <sup>-1</sup> in DMSO                                 | 50 µg ml <sup>-1</sup>  | 50 µg ml <sup>-1</sup>  |
| IPTG                          | 1 M in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                     | 1 mM                    | 1 mM                    |

### 2.2.2 Zellanzucht und Stammhaltung von *L. monocytogenes*

Alle *L. monocytogenes*-Stämme wurden standardmäßig in *Brain Heart Infusion* (BHI)-Medium bei 37 °C und 250 rpm im Rotationsschüttler (Innova TM43, New Brunswick Scientific) kultiviert. Für die kurzfristige Lagerung wurden die Bakterienstämme auf BHI-Agar-Platten vereinzelt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Die langfristige Stammhaltung erfolgte durch Zugabe von 25 % (v/v) Glycerin (Endkonzentration) zu den Bakterienkulturen und der Lagerung bei -70 °C.

BHI-Medium:

Bacto™ Brain Heart Infusion 37 g  
(Becton Dickinson GmbH)

H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad. 1 l

BHI-Agar:

Hirn–Herz–Infusionsagar 47 g  
(Becton Dickinson GmbH)

H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> ad. 1 l

### 2.2.3 Zellanzucht und Stammhaltung von *E. coli*

Für die Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurde Luria Bertani (LB)-Medium verwendet. Die Zellen wurden, wie die *L. monocytogenes*-Stämme bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Die kurzfristige Stammhaltung erfolgte auf LB-Agar-Platten. Für die langfristige Sicherung von Stämmen und Plasmiden wurden die Bakterienkulturen mit Glycerin (Endkonzentration 25 % (v/v)) versetzt und bei -70 °C aufbewahrt.

LB-Medium:

Trypton (Becton Dickinson GmbH) 10 g

Hefeextrakt (Becton Dickinson GmbH) 5 g

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| Natriumchlorid (Merck KGaA) | 10 g |
|-----------------------------|------|

$$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}} \quad \text{ad. 1 l}$$

### LB-Agar:

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| Trypton (Becton Dickinson GmbH)     | 10 g    |
| Hefeextrakt (Becton Dickinson GmbH) | 5 g     |
| Natriumchlorid (Merck KGaA)         | 10 g    |
| Agar No. 1 (Oxoid Limited)          | 15 g    |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>  | ad. 1 l |

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolation von DNA

#### 2.2.1.1 Plasmidisolation

Für die Präparation von Plasmiden wurden 4 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* TOP10-Derivaten mittels Zentrifugation bei 8000x g pelletiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH) nach Herstellerangaben. Abschließend wurde die Plasmid-DNA in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.1.2 Gewinnung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurden *L. monocytogenes*-Stämme in 5 ml BHI-Medium über Nacht kultiviert und anschließend 4 ml dieser Kulturen bei 8.000x g zentrifugiert, um die Zellen zu ernten. Diese wurden dann in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen wurden die Zellen mit dem TissueLyser (Qiagen GmbH) für die Dauer von 5 min aufgeschlossen. Eine erneute Zentrifugation bei 13.000x g für 1 min diente zur Abtrennung der Zelltrümmer und Glasperlen. Der Überstand, welcher die genomische DNA enthält, wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten dienten horizontale, 1%-ige (w/v) Agarosegele. Für die Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1x Tris-Acetat-EDTA- (TAE-) Puffer durch Aufkochen gelöst und in den Gießstand der

Elektrophorese-Kammern von BioRad ((Mini) SubCell, BioRad Laboratories GmbH) oder VWR (VWR® PerfectBlue Mini/Maxi, VWR International GmbH) gegossen. Die nach Größe aufzutrennenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x DNA-Ladepuffer (Gel Loading Dye, Purple, New England Biolabs Inc.) gemischt. Als Größenstandard wurde der GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder (0,25 kb – 10 kb, Thermo Scientific) mitgeführt. Die Auftrennung fand bei 120 V (PowerPac™ Basic, BioRad Laboratories GmbH) für 30-40 min statt. Als Elektrodenpuffer diente ebenfalls 1x TAE. Nach dem Lauf wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad für 10-20 min inkubiert und die Banden mit dem Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (BioRad Laboratories GmbH) und der Analyse-Software Image Lab 6.0 visualisiert.

### 50x TAE:

|                                     |         |
|-------------------------------------|---------|
| 0,5 mM EDTA pH 8,0                  | 100 ml  |
| Eisessig                            | 57,1 ml |
| Tris-Base                           | 242 g   |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 1l  |

### Ethidiumbromidbad:

|                                                 |            |
|-------------------------------------------------|------------|
| 0,5 % Ethidiumbromid<br>(Carl Roth GmbH+Co. KG) | 3 Tropfen  |
| 1x TAE                                          | ad. 300 ml |

### 2.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um die gewünschten DNA-Fragmente zu isolieren, wurden PCR-Produkte und Restriktionsverdaue in einem Agarosegel aufgetrennt (vgl. Abschnitt 2.2.2). Die gewünschten DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit nach

Herstellerangaben. Die DNA wurde abschließend in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  eluiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.4 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up Kit nach der Anleitung des Herstellers. Im letzten Schritt wurde die DNA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  eluiert und anschließend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde das Nanophotometer von der Firma IMPLEN verwendet. Dabei wurde die DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dieser Wert, sowie die Reinheit der DNA-Probe, welche über das A260/280-Verhältnis bestimmt wird, wurden automatisch vom Gerät ausgegeben.

### 2.2.6 Restriktionsenzymverdau

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen diente zur Erstellung oder Kontrolle von Plasmiden. Dabei wurden die Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  für analytische und 60  $\mu\text{l}$  für präparative Zwecke durchgeführt. Die Enzyme und Puffer wurden von New England Biolabs bezogen und nach Herstellerangaben verwendet. Die Überprüfung der Restriktion erfolgte mithilfe der Agarosegelelektrophorese.

### 2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Erstellung neuer Plasmide wurden DNA-Fragmente miteinander ligiert. Der Reaktionsansatz hatte dabei ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$ . Das Verhältnis von Vektor- und Fragment-DNA betrug ca. 1:3. Des Weiteren enthielt der Ansatz jeweils 2  $\mu\text{l}$  10x Ligationspuffer und T4-DNA-Ligase (New England Biolabs Inc.) und wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf das finale Volumen aufgefüllt. Abschließend wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

## 2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

## 2.2.8.1 Primererstellung

Für die Ableitung von Oligonukleotidprimern wurde das Programm „Clone Manager Professional 9“ (Scientific & Educational Software), sowie das im Internet frei verfügbare Werkzeug „OligoCalc“ (Kibbe, 2007) genutzt. Die in Tabelle 4 aufgeführten und verwendeten Primer wurden kommerziell von der Firma „IDT Integrated DNA Technologies“ in lyophilisierter Form bezogen und in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (100 pmol/μl) resuspendiert.

**Tabelle 4: Verwendete Primer**

| Name  | Sequenz 5' → 3'                                         | Beschreibung                                               |
|-------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| JR189 | CGCGCCATGGAAAAATTATTGTACGCGG<br>TGG                     | Insertion von <i>murA</i> in<br>pIMK3, NcoI ( <i>fw</i> )  |
| JR190 | GCGCGTCGACTTAGAATAAAGACGCTAAG<br>TTTGTTAC               | Insertion von <i>murA</i> in<br>pIMK3, Sall ( <i>rev</i> ) |
| PR86  | CAGATCTATCGATGCATGCCATGGAGGAT<br>TAAAAGTGTGCTTGAAGCGATT | <i>clpC</i> (10403S) upstream,<br>NcoI ( <i>fw</i> )       |
| PR87  | TACTTAGTCGACCATTGTTGTTTCCTCCTT<br>ATCGTA                | <i>clpC</i> (10403S) upstream,<br>Sall ( <i>rev</i> )      |
| PR88  | ACAATGGTCGACTAAGTAGAAAGCCTTCCT<br>TAATAAAA              | <i>clpC</i> (10403S)<br>downstream, Sall ( <i>fw</i> )     |
| PR89  | CTCGCGTCGGGCGATATCGGATCCTTGTA<br>AGCGTGAGTTGCGCTGATACT  | <i>clpC</i> (10403S)<br>downstream, BamHI ( <i>rev</i> )   |
| PR90  | CCTGGTGGAGCTGCAATTGGTTCTAGACC<br>TGTT                   | C117A Substitution in<br><i>murA</i> ( <i>fw</i> )         |
| PR91  | AACCAATTGCAGCTCCACCAGGTAAAGCT<br>ACACG                  | C117A Substitution in<br><i>murA</i> ( <i>rev</i> )        |
| PR118 | GGTGCCAAAGCTGCTGTATTACCGGTAAT                           | N23A Substitution in<br><i>murA</i> ( <i>fw</i> )          |
| PR119 | TAATACAGCAGCTTTGGCACCTTCCATTT                           | N23A Substitution in<br><i>murA</i> ( <i>rev</i> )         |
| PR122 | TGGAAGGTGCCGTAAATGCTGTATTACCG<br>G                      | K22V Substitution in<br><i>murA</i> ( <i>fw</i> )          |
| PR123 | ATACAGCATTTACGGCACCTTCCATTTTCA                          | K22V Substitution in<br><i>murA</i> ( <i>rev</i> )         |

| Name | Sequenz 5' → 3'                             | Beschreibung                                      |
|------|---------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| SW77 | GTAAAACATTGCTTGATCTTTTGAATCCAT<br>GGGTTTCAC | T7A Substitution in <i>reoM</i><br>( <i>rev</i> ) |
| SW78 | GATCAAGCAATGTTTTACAACCTTCGGCG<br>ATGATTC    | T7A Substitution in <i>reoM</i><br>( <i>fw</i> )  |

#### 2.2.8.2 Standard Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Abschnitten für präparative und analytische Zwecke wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) genutzt. In Abhängigkeit von der späteren Verwendung wurden Volumina zwischen 25 µl und 100 µl gewählt. Außerdem wurden die Annealing-Temperatur, sowie die Elongationszeit entsprechend der verwendeten Primer und zu amplifizierenden Fragmentlängen, angepasst. Für präparative Anwendungen, wie die Amplifikation von Inserts, wurde die Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.) verwendet. Analytische DNA-Amplifikationen, wie zum Beispiel der Nachweis von Deletionen oder Insertionen wurden mithilfe der *Taq*-DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.) durchgeführt. In den Tabellen 5, 6 und 7 sind die Zusammensetzungen der PCR-Ansätze und die PCR-Programme aufgeführt.

**Tabelle 5: Phusion-Polymerase PCR-Reaktionsansatz**

| Bestandteil                        | Phusion-Polymerase (25 µl Ansatz) |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| Template-DNA                       | 0,125 µl                          |
| Puffer (5x Phusion HF)             | 5 µl                              |
| 40 mM dNTPs                        | 0,25 µl                           |
| Primer fw/rev (100 pmol/µl)        | 0,125 µl / 0,125 µl               |
| Polymerase                         | 0,125 µl                          |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> | 19,25 µl                          |

**Tabelle 6: Taq-Polymerase PCR-Reaktionsansatz**

| Bestandteil                               | Taq-Polymerase (25 µl Ansatz) |
|-------------------------------------------|-------------------------------|
| Template-DNA                              | 5 µl                          |
| Puffer (10x Standard Taq Reaktionspuffer) | 2,5 µl                        |
| 40 mM dNTPs                               | 0,25 µl                       |
| Primer fw/rev (100 pmol/µl)               | 0,2 µl / 0,2 µl               |
| Polymerase                                | 0,25 µl                       |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>        | 16,6 µl                       |

**Tabelle 7: Standard PCR-Programm**

| Schritt                | Temperatur | Zeit      |             |
|------------------------|------------|-----------|-------------|
| initiale Denaturierung | 95 °C      | 5 min     |             |
| Denaturierung          | 95 °C      | 30 s      | } 32 Zyklen |
| Annealing              | 45 – 65 °C | 30 s      |             |
| Elongation             | 72 °C      | 30 s / kb |             |
| Nachsynthese           | 72 °C      | 5 min     |             |
| Pause                  | 16 °C      | ∞         |             |

### 2.2.8.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Um Nukleotidsubstitutionen in bereits vorhandenen Plasmiden vorzunehmen, wurde die ortsgerichtete Mutagenese verwendet (Liu & Naismith, 2008). Dabei besitzen die Primer einen komplementären Bereich am 5'-Ende, in dem sich auch die einzubringende Mutation befindet. Mit diesen Primern wurde nach dem Standard-PCR-Protokoll das gesamte Plasmid amplifiziert (Elongationszeit 1 min/kb). Nach der PCR wurde der Reaktionsansatz 2,5 h mit DpnI (New England Biolabs Inc.) bei 37 °C inkubiert, um die parentale DNA abzubauen. Anschließend erfolgte die Transformation des kompletten Ansatzes in *E. coli* TOP10.

### 2.2.9 Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Plasmiden oder PCR-Produkten wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* verwendet (Sanger *et al.*, 1977). Die

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Programm der Sequenzierreaktion sind in den nachfolgenden Tabellen (Tab.: 8 & Tab.: 9) aufgeführt. Für die Sequenzierreaktion wurde das BigDye™ Terminator v3.1 Kit (Thermo Scientific) verwendet. Die Analyse der Sequenzierungen erfolgte durch das Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts (MF1) und die abschließende Auswertung der Daten wurde mit dem Programm Clone Manager Professional 9 (Sci-Ed-Software) durchgeführt.

**Tabelle 8: Zusammensetzung Sequenzierreaktion**

| Bestandteil                                                   | Volumen   |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| Template-DNA<br>(150–300 ng Plasmid-DNA/10-20 ng PCR-Produkt) | X µl      |
| ABI-Puffer (5x)                                               | 2 µl      |
| BigDye 3.1                                                    | 0,5 µl    |
| Primer (10 pmol/µl)                                           | 0,5 µl    |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                           | ad. 10 µl |

**Tabelle 9: Ablauf Sequenzierreaktion**

| Schritt                | Temperatur | Zeit     |             |
|------------------------|------------|----------|-------------|
| Initiale Denaturierung | 96 °C      | 1:30 min |             |
| Denaturierung          | 96 °C      | 10 s     | } 45 Zyklen |
| Annealing              | 52 °C      | 5 s      |             |
| Elongation             | 60 °C      | 4 min    |             |
| Pause                  | 4 °C       | ∞        |             |

### 2.2.10 Herstellung rekombinanter *E. coli*-Stämme

#### 2.2.10.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Um *E. coli* TOP10 und BL21 kompetent zu machen, wurde die CaCl<sub>2</sub>-Methode nach Sambrook *et al.* genutzt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden 25 ml LB-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur beimpft und 2,5 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,4 erreicht war. Anschließend wurden die Zellen durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 5000x g und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde in 12 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert.

Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und die Zellen abschließend in ca. 1 ml der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgenommen. Für jede Transformation wurden frisch hergestellte Zellen eingesetzt.

### 2.2.10.2 Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Für die Transformation wurden 100  $\mu\text{l}$  der chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen mit 20  $\mu\text{l}$  eines Ligationsansatzes oder 1  $\mu\text{l}$  isolierter Plasmid-DNA gemischt. Der Ansatz wurden dann 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 1 min. Der Transformationsansatz wurde danach erneut auf Eis für 3 min heruntergekühlt. Daraufhin wurden 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium hinzugegeben und die Zellen 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Abschließend wurde der Transformationsansatz auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und die Zellen über Nacht bei 37 °C angezogen.

### 2.2.11 Herstellung rekombinanter *L. monocytogenes*-Stämme (Monk *et al.*, 2008)

#### 2.2.11.1 Herstellung kompetenter *L. monocytogenes*-Stämme

Die *L. monocytogenes*-Stämme wurden in 40 ml BHI-Medium 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und 3 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Danach wurden der Kultur 10  $\mu\text{g/ml}$  (Endkonzentration) Ampicillin hinzugefügt und die Inkubation bei 37 °C und 250 rpm für 2 h fortgesetzt. Daraufhin wurden die Zellen bei 5000x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und so vom Medium abgetrennt. Das Zellpellet wurde in 10 ml Sucrose-Glycerol-Waschpuffer (SGWB) aufgenommen und die Zentrifugation wiederholt. Dieser Schritt wurde insgesamt 2 weitere Male mit 10 ml und 5 ml SGWB durchgeführt. Danach wurde das Pellet in 5 ml SGWB resuspendiert und 10  $\mu\text{g/ml}$  (Endkonzentration) Lysozym hinzugefügt. Um die Aktivität des Lysozyms zu steigern wurde die Zellsuspension für 20 min bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal in 5 ml SGWB gewaschen. Abschließend wurde das Pellet dann in ca. 300  $\mu\text{l}$  SGWB aufgenommen und zu je 80  $\mu\text{l}$  aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden bei -70 °C gelagert.

### Saccharose-Glycerol-Waschpuffer (SGWB) (sterilfiltriert):

Glycerin      10 % (v/v)

Saccharose    500 mM

pH 7,0 mit NaOH

#### 2.2.11.2 Fällung von Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden zunächst 50 µl Plasmid-DNA gefällt. Dazu wurden 5 µl 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und 125 µl reinst. Ethanol hinzugegeben und die Lösung bei -20 °C für mindestens 20 min inkubiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000x g und 4 °C für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen und die gefällte DNA wurde mit 750 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Dazu wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Abschließend wurde der Überstand erneut abgenommen und die pelletierte DNA getrocknet.

#### 2.2.11.3 Transformation von *L. monocytogenes*

Zu der gefällten Plasmid-DNA wurden 80 µl elektrokompenter *L. monocytogenes*-Zellen gemischt und in eine Elektroporationsküvette (VWR, 2 mm) überführt. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser Xcell™ Elektroporator (Bio-Rad Laboratories Inc.) durchgeführt. Dazu wurde das voreingestellte Protokoll für *Agrobacterium tumefaciens* (25 µF, 200 Ω und 2400 V) verwendet. Nach der Elektroporation wurden 900 µl BHI-Medium zu den Zellen gegeben und diese bei 30 °C für 1,5 h (pMAD-Derivate) oder bei 37 °C für 1 h (pIMK-Derivate) inkubiert. Abschließend wurden die Zellen pelletiert, im Rückfluss resuspendiert und auf selektiven BHI-Agarplatten ausplattiert. Für pMAD-Derivate erfolgte dann das Wachstum bei 30 °C für 2-3 Tage. Zellen, die mit pIMK-Derivaten transformiert wurden, wurden bei 37 °C 1-2 Tage angezogen.

#### 2.2.11.4 Deletion und Mutation von Genen in *L. monocytogenes*

Für die Deletion von Genen in *L. monocytogenes* wurde die Methode von Arnaud *et al.* genutzt, bei der keine exogene DNA inseriert wird (Arnaud *et al.*, 2004). Dafür wurden DNA-Bereiche, die *up*- und *downstream* des zu deletierenden Gens liegen inklusive des Start- und Stopcodons, mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die beiden Fragmente ebenfalls mittels PCR fusioniert und

das entstandene Fusionsprodukt durch Ligation in den pMAD-Vektor eingebracht. Das resultierende Plasmid wurde wie zuvor beschrieben in *L. monocytogenes* transformiert. Die Klone wurden auf BHI-Agarplatten mit Erythromycin und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal) selektiert. Nach 2–3 -tägigem Wachstum bei 30 °C wurden blaue Klone auf einer neuen BHI-Agarplatte mit den gleichen Selektionsmarkern vereinzelt. Um die Integration des Plasmids zu erzwingen wurden die Zellen bei 42 °C für 2 Tage inkubiert. Anschließend wurden 5 ml BHI-Medium mit 5-6 blauen Einzelkolonien beimpft und zunächst 2 h bei 30 °C und danach 4 h bei 42 °C angezogen. Bei diesem Schritt soll das Plasmid, welches eine hitzesensitiven *origin of replication* besitzt, verloren gehen. Nach diesem Temperaturprotokoll wurden die Zellen in Verdünnungsstufen von  $10^{-4}$  bis  $10^{-8}$  auf X-Gal-Agarplatten ausplattiert und 2 Tage bei 37 °C angezogen. Weiße Kolonien wurden dann parallel auf BHI-Agarplatten mit X-Gal und BHI-Agarplatten mit X-Gal und Erythromycin vereinzelt, um diejenigen Klone zu identifizieren, die durch ein *double crossover* das pMAD-Derivat verloren haben. Diese Klone wurden abschließend nochmals mittels PCR auf die Deletion und den Plasmidverlust überprüft.

### 2.2.11.5 Ektopische Expression von Genen in *L. monocytogenes*

Um die Auswirkung der Quantität von Genprodukten zu untersuchen oder essentielle Gene zu depletieren, wurden Derivate der pIMK2- und pIMK3-Vektoren eingesetzt. Diese Vektoren ermöglichen eine konstitutive Überexpression (pIMK2) oder eine IPTG- (Isopropyl- $\beta$ -D-1-Thiogalaktopyranosid-) induzierbare Expression (pIMK3) des *in frame* inserierten Gens. Nach der Transformation in *L. monocytogenes* integriert das Plasmid in den tRNA<sup>Arg</sup>-Locus und vermittelt dem Stamm damit gleichzeitig eine Kanamycinresistenz. Die Insertion von pIMK2- und pIMK3-Derivaten in den tRNA<sup>Arg</sup>-Locus Kanamycin-resistenter Klone wurde durch PCR bestätigt.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Isolation zellulärer Proteine aus *L. monocytogenes*

Für die Isolation zellulärer Proteine wurden 30 ml *L. monocytogenes*-Hauptkultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 mit einer Übernachtskultur angeimpft und die Zellen schüttelnd bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 angezogen. Danach erfolgte

die Ernte der Zellen bei 4°C und 5000 x g für 5 min. Das Zellpellet wurde in ZAP-Puffer gewaschen und anschließend in 0,5 ml bis 1 ml ZAP-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Stammlösung: 100 mM in Ethanol) wurden die Zellen auf Eis mit dem Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070 (Bandelin Elektronik GmbH & CoKG) 10 min bei 4x 10 s Zyklen und ca. 40 % Output aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 13000x g für eine Minute abzentrifugiert und der Überstand, welcher die zellulären Proteine enthält, in ein neues Gefäß überführt. Die Proteinextrakte wurden bei -20 °C gelagert.

### ZAP-Puffer:

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Tris-HCl pH 7,5 | 50 mM  |
| NaCl            | 200 mM |

### 2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde ROTI® Nanoquant (Bio-Rad Laboratories Inc.) verwendet (Bradford, 1976). Das Konzentrat wurde nach Herstellerangaben 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt. Danach wurde 1 ml des fertigen Reagenzes mit 1-5 µl der Proteinlösungen in Küvetten gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Leerkontrolle diente das fertige Reagenz mit 1-5 µl ZAP-Puffer. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand der nachstehenden Formel berechnet.

$$\frac{\mu g}{\mu l} = A_{595} / (\mu l * 0,0536)$$

### 2.3.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Unterscheidung der Phosphorylierungszustände von ReoM wurden zelluläre Proteinextrakte unter nativen Bedingungen in einem 15 %-igen Polyacrylamid-(PA-) gel aufgetrennt. Die Zusammensetzung des Gels ist in Tabelle 10 aufgeführt. Als Gelsystem diente das „Mini-Protean Tetra Handcast System“ (Bio-Rad Laboratories Inc.). Vor der Auftragung wurden die Proteinproben mit nativem Ladepuffer gemischt. Der Lauf erfolgte bei Raumtemperatur für 2,5 h bei

100 V. Anschließend wurden die Proteine wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben, auf eine PVDF-Membran übertragen und ReoM mittels Immundetektion (vgl. Abschn.: 2.3.7) sichtbar gemacht.

**Tabelle 10: Zusammensetzung native PAGE**

| <b><u>Trenngel 15 %:</u></b>                                      |         |
|-------------------------------------------------------------------|---------|
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                               | 3,59 ml |
| Acrylamid/Bis-Acrylamid 37,5:1<br>(Rotiphorese®Gel 30, Carl Roth) | 7,5 ml  |
| 1,5 M Tris/HCl pH 8,8                                             | 3,75 ml |
| 10 % (w/v) APS                                                    | 150 µl  |
| Tetramethylethyldiamin<br>(TEMED) (Carl Roth)                     | 10 µl   |
| <b><u>Sammelgel 5 %:</u></b>                                      |         |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                               | 2,44 ml |
| Acrylamid/Bis-Acrylamid 37,5:1<br>(Rotiphorese®Gel 30, Carl Roth) | 530 µl  |
| 0,5 M Tris/HCl pH 6,8                                             | 1 ml    |
| 10 % (w/v) APS                                                    | 50 µl   |
| TEMED                                                             | 4 µl    |

### Laufpuffer

Glycin                      0,129 M

Tris/HCl pH 8,8      25 mM

### 6x nativer Ladepuffer:

Tris/HCl pH 8,5              50 mM

Bromphenolblau              0,1 % (w/v)

Glycerol                      10 % (w/v)

#### 2.3.4 Eindimensionale SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte mithilfe einer SDS-PAGE. Dabei wurden Polyacrylamidgele mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentration von 10 % oder 12,5 % verwendet (vgl. Tab.: 11 & 12). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 4 x SDS-Probenpuffer (ROTI®Load 1, Carl Roth) gemischt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Der Lauf wurde bei 150 V für ca. eine Stunde durchgeführt. Als Gelsystem diente, wie bei der nativen PAGE, das „Mini-Protean Tetra Handcast System“ (Bio-Rad Laboratories Inc.). Nach dem Lauf wurde die Polyacrylamid-Gele zur Färbung der Proteinbanden in Coomassie-Lösung inkubiert (vgl. Abschn.: 2.3.5) oder ein Western-Blot mit anschließender Immundetektion durchgeführt (vgl. Abschn.: 2.3.6 & 2.3.7).

**Tabelle 11: Zusammensetzung des Trenngels in der SDS-PAGE**

| <b>Bestandteil</b>                                                | <b>10 %</b> | <b>12,5 %</b> |
|-------------------------------------------------------------------|-------------|---------------|
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                               | 4 ml        | 3,1 ml        |
| Acrylamid/Bis-Acrylamid 37,5:1<br>(Rotiphorese®Gel 30, Carl Roth) | 3,3 ml      | 4,2 ml        |
| 1,5 M Tris/HCl pH 8,8                                             | 2,5 ml      | 2,5 ml        |
| 10 % (w/v) SDS                                                    | 100 µl      | 100 µl        |
| 10 % (w/v) APS                                                    | 100 µl      | 100 µl        |
| TEMED                                                             | 10 µl       | 10 µl         |

**Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels in der SDS-PAGE**

| <b>Bestandteil</b>                                                | <b>4 %</b> |
|-------------------------------------------------------------------|------------|
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                               | 2,4 ml     |
| Acrylamid/Bis-Acrylamid 37,5:1<br>(Rotiphorese®Gel 30, Carl Roth) | 530 µl     |
| 1,5 M Tris/HCl pH 6,8                                             | 1 ml       |
| 10 % (w/v) SDS                                                    | 40 µl      |
| 10 % (w/v) APS                                                    | 50 µl      |
| TEMED                                                             | 4 µl       |

### Laufpuffer:

Rotiphorese® 10x SDS-PAGE 100 ml  
(Carl Roth)

H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad. 1l

### 2.3.5 Kolloidale Coomassiefärbung

Zur Färbung von Polyacrylamidgelen wurde die Coomassiefärbelösung „ROTI®Blue“ (Carl Roth) verwendet. Für den Gebrauch wurde die Stammlösung nach untenstehenden Angaben mit Methanol und Wasser gemischt. Die Gele wurden anschließend mehrere Stunden in der Färbelösung schwenkend inkubiert. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde die Färbelösung gegen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> getauscht und die Gele darin erneut mehrere Stunden schüttelnd inkubiert. Bei starker Färbung des Wassers wurde dieses erneuert.

### Coomassiefärbelösung:

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| ROTI®Blue (5x)                      | 10 ml |
| Methanol                            | 10 ml |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | 30 ml |

### 2.3.6 Western-Blot

Um spezifische Proteine detektieren zu können, wurden sie von nativen oder SDS-haltigen Polyacrylamidgelen auf eine Immobilon®-PSQ Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Merck Millipore GmbH) übertragen. Dies erfolgte mittels einer Semi-Dry-Blot Apparatur (VWR). Für das Blotting wurden zunächst drei, in 1x Western-Blot-Puffer getränkte, Whatmanpaper (Whatman™ Grade GB003; GE Healthcare) auf die Unterseite der Apparatur gelegt. Danach folgte die Membran, die zuvor in Methanol aktiviert wurde. Auf die Membran wurde das, kurz in 1x Western-Blot-Puffer gewaschene, Polyacrylamidgel gelegt und abschließend folgten nochmals drei in 1x Western-Blot-Puffer getränkte

Whatmanpaper. Die Blottingkammer wurde verschlossen und der Lauf erfolgte bei 100 mV pro Gel für 1:15 h.

### 10x Western-Blot-Puffer:

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Tris                                | 30,3 g |
| Glycin                              | 144 g  |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 1l |

### 1x Western-Blot-Puffer:

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| 10x Western-Blot-Puffer             | 100 ml |
| Methanol                            | 100 ml |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 1l |

### 2.3.7 Immundetektion

Nach dem Blotting wurde die Membran in Blockierungslösung (5 % (w/v) Milchpulver in TBST) für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Blockierungsschritt wurde die primäre Antikörperlösung auf die Membran gegeben. Die Inkubation mit dieser Antikörperlösung (2,5 % (w/v) Milchpulver in TBST) erfolgte entweder über Nacht bei 4 °C oder bei Raumtemperatur für 4 h. Danach wurde die Membran dreimal 10 min mit 1x TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran in der sekundären Antikörperlösung (2,5 % (w/v) Milchpulver in TBST) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte erneut das Waschen der Membran mit 1x TBST. Abschließend erfolgte die Detektion der Antikörper-markierten Proteine. Dazu wurde das „SuperSignal™ West Dura Extended Duration“ Substrat der Firma Thermo Fisher nach Herstellerangaben gemischt und auf der Membran verteilt. Die Chemilumineszenz wurde mithilfe des „Chemidoc MP“-Imagers von Bio-Rad Laboratories sichtbar gemacht.

10x TBS:

|                                     |          |
|-------------------------------------|----------|
| Tris/HCl pH 8,0                     | 12,114 g |
| NaCl                                | 80 g     |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 1l   |

1x TBST:

|                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| 10x TBS pH 8,0                      | 100 ml      |
| Tween 20                            | 0,1 % (v/v) |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 1l      |

**Tabelle 13: Verwendete Antikörper**

| Bezeichnung        | Antikörper-Typ | Antigen                                   | Verdünnung | Hersteller                   |
|--------------------|----------------|-------------------------------------------|------------|------------------------------|
| Anti-MurAA         | Kaninchen-IgG  | MurAA<br>( <i>B. subtilis</i> )           | 1:5000     | (Kock <i>et al.</i> , 2004)  |
| Anti-ReoM          | Kaninchen-IgG  | ReoM-Strep<br>( <i>L. monocytogenes</i> ) | 1:500      | (Rothe <i>et al.</i> , 2024) |
| Anti-Kaninchen-HRP | Ziege-IgG      | Kaninchen-IgG                             | 1:10000    | Sigma-Aldrich                |
| Anti-ReoY          | Kaninchen-IgG  | ReoY-His<br>( <i>L. monocytogenes</i> )   | 1:10000    | diese Arbeit                 |

**2.3.8 Formaldehyd-Crosslinking und Pulldown**

Zum Nachweis von Proteininteraktionen wurden Pulldown-Experimente durchgeführt. Dafür wurden *L. monocytogenes*-Stämme verwendet, in denen das zu untersuchende Protein mit einem Poly-Histidin-Schwanz markiert und ektopisch überexprimiert (pIMK2-Derivate) wurde. Für die Anzucht der Stämme wurden 500 ml BHI-Medium mit einer Übernachtskultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 beimpft. Die Hauptkultur wurde dann schüttelnd bei 37 °C inkubiert, bis eine

OD<sub>600</sub> von 1,0 erreicht war. Der Bakterienkultur wurde 37 %-iges Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 1 % (v/v) zugesetzt, um interagierende Proteine kovalent aneinander zu binden. Nach 30 min Inkubation wurde die Suspension mit 50 mM Glycin (Endkonzentration) für 5 min inkubiert und so die Reaktion beendet. Es folgte die Ernte der Zellen bei 6000x g für 5 min und 4 °C (Avanti™ J-25, Beckman Coulter GmbH). Das Zellpellet wurde in 2 ml UT-Puffer aufgenommen und die Zellen für 60 min auf Eiswasser aufgeschlossen. Zum Zellaufschluss wurde der Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070 (Bandelin Elektronik GmbH & CoKG) mit einem *power output* von 50–60 % verwendet. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch 5 min Zentrifugation bei 13000x g abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und pro Milliliter dieses Proteinextrakts wurden 200 µl MagneHis™ Ni-Particles (Promega) hinzugegeben. Beides zusammen wurde über Nacht in einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich die MagneHis™ Ni-Particles an die mit Histidinen markierten Proteine anlagern konnten. Danach wurden die MagneHis™ Ni-Particles durch 1 min Zentrifugation bei 2500x g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es folgten fünf Waschschriffe mit 2 ml UT-Puffer bei 2500x g für 1 min. Der abschließende Zentrifugationsschritt dauerte 3 min bei 15000x g. Dann wurden 500 µl Elutionspuffer zu den MagneHis™ Ni-Particles hinzugegeben und beides zusammen für mindestens 30 min bei Raumtemperatur im Rotationsschüttler inkubiert. Zuletzt wurden die MagneHis™ Ni-Particles erneut durch 1 min Zentrifugation bei 15000x g pelletiert und der Überstand mit dem eluierten Protein in ein neues Gefäß überführt. Da die Proteinkonzentrationen oftmals zu gering waren, wurden die Eluate mithilfe von Pierce™ Proteinkonzentratoren der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben aufkonzentriert. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -20 °C. Vor der Auftragung wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 1 h bei 95 °C inkubiert, um die Vernetzungsreaktion wieder rückgängig zu machen.

### UT-Puffer (pH 7,4 - 7,5):

|                                     |                            |
|-------------------------------------|----------------------------|
| HEPES                               | 11,94 g                    |
| NaCl                                | 14,61 g                    |
| Imidazol                            | 1,702 g                    |
| Harnstoff                           | 240,24 g                   |
| Triton X-100                        | 5 ml                       |
| 1M DTT                              | 500 µl (frisch hinzugeben) |
| 100 mM PMSF                         | 5 ml (frisch hinzugeben)   |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 500 ml                 |

### Elutionspuffer:

|                                     |                              |
|-------------------------------------|------------------------------|
| 1 M Tris-HCl pH 7,5                 | 1,5 ml                       |
| 1 M Imidazol pH 7,5                 | 7,5 ml                       |
| 20 % (w/v) SDS                      | 750 µl                       |
| 1 M DTT                             | 150 µl (frisch hinzugegeben) |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 15 ml                    |

### 2.3.9 Reinigung Histidin-markierter Proteine aus *L. monocytogenes*

Um weitere Untersuchungen hinsichtlich der verschiedenen Phosphorylierungszustände von ReoM zu machen, war es nötig das Protein aus *L. monocytogenes* zu isolieren. Dafür wurde das gleiche Protokoll wie für einen *Pulldown*-Versuch (vgl. Abschn.: 2.3.8) verwendet. Lediglich die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von Formaldehyd, sowie die Beendigung dieser Reaktion durch Zugabe von Glycin wurden unterlassen.

### 2.3.10 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21 verwendet. Für die Anzucht wurde 1 l LB-Medium mit einer Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 beimpft und bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert, die bei 18 °C und 160 rpm über Nacht erfolgte. Im Anschluss wurden die Zellen durch 10-minütige Zentrifugation bei 11325x g und 4 °C (Beckman Avanti™ J-25) geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 ml ZAP-Puffer gewaschen und in 12 ml des Puffers aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit 1 mM PMSF (Endkonzentration) versetzt und der Zellaufschluss erfolgte für 30 min bei einem *power output* von 30 % mit dem Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070 (Bandelin Elektronik GmbH & CoKG). Um das Zelllysate von den Zelltrümmern zu trennen, wurde der Ansatz bei 5000x g für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat filtriert (Minisart™ Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm Porengröße), um verbliebene Zelltrümmer zu entfernen.

Aus diesem Zelllysate wurden mithilfe des Strep-Tactin® Superflow Systems (IBA GmbH) Strep-Tag®-Fusionsproteine gereinigt. Dazu wurden 1-2 ml der Strep-Tactin® Suspension auf eine Chromatographiesäule (BioRad Laboratories GmbH) gegeben und mit 5 ml Waschpuffer (Puffer W) äquilibriert. Danach wurde das Zelllysate auf die Säule gegeben. Bei diesem Schritt wurden die Fusionsproteine an die Säulenmatrix gebunden. Durch 10 Waschschrte mit jeweils 1 ml Waschpuffer wurden unspezifisch gebundene Bestandteile von der Chromatographiesäule entfernt. Abschließend erfolgte die Elution des Strep-Tag®-Fusionsproteins. Dazu wurden 6x 500 µl Puffer E auf die Säulenmatrix gegeben. Durch das im Elutionspuffer enthaltene Desthiobiotin (IBA GmbH), welches eine höhere Bindungsaffinität als das Strep-Tag®-Fusionsprotein besitzt, wurde dieses von der Säulenmatrix verdrängt. Eine Probe des durchgeflossenen Zelllysates, sowie die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden bei -20°C gelagert und mittels SDS-PAGE analysiert.

Für die affinitätschromatografische Reinigung von Histidin-markierten Proteinen wurden 1-2 ml His-Pur™ Ni-NTA Resin (Thermo Scientific) als Säulenmaterial verwendet. Alle weiteren Schritte entsprachen dem zuvor beschriebenen Protokoll für die Reinigung von Strep-Tag®-Fusionsproteinen. Für die Elution des

Histidin-Fusionsproteins wurde jedoch ein Puffer mit Imidazol eingesetzt (Puffer W mit 100 mM Imidazol).

Die gereinigten Fusionsproteine wurden mithilfe von PD-10 Säulen in 1x PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) umgepuffert, um sie für die Herstellung eines Antiserums verwenden zu können. Die Produktion eines spezifischen Antiserums in Kaninchen übernahm die Firma Biogenes (Berlin).

### ZAP-Puffer:

|                |        |
|----------------|--------|
| Tris-HCl pH7,5 | 50 mM  |
| NaCl           | 200 mM |

### Puffer W:

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Tris-HCl, pH8,0 | 100 mM |
| NaCl            | 150 mM |

### Puffer E:

|               |           |
|---------------|-----------|
| Desthiobiotin | 2,5 mM    |
| Puffer W      | ad. 10 ml |

### 2.3.11 *In vitro*-Aktivitätsmessung der Carboxyvinyltransferase MurA

Anhand des freiwerdenden Phosphates bei der Umsetzung von UDP-GlcNAc und PEP durch die Carboxyvinyltransferase MurA sollte die Aktivität des Enzyms quantifiziert werden. In jedem 50 µl Reaktionsansatz wurden 5 µg des gereinigten Enzyms bzw. der heterolog gereinigten Enzymvarianten und 10 mM UDP-GlcNAc eingesetzt. Um den Einfluss von ReoM auf die Aktivität von MurA zu bestimmen, wurden nur 2,5 µg MurA pro Versuchsansatz verwendet. Als Reaktionspuffer diente Puffer W. Die Ansätze wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 5 µl PEP (10 mM Stammlösung) bei Raumtemperatur gestartet. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden 800 µl der Farbreagenz hinzugegeben und die Absorption bei 660 nm im Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher) gemessen. Die Werte wurden gegen einen Leerwert (Probe ohne UDP-GlcNAc) korrigiert. Das freigesetzte

Phosphat wurde anhand einer mitgeführten Standardkurve (0 mM–0,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat) berechnet. Als Kontrolle wurde eine Probe mitgeführt, die mit 5 µl Fosfomycin (Stammlösung 100 µg/ml) versetzt wurde. So sollte bestätigt werden, dass bei Inhibierung der Enzymaktivität kein freies Phosphat entsteht.

### Puffer W:

Tris/HCl pH8,0            100 mM

NaCl                        150 mM

### Farbreagenz:

1 Teil                      Ammoniummolybdat (4,2 g in 100 ml HCl)

3 Teile                     Malachitgrün-Oxalacetat (225 mg in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>)

10 µl Triton X-100 pro 10 ml Farbreagenz

Die Lösung wurde vor Gebrauch 1 h bei 4 °C leicht gerührt

## 2.4 Proteomik

### 2.4.1 Präparation intrazellulärer Proteine aus *L. monocytogenes*

Zuerst wurden Übernachtskulturen der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e, LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) und LMSW30 ( $\Delta reoM$ ) hergestellt, mit denen dann 100 ml BHI-Medium zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 beimpft wurden. Diese Hauptkulturen wurden dann bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 angezogen. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C und 8000x g geerntet. Die Zellpellets wurden daraufhin zweimal in 1 ml kaltem Tris-EDTA (TE)-Puffer gewaschen. Dafür wurden die Zellpellets in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zentrifugation bei 6 °C und 10000x g durchgeführt. Abschließend wurden die Zellpellets bei -70 °C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen erneut in 1 ml kaltem TE-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss auf Eis mittels Ultraschall für je 10 min pro Probe bei einem *output* von 40 % (Sonoplus HD 2070; Bandelin Elektronik GmbH & CoKG). Die Zelltrümmer wurden danach

durch Zentrifugation bei 13000x g und 4 °C für 15 min abgetrennt und der Überstand mit den zellulären Proteinen wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt und der Überstand erneut in ein neues Gefäß gegeben. Die Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

### TE-Puffer:

Tris pH 7,5      10 mM

EDTA            1 mM

### 2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurde Roti®Nanoquant (Carl Roth) verwendet. Zunächst wurde die Roti®Nanoquant-Lösung nach Herstellerangaben im Verhältnis 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt und 60 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Für die Eichgerade wurden dann 100 µl TE-Puffer mit 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und 800 µl der verdünnten Roti®Nanoquant-Lösung gemischt. Dabei wurde das H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> mit verschiedenen definierten Mengen einer Proteinmischung versetzt (0 bis 25 µg). Nach gleicher Inkubationszeit jeder Probe mit der verdünnten Roti®Nanoquant-Lösung wurden die Absorptionen bei OD<sub>590</sub> und OD<sub>450</sub> gemessen und der Quotient (OD<sub>590</sub>/OD<sub>450</sub>) daraus ermittelt. Als Referenz der Messung wurde H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verwendet. Für die Probenmessung wurden diese in TE-Puffer verdünnt und ebenfalls 100 µl mit 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gemischt. Danach wurden 800 µl der verdünnten Roti®Nanoquant-Lösung hinzugegeben und wie zuvor beschrieben, gemessen. Anhand der Eichgerade wurden die Proteinmengen bestimmt. Anschließend wurden alle Proben auf einen gleichen Quotienten (OD<sub>590</sub>/OD<sub>450</sub>) eingestellt ( $\pm 0,002$ ) und mittels Messung überprüft.

### 2.4.3 Eindimensionale SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und kolloidale Coomassie-Färbung

Um niedermolekulare Verunreinigungen in den Proben zu entfernen und die Proteinkonzentration sowie -qualität kontrollieren zu können, wurden die Proben mittels eindimensionaler SDS-Gelelektrophorese entsprechend ihres

Molekulargewichtes aufgetrennt. Dazu wurden 12 %-ige Trenngele verwendet (Zusammensetzung der Gele siehe Abschnitt 2.3.4). Jeweils 36 µg der Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 4x Ladepuffer im Verhältnis 3:1 gemischt und 5 min bei 98 °C inkubiert. Als Standard wurden 10 µl des „*Protein low molecular weight standard*“ (GE Healthcare) aufgetragen. Für die Herstellung der Gele wurde das „Mini-Protean Tetra Handcast System“ (Bio-Rad Laboratories Inc.) verwendet. Der Lauf wurde in 1x Laufpuffer bei 15 mA, 120 V pro Gel durchgeführt.

### 4x Ladepuffer pH 6,8:

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| Glycerol                            | 7,5 ml    |
| β-Mercaptoethanol                   | 2,5 ml    |
| SDS                                 | 1,2 g     |
| Bromphenolblau 1 % (w/v)            | 200 µl    |
| Tris                                | 0,4 g     |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 50 ml |

### 10x Laufpuffer:

|                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| Tris                                | 30,3 g      |
| Glycin                              | 144,1 g     |
| SDS                                 | 10 g        |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 1000 ml |

Anschließend wurden die Gele 1-2 h in Fixierungslösung schüttelnd inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit deionisiertem Wasser, woraufhin die Colloidal Coomassie-Färbelösung zu den Gelen hinzugegeben wurde (100 ml/Gel). Die Gele wurden 2 Stunden in der Färbelösung schüttelnd inkubiert. Zuletzt wurden die Gele mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> entfärbt und mit dem „GS-800 Calibrated Densitometer“ (Bio-Rad Laboratories Inc.) und unter Verwendung der „Bio-Rad Quantity One

Software“ eingescannt. Danach wurden die Gele in Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

### Coomassie Brilliant Blue (CBB) Stammlösung:

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| Coomassie Brilliant Blue G250       | 5 g        |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> | ad. 100 ml |

### Colloidal Coomassie-Färbestammlösung (Dye Stock):

|                                                                   |            |
|-------------------------------------------------------------------|------------|
| Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | 50g        |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                               | ad. 400 ml |
| 85 % Ortho-Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )        | 6 ml       |
| H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>                               | ad. 490 ml |
| CBB Stammlösung                                                   | 10 ml      |

### Colloidal Coomassie-Färbelösung:

|           |            |
|-----------|------------|
| Dye Stock | 80 % (v/v) |
| Methanol  | 20 % (v/v) |

Mithilfe der „AIDA Image Analysis Software“ (Elysia-Raytest) wurden die Gesamtproteinmenge jeder Probe bestimmt und jede Probe in acht Fraktionen annähernd gleicher Proteinmenge eingeteilt. Dabei wurde die 66 kDa-Bande des Markers zu Hilfe genommen, welche exakt 0,5 µg Rinderserumalbumin (BSA) enthält. Die acht Fraktionen pro Probe wurden dann getrennt voneinander aus dem Gel herausgeschnitten und in 1x1 mm große Stücke zerkleinert. Für die weitere Verwendung wurden die Gelstücke in 1,5 ml Reaktionsgefäße mit ca. 150 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> überführt und bei -20 °C gelagert.

### 2.4.4 Tryptischer In-Gel-Verdau

Zunächst wurden die Gelstückchen in den 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit einer Lösung aus 50 % (v/v) Methanol und 50 % (v/v) 50 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$  (pH 7,8-8,1) unter Schütteln entfärbt. Dabei wurde die Lösung mindestens dreimal gewechselt. Danach wurden die Gelstückchen durch zweimaliges Waschen mit 200 µl Acetonitril vollständig dehydriert. Es folgte eine 5-minütige Inkubation mit 50 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ . Danach wurden die Gelstückchen erneut mithilfe von Acetonitril dehydriert und die Rehydrierung mit 50 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$  wurde wiederholt. Abschließend wurden die Gelstückchen wieder zweimal mit Acetonitril bis zur vollständigen Dehydrierung gewaschen um dann 200 µl der DTT-Lösung (10 mM Dithiotreitol (DTT) in 50 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ , pH 7,8) zu den Gelstückchen zu geben. Es folgten 30 min Inkubation bei 60 °C im Wasserbad. Im Anschluss wurden die Gelstückchen wieder zweimal mit Acetonitril gewaschen, wobei die Inkubationszeit möglichst kurzgehalten wurde. Danach wurden die Gelstückchen mit 200 µl der IAA-Lösung (50 mM Iodacetamid in 50 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ , pH 7,8) bedeckt und 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Gelstückchen in Acetonitril gewaschen und 5 min in 50 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$  inkubiert. Beide Schritte wurden wiederholt und anschließend wurden die Gelstückchen bis zur vollständigen Dehydrierung ein zweites Mal in Acetonitril inkubiert. Zum Schluss wurden die Gelstückchen für 45 min bis 2 Stunden bei Raumtemperatur unter dem Abzug in geöffneten Reaktionsgefäßen getrocknet. Daraufhin folgte die Zugabe der Verdaulösung. Dabei sollten die Gelstückchen nach der Rehydrierung mit dem Verdaupuffer knapp bedeckt sein. Um dies sicher zu stellen wurden die Proben zunächst 30 min bei 4 °C inkubiert und bei Bedarf noch Verdaupuffer hinzugegeben. Danach folgte die Inkubation im Schüttler bei 37 °C für zunächst 20 min. Erneut wurde überprüft, ob die Gelstückchen ausreichend bedeckt waren. Erst dann erfolgte der tryptische Verdau bei 37 °C und 50 rpm für 12 h. Bis zur Extraktion konnten die Verdauansätze im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### Verdaulösung:

Tris/HCl pH 7,6            50 mM

CaCl<sub>2</sub>                      1 mM

Zugabe der Trypsinstammlösung (1 µg/µl) (Promega), sodass ein Verhältnis Trypsin/Probe 1:20 (w/w) entsteht.

### 2.4.5 Extraktion

Bei der Extraktion der Proteine aus den Gelstückchen wurden alle Überstände, einschließlich der Verdaulösung in einem 2 ml Reaktionsgefäß gesammelt und bei 4 °C gelagert. Nach Abnahme der Verdaulösung wurden die Gelstückchen zunächst zweimal mit Acetonitril gewaschen und dehydriert. Danach wurden 150 µl 1 % (v/v) Ameisensäure hinzugegeben und 10 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte die Dehydrierung der Gelstückchen durch einmalige Zugabe von Acetonitril. Daraufhin wurden 150 µl 10 % (v/v) Ameisensäure hinzugegeben und der Ansatz erneut 10 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit durch zweimaliges Waschen mit Acetonitril aus den Gelstückchen entfernt und die gesammelten Überstände in einer Vakuumzentrifuge bei RT bis zur kompletten Trockenheit zentrifugiert. Abschließend wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

### 2.4.6 Entsalzen mittels Zip-Tips

Zum Entsalzen der Proben wurden µ-C18 und C18 ZipTip-Spitzen (Merck KGaA) verwendet. Zunächst wurden die Proben in 20 µl „Wash Solution 1“ (5 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ULC-MS-Wasser) resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die ZipTip-Spitze mit 10 µl der „Wetting Solution“ (50 % (v/v) Acetonitril in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) benetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Danach wurde die Spitze zweimal mit der „Wash Solution 1“ gewaschen. Es folgte die Beladung der Spitze mit der Probe, die daraufhin zehnmal am Boden des Reaktionsgefäßes wieder abgegeben und eingesaugt wurde. Danach wurde die Spitze dreimal mit der „Wash Solution 2“ (5 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ULC-MS-Wasser) gewaschen und abschließend die Proteine dreimal mit 10 µl des Elutionspuffers (60 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ULC-MS-Wasser) eluiert, wobei der Puffer in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß jeweils fünfmal abgegeben und

eingesaugt wurde. Danach wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockenheit bei RT zentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.4.7 Präparation der Proben für die Analyse

Die Proben wurden durch Zugabe von 16 µl des Puffers A (3 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ULC-MS-Wasser) gelöst und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben 5 min im Ultraschallbad (37 kHz, 100 % Power) inkubiert. Durch die Zentrifugation für 20 min bei 50000 rpm und 22 °C (Ultrazentrifuge, Beckmann Coulter) sollten störende Partikel pelletiert werden. Zum Schluss wurden die Proben luftblasenfrei in Glas-Vials (Waters™) für die LC-MS/MS überführt.

Die Analyse der Peptide erfolgte mit einem „Orbitrap Velos Pro-Massenspektrometer“, das mit einer „Waters™ NanoAquity UPLC“ gekoppelt war. Die Trennung der Peptide erfolgte mittels Flüssigkeitschromatographie über eine BEH C18-Säule mit 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mmx50 mm (Waters™) und einer Flussrate von 0,35 ml/min. Das Laufmittel A bestand aus 0,1 % Ameisensäure in UPLC-Wasser, Laufmittel B aus 80 % Acetonitril und 0,1 % Ameisensäure in UPLC-Wasser. Es wurden jeweils 5 µl der Proben injiziert. Der Gradient für die UPLC ist in Tabelle 14 aufgeführt.

**Tabelle 14: Laufmittel-Gradient für nanoAcquity-UPLC, gekoppelt mit Orbitrap Velos Pro**

| <b>Zeit [min]</b> | <b>Anteil Laufmittel B</b> |
|-------------------|----------------------------|
| 0                 | 3,7                        |
| 30                | 3,7                        |
| 65                | 22,1                       |
| 88                | 29,3                       |
| 148               | 48,3                       |
| 175               | 62,5                       |
| 192               | 99,0                       |
| 195               | 99,0                       |
| 200               | 3,7                        |
| 205               | 3,7                        |

Die MS2-Spektren wurden im  $m/z$ -Bereich von 350-1750 mit einer Auflösung von 60000 aufgenommen. Die Fragmentierung der Ionen erfolgte über *collision-induced dissociation* (CID). Dabei wurden folgende Parameter verwendet: normalisierte Kollisionsenergie: 35 %, Activation Q: 0,25, Aktivierungszeit: 10 ms, Isolationsbreite: 2  $m/z$ . Es wurde eine interne Massenkalkulation mit der universellen Polysiloxankontaminante (Masse 445,120030) durchgeführt. Es wurde die Top20-Methode verwendet. Dies bedeutet, dass die 20 abundantesten Ionen fragmentiert und in der Ionenfalle (ITMS) analysiert wurden. Mit einer dynamischen Ausschlussliste wurde sichergestellt, dass bereits gemessene Ionen nicht nochmals gemessen wurden. Dabei betrug die Ausschlussdauer 12 s. Die erlaubten Ladungszustände waren größer +2.

### 2.4.8 Auswertung

Die Auswertung der massenspektrometrischen Rohdaten erfolgte mithilfe der MaxQuant Software (v.1.6.17.0). Diese ermöglicht die Identifikation und Quantifizierung von Proteinen (Cox & Mann, 2008). Durch die Berechnung theoretischer Spektren von *in silico* aus den Proteinen der FASTA-Datei generierten Peptiden und deren Vergleich mit einem gemessenen Spektrum, können die in der Probe vorhandenen Peptide identifiziert werden. Die Protein-FASTA-Datei des Stammes EGD-e (NC\_003210.1) wurde am 13.12.2022 vom NCBI-Server heruntergeladen. Für die Datenbanksuche wurden folgende Einstellungen verwendet: Eine Carbamidomethylierung wurde als feste Modifikation eingestellt. Als variable Modifikation bei der Berechnung der Massen wurden Oxidationen von Methionin und eine Acetylierung des N-Terminus erlaubt. Beim Verdau mit Trypsin wurde die Anzahl der maximalen „*missed cleavages*“ auf 2 gesetzt. Die „*main search peptide tolerance*“ betrug 5 ppm und die maximale Ladung der Ionen wurde auf +5 begrenzt. Pro Peptid waren maximal vier Modifikationen erlaubt. Die Quantifizierung der Peptide mit der LFQ-Methode („*label free quantification*“) wurde mit einem „*min. ratio count*“ von 1 durchgeführt. Die Peptidmasse wurde auf maximal 5400 Da festgelegt und die „*false discovery rate*“ (FDR) betrug sowohl für die Proteine als auch für die „*peptide spectrum matches*“ (PSM) 0.01. Peptide mussten mindestens 6 Aminosäuren lang sein, um als solche detektiert zu werden. Identifizierungen

wurden mit einem Zeitfenster von 0,7 min auf MS-Signale ohne MS2-Spektrum übertragen, wenn die  $m/z$  im MS um weniger als 5 ppm abwich.

Die Ergebnisse der Datenbanksuche wurden anschließend in Excel gefiltert. Hierzu wurden Kontaminanten und Identifizierungen gegen die Datenbank aus reversen Sequenzen entfernt. In die Auswertung wurden nur Proteine miteinbezogen, bei welchen zusammen in allen Proben mindestens zwei einzigartige Peptide detektiert wurden und die in mindestens zwei der Replikate/Proben durch MS/MS identifiziert wurden. Zusätzlich wurden die LFQ-Intensitäten korrigiert: für eine zuverlässige Identifizierung musste gelten, dass die Summe der drei Intensitäten geteilt durch die Zahl der jeweiligen einzigartigen Peptide größer als 250.000 ist. War die Summe der Intensitäten kleiner als 250.000 wurde die LFQ-Intensität auf null gesetzt. Mit der Definition einer Untergrenze von 250.000 wurde verhindert, dass es durch Hintergrundsignale zu falsch-positiv identifizierten Proteinen kommt.

Für die statistische Analyse mit der Perseus Software wurden die korrigierten LFQ-Intensitäten von MaxQuant verwendet, welche eine robuste, lautfreie und relative Proteinquantifizierung ermöglichen (Cox *et al.*, 2014, Tyanova *et al.*, 2016). Nach einem Clustering und dem Logarithmieren der Daten zur Basis 2 in der Software Perseus (v1.5.2.6) erfolgte die Z-Score-Standardisierung. Anschließend wurde ein „*multiple sample test*“ durchgeführt (T-Test:  $p$ -value 0,01). Darauf folgte jeweils noch ein T-Test ( $p$ -value 0,01) gegen die Kontrolle EGD-e. Die Ergebnisse wurden in die Ursprungstabelle übernommen und zum Schluss wurden aus den korrigierten LFQ-Intensitäten die Mittelwerte und korrigierten Standardabweichungen (StabW/Quadratwurzel der Anzahl der Replikate) berechnet und in Relation zur Kontrolle EGD-e gesetzt.

Die Probenvorbereitung, Messung und Auswertung fand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Proteomik“ von Prof. Dr. Susanne Engelmann am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig statt.

### 2.5 Physiologische Methoden

#### 2.5.1 Wachstumskurven

Zur Bestimmung von Wachstumsdefiziten wurden Wachstumskurven mit dem Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher) erstellt. Dazu wurde zunächst eine 5 ml-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 eingestellt. Zum Beimpfen der 96-well-Platte wurden je well 200 µl dieser Kultur verwendet. Anschließend wurde die Platte in einer Kinetikschleife unter Schütteln bei 37°C bzw. 42 °C inkubiert und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) in den einzelnen wells in 5-Minuten Abständen gemessen.

#### 2.5.2 Bestimmung von Antibiotikaresistenzen

Um die MHK (minimale Hemmkonzentration) verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme für Ceftriaxon zu ermitteln, wurde Zellmaterial aus einer Übernachtskultur mit einem sterilen Tupfer gleichmäßig auf einer BHI-Agarplatte ausgestrichen. Danach wurden Ceftriaxon-Teststreifen (0,016-256 µg/ml, Bestbion<sup>dx</sup>) auf den Agar gelegt und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Die MHK wurde anschließend anhand des Hemmhofes abgelesen.

#### 2.5.3 Untersuchung der Lysozymresistenz

Zur Messung der Lysozymresistenz eines *L. monocytogenes*-Stammes wurden 30 ml Hauptkultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 bei 37 °C angezogen. Anschließend erfolgte die Zellernte bei 5000x g und 4 °C für 5 min. Das Zellpellet wurde in 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0) zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 resuspendiert. Daraufhin wurde Lysozym zu einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml hinzugegeben und die OD<sub>600</sub> im Abstand von 15 min gemessen. Zwischen den Messungen wurden die Bakterienkulturen schüttelnd bei 37 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der optischen Dichte ( $\lambda$  = 600 nm) erfolgte mittels Messung in Küvetten am Spektrophotometer (BioSpectrometer basic, Eppendorf).

#### 2.5.4 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Für die Mikroskopie wurden *L. monocytogenes*-Zellen bis zur exponentiellen Wachstumsphase, also einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 bei 37 °C schüttelnd angezogen. Von dieser Zellsuspension wurden 0,5 µl auf einen mit 1 %-iger Agarose (in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) beschichteten Objektträger getropft. Nachdem die Flüssigkeit

getrocknet war, wurde das Präparat mit einem Deckglas verschlossen. Die Mikroskopie der Zellen erfolgte im Phasenkontrast des Nikon Eclipse Ti-Mikroskops. Über die gekoppelte Nikon DS-MBWc CCD-Kamera wurden Aufnahmen der Zellen gemacht. Um die Zellmembranen sichtbar zu machen und somit die Zelllänge bestimmen zu können, wurden 100 µl Bakterienkultur mit 1 µl Nilrotlösung (100 mg/ml in DMSO) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden erneut 0,5 µl dieser Bakteriensuspension auf einen präparierten Objektträger aufgetragen. Die Mikroskopie erfolgte diesmal unter der Nutzung des Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC)-Kanals. Zur Auswertung der Zelllängen wurden pro Stamm 200-300 Zellen mit der Nikon NIS-Elements AR Software vermessen.

### 3. Ergebnisse

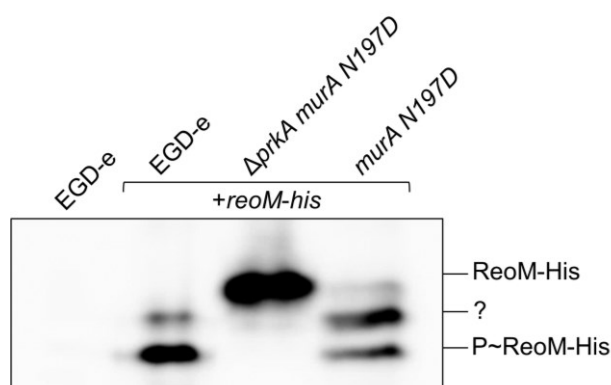
#### 3.1 Nachweis der Phosphorylierung von ReoM *in vivo*

##### 3.1.1 Differenzierung der ReoM-Phosphorylierung anhand des Laufverhaltens in einer nativen PAGE

Die Peptidoglykanbiosynthese kann mithilfe eines Regulationsweges kontrolliert werden, der die Proteolyse von MurA, dem ersten Enzym des Syntheseweges, steuert (Wamp *et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022). Dabei spielt die Phosphorylierung vom Threonin 7 des postulierten Adapterproteins ReoM eine entscheidende Rolle. Die Modifikation stört die Interaktion von ReoM und MurA und verhindert damit den Abbau des Enzyms durch die ClpCP-Protease. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ReoM wird durch die PASTA-eSTK PrkA und die dazugehörige Phosphatase PrpC durchgeführt (Wamp *et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ReoM und im speziellen die Phosphorylierung von ReoM genauer untersucht werden, um weitere Erkenntnisse über die Funktionsweise des Regulationsweges zu gewinnen. Dazu wurde eine Methode etabliert und eingesetzt, mit der der Phosphorylierungszustand von ReoM *in vivo* nachgewiesen werden kann. Die Methode basiert auf Ergebnissen aus *in vitro*-Experimenten, die zeigten, dass ReoM und P~ReoM in einer nativen PAGE anhand ihres Laufverhaltens unterschieden werden können (Wamp *et al.*, 2020). Für den *in vivo*-Nachweis der ReoM-Phosphorylierung wurden zelluläre Proteine aus *L. monocytogenes*-Stämmen in einer solchen nativen PAGE anhand ihrer Ladung separiert. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und ReoM wurde mithilfe eines spezifischen IgG-Antikörpers identifiziert. Zunächst konnte ReoM in Proteinextrakten des Wildtypstammes EGD-e nicht detektiert werden, da der Antikörper nicht sensitiv genug war (vgl. Abb.: 7). Daher wurde eine weitere *reoM*-Kopie mit einem C-terminalen Histidin-*tag* unter der Kontrolle des *P<sub>help</sub>*-Promotors (Monk *et al.*, 2008), welcher eine kontinuierliche Expression von *reoM*-His verursacht, in alle *L. monocytogenes*-Stämme eingebracht. Stamm LMJD22 (EGD-e +*reoM*-his) diente nun als neuer Kontrollstamm, der den Wildtypzustand wiedergeben sollte. Um die Laufhöhe von unphosphoryliertem ReoM bestimmen zu können, sollte ein  $\Delta prkA$ -Stamm

mitgeführt werden. Da die Deletion von *prkA* in EGD-e letal ist, wurde sie durch die Einbringung einer *murA* escape-Mutation (*murA N197D*) kompensiert (Wamp *et al.*, 2022). Der resultierende Stamm wurde als LMPR5 ( $\Delta prkA$  *murA N197D* +*reoM-his*) bezeichnet. Um auch zu kontrollieren, ob MurA N197D die Phosphorylierung von ReoM beeinflusst, wurde zusätzlich der Stamm LMPR9 (*murA N197D* +*reoM-his*) bei dem Versuch mitgeführt. Insgesamt ließen sich drei verschiedene ReoM-His-Varianten anhand ihrer Laufgeschwindigkeit in der nativen PAGE identifizieren (vgl. Abb.: 7). Das unphosphorylierte ReoM-His aus  $\Delta prkA$  *murA N197D* +*reoM-his* migrierte am langsamsten in diesem Trennsystem. In den Proteinextrakten von EGD-e +*reoM-his* und *murA N197D* +*reoM-his* konnten zwei weitere ReoM-His-Varianten detektiert werden, die beide schneller als unphosphoryliertes ReoM-His migrierten (vgl. Abb.: 7). In dem Stamm, der den Wildtypzustand widerspiegeln sollte (EGD-e +*reoM-his*), besaß die unterste ReoM-His-Bande die größte Intensität. Diese Bande spiegelt also die vorherrschende ReoM-His-Variante in diesem Stamm wider und wurde deshalb als T7-phosphoryliertes ReoM-His interpretiert. Bei der mittleren ReoM-His-Bande könnte es sich um einen intermediären Zustand handeln. ReoM liegt *in vivo* als Dimer vor (Wamp *et al.*, 2020). Die Bande könnte demnach ein einfach phosphoryliertes ReoM-Dimer repräsentieren, während die anderen ReoM-Dimere zweifach oder gar nicht phosphoryliert sind.

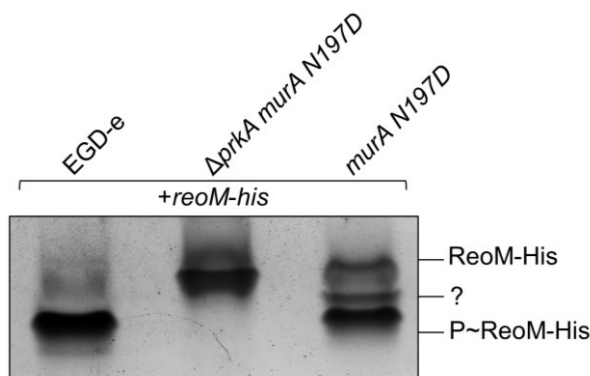


**Abbildung 7: Phosphorylierungszustände von ReoM *in vivo*.**

Western-Blot nach einer 15 % nativen PAGE zur Detektion und Separation von verschiedenen ReoM-His-Varianten in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e, LMJD22 (EGD-e +*reoM-his*), LMPR5 ( $\Delta prkA$  *murA N197D* +*reoM-his*) und LMPR9 (*murA N197D* +*reoM-his*). Es wurden 15 µg der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

### 3.1.2 Verifizierung der ReoM-Phosphorylierung

In Zusammenarbeit mit Dr.-Ing. Jörg Döllinger aus der Abteilung ZBS 6 „Proteomik und Spektroskopie“ des Robert Koch-Institutes sollten durch massenspektrometrische Analysen die postulierten Phosphorylierungszustände von ReoM-His kontrolliert werden. Dazu wurde aus den gleichen Stämmen (LMJD22, LMPR5 und LMPR9) ReoM-His durch Affinitätschromatographie gereinigt. Vor der Analyse wurden die ReoM-His-Varianten erneut mittels nativer PAGE analysiert und durch eine kolloidale Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Die gereinigten Spezies von ReoM-His wiesen das gleiche Laufverhalten wie die ReoM-His-Spezies aus nativen Proteinextrakten auf und ließen erneut die Unterscheidung von drei verschiedenen ReoM-His-Varianten zu (vgl. Abb.: 8). Für die massenspektrometrische Analyse wurden diese aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und extrahiert (vgl. Abschn.: 2.4.4 & 2.4.5). Die weitere Probenbearbeitung, Messung und Auswertung erfolgte dann in Abteilung ZBS 6. Die Analyse ergab, dass ReoM-His aus EGD-e +*reoM-his* (unterste Proteinbande) zwei Phosphorylierungen aufweist, am Threonin 7 und am Tyrosin 10. Die gleichen Phosphorylierungsstellen konnten auch bei der ReoM-His-Variante mit mittlerer Laufhöhe aus *murA N197D* + *reoM-his* identifiziert werden, jedoch mit einer geringeren Quantität. Bei der ReoM-His-Variante aus  $\Delta$ *prkA murA N197D* + *reoM-his* konnte nur eine Phosphorylierung am Tyrosin 10 nachgewiesen werden. Die Daten bestätigen, dass die Phosphorylierung von Threonin 7 ausschlaggebend für das unterschiedliche Laufverhalten von ReoM-His in der nativen PAGE ist und passen zu der Hypothese, dass es sich bei der mittleren ReoM-His-Bande um ein einfach T7-phosphoryliertes ReoM-His-Dimer handelt.

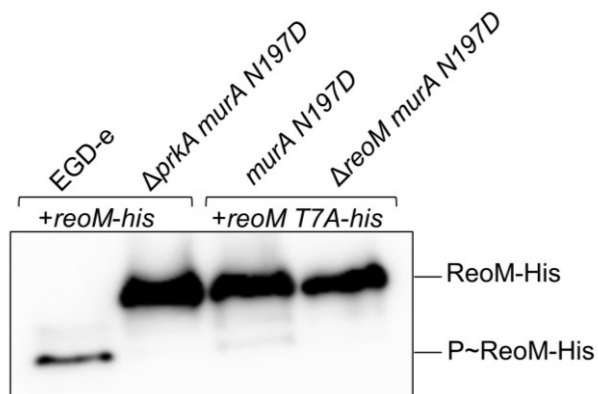


**Abbildung 8: Phosphorylierungszustände von isoliertem ReoM-His.**

Coomassie-gefärbtes 15 % natives PAGE mit gereinigtem ReoM-His aus den *L. monocytogenes*-Stämmen LMJD22 (EGD-e +*reoM-his*), LMPR5 ( $\Delta$ *prkA murA N197D* +*reoM-his*) und LMPR9 (*murA N197D* +*reoM-his*).

Zur Absicherung dieser Aussage wurde zusätzlich untersucht, ob eine Variante von ReoM-His, die nicht am Threonin 7 phosphoryliert werden kann, in einer nativen PAGE das gleiche Laufverhalten wie ReoM-His aus dem Stamm  $\Delta prkA\ murA\ N197D + reoM-his$  (unphosphoryliertes ReoM-His) aufweist. Um die Phosphorylierung von ReoM-His zu verhindern, wurde das Threonin an Position 7 durch Alanin substituiert (ReoM T7A-His). Dieser Aminosäureaustausch führt jedoch zur unkontrollierten Proteolyse von MurA und ist toxisch in EGD-e (Wamp *et al.*, 2022), weshalb Stämme mit der *escape*-Mutation *murA N197D* für die kontinuierliche Expression von *reoM T7A-his* verwendet wurden. Die resultierenden Stämme LMPR42 (*murA N197D + reoM T7A-his*) und LMPR48 ( $\Delta reoM\ murA\ N197D + reoM\ T7A-his$ ) wurden hinsichtlich der *in vivo* ReoM-Phosphorylierung untersucht (vgl. Abb.: 9). In beiden Stämmen wurde ReoM T7A-His auf der gleichen Höhe wie ReoM-His aus dem Stamm  $\Delta prkA\ murA\ N197D + reoM-his$  nachgewiesen. In den Proteinextrakten des Stammes *murA N197D + reoM T7A-his* war außerdem eine schwache Bande mit der Laufhöhe von P~ReoM-His wie in EGD-e *+reoM-his* zu erkennen. Dabei handelt es sich vermutlich um ReoM, das auf das noch vorhandene endogene Wildtyp-Allel von *reoM* zurückzuführen ist.

Das Laufverhalten von ReoM-His in der nativen PAGE hängt nach diesem Ergebnis ebenfalls von der T7-Phosphorylierung ab und bestätigt das Resultat der massenspektrometrischen Analyse. Somit kann anhand des Laufmusters von ReoM-His in einer nativen PAGE bestimmt werden, ob das Protein *in vivo* am Threonin 7 phosphoryliert ist oder nicht.

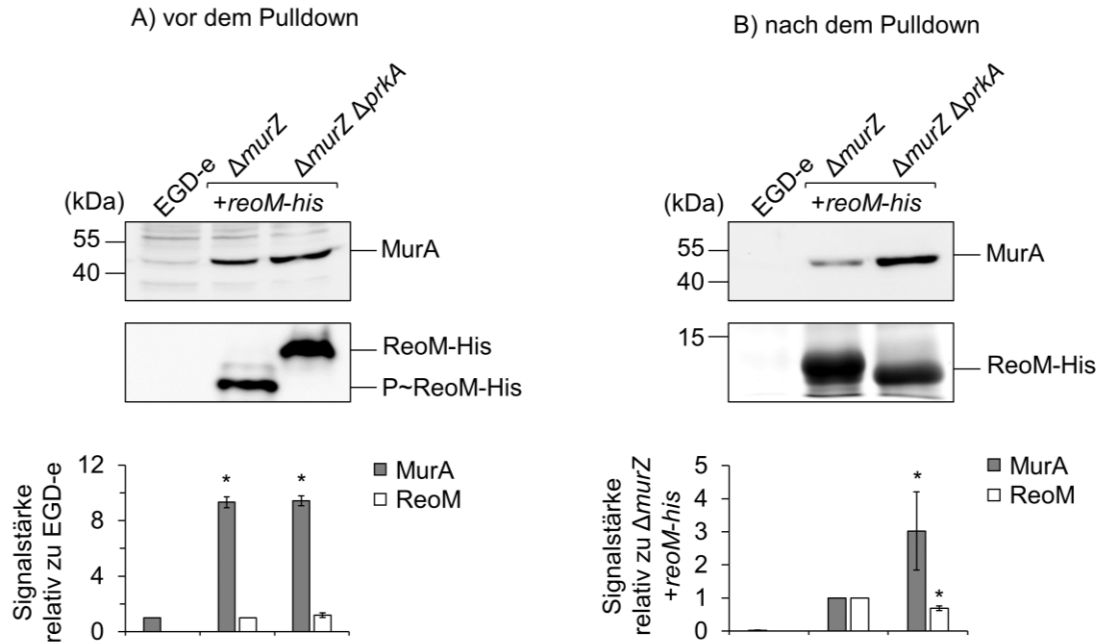


**Abbildung 9: Die *in vivo*-Phosphorylierung von ReoM-His durch PrkA erfolgt am Threonin 7.**

Western-Blot nach einer 15 % nativen PAGE zur Detektion und Separation von verschiedenen ReoM-His-Varianten in den *L. monocytogenes*-Stämmen LMJD22 (EGD-e *+reoM-his*), LMPR5 ( $\Delta prkA\ murA\ N197D + reoM-his$ ), LMPR42 (*murA N197D + reoM T7A-his*) und LMPR48 ( $\Delta reoM\ murA\ N197D + reoM\ T7A-his$ ). Es wurden 15  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

### 3.1.3 Auswirkung der ReoM-Phosphorylierung auf die Interaktion mit MurA und die MurA-Aktivität

Nachdem eine Methodik zur Bestimmung des *in vivo*-Phosphorylierungszustandes von ReoM geschaffen und überprüft wurde, sollte noch einmal untersucht werden, ob die Phosphorylierung vom Threonin 7 die Interaktion von ReoM mit MurA tatsächlich beeinträchtigt. Die bisherigen Daten dazu stammen aus genetischen Untersuchungen und zeigen die Beeinträchtigung der Proteolyse von MurA durch das Fehlen von ReoM, sowie die Toxizität der phosphoablative ReoM-Variante (ReoM T7A) (Wamp *et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022). Zur weiteren Bestätigung wurden *in vivo crosslinking* und *pulldown*-Experimente mit den Stämmen EGD-e (Kontrolle), LMPR25 ( $\Delta murZ + reoM-his$ ) und LMPR29 ( $\Delta murZ \Delta prkA + reoM-his$ ) durchgeführt, um die direkte Interaktion zwischen P~ReoM-His und MurA bzw. ReoM-His und MurA nachzuweisen. Die Deletion von *murZ* führte zur intrazellulären Akkumulation von MurA und erleichterte die Detektion des MurA-Proteins im Western-Blot. Zusätzlich wurde durch die Anreicherung von MurA die Letalität der Deletion von *prkA* aufgehoben. Vor und nach dem *Pulldown* wurden Proteinextrakte bzw. die gereinigten Proteine mit einer SDS- oder nativen PAGE separiert und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht oder auf eine PVDF-Membran übertragen und mithilfe eines Antikörpers detektiert. Abschließend wurden die Bandenintensitäten quantifiziert und verglichen (vgl. Abb.: 10). In den Proteinextrakten vor dem *Pulldown* (vgl. Abb.: 10 A) konnten nahezu identische MurA-Mengen in den Stämmen  $\Delta murZ + reoM-his$  und  $\Delta murZ \Delta prkA + reoM-his$  detektiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ReoM-His im Stamm  $\Delta murZ + reoM-his$  am T7 phosphoryliert ist, während ReoM-His aus  $\Delta murZ \Delta prkA + reoM-his$  keine Phosphorylierung am T7 aufweist. Nach dem *crosslinking* wurden mit dem unphosphorylierten ReoM-His ( $\Delta murZ \Delta prkA + reoM-his$ ) signifikant größere MurA-Mengen mitgereinigt als mit P~ReoM-His ( $\Delta murZ + reoM-his$ ) (vgl. Abb.: 10 B). Gleichzeitig war die Menge an isoliertem ReoM-His aus  $\Delta murZ \Delta prkA + reoM-his$  signifikant geringer ( $P < 0.01$ ) im Vergleich zu P~ReoM-His aus  $\Delta murZ + reoM-his$ . Damit bestätigen die Ergebnisse eine Beeinträchtigung der Interaktion von ReoM-His und MurA durch die T7-Phosphorylierung von ReoM *in vivo*.



**Abbildung 10: Auswirkung der ReoM-Phosphorylierung auf die Interaktion mit MurA.**

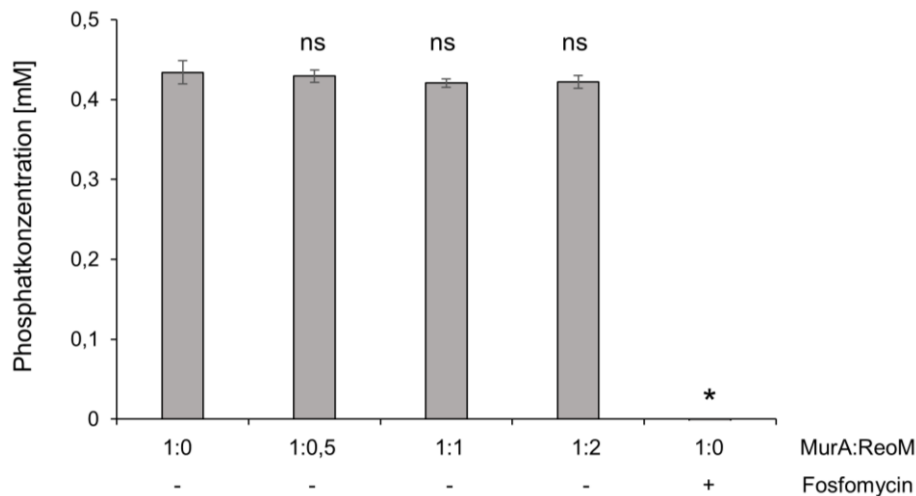
Pulldown-Experiment nach dem *in vivo* Formaldehyd-crosslinking mit den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (Kontrolle), LMPR25 ( $\Delta murZ$  +  $reoM$ -his) und LMPR29 ( $\Delta murZ \Delta prkA$  +  $reoM$ -his).

(A) Bestimmung der MurA-Mengen (oben) und ReoM-Phosphorylierung (Mitte) vor dem crosslinking mittels Western-Blot. Zur Detektion von ReoM wurden die Proben mittels nativer PAGE aufgetrennt. Die Signalstärken wurden mittels Densitometrie quantifiziert und in Relation zum Wildtyp dargestellt (unten). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Replikaten zu sehen. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert ( $P < 0,01$ , T-Test mit Bonferroni-Holm Korrektur,  $n = 3$ ).

(B) Bestimmung der MurA-Mengen mittels Western-Blot (oben) und der ReoM-Mengen mittels SDS-PAGE (Mitte) nach dem pulldown. Die MurA- und ReoM-Mengen wurden, wie oben beschrieben, quantifiziert, aber in Relation zur  $\Delta murZ$  +  $reoM$ -his-Probe dargestellt (unten). Es sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Replikaten zu sehen. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert ( $P < 0,05$  für MurA,  $P < 0,01$  für ReoM, T-Test mit Bonferroni-Holm Korrektur,  $n = 3$ ).

In *S. pneumoniae* bilden MurZ und MurA ein synthetisch letales Paar, bei dem aber nur MurZ für ein normales Wachstum benötigt wird. Die Regulation der Peptidoglykanbiosynthese findet allerdings nicht, wie in *L. monocytogenes*, durch den kontrollierten Abbau von MurZ oder MurA statt. Stattdessen wird vermutet, dass unphosphoryliertes ReoM die Aktivität der Enzyme inhibiert (Tsui *et al.*, 2023). Um diese Annahme in *L. monocytogenes* zu überprüfen, wurde die *in vitro*-Aktivität von MurA in Gegenwart von ReoM gemessen. Dabei wurde das Verhältnis von MurA zu ReoM variiert und das durch MurA aus Phosphoenolpyruvat freigesetzte Phosphat nach 30 min bestimmt (vgl. Abb.: 11). Es konnte keine Veränderung der Aktivität von MurA durch die Zugabe von ReoM

festgestellt werden. Die freigesetzten Phosphatmengen entsprachen der Kontrolle, bei der MurA kein ReoM zugesetzt wurde (vgl. Abb.: 11). Die Zugabe von Fosfomycin führte zur Inhibierung von MurA, wodurch kein Phosphat freigesetzt wurde und diente der Kontrolle, dass die gemessenen Phosphatmengen der Enzymreaktion entstammten. Das Experiment zeigt, dass ReoM keinen Einfluss auf die *in vitro* MurA-Aktivität hat und lässt vermuten, dass ReoM auch *in vivo* nicht als Regulator der Enzymaktivität von MurA fungiert, wie es in *S. pneumoniae* der Fall ist.



**Abbildung 11: Einfluss von ReoM auf die Aktivität von MurA.**

*In vitro*-Aktivität von MurA in Gegenwart verschiedener ReoM Konzentrationen. Die Aktivität wurde anhand des freigesetzten Phosphats nach 30 min in Gegenwart von UDP-GlcNAc und PEP bestimmt. Ein 1:1 Verhältnis entspricht einer Äquimolarität zwischen MurA und ReoM. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei technischen Replikaten abgebildet. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert ( $P < 0,01$ , ns = nicht signifikant, T-Test mit Bonferroni-Holm Korrektur,  $n=3$ ).

#### 3.2 Die Akkumulation von MurA verringert die Phosphorylierung von ReoM

Mithilfe der nativen Auftrennung von Proteinextrakten in einem Polyacrylamidgel, gefolgt von Western-Blotting und der anschließenden Immundetektion von ReoM, war es nun möglich die Phosphorylierung von ReoM an T7 *in vivo* nachzuweisen. Die Bezeichnung phosphoryliertes und unphosphoryliertes ReoM, die im weiteren Verlauf der Arbeit genutzt wird, bezieht sich nur auf die Modifikation vom Threonin 7. Die Beschreibung der Phosphorylierung des Tyrosin 10 wird vernachlässigt.

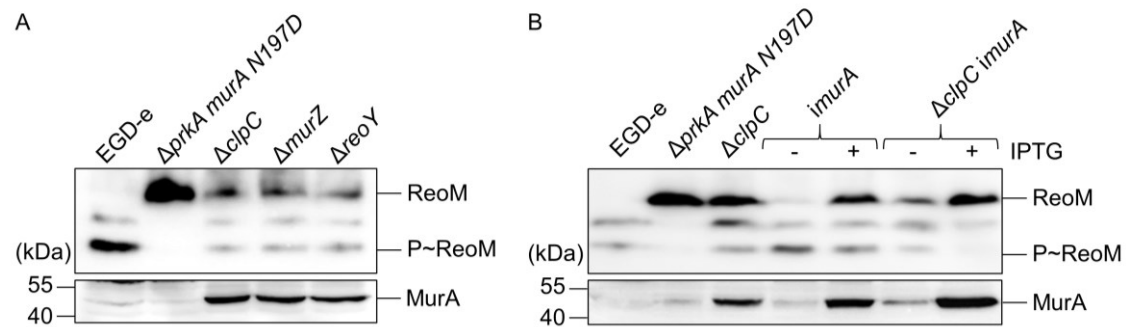
### 3.2.1 Änderung der ReoM-Phosphorylierung bei intrazellulärer Akkumulation von MurA

Die Methodik sollte als nächstes eingesetzt werden, um genetische und physiologische Determinanten zu identifizieren, die für die Phosphorylierung von ReoM notwendig sind. Dafür wurde zunächst mit *L. monocytogenes*-Stämmen weitergearbeitet, die ReoM-His überproduzierten. Bei diesen Stämmen trat jedoch ein Problem auf: Effekte, die auf die ReoM-Phosphorylierung wirkten, wurden maskiert. Um auch endogene ReoM-Mengen mit dem vorhandenen Antikörper detektieren zu können, wurden daher 50 µg Protein aus den zellulären Extrakten auf die nativen PA-Gele geladen.

Auch ohne den Poly-Histidin-Schwanz konnte ReoM auf drei verschiedenen Laufhöhen detektiert werden (vgl. Abb.: 12). Das unphosphorylierte ReoM aus dem Stamm LMS266 ( $\Delta prkA\ murA\ N197D$ ) besaß, wie unphosphoryliertes ReoM-His, die geringste Laufgeschwindigkeit. Im Wildtypstamm EGD-e war die Intensität der niedrigsten Bande am stärksten, die phosphoryliertem ReoM entspricht (vgl. Abb.: 7 & 12). Zeitgleich wurde auch der Phosphorylierungszustand von nativem ReoM in Mutanten des MurA-Degradationsweges untersucht (vgl. Abb.: 12 A). Namentlich handelt es sich um die *L. monocytogenes*-Stämme LMJR138 ( $\Delta clpC$ ), LMJR104 ( $\Delta murZ$ ) und LMSW32 ( $\Delta reoY$ ). Alle drei Stämme weisen Gendelektionen auf, die den Abbau von MurA beeinträchtigen und zur Akkumulation des Enzyms führen (Wamp *et al.*, 2020). Dies bestätigte auch der Western-Blot in Abbildung 12 A (unten). Überraschender Weise wurde zugleich in allen drei Stämmen hauptsächlich unphosphoryliertes ReoM detektiert (vgl. Abb.: 12 A oben). Die erste Vermutung legte daher nahe, dass die MurA-Akkumulation die Phosphorylierung von ReoM beeinflusst. Um zu überprüfen, ob allein die intrazelluläre Anreicherung von MurA und nicht die Störung der zellulären Proteolyse die Verringerung der ReoM-Phosphorylierung verursachte, wurden weitere Stämme getestet. LMJR123 (*imurA*) und LMJR52 ( $\Delta clpC\ imurA$ ) ermöglichen eine IPTG-abhängige MurA-Produktion. Dazu wurde der pIMK3-Vektor genutzt, mit dem eine weitere Genkopie unter der Kontrolle des Lac-Repressors ektopisch in das Genom inseriert werden kann (Monk *et al.*, 2008). Beide Stämme besitzen nur noch die ektopische *murA*-Kopie (*imurA*). Die Stämme wurden zur Gewinnung der

Proteinextrakte ohne IPTG (-) oder mit 1 mM IPTG (Endkonzentration) im Medium (+) angezogen. Wie in Abbildung 12 B zu sehen ist, ändert sich der Phosphorylierungszustand von ReoM in Abhängigkeit von der IPTG-Zugabe bei der Zellanzucht. In Anwesenheit von IPTG, also bei einer Überproduktion von MurA, liegt ReoM in beiden Stämmen (*imurA* und  $\Delta clpC$  *imurA*) hauptsächlich unphosphoryliert vor, wie auch in der  $\Delta clpC$ -Mutante. Dass eine Akkumulation von MurA unter diesen Bedingungen stattfand, bestätigt der parallel durchgeführte und MurA-spezifische Western-Blot (vgl. Abb.: 12 B). Die Erhöhung der intrazellulären MurA-Menge verursachte somit auch in diesen Stämmen eine Verringerung der ReoM-Phosphorylierung. Zusätzlich erhöhte die Depletion von MurA (-IPTG) im Stamm  $\Delta clpC$  *imurA* die ReoM-Phosphorylierung im Vergleich zum  $\Delta clpC$ -Stamm. Die in der  $\Delta clpC$ -Mutante beobachtete Unterdrückung der ReoM-Phosphorylierung ist also unabhängig von der Störung der zellulären Proteolyse an sich und wird vielmehr durch die MurA-Akkumulation verursacht.

Es könnte sich um einen internen Kontrollmechanismus handeln, bei dem MurA und PrkA um den Bindungspartner ReoM konkurrieren, um somit sicher zu stellen, dass überschüssiges MurA abgebaut wird. In einem solchen Szenario würde die Akkumulation von MurA dafür sorgen, dass sich vermehrt ReoM-MurA-Komplexe bilden. Damit würde ReoM nicht mehr für die Phosphorylierung durch PrkA zur Verfügung stehen. Erst wenn das überschüssige MurA abgebaut wurde, würde wieder freies ReoM entstehen, welches phosphoryliert werden könnte.



**Abbildung 12: Die Phosphorylierung von ReoM ist abhängig von der intrazellulären MurA-Menge.**

(A) Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMS266 ( $\Delta prkA\ murA\ N197D$ ), LMJR138 ( $\Delta clpC$ ), LMJR104 ( $\Delta murZ$ ) und LMSW32 ( $\Delta reoY$ ) untersucht (oben). Die MurA-Mengen in den gleichen Stämmen wurden mit einer 12,5 % SDS-PAGE und einem Western-Blot sichtbar gemacht (unten). Dazu wurde die SDS-PAGE mit jeweils 15 µg Protein aus Proteinextrakten beladen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

(B) Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMS266 ( $\Delta prkA\ murA\ N197D$ ), LMJR138 ( $\Delta clpC$ ), LMJR123 (*imurA*) und LMPR52 ( $\Delta clpC\ imurA$ ) untersucht (oben). Die Zellen wurden in BHI-Medium  $\pm$  1 mM IPTG angezogen. Die MurA-Mengen in den gleichen Stämmen wurden mit einer 12,5 % SDS-PAGE und einem Western-Blot sichtbar gemacht (unten). Dazu wurde die SDS-PAGE mit jeweils 15 µg Protein aus Proteinextrakten beladen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

Dafür, dass PrkA und MurA um den Bindungspartner ReoM konkurrieren und dadurch möglicherweise der Abbau von überschüssigem MurA kontrolliert wird, spricht auch, dass eine gesteigerte Produktion von ReoM den Effekt der intrazellulären MurA-Akkumulation aufhebt (vgl. Abb.: 13). In den Stämmen LMPR1 ( $\Delta clpC + reoM-his$ ), LMPR25 ( $\Delta murZ + reoM-his$ ) und LMPR26 ( $\Delta reoY + reoM-his$ ) lag ReoM-His wieder fast vollständig phosphoryliert vor, obwohl in diesen Stämmen MurA nicht proteolysiert werden kann und akkumulieren sollte. In den gleichen Stammhintergründen ohne Überproduktion von ReoM-His, also den Stämmen LMJR138 ( $\Delta clpC$ ), LMJR104 ( $\Delta murZ$ ) und LMSW32 ( $\Delta reoY$ ) wurde, wie bereits erwähnt, durch die intrazelluläre Anreicherung von MurA hauptsächlich unphosphoryliertes ReoM detektiert (vgl. Abb.: 12). Die Überproduktion von ReoM gleicht vermutlich das Verhältnis zwischen MurA und ReoM wieder aus. Es entsteht eine Art Wildtypzustand, bei dem wieder ausreichende Mengen ReoM für die Phosphorylierung durch PrkA zur Verfügung stehen.

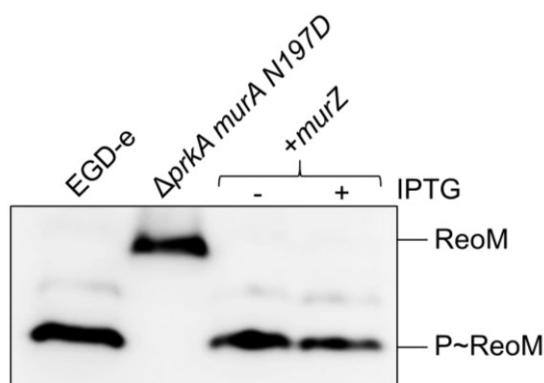


**Abbildung 13: Vergleich der ReoM-Phosphorylierung bei MurA-Akkumulation und gleichzeitiger Überproduktion von ReoM-His.**

(A) Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen LMJD22 (EGD-e +*reoM-his*), LMPR5 ( $\Delta prkA$  *murA* N197D +*reoM-his*), LMPR1 ( $\Delta clpC$  +*reoM-his*), LMPR25 ( $\Delta murZ$  +*reoM-his*) und LMPR26 ( $\Delta reoY$  +*reoM-his*) untersucht. Es wurden 15  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

### 3.2.2 Einfluss von MurZ auf die ReoM-Phosphorylierung

Das Genom von *L. monocytogenes* besitzt ein weiteres Gen, *murZ*, das wie *murA* eine UDP-*N*-Acetylglukosamin-Enolpyruvat-Transferase kodiert. Auch MurZ ist an der Proteolyse von MurA beteiligt, kann aber unter den bekannten Bedingungen MurA nicht ersetzen (Rismondo *et al.*, 2016a, Wamp *et al.*, 2020). Dennoch sollte überprüft werden, ob eine Überexpression von *murZ* den gleichen Effekt auf die ReoM-Phosphorylierung ausübt, wie die Überexpression von *murA*. Dazu wurde im Wildtypstamm EGD-e eine IPTG-induzierbare *murZ*-Kopie ektopisch in das Genom inseriert. Der resultierende Stamm heißt LMPR50 (+*murZ*) und besitzt weiterhin noch sein endogenes *murZ*-Allel. Abbildung 14 zeigt, dass die Überproduktion von MurZ (+IPTG) den Phosphorylierungszustand von ReoM nicht verändert. ReoM ist weiterhin nahezu vollständig phosphoryliert. Die Phosphorylierung von ReoM ist somit unabhängig von erhöhten intrazellulären MurZ-Mengen. Ob MurZ tatsächlich akkumulierte, konnte jedoch nicht kontrolliert werden, da kein MurZ-Antiserum zur Verfügung stand.

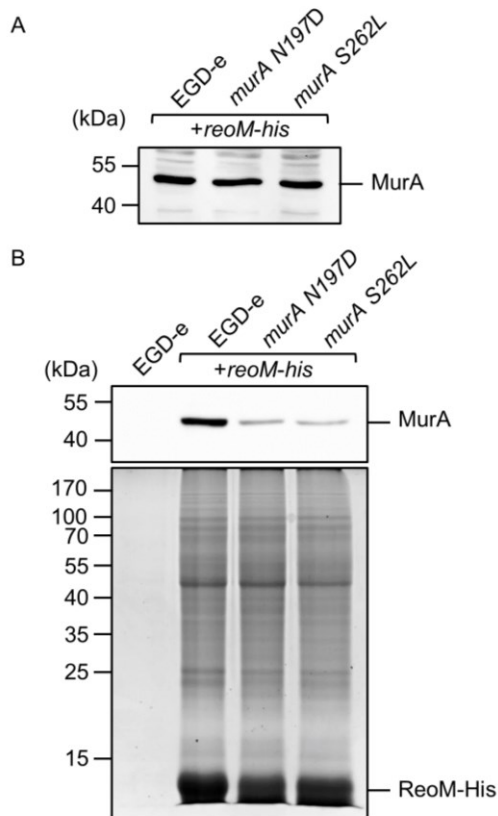


**Abbildung 14: Effekt der MurZ-Überproduktion auf die ReoM-Phosphorylierung.**

Der Western-Blot zeigt die ReoM-Phosphorylierung in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMS266 ( $\Delta prkA$  *murA* N197D) und LMPR50 (+*murZ*). Die Stämme wurden in BHI-Medium  $\pm$  1 mM IPTG angezogen. Es wurden 50  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

3.2.3 Charakterisierung der *escape* Mutationen *murA N197D* und *murA S262L*

In Abschnitt 3.1.1 wurde bereits die *escape*-Variante MurA N197D erwähnt, welche die eigentlich letale Deletion von *prkA* erst ermöglicht. Diese MurA-Variante, sowie die Variante MurA S262L wurden als Suppressoren der  $\Delta$ *gpsB*-Mutante identifiziert (Wamp *et al.*, 2022). Beide MurA-Varianten akkumulieren im Gegensatz zum Wildtyp-MurA (Wamp *et al.*, 2022). Um herauszufinden, ob ihre Proteolyse beeinträchtigt ist, weil MurA N197D und MurA S262L nicht mehr mit ReoM interagieren können, wurden *pulldown*-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Stämme LMPR1 ( $\Delta$ *clpC* +*reoM-his*), LMPR14 ( $\Delta$ *clpC murA N197D* +*reoM-his*) und LMPR13 ( $\Delta$ *clpC murA S262L* +*reoM-his*) verwendet, bei denen MurA durch die Deletion von *clpC* akkumulieren konnte und einen Nachweis des Proteins erleichtert. Nach der Anzucht wurde MurA bzw. die MurA-Varianten durch Zugabe von Formaldehyd mit ReoM-His vernetzt und die MurA-ReoM-His-Komplexe wurden mittels Affinitätschromatografie gereinigt. Das *crosslinking* wurde anschließend durch Hitzebehandlung rückgängig gemacht, die Eluate wurden mittels SDS-PAGE separiert und ReoM wurde durch kolloidale Coomassie-Färbung sichtbar gemacht, wohingegen MurA mittels Western-Blot und Immunfärbung detektiert wurde (vgl. Abb.: 15). Es wurde weniger MurA N197D und MurA S262L mit ReoM-His gemeinsam aufgereinigt als Wildtyp-MurA. Dabei konnten vor dem *crosslinking* ähnliche Mengen von MurA und seiner mutierten Varianten detektiert werden (vgl. Abb.: 15 A). Die Interaktion zwischen ReoM und MurA N197D bzw. MurA S262L ist nach diesem Ergebnis zu urteilen, beeinträchtigt und damit wahrscheinlich ursächlich für die verringerte Degradation von MurA.

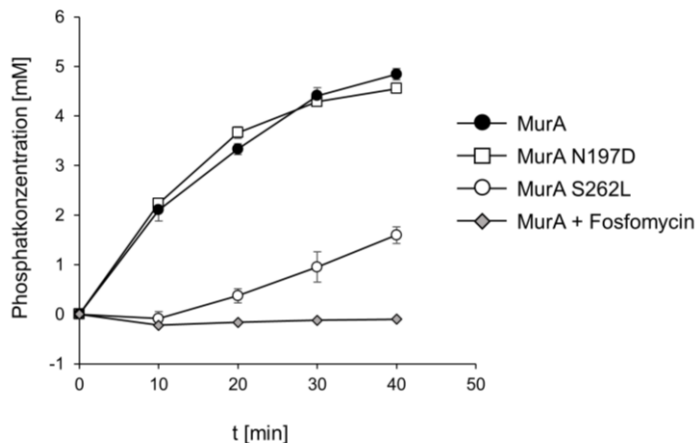


**Abbildung 15: Interaktionsfähigkeit der MurA Varianten N197D und S262L mit ReoM.**

Pulldown-Experiment nach dem *in vivo* Formaldehyd-crosslinking mit den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (Kontrolle), LMPR1 ( $\Delta clpC$  + *reoM-his*), LMPR14 ( $\Delta clpC$  *murA* N197D + *reoM-his*) und LMPR13 ( $\Delta clpC$  *murA* S262L + *reoM-his*).

(A) Bestimmung der MurA-Mengen mittels Western-Blot vor dem crosslinking. (B) Bestimmung der MurA-Mengen (oben) und ReoM-His-Mengen (unten) nach dem crosslinking mittels Western-Blot bzw. SDS-PAGE.

Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die *escape*-Mutationen die Enzymaktivität von MurA verändern. Es bestand die Annahme, dass eine erhöhte Enzymaktivität und damit einhergehend eine gesteigerte PG-Biosynthese die Suppression der *gpsB*-Deletion verursachen könnte (Wamp *et al.*, 2022). Um das zu kontrollieren, wurde die *in vitro*-Aktivität der Varianten MurA N197D und MurA S262L im Vergleich zum Wildtypenzym bestimmt. Über einen Zeitraum von 40 min wurde die freigesetzte Phosphatmenge der drei MurA-Varianten gemessen (vgl. Abb.: 16). Die Variante MurA N197D setzte ähnliche Phosphatkonzentrationen frei, wie das Wildtypenzym, wies also eine Wildtyp-ähnliche Aktivität auf. Die MurA-Variante S262L war im Gegensatz dazu deutlich verringert in ihrer Aktivität. Die Suppression des  $\Delta gpsB$ -Phänotyps ist also nicht auf eine gesteigerte enzymatische Aktivität der MurA-Varianten MurA N197D und MurA S262L zurückzuführen, sondern wird vermutlich allein durch ihre verringerte Interaktion mit ReoM verursacht.

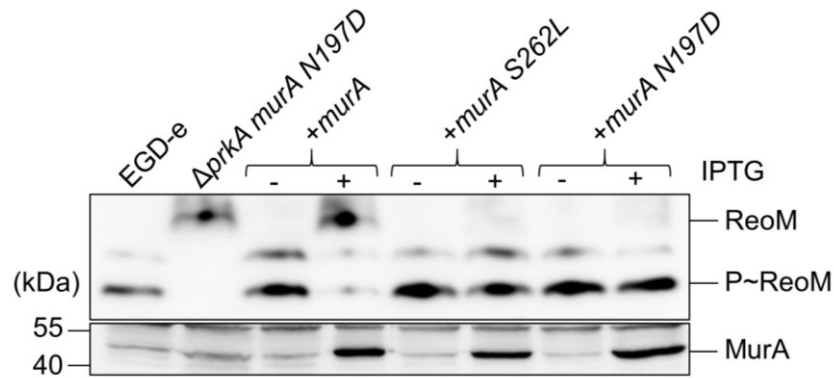


**Abbildung 16: *In vitro*-Aktivität der MurA-Varianten MurA N197D und MurA S262L.**

Die Aktivität wurde anhand des freigesetzten Phosphats von MurA-Strep, MurA N197D-Strep und MurA S262L-Strep in Gegenwart von UDP-GlcNAc und PEP bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus drei technischen Replikaten abgebildet.

#### 3.2.4 Notwendigkeit der Interaktion zwischen MurA und ReoM für die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung

Die Bestätigung, dass ReoM und MurA für die Proteolyse von MurA miteinander interagieren müssen, eröffnete die Frage, ob ihre Interaktion miteinander auch Auswirkungen auf die ReoM-Phosphorylierung hat. Insbesondere war fraglich, ob die Akkumulation von MurA N197D oder MurA S262L ebenfalls einen Rückgang der ReoM-Phosphorylierung verursacht, wie es bei einer intrazellulären Anreicherung des Wildtypproteins der Fall war. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die ReoM-Phosphorylierung in den Stämmen LMSW136 (+*murA S262L*) und LMSW137 (+*murA N197D*), welche die MurA-Varianten MurA S262L und MurA N197D IPTG-abhängig produzieren können, untersucht. Wie in Abbildung 17 zu erkennen, blieb bei Überproduktion dieser MurA-Varianten die Reduktion der Phosphorylierung von ReoM aus. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Überproduktion des *murA*-Wildtypallels im Stamm LMJR116 (+*murA*) erneut hauptsächlich unphosphoryliertes ReoM nachgewiesen werden. Dass eine Akkumulation von MurA und den MurA-Varianten vorlag wurde mittels Western-Blot kontrolliert (vgl. Abb.: 17). Für den MurA-Mengen abhängigen Effekt auf die ReoM-Phosphorylierung ist nach diesem Experiment zu urteilen, eine Interaktion zwischen MurA und ReoM notwendig.



**Abbildung 17: MurA muss für die Unterdrückung der ReoM-Phosphorylierung mit ReoM interagieren können.**

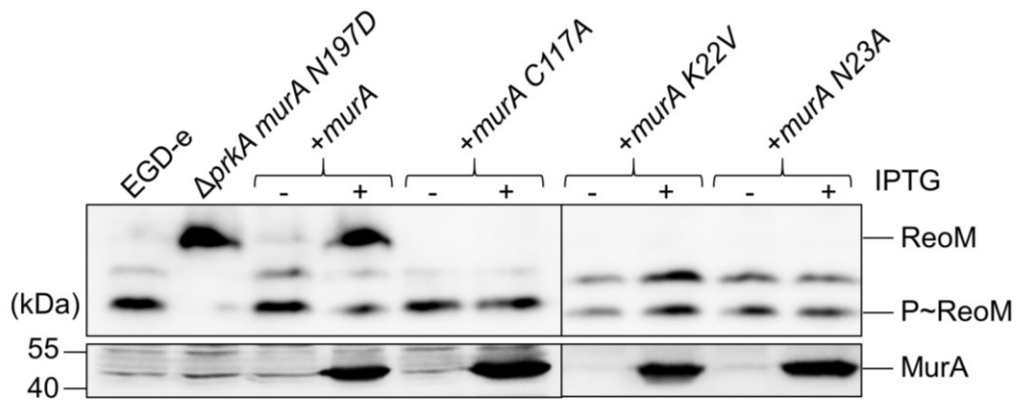
Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMS266 ( $\Delta prkA$  *murA* N197D), LMJR116 (+*murA*), LMSW136 (+*murA* S262L) und LMSW137 (+*murA* N197D) untersucht (oben). Es wurden 50  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Die MurA-Mengen in den gleichen Stämmen wurden mit einer 12,5 % SDS-PAGE und einem Western-Blot sichtbar gemacht (unten). Dazu wurde die SDS-PAGE mit jeweils 15  $\mu$ g Protein aus Proteinextrakten beladen. Die Stämme wurden in BHI-Medium  $\pm$  1 mM IPTG angezogen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

### 3.2.5 Notwendigkeit der Substratbindung und Enzymaktivität von MurA für die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung

Die Akkumulation von MurA verursachte eine Verringerung der ReoM-Phosphorylierung, die möglicherweise auf die Konkurrenz von MurA und PrkA um den Bindungspartner ReoM zurückzuführen ist. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Überproduktion von MurA-Varianten mit einer verringerten Bindung an ReoM diesen Effekt nicht verursachten. Die intrazelluläre Anreicherung von MurA führt aber zusätzlich auch zu einer Steigerung der Peptidoglykanbiosynthese (Wamp *et al.*, 2022). Das bedeutet, dass neben MurA auch Intermediate des Biosyntheseweges akkumulieren könnten. Um herauszufinden, ob solche Intermediate an der Verringerung der ReoM-Phosphorylierung beteiligt sind, sollte eine enzymatisch inaktive MurA-Variante hinsichtlich ihres Einflusses auf die ReoM-Phosphorylierung untersucht werden. Dazu wurde das Cystein im aktiven Zentrum von MurA, das sich an Position 117 der Aminosäuresequenz befindet (siehe Anhang), durch Alanin substituiert (MurA C117A) (Marquardt *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 1996, Skarzynski *et al.*, 1996). Wie der Abbildung 18 zu entnehmen, trat bei der Überproduktion (+IPTG) dieser MurA-Variante im Stamm LMPR51 (+*murA* C117A) keine Verringerung der ReoM-Phosphorylierung auf, obwohl das Protein intrazellulär

akkumulierte. Im Gegensatz dazu konnte durch die Überexpression des *murA*-Wildtypallels im Stamm LMJR116 (+*murA*) eine geringere Phosphorylierung von ReoM nachgewiesen werden. Die enzymatische Aktivität von MurA ist demnach notwendig, um einen Rückgang der ReoM-Phosphorylierung verursachen zu können. Somit könnten Intermediate des Peptidoglykanbiosyntheseweges eine Rolle bei der Kontrolle der Phosphorylierung von ReoM spielen.

Für die enzymatische Aktivität von MurA ist auch die Substratbindung essentiell. Während des Reaktionszyklus ändert sich außerdem die Konformation von MurA. In der Abwesenheit von Substraten besitzt das Enzym eine offene Struktur, die sich unter anderem durch die Bindung von UDP-GlcNAc zu einer kompakteren geschlossenen Form verändert (Schönbrunn *et al.*, 1996, Skarzynski *et al.*, 1996, Schönbrunn *et al.*, 1998, Zhu *et al.*, 2012). Mithilfe von MurA-Varianten, die in ihrer Substratbindung beeinträchtigt sind, sollte daher untersucht werden, ob die Konformation von MurA und die Bindung von UDP-GlcNAc eine Rolle in der Kontrolle der ReoM-Phosphorylierung spielen. Auch dies sollte mithilfe der Überproduktion von MurA-Varianten (MurA K22V und MurA N23A) kontrolliert werden. Die Substitutionen leiten sich aus der Proteinsequenz von MurA aus *Enterobacter cloacae* ab (Samland *et al.*, 1999, Samland *et al.*, 2001). MurA K22V aus *E. cloacae* kann UDP-GlcNAc und PEP binden, wie die Wildtypform des Proteins. Allerdings bildet MurA K22V in Gegenwart von UDP-GlcNAc die kovalente Bindung an PEP nicht mehr aus und ist in der Enzymaktivität stark reduziert (< 0,5 %) (Samland *et al.*, 1999). Bei der Variante MurA N23A ist in der Bindung von UDP-GlcNAc beeinträchtigt und das Enzym besitzt eine fast vollständig reduzierte Aktivität (0,1 - 0,35 %). Die Bindung von PEP an das Enzym bleibt aber unbeeinträchtigt (Samland *et al.*, 2001). Auch in den Stämmen, LMJR57 (+*murA* K22V) und LMJR56 (+*murA* N23A), welche die beschriebenen MurA-Varianten IPTG-abhängig produzierten und akkumulierten, konnte keine Verringerung der ReoM-Phosphorylierung detektiert werden (vgl. Abb.: 18). MurA muss also auch die Substrate UDP-GlcNAc und PEP binden können, um die ReoM-Phosphorylierung zu beeinflussen. Vermutlich muss MurA in der geschlossenen Konformation vorliegen, um die ReoM-Phosphorylierung unterdrücken zu können.



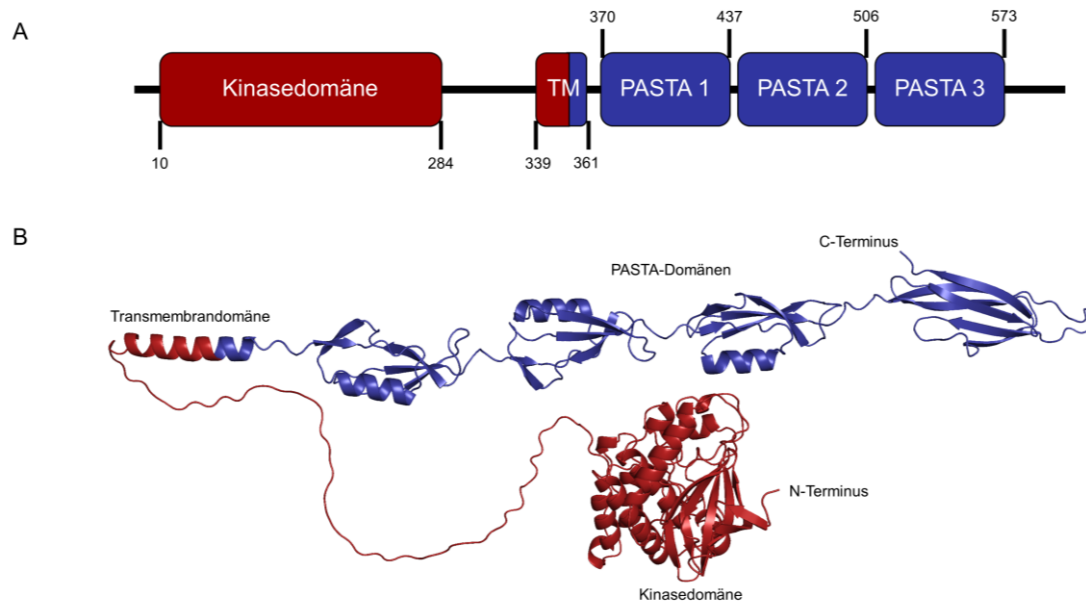
**Abbildung 18: Für die Änderung der ReoM-Phosphorylierung benötigt MurA das Cystein im aktiven Zentrum und die Fähigkeit zur Substratbindung.**

Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e, LMS266 ( $\Delta prkA$  *murA* N197D), LMJR116 (+*murA*) und LMPR51 (+*murA* C117A), LMPR57 (+*murA* K22V) und LMPR56 (+*murA* N23A) untersucht (oben). Es wurden 50  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Die MurA-Mengen in den gleichen Stämmen wurden mit einer 12,5 % SDS-PAGE und einem Western-Blot sichtbar gemacht (unten). Dazu wurde die SDS-PAGE mit jeweils 15  $\mu$ g Protein aus Proteinextrakten beladen. Die Stämme wurden in BHI-Medium  $\pm$  1 mM IPTG angezogen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

### 3.3 Einfluss extrazellulärer Signale auf die Phosphorylierung von ReoM

#### 3.3.1 Relevanz der PASTA-Domänen von PrkA für die Kinaseaktivität und Phosphorylierung von ReoM

Die Wahrnehmung von extrazellulären Signalen findet durch die PASTA-Motive von PASTA-eSTKs statt (Barthe *et al.*, 2010). Ob die PASTA-Domänen von PrkA überhaupt eine Rolle bei der ReoM-Phosphorylierung spielen, sollte als Nächstes überprüft werden. Dazu wurde der C-Terminus von PrkA (AS 356-655), welcher die PASTA-Motive und einen Teil der transmembranen Region umfasst, entfernt (vgl. Abb.: 19) (Lima *et al.*, 2011). Nachfolgend wird diese PrkA-Variante als PrkA $\Delta$ C referenziert.



**Abbildung 19: Struktureller Aufbau der PASTA-eSTK PrkA aus *L. monocytogenes*.**

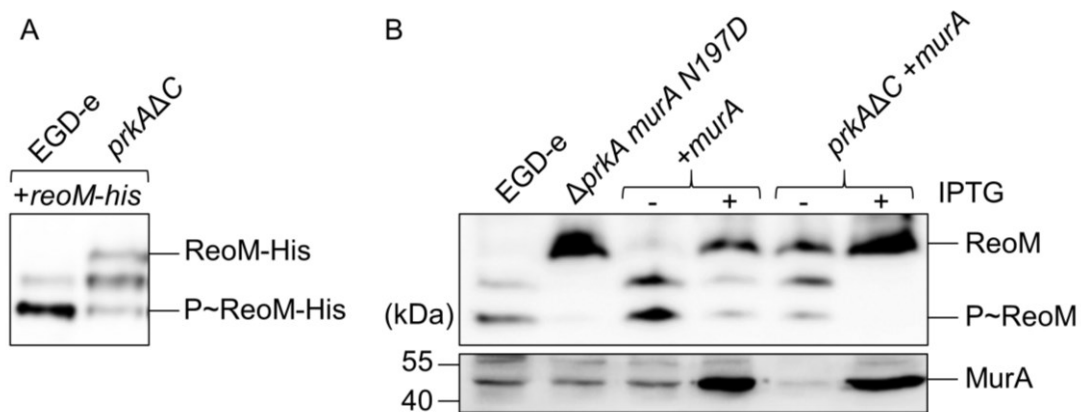
(A) Schematische Darstellung der Domänen von PrkA. N-terminal befindet sich die Kinasedomäne, gefolgt von der Transmembrandomäne (TM) und den drei PASTA-Domänen. Der intrazelluläre Teil des Proteins erstreckt sich über die Aminosäuren 1-338 (Lima *et al.*, 2011).

(B) Strukturvorhersage von PrkA (UniProtID: Q8Y679) mittels AlphaFold Monomer v2.0 (Jumper *et al.*, 2021, Varadi *et al.*, 2021). In Blau ist der Bereich des Proteins markiert, der bei der Variante PrkAΔC fehlt (Aminosäuren 1-355).

Bei gleichzeitiger Überproduktion von ReoM-His zeigte der Stamm, der die trunkierte PrkA-Variante exprimiert (LMPR30; *prkAΔC +reoM-his*) eine verringerte ReoM-Phosphorylierung (vgl. Abb.: 20 A). Es konnte ungefähr genauso viel unphosphoryliertes wie phosphoryliertes ReoM detektiert werden. Die PASTA-Domänen und die Membranverankerung von PrkA sind demnach für eine Kinaseaktivität auf dem Niveau des Wildtypproteins notwendig.

Um herauszufinden, ob sich hohe intrazelluläre MurA-Mengen weiterhin auf die ReoM-Phosphorylierung auswirken, wurde im Stammhintergrund *prkAΔC* IPTG-abhängig ein zusätzliches *murA*-Allel exprimiert (LMPR49; *prkAΔC +murA*). Wenn das zusätzliche MurA-Allel nicht exprimiert wurde (-IPTG), konnte ein Rückgang der ReoM-Phosphorylierung im Stamm *prkAΔC +murA* beobachtet werden (vgl. Abb.: 20 B). Dieser Rückgang ähnelt dem Phosphorylierungszustand von ReoM im Stamm LMPR30 (*prkAΔC +reoM-his*). Wenn intrazelluläres MurA im Stamm *prkAΔC +murA* akkumulierte (+IPTG), konnte eine noch geringere ReoM-Phosphorylierung detektiert werden. Es wurde

sogar mehr unphosphoryliertes ReoM nachgewiesen als im Vergleichsstamm LMJR116 (+*murA*) mit IPTG-Zugabe. Die verminderte ReoM-Phosphorylierung als Resultat der MurA-Akkumulation addierte sich also zu der geringeren ReoM-Phosphorylierung aufgrund der fehlenden PASTA-Domänen. Die Effekte treten demnach unabhängig voneinander auf. Damit lässt sich ein extrazelluläres Intermediat der Peptidoglykanbiosynthese als Signalgeber für die Verringerung der ReoM-Phosphorylierung bei hohen intrazellulären MurA-Leveln ausschließen. Es besteht aber weiterhin die Möglichkeit, dass intrazelluläre Intermediate an der Steuerung der ReoM-Phosphorylierung beteiligt sind.



**Abbildung 20: Einfluss der PASTA-Domänen auf die Aktivität von PrkA und ReoM-Phosphorylierung in Gegenwart hoher intrazellulärer MurA-Mengen.**

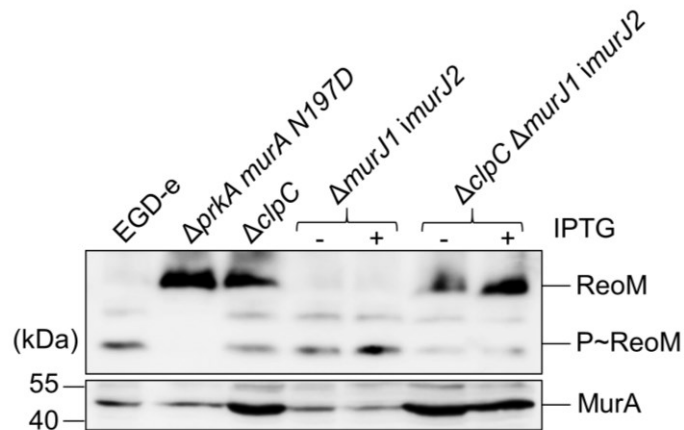
(A) Die Änderung der ReoM-Phosphorylierung durch das Fehlen der PASTA-Domänen von PrkA wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen LMJD22 (EGD-e +*reoM-his*) und LMJR30 (*prkAΔC* +*reoM-his*) untersucht. Es wurden 15 µg der Proteinextrakte aufgetragen.

(B) Der Einfluss der MurA-Akkumulation auf die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMS266 ( $\Delta prkA$  *murA* N197D), LMJR116 (+*murA*) und LMJR49 (*prkAΔC* +*murA*) untersucht (oben). Es wurden 50 µg der Proteinextrakte aufgetragen. Die MurA-Mengen in den gleichen Stämmen wurden mit einer 12,5 % SDS-PAGE und einem Western-Blot sichtbar gemacht (unten). Dazu wurde die SDS-PAGE mit jeweils 15 µg Protein aus Proteinextrakten beladen. Die Stämme wurden in BHI-Medium  $\pm$  1 mM IPTG angezogen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

### 3.3.2 Einfluss von Lipid II auf die Phosphorylierung von ReoM

Nach bisherigen Erkenntnissen sollen PASTA-eSTKs wie PrkA extrazelluläres Lipid II und/oder Muropeptide mithilfe der PASTA-Domänen wahrnehmen können und infolgedessen soll die Kinaseaktivität moduliert werden (Barthe *et al.*, 2010). Bei einem Anstieg der intrazellulären MurA-Menge könnte sich auch die Lipid II-Produktion erhöhen und größere Mengen davon über die

Zytoplasmamembran transportiert werden. Der Anstieg von extrazellulärem Lipid II könnte dann den Rückgang der ReoM-Phosphorylierung durch Hemmung der Kinaseaktivität verursachen. Um diese Hypothese zu testen, wurden *L. monocytogenes*-Stämme hinsichtlich der ReoM-Phosphorylierung *in vivo* untersucht, denen die Flippasen für den Membrantransport von Lipid II fehlen. Es handelt sich um Abkömmlinge des Wildtypstammes 10403S, der zwei Flippasen MurJ1 und MurJ2 besitzt. Der Stamm ANG5140 ( $\Delta murJ1 imurJ2$ ) wurde freundlicherweise von Jeanine Rismondo und Angelika Gründling zur Verfügung gestellt und besitzt nur noch die Flippase MurJ2, die sich IPTG-abhängig produzieren lässt. Damit in diesem Stammhintergrund MurA akkumulieren kann, wurde zusätzlich *clpC* deletiert (LMPR54;  $\Delta clpC \Delta murJ1 imurJ2$ ). Im Stamm  $\Delta murJ1 imurJ2$  liegt ReoM bei Depletion und Expression von *murJ2* (-/+IPTG) hauptsächlich phosphoryliert vor, wie auch im Wildtypstamm EGD-e (vgl. Abb.: 21). Wenn Lipid II als Aktivator der PrkA-Kinase wirkt, hätte man durch die Depletion von *murJ2* einen Rückgang der ReoM-Phosphorylierung erwartet, da weniger extrazelluläres Lipid II für die Aktivierung von PrkA vorhanden sein sollte. In dem Stamm  $\Delta clpC \Delta murJ1 imurJ2$  ist ebenfalls keine Veränderung der ReoM-Phosphorylierung in Ab- und Anwesenheit von MurJ2 (-/+IPTG) erkennbar. ReoM liegt überwiegend im unphosphorylierten Zustand vor, wie im Stamm  $\Delta clpC$ , in dem ebenfalls MurA akkumulierte (vgl. Abb.: 21). Die Depletion von MurJ wirkt sich also auch bei Akkumulation von MurA nicht auf die ReoM-Phosphorylierung aus. Eine Hemmung der Kinaseaktivität von PrkA durch extrazelluläres Lipid II kann durch dieses Experiment nicht bestätigt werden.



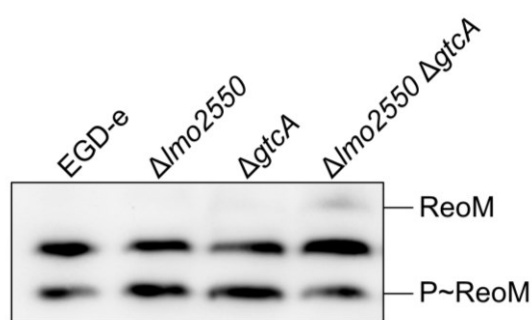
**Abbildung 21: Die Änderung der ReoM-Phosphorylierung durch MurA-Akkumulation ist unabhängig von MurJ.**

Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMS266 ( $\Delta prkA$  *murA* N197D), LMJR138 ( $\Delta clpC$ ), ANG5140 ( $\Delta murJ1$  *imurJ2*) und LMPR54 ( $\Delta clpC$   $\Delta murJ1$  *imurJ2*) untersucht (oben). Es wurden 50  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Die MurA-Mengen in den gleichen Stämmen wurden mit einer 12,5 % SDS-PAGE und einem Western-Blot sichtbar gemacht (unten). Dazu wurde die SDS-PAGE mit jeweils 15  $\mu$ g Protein aus Proteinextrakten beladen. Die Stämme wurden in BHI-Medium  $\pm$  1 mM IPTG angezogen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

#### 3.4 Änderung der ReoM-Phosphorylierung durch Erhöhung der PG-Biosynthese

Mit einem weiteren Versuch sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich intrazellulär akkumulierende Intermediate des PG-Biosyntheseweges auf die ReoM-Phosphorylierung auswirken. Durch die Akkumulation von MurA konnte eine Verringerung der ReoM-Phosphorylierung beobachtet werden, die unabhängig von extrazellulären Signalen stattfindet. Die Akkumulation von MurA verursacht eine Erhöhung des Stoffwechselflusses in die PG-Biosynthese, was sich beispielsweise durch eine Verdickung der Zellwand an den Zellpolen zeigen ließ (Wamp *et al.*, 2020). Damit einhergehend könnten sich andere intrazelluläre Intermediate des PG-Biosyntheseweges anreichern, die möglicherweise die beobachtete Reduktion der ReoM-Phosphorylierung anstelle von MurA herbeigeführt haben. Eine Erhöhung des Stoffwechselflusses in die PG-Biosynthese kann auch erreicht werden, wenn andere metabolische Wege, die UDP-GlcNAc verbrauchen, blockiert sind. Der Metabolit wird nicht nur von den Enzymen MurA und MurB zu UDP-MurNAc umgesetzt, sondern ist auch ein Baustein der Wandteichonsäurebiosynthese (Kaya *et al.*, 1985). In *L. monocytogenes* werden außerdem die Wandteichonsäuren mit UDP-GlcNAc dekoriert (Eugster *et al.*, 2011). Diese Modifikationen werden von den Enzymen

GtcA und Lmo2550 unter Verbrauch von UDP-GlcNAc katalysiert (Promadej *et al.*, 1999, Eugster *et al.*, 2011). Rismondo *et al.* konnten 2016 zeigen, dass die Deletionen von *gtcA* und *lmo2550* den Wachstumsdefekt einer  $\Delta gpsB$ -Mutante durch die Anreicherung von UDP-GlcNAc teilweise supprimieren (Rismondo *et al.*, 2016a). Dadurch konnte ohne eine gleichzeitige Akkumulation von MurA die PG-Biosynthese erhöht werden (Rismondo *et al.*, 2016a). Die gleichen Stämme (LMJR156:  $\Delta lmo2550$ ; LMJR174:  $\Delta gtcA$ ) und ein Stamm mit der Kombination beider Deletionen (LMS201:  $\Delta lmo2550 \Delta gtcA$ ) wurden daher hinsichtlich der ReoM-Phosphorylierung untersucht, zeigten jedoch keine Verringerung der ReoM-Phosphorylierung in Vergleich zum Wildtypstamm (vgl. Abb.: 22). Die ReoM-Phosphorylierung ist demnach unabhängig von der Erhöhung der PG-Biosynthese und damit auch unabhängig von intrazellulären Intermediaten des Biosyntheseweges. Die Verringerung der ReoM-Phosphorylierung ist also spezifisch auf die Akkumulation von MurA zurückzuführen.



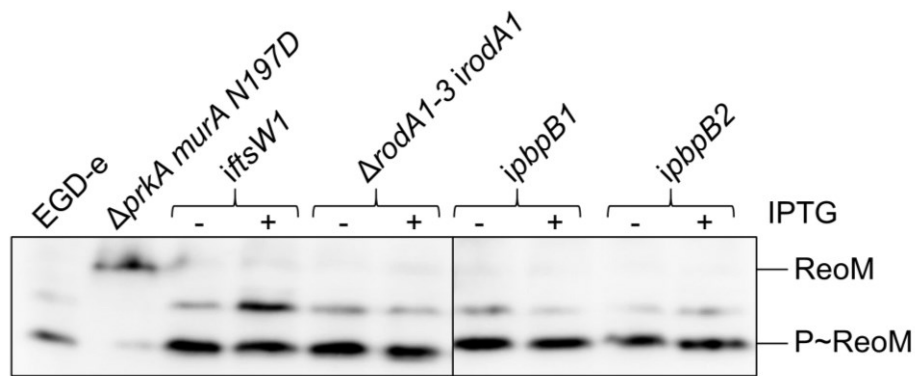
**Abbildung 22: Auswirkung einer erhöhten PG-Biosynthese auf die ReoM-Phosphorylierung.**

Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMJR156 ( $\Delta lmo2550$ ), LMJR174 ( $\Delta gtcA$ ) und LMS201 ( $\Delta lmo2550 \Delta gtcA$ ) untersucht. Es wurden 50  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

### 3.5 Einfluss des Elongasoms und Divisoms auf die ReoM-Phosphorylierung

Alle Proteine des PrkA/ReoM/MurA-Regulationsweges wurden als Suppressormutationen des  $\Delta gpsB$ -Stammes LMJR19 identifiziert (Rismondo *et al.*, 2016a, Wamp *et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022). GpsB ist Bestandteil des Divisoms und wurde auch im Zusammenhang mit Untersuchungen des Elongasoms gefunden (Errington & Wu, 2017, Halbedel & Lewis, 2019). Daher sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung von ReoM auch im Zusammenhang mit der Zellteilung oder dem lateralen Zellwachstum in *L. monocytogenes* reguliert wird. Dazu wurde die ReoM-Phosphorylierung in den Stämmen ANG4314 (*iftsW1*) und ANG5192 ( $\Delta rodA1-3$  *irodA1*), sowie den Stämmen LMJR27 (*ipbpB1*) und LMJR18 (*ipbpB2*) kontrolliert, in denen

essentielle Proteine der Zellteilung und Zellverlängerung depletiert werden können. Die Transglykosylasen FtsW1 und das PBPB2 werden für die Zellteilung benötigt (Rismondo *et al.*, 2015, Rismondo *et al.*, 2019), während RodA1 und PBPB1 für das laterale Zellwachstum verantwortlich sind (Rismondo *et al.*, 2015, Rismondo *et al.*, 2019, Liu *et al.*, 2021). Wie der Abbildung 23 zu entnehmen, hatte jedoch keine der Depletionen Auswirkungen auf die Phosphorylierung von ReoM. Das Protein lag, wie im Wildtyp, hauptsächlich phosphoryliert vor. Die Störung der Zellteilung oder -elongation verursachte keine Veränderung der ReoM-Phosphorylierung. Die Regulation der ReoM-Phosphorylierung findet also vermutlich nicht im Zusammenspiel mit der Zellteilung- oder Verlängerung statt.

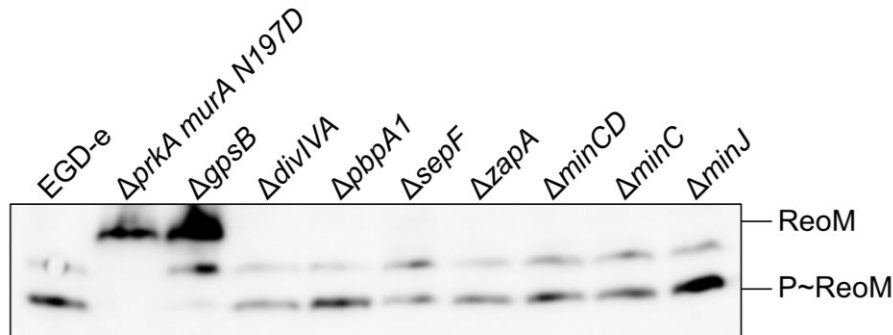


**Abbildung 23: Einfluss der Störung von Zellteilung und lateralem Wachstum auf die ReoM-Phosphorylierung.**

Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMS266 ( $\Delta prkA\ murA\ N197D$ ), ANG4314 (*iftsW1*) und ANG5192 ( $\Delta rodA1-3\ irodA1$ ), LMJR27 (*ipbpB1*) und LMJR18 (*ipbpB2*) untersucht. Die Stämme wurden in BHI-Medium  $\pm 1\text{ mM}$  IPTG angezogen. Es wurden 50  $\mu\text{g}$  der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

Damit blieb jedoch die Frage offen, welche Rolle vor allem GpsB, aber auch andere nicht-essentielle Divisomproteine bei der Phosphorylierung von ReoM spielen. Um das herauszufinden, wurden die Stämme LMJR19 ( $\Delta gpsB$ ), LMS2 ( $\Delta divIVA$ ), LMS57 ( $\Delta pbpA1$ ), LMLR8 ( $\Delta sepF$ ), LMLR9 ( $\Delta zapA$ ), LMKK35 ( $\Delta minCD$ ), LMS148 ( $\Delta minC$ ) and LMKK61 ( $\Delta minJ$ ) hinsichtlich des Phosphorylierungszustandes von ReoM untersucht. Der Abbildung 24 ist zu entnehmen, dass von den aufgezählten Divisommutanten nur im Stamm LMJR19 ( $\Delta gpsB$ ) ein Rückgang der ReoM-Phosphorylierung detektiert werden konnte. In den anderen Divisommutanten entsprach der Phosphorylierungszustand von ReoM dem Wildtypzustand. Ein allgemeiner Einfluss des Divisoms lässt sich

zusammen mit dem vorangegangenen Ergebnis daher ausschließen. Der Effekt ist GpsB-spezifisch. Das Protein wird als Determinante der zellulären Lokalisation von PrkA-Homologen PASTA-eSTKs beschrieben. Es wird von diesen phosphoryliert und moduliert beispielsweise in *B. subtilis* die Aktivität der Kinase PrkC (Pompeo *et al.*, 2015). Es könnte also sein, dass GpsB eine strukturelle Funktion einnimmt: Erst durch die Anwesenheit des Proteins besitzt die Kinase eine Aktivität auf Wildtypniveau.



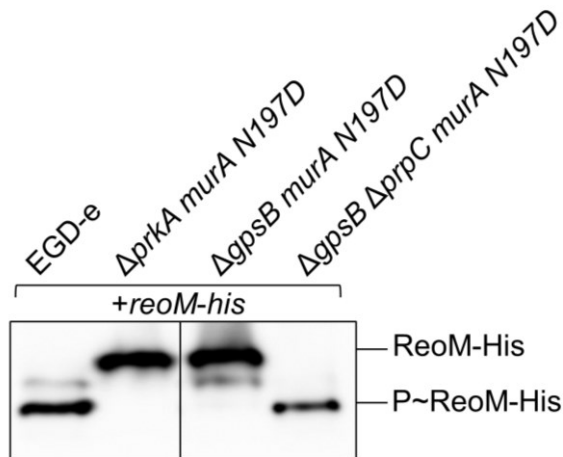
**Abbildung 24: Einfluss nicht-essentieller Divisomproteine auf die ReoM-Phosphorylierung.**

Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMS266 ( $\Delta prkA\ murA\ N197D$ ), LMJR19 ( $\Delta gpsB$ ), LMS2 ( $\Delta divIVA$ ), LMS57 ( $\Delta pbpA1$ ), LMLR8 ( $\Delta sepF$ ), LMLR9 ( $\Delta zapA$ ), LMKK35 ( $\Delta minCD$ ), LMS148 ( $\Delta minC$ ) and LMKK61 ( $\Delta minJ$ ) untersucht. Es wurden 50  $\mu g$  der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

### 3.6 Einfluss von GpsB auf die ReoM-Phosphorylierung

Um weitere Informationen darüber zu erlangen, ob GpsB für die Aktivität von PrkA benötigt wird, sollte die Deletion von GpsB mit der Überproduktion von ReoM-His kombiniert werden. Dies war allerdings nur in Gegenwart von *murA N197D* möglich. Ähnlich verhält es sich mit der Deletion von *prkA*, die ebenfalls erst durch zusätzliche Mutationen, wie *murA N197D* möglich ist. Im resultierenden Stamm LMJR10 ( $\Delta gpsB\ murA\ N197D + reoM-his$ ) konnte wie in der  $\Delta gpsB$ -Mutante ebenfalls hauptsächlich unphosphoryliertes ReoM-His detektiert werden (vgl. Abb.: 25). Die Phosphorylierung von ReoM verringerte sich durch die Deletion von *gpsB* so stark, dass die zusätzliche Überproduktion von ReoM-His einen letalen Abbau von MurA verursachte. Wenn in diesem Stammhintergrund zudem die Phosphatase PrpC fehlte (LMJR34;  $\Delta gpsB\ \Delta prpC\ murA\ N197D + reoM-his$ ), konnte wieder P~ReoM-His nachgewiesen werden

(vgl. Abb.: 25). Die Kinaseaktivität von PrkA geht durch die Deletion von *gpsB* also nicht vollständig verloren.



**Abbildung 25: Charakterisierung der ReoM-Phosphorylierung in Abwesenheit von GpsB.**

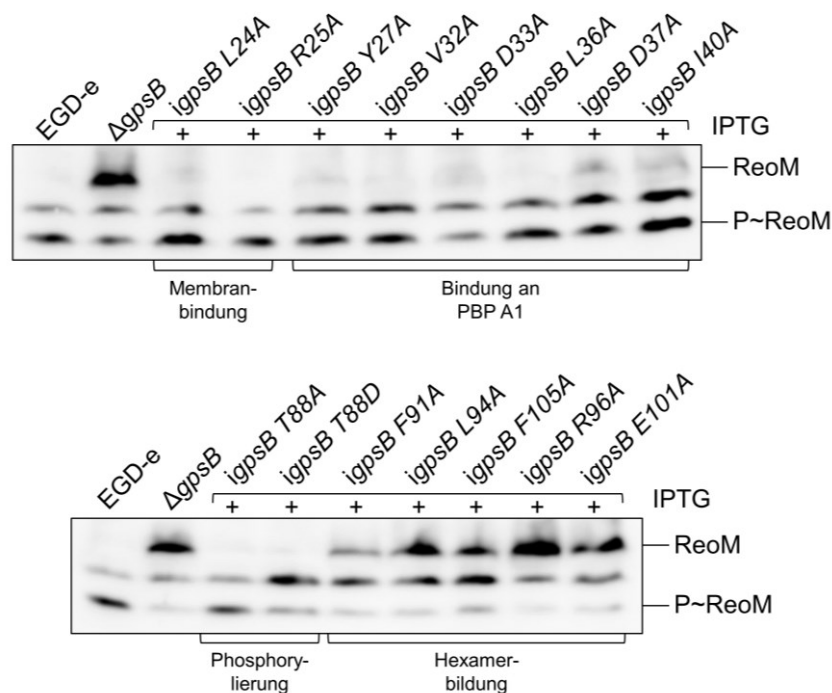
Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen LMJD22 (EGD-e +*reoM-his*), LMJR5 ( $\Delta prkA$  *murA* N197D +*reoM-his*), LMJR10 ( $\Delta gpsB$  *murA* N197D +*reoM-his*) und LMJR34 ( $\Delta gpsB$   $\Delta prpC$  *murA* N197D +*reoM-his*) untersucht. Es wurden 15  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

Welche strukturellen Eigenschaften von GpsB für die Phosphorylierung von ReoM notwendig sind, sollte anhand verschiedener GpsB-Substitutionsvarianten bestimmt werden (vgl. Abb.: 26). GpsB bildet *in vivo* eine hexamere Struktur, die an die Membran gebunden ist (Cleverley *et al.*, 2016, Rismondo *et al.*, 2016b). Mit den Stämmen LMJR68 (*igpsB* L24A) und LMJR4 (*igpsB* R25A) können GpsB-Varianten IPTG-abhängig produziert werden, die nicht mehr an die Membran binden (Rismondo *et al.*, 2016b), während die GpsB-Varianten aus den Stämmen LMS185 (*igpsB* F91A), LMS186 (*igpsB* L94A), LMS187 (*igpsB* F105A), LMJR163 (*igpsB* R96A) und LMJR164 (*igpsB* E101A) die Hexamerstruktur nicht mehr ausbilden (Cleverley *et al.*, 2016, Rismondo *et al.*, 2016b). Weiterhin ist GpsB ein bekannter Interaktionspartner von PBPA1 (Cleverley *et al.*, 2016, Rismondo *et al.*, 2016b, Cleverley *et al.*, 2019). Ob auch die PBPA1-Bindung für die ReoM-Phosphorylierung eine Rolle spielt, sollte anhand der Stämme LMJR130 (*igpsB* Y27A), LMJR131 (*igpsB* V32A), LMJR135 (*igpsB* D33A), LMJR132 (*igpsB* L36A), LMJR133 (*igpsB* D37A) und LMJR134 (*igpsB* I40A) überprüft werden, deren GpsB-Varianten in ihrer Bindung an PBPA1 beeinträchtigt sind (Rismondo *et al.*, 2016b).

Zu guter Letzt ist GpsB auch ein Phosphorylierungsziel von PrkA in *L. monocytogenes*. Das Protein wird am Threonin 88 phosphoryliert. Dieser Aminosäurerest ist ebenfalls in GpsB aus *B. subtilis* konserviert (Pompeo *et al.*,

2015, Cleverley *et al.*, 2016, Kelliher *et al.*, 2021). Deshalb sollte auch überprüft werden, ob die Phosphorylierung vom Threonin 88 in GpsB durch PrkA wichtig für die Kinaseaktivität ist. Dazu wurden die Stämme LMJR161 (*igpsB T88A*) und LMJR162 (*igpsB T88D*) untersucht. Sie produzieren GpsB-Varianten, die eine veränderte Phosphorylierungsstelle aufweisen. GpsB T88D ahmt die Phosphorylierung nach, während GpsB T88A nicht mehr phosphoryliert werden kann (Cleverley *et al.*, 2016).

Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Untersuchung des *in vivo*-Phosphorylierungszustandes von ReoM bei allen GpsB-Varianten. Nur die Stämme, welche GpsB-Varianten produzierten, die keine Hexamerstruktur mehr ausbilden, wiesen einen eindeutigen Rückgang der ReoM-Phosphorylierung auf, die auch bei der Deletion von *gpsB* auftrat. Demnach ist die Fähigkeit zur Ausbildung einer Hexamerstruktur von GpsB für die Phosphorylierung von ReoM auf dem Niveau des Wildtyps notwendig.



**Abbildung 26: Auswirkung von funktionellen *gpsB*-Mutationen auf die ReoM-Phosphorylierung.**

Die Phosphorylierung von ReoM wurde in den *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (WT), LMJR19 ( $\Delta$ *gpsB*), LMJR68 (*igpsB L24A*), LMJR4 (*igpsB R25A*), LMJR130 (*igpsB Y27A*), LMJR131 (*igpsB V32A*), LMJR135 (*igpsB D33A*), LMJR132 (*igpsB L36A*), LMJR133 (*igpsB D37A*), LMJR134 (*igpsB I40A*), LMJR161 (*igpsB T88A*), LMJR162 (*igpsB T88D*), LMS185 (*igpsB F91A*), LMS186 (*igpsB L94A*), LMS187 (*igpsB F105A*), LMJR163 (*igpsB R96A*) und LMJR164 (*igpsB E101A*) untersucht. Es wurden 50  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

#### 3.7 Vergleich der Phänotypen von $\Delta gpsB$ - und $prkA\Delta C$ -Mutanten

Anhand der bisherigen Ergebnisse besteht die Vermutung, dass GpsB in der hexameren Form die Aktivität der PASTA-eSTK PrkA fördert. Demnach sind PrkA und GpsB an derselben Aufgabe, ReoM zu phosphorylieren, beteiligt. Deletionsstämme von  $prkA$  und  $gpsB$  sollten also auch ähnliche Phänotypen ausprägen. Dies war Gegenstand der nächsten Untersuchungen. Da PrkA essentiell in *L. monocytogenes* EGD-e ist (Wamp *et al.*, 2020), wurde auf die  $prkA\Delta C$ -Mutante (LMS278) zurückgegriffen, die in ihrer Kinaseaktivität zumindest verringert ist. Beide Stämme, die  $prkA\Delta C$ - und die  $\Delta gpsB$ -Mutante wurden hinsichtlich ihres Wachstums bei 37 °C und 42 °C, ihrer Resistenz gegenüber Lysozym und Ceftriaxon ( $\beta$ -Laktam-Antibiotikum) und ihrer Zelllänge untersucht (vgl. Abb.: 27). Die Wachstumsexperimente, sowie die Testung der Ceftriaxonresistenz wurden von Prof. Dr. Sven Halbedel durchgeführt.

Die  $\Delta gpsB$ -Mutante wies bereits ein Wachstumsdefizit bei 37 °C auf (vgl. Abb.: 27 A). Bei einer Temperatur von 42 °C zeigten beide Mutanten ( $\Delta gpsB$  und  $prkA\Delta C$ ) kein Wachstum mehr (vgl. Abb.: 27 B). Der beobachtete Wachstumsphänotyp der  $\Delta gpsB$ -Mutante wurde zuvor von Rismondo *et al.* beschrieben und war damit bekannt (Rismondo *et al.*, 2016b).

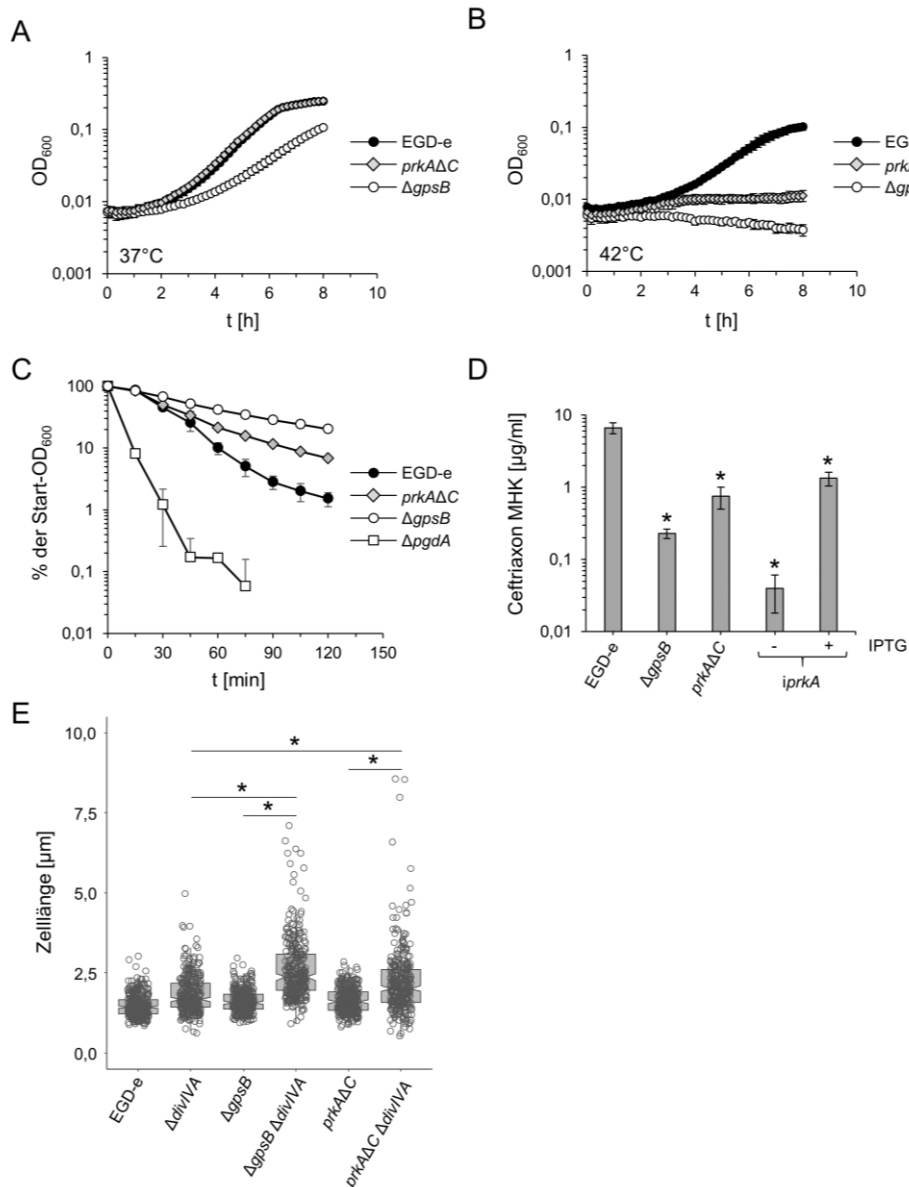
Ein weiterer bekannter Phänotyp der  $\Delta gpsB$ -Mutante ist eine, im Vergleich zum Wildtyp, erhöhte Resistenz gegenüber Lysozym (Rismondo *et al.*, 2018). Diese kann durch die Modifikation des Peptidoglykans in Form von Acetylierungen und Deacetylierungen erreicht werden (Boneca *et al.*, 2007, Aubry *et al.*, 2011). Beim Fehlen der *N*-Deacetylase PgdA verringert sich beispielsweise die Lysozymresistenz deutlich (Rismondo *et al.*, 2018). Daher wurde der Stamm LMS163 ( $\Delta pgdA$ ) als Kontrolle mitgeführt (vgl. Abb.: 27 C). Der  $prkA\Delta C$ -Stamm zeigte bei diesem Versuch, wie die  $\Delta gpsB$ -Mutante, eine höhere Lysozymresistenz als der Wildtypstamm EGD-e, erreichte aber nicht ganz das Niveau der  $\Delta gpsB$ -Mutante.

Neben der Lysozymresistenz lassen sich Veränderungen der Zellwand auch durch Antibiotikaresistenzmessungen bestimmen. Daher wurde auch die Anfälligkeit der Stämme gegenüber Ceftriaxon getestet. Der Stamm LMSW84 ( $\Delta prkA$ ) wurde im Rahmen der Entdeckung des PrkA/ReoM/MurA-

Regulationsweges hinsichtlich der Ceftriaxonresistenz bereits untersucht (Wamp *et al.*, 2020). Dabei zeigte sich, dass die Depletion von PrkA zu einer signifikant verringerten Ceftriaxonresistenz im Vergleich zum Wildtyp führt. Auch die Komplementation von *prkA* konnte den Wildtypzustand nicht wiederherstellen (Wamp *et al.*, 2020). Der gleiche Stamm wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet und die MHK für Ceftriaxon im Vergleich zum Wildtyp, sowie der  $\Delta$ *gpsB*- und *prkA* $\Delta$ C-Mutanten ermittelt (vgl. Abb.: 27 D). Sowohl die  $\Delta$ *gpsB*- als auch *prkA* $\Delta$ C-Mutante wiesen eine signifikant verringerte MHK im Vergleich zum Wildtypstamm auf. Beide MHKs waren jedoch höher als die MHK der *iprkA*-Mutante unter PrkA-Depletion (-IPTG). Die Deletion von *gpsB* oder das Fehlen der PASTA-Domänen von PrkA hatte also geringere Auswirkungen auf die Ceftriaxonresistenz als die Depletion von PrkA. Wahrscheinlich sind die  $\Delta$ *gpsB*-, *prkA* $\Delta$ C- und *iprkA*-Stämme anfälliger gegenüber Ceftriaxon als der Wildtypstamm, weil sie eine geringere Kinaseaktivität und ReoM-Phosphorylierung besitzen. Dadurch wird der Abbau von MurA eingeleitet und als Konsequenz nimmt die Peptidoglykanproduktion und die Antibiotikaresistenz ab. Im Gegensatz dazu wiesen Stämme, in denen MurA akkumuliert, eine höhere Ceftriaxonresistenz als EGD-e auf (Wamp *et al.*, 2020).

Ein weiterer charakteristischer Phänotyp tritt durch die Kombination der Deletion von *gpsB* mit der Deletion des Zellteilungsgens *divIVA* auf. Die Zellen eines solchen Stammes ( $\Delta$ *gpsB*  $\Delta$ *divIVA*) sind sichtbar länger (vgl. Abb.: 27 E) (Rismondo *et al.*, 2016b). Der gleiche Effekt konnte auch durch die Kombination der *prkA* $\Delta$ C- und  $\Delta$ *divIVA*- Deletionen erzielt werden. Ein solcher Stamm (*prkA* $\Delta$ C  $\Delta$ *divIVA*) wies ebenfalls eine signifikante Verlängerung der Zellen im Vergleich zu den Einzeldelationen ( $\Delta$ *divIVA*,  $\Delta$ *gpsB*, *prkA* $\Delta$ C) auf (vgl. Abb.: 27 E).

Die *prkA* $\Delta$ C- und  $\Delta$ *gpsB*-Stämme bilden, nach diesen Ergebnissen ähnliche Phänotypen aus. Es ist also anzunehmen, dass GpsB und PrkA eine ähnliche Funktion besitzen, bzw. an einer ähnlichen zellulären Aufgabe beteiligt sind. Das deckt sich mit der Hypothese, dass GpsB die Kinaseaktivität von PrkA erhöht.



**Abbildung 27: Phänotypischer Vergleich von *L. monocytogenes*  $\Delta gpsB$ - und  $prkA\Delta C$ -Mutanten.**

(A-B) Wachstum der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ( $\Delta gpsB$ ), LMS278 ( $prkA\Delta C$ ) in BHI-Medium bei 37 °C (A) und 42 °C (B).

(C) Die *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ( $\Delta gpsB$ ), LMS278 ( $prkA\Delta C$ ) und LMS163 ( $\Delta pgdA$ ) wurden Lysozym ausgesetzt und die Abnahme der optischen Dichte über die Zeit wurde aufgezeichnet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Replikaten sind angegeben.

(D) Die minimale Hemmkonzentration von Ceftriaxon wurde für die *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMJR19 ( $\Delta gpsB$ ), LMS278 ( $prkA\Delta C$ ) und LMSW84 ( $iprkA$ ) in Gegenwart von  $\pm$  IPTG bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Replikaten sind angegeben. Statistisch signifikante Abweichungen vom Wildtyp sind durch Sternchen markiert ( $P < 0,01$ , T-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur).

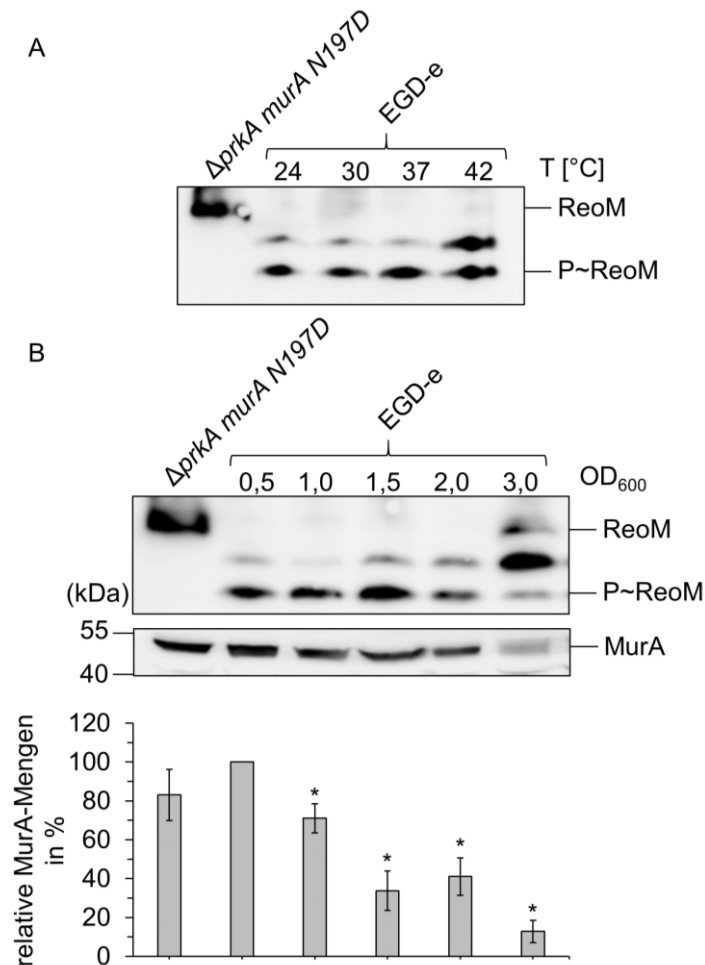
(E) Die Box-Plots zeigen die Zelllängen der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMS2 ( $\Delta divIVA$ ), LMJR19 ( $\Delta gpsB$ ), LMJR28 ( $\Delta gpsB \Delta divIVA$ ), LMS278 ( $prkA\Delta C$ ) und LMPR27 ( $prkA\Delta C \Delta divIVA$ ) während der mittleren logarithmischen Wachstumsphase. Es wurden 300 Zellen pro Stamm gemessen. Statistisch signifikante Abweichungen sind durch Sternchen markiert ( $P < 0,001$ , T-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur).

#### 3.8 Untersuchung der ReoM-Phosphorylierung bei veränderten Wachstumsbedingungen

##### 3.8.1 Einfluss der Wachstumstemperatur und Wachstumsphase auf die ReoM-Phosphorylierung

Anhand der bisherigen Daten konnte gezeigt werden, dass sich die Phosphorylierung von ReoM verringert, wenn MurA intrazellulär akkumuliert oder GpsB fehlt, bzw. keine Hexamerstruktur mehr ausbilden kann. Zusätzlich werden die PASTA-Domänen von PrkA für eine Kinaseaktivität auf Wildtypniveau benötigt. Diese Informationen wurden durch genetische Veränderungen von *L. monocytogenes* erlangt. Im Wildtypstamm EGD-e lag ReoM nach bisherigen Ergebnissen stets phosphoryliert vor. Es fehlen also noch Informationen dazu, ob die ReoM-Phosphorylierung an Umweltbedingungen angepasst wird, um die Degradation von MurA und damit die Peptidoglykanbiosynthese zu regulieren.

Um diesen Aspekt zu erörtern, wurde die ReoM-Phosphorylierung in EGD-e bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen und Wachstumsstadien überprüft. Dazu wurde EGD-e bei einer Temperatur von 24 °C, 30 °C, 37 °C oder 42 °C in BHI-Medium bis zu einer identischen optischen Dichte ( $OD_{600} = 1,0$ ) angezogen und die *in vivo*-ReoM-Phosphorylierung analysiert (vgl. Abb.: 28 A). Unter diesen Wachstumsbedingungen lag ReoM auch weiterhin hauptsächlich als P~ReoM vor. Bei einer Wachstumstemperatur von 42 °C konnte bei einem Replikat eine höhere Menge des vermutlich einfach phosphorylierten ReoM-Dimers detektiert werden (vgl. Abb.: 28 A). Wenn jedoch die Wachstumstemperatur konstant bei 37 °C gehalten wurde und stattdessen die Zellen für die Gewinnung der Proteinextrakte zu verschiedenen Zeitpunkten und damit Wachstumsstadien geerntet wurden, zeigte sich eine Änderung der ReoM-Phosphorylierung. In der späten stationären Wachstumsphase ( $OD_{600} = 3,0$ ) verschob sich der Phosphorylierungszustand von ReoM. Es konnte mehr unphosphoryliertes und weniger phosphoryliertes ReoM detektiert werden (vgl. Abb.: 28 B). Simultan nahm auch die intrazelluläre MurA-Menge signifikant ab (vgl. Abb.: 28 B). Vermutlich leitete das unphosphorylierte ReoM durch die Bindung an MurA die Proteolyse des Enzyms ein.



**Abbildung 28: Einfluss der Wachstumstemperatur und der Wachstumsphase auf die ReoM-Phosphorylierung.**

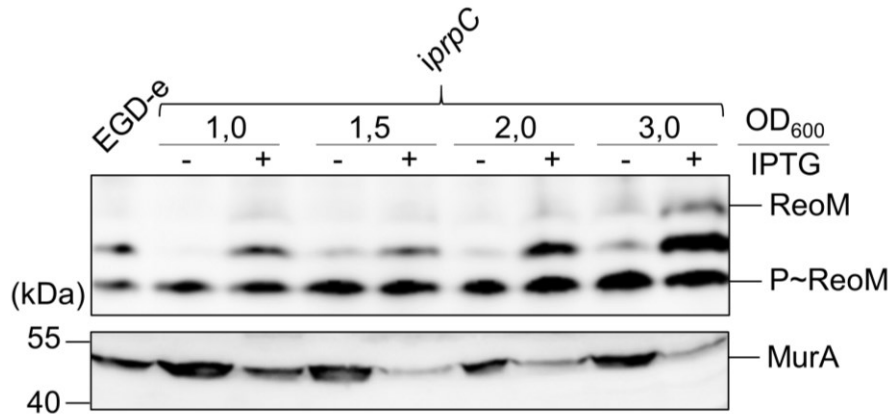
(A) Der Western-Blot zeigt die ReoM-Phosphorylierung im *L. monocytogenes*-Stamm EGD-e bei verschiedenen Wachstumstemperaturen. Der Stamm wurde in BHI-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 angezogen. LMS266 ( $\Delta prkA\ murA\ N197D$ ) wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Es wurden 50 µg der Proteinextrakte aufgetragen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

(B) Der Western-Blot zeigt die ReoM-Phosphorylierung im *L. monocytogenes*-Stamm EGD-e in verschiedenen Wachstumsphasen. Der Stamm wurde in BHI-Medium bei 37 °C bis zu den angegebenen OD<sub>600</sub> angezogen (oben). LMS266 ( $\Delta prkA\ murA\ N197D$ ) wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Es wurden 50 µg der Proteinextrakte aufgetragen. Die MurA-Mengen bei den gleichen Bedingungen wurden mit einer 10 % SDS-PAGE und einem Western-Blot sichtbar gemacht (unten). Dazu wurde die SDS-PAGE mit jeweils 50 µg Protein aus Proteinextrakten beladen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der MurA-Mengen aus drei Replikaten wurden mittels Densitometrie bestimmt und relativ zum Wildtyp bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 dargestellt. Statistisch signifikante Abweichungen vom Wildtyp bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 sind durch Sternchen markiert ( $P < 0,01$ , T-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur).

#### 3.8.2 Abhängigkeit der verminderten ReoM-Phosphorylierung in der stationären Wachstumsphase von PrpC

Mit einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, warum die ReoM-Phosphorylierung in der späten stationären Wachstumsphase abnimmt. Ein Szenario wäre, dass die Kinaseaktivität von PrkA sich verringert und dadurch die Phosphorylierung von ReoM zurückgeht. Es könnte aber auch sein, dass die Phosphataseaktivität von PrpC steigt und damit die Dephosphorylierung von ReoM zunimmt.

Um ersteres überprüfen zu können, müsste die Phosphorylierung von ReoM entlang des Wachstums in einem Stamm mit inaktivem PrkA untersucht werden. Dies gestaltet sich als schwierig, da die Deletion von *prkA* letal ist. In einem PrkA-Depletionsstamm oder der *prkAΔC*-Mutante liegt ReoM bereits vollständig oder teilweise unphosphoryliert vor. Die weitere Reduktion der ReoM-Phosphorylierung war mithilfe der etablierten Methodik nicht eindeutig detektierbar. Betrachtet man die ReoM-Phosphorylierung in einem PrpC-Depletionsstamm, so ergibt sich ein anderes Bild. Auch *prpC* lässt sich in EGD-e nicht deletieren, aber der Stamm LMSW83 (*iprpC*) wächst in Abwesenheit des Induktors IPTG (Wamp *et al.*, 2020). Durch die Depletion von PrpC sollte sich die Produktion von PrpC und damit auch die Dephosphorylierung von ReoM verringern. Ein solcher Stamm (*iprpC*-IPTG) sollte daher hauptsächlich P~ReoM enthalten. Das konnte auch experimentell bestätigt werden (vgl. Abb.: 29). In der späten stationären Wachstumsphase ( $OD_{600} = 3,0$ ) zeigte dieser Stamm keinen Rückgang der ReoM-Phosphorylierung, wie es zuvor beim Wildtyp EGD-e beobachtet wurde (vgl. Abb.: 28 & 29). Erst durch die Komplementation von *prpC* (+IPTG) konnte die Abnahme der ReoM-Phosphorylierung wieder detektiert werden (vgl. Abb.: 29). Und auch die intrazelluläre MurA-Menge reduzierte sich nur in Anwesenheit von PrpC (vgl. Abb.: 29). PrpC ist demnach für die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung in der stationären Phase notwendig. Es ist also davon auszugehen, dass die Aktivität der Phosphatase in der stationären Phase zunimmt und die Verringerung der ReoM-Phosphorylierung verursacht.



**Abbildung 29: Der Rückgang der ReoM-Phosphorylierung und der intrazellulären MurA-Mengen in der stationären Phase ist PrpC-abhängig.**

Der Western-Blot zeigt die ReoM-Phosphorylierung im *L. monocytogenes*-Stamm LMSW83 (*iprpC*) in verschiedenen Wachstumsphasen. Der Stamm wurde in BHI-Medium  $\pm$  IPTG bei 37 °C bis zu den angegebenen OD<sub>600</sub> angezogen (oben). Der Stamm EGD-e wurde als Kontrolle mitgeführt. Es wurden 50  $\mu$ g der Proteinextrakte aufgetragen. Die MurA-Mengen bei den gleichen Bedingungen wurden mit einer 10 % SDS-PAGE und einem Western-Blot sichtbar gemacht (unten). Dazu wurde die SDS-PAGE mit jeweils 50  $\mu$ g Protein aus Proteinextrakten beladen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und zeigte jedes Mal ein gleichwertiges Ergebnis.

### 3.9 Vergleich der Proteome von LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) und LMSW30 ( $\Delta reoM$ )

Die Peptidoglykanbiosynthese wird durch die Steuerung des proteolytischen Abbaus von MurA, dem ersten Enzym des Biosyntheseweges, angepasst. Dafür interagiert ReoM im unphosphorylierten Zustand mit MurA und leitet zusammen mit den Proteinen MurZ und ReoY die Degradation von MurA durch die ClpCP-Protease ein (Wamp *et al.*, 2020). ReoM und ReoY werden auch als mögliche Adapterproteine des Proteasekomplexes beschrieben (Wamp *et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022). In dieser Funktion könnten sie nicht nur MurA zur Degradation führen, sondern auch die Degradation weiterer Proteine einleiten. Durch den Vergleich der Proteome von LMSW30 ( $\Delta reoM$ ) und EGD-e sollten weitere Proteine identifiziert werden, deren Proteolyse von ReoM abhängt. Dabei sollte anhand des Proteoms vom Stamm LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) kontrolliert werden, ob ein Protein gleichzeitig auch durch den Proteasekomplex ClpCP degradiert wird. Die Aufbereitung und Analyse der Proteome wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Susanne Engelmann am Helmholtz Institut für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt. Der Versuchsablauf und die statistische Auswertung sind in Abschnitt 2.4 beschrieben.

Insgesamt konnten in den drei Stämmen 1650 zytosolische Proteine sicher identifiziert werden. Die Proteomdaten von LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) und LMSW30 ( $\Delta reoM$ ) wurden in Relation zu EGD-e gesetzt, um an- und abgereicherte Proteine in den Mutanten identifizieren zu können. Alle signifikant veränderten Proteine sind in den Tabellen 19 & 20 im Anhang aufgelistet (T-Test,  $P < 0,01$ ). In der  $\Delta clpC$ -Mutante konnten 21 Proteine identifiziert werden, die im Vergleich zum Stamm EGD-e signifikant an- oder abgereichert waren (vgl. Tab.: 19). In Stamm LMSW30 ( $\Delta reoM$ ) zeigten nur 9 Proteine eine statistische signifikante Änderung im Vergleich mit dem Wildtypstamm (vgl. Tab.: 20).

Von besonderem Interesse waren die Proteine, die sich sowohl in den  $\Delta clpC$ -Mutante als auch in der  $\Delta reoM$ -Mutante anreicherten, da man annehmen konnte, dass diese Proteine von der ClpCP-Protease abgebaut werden und ReoM dafür als Adapter fungieren könnte. Dafür wurde zunächst nach Proteinen gesucht, die in LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) und LMSW30 ( $\Delta reoM$ ) eine statistisch signifikante Änderung zur Kontrolle EGD-e aufwiesen (T-Test,  $P < 0,01$ ) (vgl. Tab.: 15). Gleichzeitig sollten die Proteine in beiden Stämmen, LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) und LMSW30 ( $\Delta reoM$ ), im Vergleich zu EGD-e mindestens 1,5-fache angereichert sein. Diesen Parametern entsprach nur MurA (vgl. Tab.: 15). Die statistisch signifikante Akkumulation von MurA bestätigt, dass das Protein durch ReoM von ClpCP abgebaut wird und deckt sich mit den Ergebnissen aus anderen MurA-Abbauversuchen (Wamp *et al.*, 2020). Das Protein MreBH ist ebenfalls in beiden Stämmen signifikant erhöht, fällt in der  $\Delta reoM$ -Mutante aber ganz knapp unter gesetzten den Schwellenwert, der eine 1,5-fache Anreicherung des Proteins vorgibt (vgl. Tab.:15).

Da nur ein Protein, MurA, den gesetzten Kriterien (signifikante und 1,5-fache Anreicherung des Proteins in beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtypstamm) entsprach, wurden in einem weiteren Schritt Proteine gesucht, die in der  $\Delta clpC$ -Mutante und der  $\Delta reoM$ -Mutante im Vergleich zum Stamm EGD-e 1,5-fach angereichert waren, aber nur in einer der beiden Stämme (LMJR138 oder LMSW30) diese Anreicherung auch statistisch signifikant war (vgl. Tab.: 16). Diesen Kriterien entsprachen zwei Proteine: Lmo0627 und CmoJ. CmoJ war nur in der  $\Delta clpC$ -Mutante statistisch signifikant erhöht, reicherte sich aber auch in LMSW30 an, weshalb es für weitere Untersuchungen interessant sein könnte.

Umgekehrt war das unbekannte Protein Lmo0627 in LMSW30 ( $\Delta$ reoM) statistisch signifikant erhöht, erreichte aber im Stamm LMJR138 ( $\Delta$ c/pC) kein Signifikanzniveau. Das Protein CwhA war in der  $\Delta$ reoM-Mutante statistisch signifikant erhöht und reicherte sich auch in der  $\Delta$ c/pC-Mutante an. Die Anreicherung von CwhA in der  $\Delta$ c/pC-Mutante lag jedoch unter dem gesetztem Schwellenwert von einer 1,5-fachen Erhöhung im Vergleich zum Wildtypstamm (vgl. Tab.: 16). Dennoch könnten CwhA und auch Lmo0627 vor allem wegen der hohen Anreicherung in LMSW30 ( $\Delta$ reoM) von Interesse sein.

Neben der statistischen Signifikanz der Proteinanreicherung sollten auch Proteine identifiziert werden, die allein aufgrund ihrer sehr hohen Anreicherung in der  $\Delta$ c/pC-Mutante oder der  $\Delta$ reoM-Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm von Bedeutung sein könnten. Diese „biologisch auffälligen“ Proteine sind in der Tabelle 17 aufgeführt. Um die Änderung zu beschreiben wurden die Mittelwerte der korrigierten LFQ-Intensitäten aus drei biologischen Replikaten pro Stamm verwendet. Diese sollten mindestens 8-fach erhöht sein im Vergleich zum Wildtypstamm und gleichzeitig eine Standardabweichung von weniger als 40 % aufweisen. Die LFQ-Intensitäten (LFQ, *label free quantitation*) dienen zur relativen Quantifizierung von Proteinproben. Um eine zuverlässige Identifizierung von angereicherten Proteinen sicherzustellen und falsch-positive Treffer zu minimieren, wurden diese Werte korrigiert. Dabei galt, dass die Summe der gemessenen Intensitäten aus jeweils drei biologischen Replikaten durch die Zahl der jeweiligen einzigartigen Peptide dividiert, einen Wert von mehr als 250000 ergeben musste. Andernfalls wurde die LFQ-Intensität, die von der Auswertungssoftware MaxQuant vorgegeben wurde, durch den Wert null ersetzt.

Es konnten nur zwei Proteine identifiziert werden, die in LMJR138 ( $\Delta$ c/pC) oder LMSW30 ( $\Delta$ reoM) eine mindestens 8-fache positive Änderung zu EGD-e aufwiesen: ReoY und FlgC (vgl. Tab.: 17). FlgC war in beiden Stämmen (LMJR138 und LMSW30) „biologisch auffällig“ erhöht. In der  $\Delta$ c/pC-Mutante lag die Standardabweichung allerdings über der gesetzten Grenze von 40 %. Dennoch könnte das Protein aufgrund der starken Anreicherung in beiden Stämmen interessant sein. Die ReoY-Menge in der  $\Delta$ c/pC-Mutante war im Vergleich zum Wildtypstamm EGD-e um den Faktor 8,19 erhöht. Zusätzlich war diese Anreicherung statistisch signifikant (vgl. Tab.: 19). Das Protein wird

ebenfalls als Adaptor der ClpCP-Protease beschrieben und ist an der Degradation von MurA beteiligt (Wamp *et al.*, 2020). Spannend ist, dass es sich nicht in LMSW30 ( $\Delta\text{reoM}$ ) anreicherte. Es wird also im Gegensatz zu MurA vermutlich unabhängig von ReoM abgebaut.

Abschließend wurde nach *de novo*-synthetisierten Proteinen in der  $\Delta\text{clpC}$ -Mutante oder der  $\Delta\text{reoM}$ -Mutante gesucht. Dafür mussten die korrigierten LFQ-Intensitäten eines Proteins in allen Replikaten von EGD-e den Wert null haben. Die Proteine durften also nur in LMJR138 ( $\Delta\text{clpC}$ ) und LMSW30 ( $\Delta\text{reoM}$ ) detektiert worden sein. Zusätzlich musste ein Protein in mindestens zwei Replikaten von LMJR138 ( $\Delta\text{clpC}$ ) oder LMSW30 ( $\Delta\text{reoM}$ ) nachgewiesen worden sein und die Werte der korrigierten LFQ-Intensitäten mussten 4-fach über der Nachweisgrenze von 250000 liegen. In den Tabellen 21 und 22 sind alle Proteine aufgeführt, die in LMSW30 oder LMJR138 *de novo*-synthetisiert wurden. Die Tabelle 18 enthält die Proteine, die in beiden Stämmen, LMJR138 und LMSW30, *de novo* auftraten. Drei dieser Proteine Lmo2437, Lmo0940 und Lmo0459 besitzen noch keine zugeordnete Funktion, wohingegen Lmo2504 als mögliches Peptidoglykan-lytisches Protein P45 mit einer Funktion in der Zellwand- oder Membranbiosynthese beschrieben wurde (Schubert *et al.*, 2000).

Tabelle 15: Im Vergleich zu EGD-e statistisch signifikant angereicherte Proteine in LMJR138 ( $\Delta c/pC$ ) und LMSW30 ( $\Delta reoM$ )

| Uniprot ID | Locus ID                        | Beschreibung <sup>#</sup>                                  | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                        | Veränderung LMJR138/EGD-e ( $\log_2$ ) | Veränderung LMSW30/EGDe ( $\log_2$ ) | ANOVA   | T-Test EGD-e LMJR138 | T-Test EGD-e LMSW30 |
|------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|
| Q8Y4C4     | <i>Imo2526</i><br><i>/murA</i>  | UDP- <i>N</i> -Acetylglukosamin-1-Carboxyvinyl-transferase | Zellwand-/Membranbiosynthese; Peptidoglykanbiosynthese | 1,22                                   | 1,03                                 | 1,5E-03 | 3,0E-03              | 4,7E-03             |
| Q8Y6H3     | <i>Imo1713</i><br><i>/mreBH</i> | Stäbchenform bestimmendes Protein                          | Zellform; Kontrolle des Zellzyklus; Mitose und Meiose  | 0,76                                   | 0,54                                 | 1,1E-03 | 2,5E-03              | 2,7E-03             |

<sup>#</sup>Informationen von <https://listiwiki.uni-goettingen.de> (Elfmann *et al.*, 2023)

**Tabelle 16: Angereicherte Proteine in LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) und LMSW30 ( $\Delta reoM$ ) mit statistischer Signifikanz der Anreicherung in LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) oder LMSW30 ( $\Delta reoM$ )**

| Uniprot ID | Locus ID                                            | Beschreibung <sup>#</sup>                                                                                                        | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                                                                                                    | Veränderung LMJR138/EGD-e ( $\log_2$ ) | Veränderung LMSW30/EGDe ( $\log_2$ ) | ANOVA   | T-Test EGD-e LMJR138 | T-Test EGD-e LMSW30 |
|------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|
| Q8Y9A5     | <i>Imo0627</i>                                      | Peptidoglykan-gebundenes Protein                                                                                                 | unbekannt                                                                                                                                          | 0,91                                   | 1,83                                 | 5,5E-03 | 8,5E-02              | 2,8E-03             |
| Q8Y4T9     | <i>Imo2343</i><br><i>/cmoJ</i>                      | mögliche Coenzym F420-abhängige N5, N10-Methylen-Tetrahydromethanopterin-Reduktase und verwandte Flavin-abhängige Oxidoreduktase | Energieproduktion und -konversion                                                                                                                  | 1,27                                   | 0,68                                 | 9,8E-02 | 3,0E-03              | 5,8E-01             |
| P21171     | <i>Imo0582</i><br><i>/cwhA</i> ,<br>p60, <i>iap</i> | Invasionsassoziierte sekretierte Endopeptidase                                                                                   | Zellwand-/Membranbiosynthese; Autolytische Aktivität, die für die Peptidoglykansynthese erforderlich ist (Zellverlängerung); Zellwandabbau/-umsatz | 0,48                                   | 1,19                                 | 8,3E-03 | 6,2E-02              | 8,1E-03             |

<sup>#</sup>Informationen von <https://listiwiki.uni-goettingen.de> (Elfmann *et al.*, 2023)

Tabelle 17: Im Vergleich zu EGD-e mindestens 8-fach angereicherte Proteine in LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) oder LMSW30 ( $\Delta reoM$ )

| Uniprot ID | Locus ID                       | Produkt <sup>#</sup>                                 | Kategorie/<br>Funktion <sup>#</sup>                               | Veränderung<br>LMJR138/<br>EGD-e (log <sub>2</sub> ) | Veränderung<br>LMSW30/<br>EGDe (log <sub>2</sub> ) | Mittelwert und<br>StabW der<br>korrigierten LFQ*<br>Intensitäten<br>LMJR138 | Mittelwert und<br>StabW der<br>korrigierten LFQ*<br>Intensitäten<br>LMSW30 |
|------------|--------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Q92DU3     | <i>Imo0711</i><br><i>/flgC</i> | Stäbchenprotein<br>des<br>Geißelgrundkörpers<br>FlgC | Motilität und<br>Chemotaxis,<br>Flagellarproteine,<br>Basalkörper | 3,93                                                 | 5,30                                               | 2027687<br>± 997870                                                         | 5213067<br>± 1933060                                                       |
| Q8Y5Y2     | <i>Imo1921</i><br><i>/reoY</i> | Regulator der<br>ClpCP Aktivität                     | Cephalosporin-<br>resistenz                                       | 3,03                                                 | 0,22                                               | 12510567<br>± 3009483                                                       | 1777097<br>± 875858                                                        |

<sup>#</sup>Informationen von <https://listiwiki.uni-goettingen.de> (Elfmann *et al.*, 2023); \*Korrigierte LFQ-Intensitäten: Die Summe der drei gemessenen Intensitäten pro Stamm (3 biologische Replikate) wurden durch die Anzahl der jeweiligen einzigartigen Peptide dividiert. Bei Werten, die unterhalb des Schwellenwertes von 250000 lagen, wurde eine Null eingetragen.

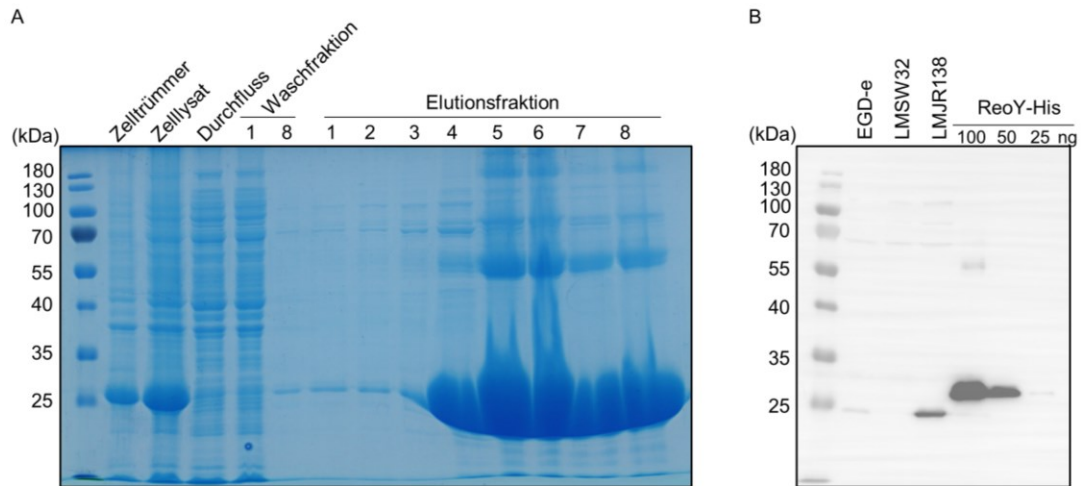
Tabelle 18: *De novo*-synthetisierte Proteine in LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) und LMSW30 ( $\Delta reoM$ )

| Uniprot ID | Locus ID       | Produkt <sup>#</sup>                             | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                  | Mittelwert der<br>korrigierten<br>LFQ*<br>Intensitäten<br>LMJR138 | Mittelwert der<br>korrigierten<br>LFQ*<br>Intensitäten<br>LMSW30 |
|------------|----------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Q8Y4E2     | <i>Imo2504</i> | mögliches Peptidoglykan-lytisches<br>Protein P45 | Zellwand-/Membranbiosynthese;<br>Zellwandabbau/-umsatz; Autolyse | 998173                                                            | 1196927                                                          |
| Q8Y4K1     | <i>Imo2437</i> | unbekannt                                        | unbekannt                                                        | 1556220                                                           | 879827                                                           |
| Q8Y8G4     | <i>Imo0940</i> | unbekannt                                        | unbekannt                                                        | 6946300                                                           | 28596133                                                         |
| Q8Y9R4     | <i>Imo0459</i> | unbekannt                                        | unbekannt                                                        | 1223333                                                           | 1484500                                                          |

<sup>#</sup>Informationen von <https://listiwiki.uni-goettingen.de> (Elfmann *et al.*, 2023); \*Korrigierte LFQ-Intensitäten: Die Summe der drei gemessenen Intensitäten pro Stamm (3 biologische Replikate) wurden durch die Anzahl der jeweiligen einzigartigen Peptide dividiert. Bei Werten, die unterhalb des Schwellenwertes von 250000 lagen, wurde eine Null eingetragen.

## 3.9.1 Herstellung eines ReoY-Antiserums

Zur Verifizierung der auffällig hohen Akkumulation von ReoY im  $\Delta clpC$ -Stamm (vgl. Tab.: 17), wurde ein Antiserum gegen ReoY von der Firma Biogenes (Berlin) hergestellt. Dazu wurde ReoY mit einem Poly-Histidin-Schwanz markiert und heterolog aus *E. coli* gereinigt (vgl. Abb.: 30). Das Fusionsprotein ließ sich in großen Mengen, jedoch mit leichten Verunreinigungen durch andere Proteine, reinigen. Es wurden nur die Elutionsfraktionen mit den optisch geringsten Kontaminationen (4, 7 und 8) für die Antiserumherstellung in einen physiologischen Puffer überführt und an die Firma versandt. Die Funktionsfähigkeit des in Kaninchen generierten Antiserums wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Westernblot kontrolliert (vgl. Abb.: 30). Dazu wurden Proteinextrakte der *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (wt), LMSW32 ( $\Delta reoY$ ) und LMJR138 ( $\Delta clpC$ ) mitgeführt, sowie gereinigtes ReoY-His in verschiedenen Mengen aufgetragen. Das gereinigte und mit Histidinen markierte ReoY besitzt eine molekulare Masse von etwas mehr als 25 kDa, da zu der molekularen Masse von ReoY (21.21 kDa) noch die Masse der Histidine und einer TEV-Proteasesequenz hinzukommen. Mit dem Antiserum (Konzentration 1:10000) konnten noch 25 ng gereinigtes ReoY-His detektiert werden. Es konnte außerdem ReoY in den Proteinextrakten von EGD-e und LMJR138 mithilfe des Antiserums nachgewiesen werden. Diese Wildtypform des Proteins wies auch eine niedrigere molekulare Masse durch das Fehlen der Histidinmarkierung und der TEV-Sequenz auf. Im Stamm LMJR138 konnten zusätzlich größere ReoY-Mengen detektiert werden, die auf eine Akkumulation des Proteins durch die Abwesenheit von ClpC hindeuten. Damit bestätigt sich das Ergebnis der Proteomanalyse. Abschließend konnte auch gezeigt werden, dass in der  $\Delta reoY$ -Mutante (LMSW32) kein ReoY mithilfe des Antiserums nachweisbar war und man mit dem Serum demnach spezifisch ReoY nachweisen kann. Damit kann das Antiserum auch für zukünftige Experimente genutzt werden, um beispielsweise die intrazelluläre Proteinmenge von ReoY zu bestimmen und so den Abbau des Proteins unter bestimmten Bedingungen zu kontrollieren.



**Abbildung 30: Reinigung von ReoY-His und Kontrolle des Antiserums.**

SDS-PAGE der affinitätschromatographischen Reinigung von ReoY-His. (A) Auftrennung der Proben aus in einem 12,5 %-igen Polyacrylamidgel. Das ca. 21 kDa große ReoY-Monomer konnte in den Zelltrümmern, dem Zelllysat und den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden. Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™) mitgeführt.

(B) Test des ReoY-Antiserums. Der Western Blot zeigt 15 µg der Zellextrakte der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (WT), LMSW32 ( $\Delta$ reoY) und LMJR138 ( $\Delta$ c/pC) sowie verschiedene Mengen des gereinigten ReoY-His-Fusionsproteins. Das Antiserum wurde 1:10000 eingesetzt. Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™) mitgeführt.

## 4. Diskussion

### 4.1 ReoM liegt *in vivo* in drei Phosphorylierungszuständen vor

Das Protein ReoM wird *in vitro* durch die PASTA-eSTK PrkA am Threonin 7 phosphoryliert und diese Phosphorylierung wird von der assoziierten Phosphatase PrpC wieder entfernt (Wamp *et al.*, 2020). Auch das ReoM-Homolog aus *E. faecalis*, IreB, wird am T7 durch die korrespondierende Kinase IreK phosphoryliert (Hall *et al.*, 2013). Untersuchungen des Phosphorylierungszustandes von IreB *in vivo* mittels Phospho-tag SDS-PAGE ließen die Unterscheidung von zwei IreB-Varianten zu, die als T7-phosphoryliertes und unphosphoryliertes IreB interpretiert wurden (Labbe & Kristich, 2017). Die Auftrennung von Proteinextrakten verschiedener *L. monocytogenes*-Stämme in einem Polyacrylamidgel unter nicht-denaturierenden Bedingungen und die anschließende Immundetektion von ReoM ermöglichte die Unterscheidung von drei verschiedenen, *in vivo* auftretenden, ReoM-Varianten. Diese drei ReoM-Varianten konnten ebenfalls unter denaturierenden Bedingungen aus *L. monocytogenes*-Stämmen gereinigt werden und ihr Laufverhalten im Gel wurde durch eine C-terminale Histidinmarkierung nicht gestört. Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass die drei ReoM-Varianten an verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert sind. Dabei konnten zwei Phosphorylierungsstellen, Threonin 7 und Tyrosin 10, sicher nachgewiesen werden. Im Wildtyp wurde hauptsächlich ReoM mit beiden Phosphorylierungen nachgewiesen. In Abwesenheit der PASTA-eSTK PrkA ist ReoM nur am Tyrosin 10 phosphoryliert. Dies bestätigt, dass die Phosphorylierung von T7 spezifisch durch PrkA erfolgt. Weiterhin entstand eine ReoM-Bande mit gleicher Laufhöhe wie in der  $\Delta prkA$ -Mutante, wenn das T7 durch ein nicht-phosphorylierbares Alanin ersetzt wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass für das Laufverhalten von ReoM im eingesetzten Polyacrylamidgel der Phosphorylierungszustand von T7 entscheidend ist. Die dritte ReoM-Variante mit einer mittleren Laufgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel war ebenfalls an beiden Aminosäuren, T7 und Y10, phosphoryliert. Unklar ist noch worin sich diese ReoM-Variante von der ReoM-Variante, die im Wildtyp identifiziert wurde und die unterste Bande im Polyacrylamidgel bildete, unterscheidet. In einem nativen Polyacrylamidgel werden Proteine hauptsächlich anhand ihrer

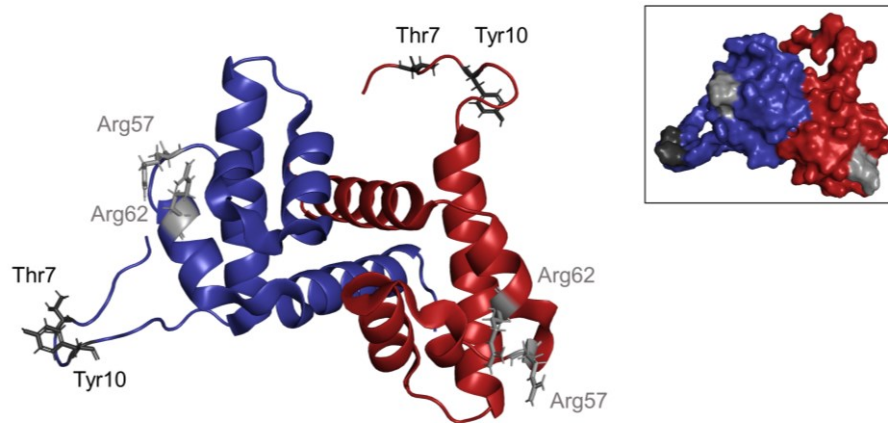
Gesamtladung aufgetrennt (Wittig & Schägger, 2005). Da beide ReoM-Varianten am T7 und Y10 phosphoryliert sind, sollte sich ihre Ladung nicht unterscheiden und sie sollten damit im angewendeten Gelsystem die gleiche Laufgeschwindigkeit aufweisen. Durch Kristallstrukturen von ReoM und IreB konnte gezeigt werden, dass beide Proteine *in vivo* als Homodimere vorliegen (Hall *et al.*, 2017, Wamp *et al.*, 2020). Die einfachste Erklärung für das unterschiedliche Laufverhalten der beiden ReoM-Varianten im nativen Polyacrylamidgel wäre also, dass die am schnellsten wandernde ReoM-Spezies T7-Phosphorylierungen an beiden Monomereinheiten des Dimers aufweist, während es sich bei der mittleren Bande um ein ReoM-Dimer handelt, bei dem nur eines der beiden Monomere am T7 phosphoryliert ist. Ein solcher intermediärer Phosphorylierungszustand zwischen vollständiger T7-Phosphorylierung des Dimers und keiner Phosphorylierung eines T7-Restes in Abwesenheit von PrkA wäre auch mit dem Laufverhalten konsistent und deutet darauf hin, dass das ReoM-Dimer so stabil ist, dass selbst die denaturierenden Bedingungen bei der Reinigung aus *L. monocytogenes* die Oligomerisierung des Proteins nicht zerstören. Zur eindeutigen Bestimmung des Phosphorylierungszustandes der ReoM-Variante, welche die mittlere Bande bildet, könnte man die Abundanz der T7-Phosphorylierung massenspektrometrisch bestimmen. Dafür müssten weitere Messungen erfolgen. Es wäre auch möglich, genetische Mutationen einzuführen, die die Dimerisierung von ReoM stören, und zu beobachten, ob dadurch die mittlere Bande nicht mehr nachweisbar ist. Anhand von IreB wurden bereits konservierte Aminosäuren identifiziert, deren Substitution zu einer Aufbrechung der Dimerstruktur und damit einhergehend zu einer Funktionslosigkeit von IreB führen (M73R und Y780E) (Hall *et al.*, 2017). Inwieweit diese intermediäre ReoM-Variante eine physiologische Rolle spielt und welche Bedingungen ihre Entstehung begünstigen, ist ebenfalls noch zu klären. Dies könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, wenn die Struktur und Modifikation dieser ReoM-Variante entschlüsselt wurde. Ebenso sollte noch geklärt werden, ob die Y10-Phosphorylierung eine Funktion ausübt.

## 4.2 Die Phosphorylierung von ReoM an T7 beeinträchtigt die Interaktion mit MurA

Bisher wurde in *L. monocytogenes* kein direkter Nachweis erbracht, dass die Phosphorylierung von ReoM am T7 auch die Interaktionsfähigkeit mit MurA verhindert, wie es der postulierte Regulationsmechanismus voraussetzt (Wamp *et al.*, 2020). In *E. faecalis* konnte allerdings bereits mittels *thermal shift assays* nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von IreB die Bindung an MurAA *in vitro* beeinträchtigt (Mascari *et al.*, 2023). Anhand von *protein crosslinking* und *pulldown* Experimenten wurde in dieser Arbeit bestätigt, dass die Phosphorylierung von ReoM die Bindung an MurA *in vivo* stört. Es konnten signifikant größere Mengen MurA zusammen mit unphosphoryliertem ReoM aus dem Stamm LMPR29 ( $\Delta murZ \Delta prkA +reoM-his$ ) gereinigt werden als aus dem Vergleichsstamm LMPR25 ( $\Delta murZ +reoM-his$ ), in dem vor dem *protein crosslinking* nur phosphoryliertes ReoM nachgewiesen werden konnte. Unklar ist, warum überhaupt MurA im Stamm LMPR25 ( $\Delta murZ +reoM-his$ ) nach dem *pulldown* detektiert werden konnte, wenn in diesem Stamm ausschließlich P~ReoM vorlag, das mit MurA nicht interagieren sollte. Vermutlich weisen dieser Stamm und auch der Wildtypstamm EGD-e geringe Mengen an unphosphoryliertem ReoM auf, die mithilfe der verwendeten Detektionsmethode allerdings nicht nachgewiesen werden können. Der polyklonale ReoM-Antikörper weist eine geringe Sensitivität auf. Dies zeigt sich z.B. darin, dass große Mengen an Proteinextrakt eingesetzt werden mussten, um natives ReoM nachweisen zu können. Es ist also wahrscheinlich, dass das detektierte MurA im Stamm LMPR25 ( $\Delta murZ +reoM-his$ ) zusammen mit unphosphoryliertem ReoM gereinigt wurde.

Die Störung der Interaktion zwischen P~ReoM und MurA ergibt sich wahrscheinlich aus einer Änderung der Konformation von ReoM im Zuge der Phosphorylierung. Anhand der Kristallstruktur von ReoM konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit eines Sulfations, welches die T7-Phosphorylierung nachahmt, der unstrukturierte N-Terminus von ReoM mit der positiv geladenen Oberfläche des Proteins interagiert (Wamp *et al.*, 2020). Durch die Strukturierung der N-terminalen Region an die Proteinoberfläche wird vermutlich die Konformation des ReoM-Dimers so verändert, dass die Interaktion mit MurA beeinträchtigt ist. Bestätigt wurde das durch den Austausch konservierter

Oberflächenarginine in ReoM (R57 und R62) zu Alaninen: Diese Substitutionen riefen den gleichen Phänotyp wie die T7A-Substitution hervor. Sie liegen gegenüber vom N-Terminus und sind notwendig für die Interaktion vom phosphorylierten T7 mit der Proteinoberfläche (vgl. Abb.: 31) (Wamp *et al.*, 2020).



**Abbildung 31: Struktur des ReoM-Dimer (PDB: 6tif) (Wamp *et al.*, 2020).**

Die Monomeruntereinheiten sind blau und rot eingefärbt. Schwarz markiert wurden die Phosphorylierungsstellen Thr7 und Tyr10. In Grau sind die Oberflächenarginine markiert, die für die Interaktion mit der N-terminalen flexiblen Domäne essentiell sind (Wamp *et al.*, 2020).

Im Gegensatz zu *L. monocytogenes*, *E. faecalis* und *B. subtilis* ist in *S. pneumoniae* nicht das MurA-Homolog, sondern das MurZ-Homolog für das normale Wachstum des Bakteriums notwendig (Tsui *et al.*, 2023). Und im Gegensatz zu *L. monocytogenes*, *B. subtilis* und *E. faecalis* wird die aktive UDP-*N*-Acetylglukosamin-Enolpyruvyltransferase in *S. pneumoniae* nicht durch einen Clp-Proteasekomplex abgebaut (Kock *et al.*, 2004, Wamp *et al.*, 2020, Mascari *et al.*, 2023, Tsui *et al.*, 2023). Die Regulation der Peptidoglykanbiosynthese erfolgt in diesem Organismus durch die Veränderung der Aktivität von MurZ und MurA (Tsui *et al.*, 2023). Diese wird vermutlich durch Bindung des ReoM-Homologs IreB an die Enzyme moduliert, wobei die Phosphorylierung von IreB ebenfalls die Interaktion mit MurZ und MurA beeinträchtigt (Tsui *et al.*, 2023). Ob IreB als Aktivator oder Inhibitor an MurZ und MurA bindet, ist laut der Aussage der Autoren noch unklar. Ihre Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Gegenwart von phosphoryliertem IreB die Aktivität der Enzyme steigt und im Gegenzug durch die Aktivitätsverringern von StkP (PrkA-Homolog), die zu einer geringeren Phosphorylierung von IreB führt, die Aktivität von MurA und MurZ

sinkt (Tsui *et al.*, 2023). Wenn man davon ausgeht, dass IreB, wie ReoM, im phosphorylierten Zustand nicht mit MurA bzw. MurZ interagieren kann, dann sollte es sich demnach bei IreB um einen negativen Regulator handeln, der durch die Bindung an MurA oder MurZ die Enzymaktivität verringert. In *L. monocytogenes* konnte *in vitro* keine Änderung der Enzymaktivität von MurA in Gegenwart verschiedener ReoM-Konzentrationen gemessen werden. Somit wird die Aktivität von MurA in *L. monocytogenes* wahrscheinlich nicht durch die Bindung von ReoM reguliert. Der Grund für den veränderten Regulationsmechanismus in *S. pneumoniae* könnte das Fehlen eines ReoY-Homologs sein, dass in *L. monocytogenes* für die Proteolyse von MurA notwendig ist. ReoY-Homologe sind nur in *Bacilli* vorzufinden (Wamp *et al.*, 2020). In *E. faecalis* und *B. subtilis*, in denen die Peptidoglykanbiosynthese auch über die Proteolyse von MurA-Homologen reguliert wird, wurden ReoY-Homologe identifiziert (Kock *et al.*, 2004, Banla *et al.*, 2017, Wamp *et al.*, 2020, Zheng *et al.*, 2020, Mascari *et al.*, 2023). Für die Regulation der Aktivität der UDP-N-Acetylglukosamin-Enolpyruvyltransferasen sind auch noch weitere Mechanismen bekannt. Beispielsweise wird MurA aus *E. coli* durch UDP-MurNAc gehemmt (Mizyed *et al.*, 2005). In *M. tuberculosis* wurde eine Amidase identifiziert, CwhM, welche von der PASTA-eSTK phosphoryliert wird und in dieser Form MurA allosterisch aktiviert (Boutte *et al.*, 2016, Turapov *et al.*, 2018). Es besteht also die Möglichkeit, dass auch die Aktivität von MurA aus *L. monocytogenes* durch Ligandenbindung reguliert wird.

4.3 Die ReoM-Phosphorylierung wird durch die Akkumulation von MurA beeinflusst

4.3.1 Die intrazelluläre Akkumulation von MurA reduziert die Phosphorylierung von ReoM

Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie die Phosphorylierung von PrkA, ReoM und homologen Proteinen in anderen Gram-positiven Bakterien reguliert wird. In *E. faecalis* nimmt die Phosphorylierung von IreK und IreB zu, wenn das Bakterium dem  $\beta$ -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon ausgesetzt ist, was den Schluss zulässt, dass das System auf Zellwandschäden reagiert (Labbe & Kristich, 2017). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass IreK und IreB nur in der exponentiellen Wachstumsphase phosphoryliert sind und damit vielleicht das

Zellwachstum und/oder die Zellteilung die Phosphorylierung stimulieren (Labbe & Kristich, 2017). In *B. subtilis* hingegen konnte eine Phosphorylierung von PrkC sowohl in der exponentiellen Wachstumsphase, als auch in der stationären Phase nachgewiesen werden (Pompeo *et al.*, 2018). Ein direkter Nachweis der Phosphorylierung von PrkA oder ReoM in *L. monocytogenes* wurde bisher nicht erbracht. Kelliher *et al.* konnten allerdings anhand von Phosphoproteomdaten zeigen, dass die Phosphorylierung von PrkA und ReoM in Gegenwart des zellwandschädigenden Antibiotikums Ceftriaxon zunimmt (Kelliher *et al.*, 2021). In dieser Arbeit wurde erstmals beobachtet, dass die Akkumulation von MurA in *L. monocytogenes* zu einer Abnahme der Phosphorylierung von ReoM führt. Die Abnahme der ReoM-Phosphorylierung trat auch dann auf, wenn der Abbau von MurA und der Proteasekomplex ClpCP nicht beeinträchtigt waren, sondern die MurA-Akkumulation durch eine Überproduktion von MurA verursacht wurde. Eine Störung der generellen Proteinhomöostase ist demnach vermutlich nicht die Ursache für die verminderte ReoM-Phosphorylierung. Darüber hinaus konnte die Reduktion der Phosphorylierung von ReoM, die durch die Akkumulation von MurA verursacht wurde, durch eine Überproduktion von ReoM-His aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, dass ein quantitatives Gleichgewicht zwischen MurA und ReoM für die Regulation der ReoM-Phosphorylierung bestehen muss.

#### 4.3.2 Die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung wird nicht durch die Steigerung der PG-Biosynthese verursacht

Eine Hypothese ist, dass die Abnahme der ReoM-Phosphorylierung, die bei der Akkumulation von MurA beobachtet wurde, möglicherweise auch indirekt durch eine Zunahme der Peptidoglykanbiosynthese infolge der gesteigerten MurA-Mengen verursacht wird. Dass die Biosynthese von Peptidoglykanen durch die Akkumulation von MurA gesteigert wird, zeigt sich beispielsweise direkt durch eine Verdickung der Zellwand an den Zellpolen oder indirekt durch eine erhöhte Ceftriaxonresistenz bei *L. monocytogenes* (Wamp *et al.*, 2020). Auch in *E. faecalis* konnte eine Erhöhung der Peptidoglykanbiosynthese und damit einhergehend der Cephalosporinresistenz durch die Akkumulation von MurAA gezeigt werden. Durch Messung des Einbaus von [<sup>14</sup>C] GlcNAc in die Zellwand konnte die Steigerung der Peptidoglykanbiosynthese direkt bestätigt werden. (Mascari *et al.*, 2022, Mascari *et al.*, 2023). Eine Steigerung der

Peptidoglykanbiosynthese unabhängig von der MurA-Menge konnte auch durch eine Erhöhung des Substratflusses in die Peptidoglykanbiosynthese erreicht werden. Dazu wurden andere UDP-GlcNAc verbrauchende Synthesewege abgeschnitten (Rismondo *et al.*, 2016a). In diesen Fällen, d.h. bei einer Erhöhung der Peptidoglykanbiosynthese unabhängig von einer Anreicherung von MurA, wurde keine Abnahme der ReoM-Phosphorylierung beobachtet. Das lässt den Schluss zu, dass die Erhöhung der Peptidoglykanbiosynthese keine Rolle bei der Regulation der ReoM-Phosphorylierung spielt. Es ist jedoch möglich, dass die Erhöhung der Peptidoglykanbiosynthese nicht ausreichend war, um die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung zu bewirken. Die Steigerung der Peptidoglykanbiosynthese durch eine erhöhte Substratverfügbarkeit für MurA konnte das Wachstumsdefizit der  $\Delta gpsB$ -Mutante nur teilweise supprimieren, während die Akkumulation von MurA den Phänotyp vollständig aufheben konnte (Rismondo *et al.*, 2016a). Dass die erhöhte Peptidoglykanbiosynthese keinen Einfluss auf die ReoM-Phosphorylierung hat, wird auch durch das Fehlen eines negativen *feedbacks* über die PASTA-Domänen von PrkA bestätigt. Die PASTA-Domänen von eSTKs sollen extrazelluläre Peptidoglykanfragmente binden und infolgedessen die Aktivität der Kinase modulieren (Pompeo *et al.*, 2018, Kaur *et al.*, 2019). Durch das Fehlen der C-terminalen Region (PASTA-Domänen und einen Teil der Transmembranregion) von PrkA konnte eine Reduktion der ReoM-Phosphorylierung beobachtet werden. Gleichzeitig blieb die intrazelluläre MurA-Menge im Vergleich zum Wildtypstamm unverändert. Die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung in der *prkA $\Delta$ C*-Mutante ist also unabhängig von der MurA-Menge. Wurde in der *prkA $\Delta$ C*-Mutante zusätzlich MurA durch Überproduktion angereichert, konnte eine weitere Reduktion der ReoM-Phosphorylierung beobachtet werden. Die Phosphorylierung von ReoM war sogar noch geringer als die des Wildtypstammes, in dem MurA überproduziert wurde. Eine Reduktion der ReoM-Phosphorylierung durch Anreicherung von MurA war also auch in Abwesenheit der PASTA-Domänen von PrkA möglich. Daraus kann geschlossen werden, dass eine erhöhte Peptidoglykanbiosynthese die Aktivität von PrkA nicht in Abhängigkeit von den PASTA-Domänen reduziert. Der beobachtete Rückgang der ReoM-Phosphorylierung durch die Akkumulation von MurA findet damit unabhängig von extrazellulären Signalen statt. Dieses Ergebnis wird durch die Tatsache untermauert, dass die MurA-akkumulationsbedingte Reduktion der

ReoM-Phosphorylierung auch unabhängig vom Lipid II-Transport über die Zytoplasmamembran war.

#### 4.3.3 PrkA und MurA konkurrieren um den Bindungspartner ReoM

Eine zweite Hypothese ist, dass MurA und PrkA um ReoM als Interaktionspartner konkurrieren. Das würde den Rückgang der ReoM-Phosphorylierung erklären, wenn MurA intrazellulär angereichert ist: MurA kann dann vermehrt an ReoM binden und entzieht es seinem Interaktionspartner PrkA zur Phosphorylierung. Durch eine Überproduktion von ReoM-His konnte diese Konkurrenz wieder aufgehoben werden. Es scheint also ein Gleichgewicht im Mengenverhältnis zwischen MurA und ReoM zu bestehen, das möglicherweise auch für die Regulation der Peptidoglykanbiosynthese erforderlich ist und vielleicht sicher stellt, dass überschüssiges MurA abgebaut wird. Demnach könnte auch die Überproduktion von PrkA die Phosphorylierung von ReoM wiederherstellen, wenn MurA intrazellulär akkumuliert. Bei diesem Modell könnten außerdem weitere Interaktionspartner von MurA, unphosphoryliertem ReoM oder PrkA eine Rolle spielen. In Phosphorylierungszyklen, die durch alternierende Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen gekennzeichnet sind, bestimmen unter anderem die Affinität und Abundanz der einzelnen Interaktionspartner für das phosphorylierte oder unphosphorylierte Substrat die Reaktionskinetik, die Reaktionsempfindlichkeit und wie schnell eine Anpassung auf zellulärer Ebene stattfindet (Salazar & Höfer, 2006a, Salazar & Höfer, 2006b). ReoM ist nicht das einzige Substrat von PrkA. Insgesamt konnten in *L. monocytogenes* 10403S 23 Substrate der PASTA-Kinase identifiziert werden, die ebenfalls um die Interaktion mit PrkA konkurrieren könnten (Kelliher *et al.*, 2021). In EGD-e konnten sogar 62 Proteine bestimmt werden, die direkt oder indirekt mit der katalytischen Domäne von PrkA interagieren (Lima *et al.*, 2011). Weiterhin ist nicht klar, wie MurZ und ReoY in den Regulationsweg integriert sind. In *bacterial two hybrid*- (BACTH-) Experimenten konnte eine Interaktion zwischen ReoM und ReoY gezeigt werden (Wamp *et al.*, 2020). Um genauere Informationen über die Konkurrenz von MurA und PrkA um den Bindungspartner ReoM (nicht-phosphoryliert) zu erhalten, wäre es daher notwendig Bindungsparameter und eventuell auch Reaktionskinetiken der Phosphorylierungsreaktion zu bestimmen.

Insbesondere über die Rolle von MurZ beim Abbau von MurA und über die Proteine, mit denen MurZ interagiert, ist wenig bekannt. Winkler *et al.* haben anhand von Daten aus *E. faecalis* ein Modell für die Regulation des MurAA-Abbaus aufgestellt (Mascari *et al.*, 2023, Winkler *et al.*, 2023). Dabei soll das ReoM-Homolog IreB im unphosphorylierten Zustand zunächst MurZ und danach MurA binden. Darauf folgt die Bindung des Proteinkomplexes an ReoY und die Proteolyse von MurA (Winkler *et al.*, 2023). In *L. monocytogenes* führte die Überproduktion von MurZ nicht zu einer Verminderung der ReoM-Phosphorylierung, wie sie bei der Akkumulation von MurA beobachtet wurde. Wenn man annimmt, dass die Abnahme von P~ReoM durch die Bindung von MurA an ReoM verursacht wird, lässt sich aus dem Ergebnis schlussfolgern, dass MurZ nicht mit ReoM interagiert. MurZ konnte ReoM dem Interaktionspartner PrkA nicht entziehen. Zur Bestätigung könnten weitere Untersuchungen zur Interaktion zwischen MurZ und ReoM erfolgen. In BACTH-Experimenten waren *murZ*-Fusionen nicht funktional (Wamp *et al.*, 2020). Stattdessen könnten andere Methoden, wie *protein crosslinking* und *pulldown* zum Einsatz kommen.

Hingegen konnten bereits einige Erkenntnisse über die Interaktion zwischen MurA und ReoM gewonnen werden. Die Interaktion wurde zunächst anhand genetischer Konstellationen und BACTH-Experimenten bestätigt (Wamp *et al.*, 2020). Anschließend konnten MurA-Varianten identifiziert werden, die in der Bindung an ReoM durch Substitutionen beeinträchtigt sind (Wamp *et al.*, 2022). Die Interaktion dieser MurA *escape* Varianten, MurA N197D und MurA S262L, mit ReoM wurde ebenfalls anhand von BACTH-Experimenten untersucht. Außerdem wurden die Bindungskinetiken mithilfe von *surface plasmon resonance* Messungen bestimmt (Wamp *et al.*, 2022). Zusätzlich wurde die Interaktion zwischen ReoM und MurA, MurA N197D oder MurA S262L *in vivo* mittels *protein crosslinking* und *pulldown* Experimenten bestimmt und bestätigte die verringerte Interaktion der MurA *escape* Varianten mit ReoM (vgl. Abschn.: 3.2.3) (Wamp *et al.*, 2022). Die Aminosäure N197 liegt an der Oberfläche von MurA (vgl. Abb.: 32). Es ist also anzunehmen, dass die Substitution N197D die Bindung zu ReoM direkt stört. Die Aminosäure S262 ist weiter innerhalb der MurA-Proteinstruktur lokalisiert (vgl. Abb.: 32). Ihre Substitution durch S262L führt vermutlich zu einer Veränderung der MurA-Struktur und wirkt sich somit

indirekt auf die Interaktion mit ReoM aus. Möglicherweise spielt dabei auch eine veränderte Enzymaktivität oder Substratbindung eine Rolle, da MurA S262L eine deutlich verringerte Aktivität *in vitro* aufwies (Wamp *et al.*, 2022). Wenn in *L. monocytogenes* die MurA *escape* Varianten MurA N197D oder MurA S262L anstatt der Wildtypvariante akkumulierten, konnte keine Verringerung der ReoM-Phosphorylierung beobachtet werden. Das bestätigt die Annahme, dass der Rückgang von P~ReoM, der bei Akkumulation von MurA entsteht, durch die Interaktion der Proteine verursacht wird. Auch in anderen Organismen konnten Substitutionsvarianten von MurA/MurZ-Homologen gefunden werden, welche die Proteinbindungen beeinflussen. In *E. faecalis* wurde beispielsweise eine MurAA-Variante (MurAA N188K) identifiziert, die keine Bindung mit IreB eingehen kann und dadurch die intrazelluläre Abundanz von MurAA teilweise stabilisierte (Mascari *et al.*, 2023). Nach Vergleich der Aminosäuresequenz mit MurA aus *L. monocytogenes*, liegt die Mutation ebenfalls an der Oberfläche des Proteins und verhindert somit vermutlich direkt die Interaktion mit IreB. Die Enzymaktivität wurde durch die Substitution nicht verändert (Mascari *et al.*, 2023). In *S. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass Substitutionen an der Oberfläche der aktiven UDP-*N*-Acetylglukosamin-Enolpyruvyltransferase MurZ (D280Y, I265V, E259A) den Phänotyp der Deletion von *gpsB* und *stkP* supprimieren können. Auch hier wird angenommen, dass der Effekt auf einer gestörten Bindung an IreB beruht (Tsui *et al.*, 2023).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch einschränkend zu berücksichtigen, dass die MurA-Variante N197D widersprüchliche Phänotypen bezüglich der Phosphorylierung von ReoM zeigte. Im Stammhintergrund, in dem ReoM-His überproduziert wurde, konnte eine geringere ReoM-Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtypstamm beobachtet werden. Dies lässt sich nicht durch die beeinträchtigte Bindung von MurA N197D an ReoM erklären. Eigentlich wäre ein gegenteiliger Effekt zu erwarten gewesen: MurA N197D bindet ReoM nicht mehr, wodurch ReoM für die Interaktion mit PrkA zur Verfügung steht und phosphoryliert werden sollte. Wenn hingegen MurA N197D überproduziert wurde, fand kein Rückgang der ReoM-Phosphorylierung statt. In diesem Fall greift also der postulierte Regulationsmechanismus: MurA N197D kann nicht mit ReoM interagieren und das Protein steht für die Phosphorylierung zur Verfügung.

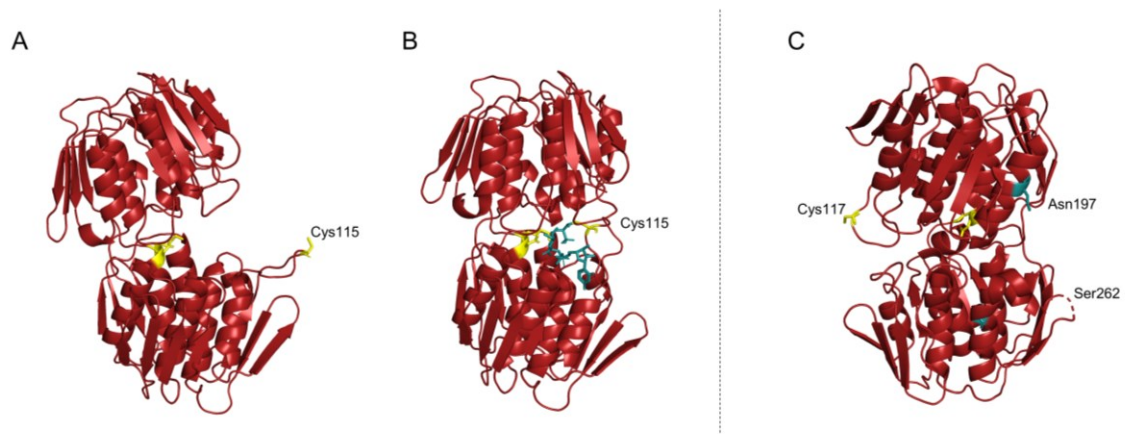
Warum die Überproduktion von ReoM-His im Stammhintergrund *murA N197D* die ReoM-Phosphorylierung verringerte, muss noch aufgeklärt werden. Die MurA-Substitution N197D scheint also nicht nur Auswirkungen auf die Interaktion mit ReoM zu haben.

#### 4.5 Die Kontrolle der ReoM-Phosphorylierung ist an die Aktivität und Substratbindung von MurA gekoppelt

Bereits in *E. faecalis* konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion zwischen IreB und MurAA *in vitro* die Substrate PEP und UDP-GlcNAc vorhanden sein müssen (Mascari *et al.*, 2023). Auch die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung durch akkumulierendes MurA in *L. monocytogenes* war abhängig von der Enzymaktivität und Substratbindung von MurA: Die Phosphorylierung von ReoM konnte nicht unterdrückt werden, wenn die MurA-Varianten MurA C117A, MurA K22V oder MurA N23A überproduziert wurden, deren Substratbindung (PEP oder GlcNAc) und Enzymaktivität beeinträchtigt waren (Kim *et al.*, 1996, Samland *et al.*, 1999, Samland *et al.*, 2001). MurA liegt ohne Bindung der Substrate in einer offenen Konformation vor, die erst durch die Bindung in eine geschlossene Konformation übergeht (vgl. Abb.: 32) (Schönbrunn *et al.*, 1996, Skarzynski *et al.*, 1996, Schönbrunn *et al.*, 1998). Im Laufe eines Reaktionszyklus findet eine dynamische Veränderung der Enzymstruktur statt, bei der PEP und UDP-GlcNAc zu einem tetrahedrischen Intermediat und abschließend zu Enolpyruvyl-UDP-N-Acetylglukosamin (EP-UDP-GlcNAc) und Phosphat (P<sub>i</sub>) umgesetzt werden (Schönbrunn *et al.*, 2000, Jackson *et al.*, 2009). Möglicherweise muss MurA in einer bestimmten Konformation vorliegen, um mit ReoM interagieren zu können. Eventuell werden so Interaktionsbereiche zugänglich. Bekannte Interaktionsstellen sind N197 und S262 (Wamp *et al.*, 2022). Betrachtet man die Proteinstruktur von *L. monocytogenes*, so könnte durch die Substratbindung und Konformationsänderung zumindest die Aminosäure N197 für die Bindung an ReoM exponiert werden (vgl. Abb.: 32). Interessant ist die Frage, ob die Substratbindung eine regulatorische Komponente darstellt. Möglicherweise ist der Abbau von MurA nur notwendig, wenn das Enzym mit Substraten versorgt ist, da sonst ohnehin keine Peptidoglykanbiosynthese stattfinden kann. Der Abbau von MurA könnte dann dazu führen, dass die zuvor gebundenen Substrate wieder freigesetzt werden

und für andere Stoffwechselwege zur Verfügung stehen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Proteolyse von MurA durch Trypsin *in vitro* beeinträchtigt ist, wenn MurA in der geschlossenen Konformation, also mit gebundenen Substraten, vorliegt (Krekel *et al.*, 1999). Inwieweit der Versuchsaufbau auch für die Proteolyse durch den ClpCP-Komplex gilt, der mit Hilfe der ATPase-Untereinheit das Protein entfaltet, ist jedoch fraglich (Horwich *et al.*, 1999).

Neben PEP und UDP-GlcNAc kann MurA aus *E. coli* auch das MurA/MurB-Reaktionsprodukt UDP-MurNAc binden und wird durch dieses enzymatisch inhibiert (Mizyed *et al.*, 2005). Die Bindung von UDP-MurNAc führt zu einer *staged conformation*, die sich durch eine Verschiebung von Enzym-Ligand-Kontakten zu Intraproteinkontakten von der geschlossenen Konformation unterscheidet (Mizyed *et al.*, 2005, Jackson *et al.*, 2009). Für die Entstehung der *staged conformation* ist das aktive Cystein (*L. monocytogenes* MurA C117) relevant. Die Aminosäure bindet PEP oder den Inhibitor Fosfomycin und ist für die katalytische Funktion von MurA essentiell. Außerdem ist C117 an der Freisetzung des MurA-Reaktionsproduktes beteiligt (Marquardt *et al.*, 1994, Kim *et al.*, 1996, Eschenburg *et al.*, 2005). Auch die getesteten MurA-Varianten K22V und N23A sind in ihrer Enzymaktivität verringert (<0,5%), während MurA C117A keine katalytische Aktivität besitzt (Kim *et al.*, 1996, Samland *et al.*, 1999, Samland *et al.*, 2001). Ob die Bindung von PEP und UDP-GlcNAc, die Bindung von UDP-MurNAc oder die enzymatische Aktivität von MurA und damit die Fähigkeit, die verschiedenen Konformationen einzunehmen und Produkte freizusetzen, für die Bindung an ReoM entscheidend ist, lässt sich aus den Daten nicht eindeutig ableiten. Dazu sind weitere Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen MurA und ReoM in Gegenwart verschiedener Substrate notwendig.



**Abbildung 32: Proteinstruktur des MurA-Monomers.**

(A) *E. coli* MurA-Monomer in der offenen Struktur (PDB: 1NAW) (Schönbrunn *et al.*, 1996).

(B) *E. coli* MurA-Monomer in der geschlossenen Struktur (PDB: 1UAE) (Skarzynski *et al.*, 1996). In Gelb sind die Aminosäuren K22, N23 und C115 markiert, die an der Substratbindung und -umsetzung beteiligt sind (Kim *et al.*, 1996, Samland *et al.*, 1999, Samland *et al.*, 2001). Die Substrate Fosfomycin und UDP-GlcNAc sind in hellblau dargestellt.

(C) *L. monocytogenes* MurA-Monomer (PDB: 3R38) (unveröffentlicht). In Gelb sind die Aminosäuren K22, N23 und C117 markiert, die an der Substratbindung und -umsetzung beteiligt sind. Hellblau markiert wurden die Aminosäuren N197 und S262, welche für die Bindung von ReoM eine Rolle spielen.

#### 4.6 Die PASTA-Domänen sind für die vollständige Aktivität der Kinase PrkA notwendig

Die Rolle der PASTA-Domänen von eSTKs bei der Aktivierung der Kinase wurde in verschiedenen Organismen untersucht. So konnte beispielsweise bei PrkC aus *B. subtilis* *in vitro* keine Aktivitätsänderung der Kinase durch das Fehlen der PASTA-Domänen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte *in vitro* auch nicht nachgewiesen werden, dass Muropeptide die Aktivität des vollständigen Proteins modulieren. *In vivo*-Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Aktivität der Kinase in der stationären Wachstumsphase von den PASTA-Domänen und der Bindung extrazellulärer Peptidoglykanfragmente abhängt (Pompeo *et al.*, 2018). Auch Untersuchungen von StkP (*S. pneumoniae*) konnten zeigen, dass die PASTA-Domänen für die Aktivität der Kinase *in vivo* notwendig sind. Außerdem korrelierte die Kinaseaktivität mit der Anzahl der PASTA-Domänen (Zucchini *et al.*, 2018). In *M. tuberculosis* führt die fehlende Bindung extrazellulärer Liganden, wie Peptidoglykanfragmente, an die PASTA-Domänen von PknB zu einer Hyperaktivierung der Kinase (Kaur *et al.*, 2019). Darüber hinaus wird die Kinaseaktivität durch andere Faktoren, wie beispielsweise die

Interaktion mit Substraten, kontrolliert (Pompeo *et al.*, 2015). Bei PrkA aus *L. monocytogenes* konnte in Abwesenheit der extrazellulären PASTA-Domänen und eines Teils der Transmembranregion eine reduzierte ReoM-Phosphorylierung beobachtet werden. Gleichzeitig blieb die intrazelluläre MurA-Menge unverändert. Die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung erfolgte also unabhängig von MurA. Darüber hinaus wurde auch weiterhin eine reduzierte Phosphorylierung beobachtet, wenn ReoM-His in der *prkAΔC*-Mutante überproduziert wurde. Beides zusammen deutet darauf hin, dass die reduzierte ReoM-Phosphorylierung in der *prkAΔC*-Mutante nicht auf ein Ungleichgewicht zwischen MurA, ReoM und PrkA zurückzuführen ist. Das Fehlen der PASTA-Domänen und eines Teils der Transmembranregion vermindert also vermutlich die Kinaseaktivität. Um die Rolle der PASTA-Domänen und der Transmembranregion für die Kinaseaktivität von PrkA besser unterscheiden zu können, sollten weitere Mutanten untersucht werden, bei denen entweder nur die PASTA-Domänen oder die PASTA-Domänen zusammen mit der gesamten Transmembrandomäne fehlen. Beispielsweise kann *B. subtilis* PrkC ohne die Transmembranregion und unabhängig von den PASTA-Domänen nicht mehr an den Zellpolen oder am Septum lokalisiert werden (Pompeo *et al.*, 2018). Im Fall von StkP verhindert allein das Fehlen der PASTA-Domänen die Lokalisierung an der Zellteilungsstelle (Beilharz *et al.*, 2012, Fleurie *et al.*, 2012). Es ist nicht geklärt, wo PrkA aus *L. monocytogenes* in der Zelle lokalisiert ist und ob die zelluläre Verortung mit der Kinaseaktivität und den PASTA-Domänen zusammenhängt. Die Position von PrkA in der Zelle könnte durch die Markierung mit einem fluoreszierenden Protein untersucht werden. Um festzustellen, ob PrkA, wie PrkC in *B. subtilis*, durch die PASTA-Domänen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase aktiviert wird, müsste man die Autophosphorylierung von PrkAΔC in verschiedenen Wachstumsphasen kontrollieren. Der indirekte Nachweis mittels ReoM-Phosphorylierung war für diesen Zweck nicht sensitiv genug ist (Daten nicht gezeigt) (Pompeo *et al.*, 2018).

#### 4.7 Lipid II ist kein Signalmolekül von PrkA

In *S. aureus* konnte *in vitro* eine Interaktion zwischen der PASTA-eSTK PknB (Stk1) und Lipid II nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde eine zelluläre Delokalisierung von PknB beobachtet, wenn die Biosynthese von Lipid II durch

Zugabe von Tunicamycin gehemmt wurde. Unter Standardlaborbedingungen befindet sich PknB an den Zellteilungsstellen. Durch das Fehlen der PASTA-Domänen verliert das Protein ebenfalls diese septale Lokalisation (Hardt *et al.*, 2017). Ähnliches wurde für PknB aus *M. tuberculosis* gezeigt (Kaur *et al.*, 2019). Außerdem soll die Bindung von Lipid II die Kinaseaktivität von PknB hemmen (Kaur *et al.*, 2019). In *L. monocytogenes* konnte durch die Depletion von MurJ2 bei gleichzeitiger Abwesenheit der zweiten Flippase MurJ1 keine Änderung der ReoM-Phosphorylierung festgestellt werden. Aufgrund der reduzierten MurJ-Synthese sollte weniger Lipid II über die Membran transportiert werden und sich somit im extrazellulären Bereich befinden. Daraus kann geschlossen werden, dass das extrazelluläre Lipid II PrkA nicht aktiviert, da sonst eine Abnahme der ReoM-Phosphorylierung zu beobachten gewesen wäre. Ob Lipid II eine inhibitorische Funktion wie bei *M. tuberculosis* besitzt, kann aus dem Experiment nicht abgeleitet werden. Kontrollversuche konnten zeigen, dass die Depletion von MurJ eine 4-fach geringere Lysozymresistenz verursacht, die auf einen Zellwanddefekt schließen lässt (Rothe *et al.*, 2024). Die Komplementation von MurJ führte wiederum zu einer Lysozymresistenz auf Wildtypniveau (Rothe *et al.*, 2024). Um feststellen zu können, ob extrazelluläres Lipid II die Aktivität von PrkA reduziert, bräuchte man eine Mutante, die größere Mengen Lipid II über die Membran transportieren kann als der Wildtypstamm und die dementsprechend auch eine höhere Lysozymresistenz aufweist als der Wildtypstamm.

Bei diesen Ergebnissen ist jedoch auch zu berücksichtigen, dass ein anderer Stammhintergrund verwendet wurde. Im Stamm 10304S ist PrkA nicht essentiell, was bedeuten könnte, dass die Regulation der Peptidoglykanbiosynthese durch PrkA, ReoM und MurA anders verläuft als in EGD-e (Kelliher *et al.*, 2021). Zur Validierung der Ergebnisse sollte zusätzlich die Menge an extrazellulärem Lipid II bestimmt werden. Man könnte beispielsweise mittels HADA- (3-[[[(7-Hydroxy-2-oxo-2H-1-Benzopyran-3-yl)Carbonyl]Amino]-D-Alanin-Hydrochlorid-]) Färbung die Peptidoglykanproduktion quantifizieren, die von der Verfügbarkeit des Vorläufermoleküls Lipid II abhängig ist (Kuru *et al.*, 2012). Aber auch die Resistenz gegenüber zellwandschädigenden Antibiotika könnte indirekt Aufschluss über die Intensität der Peptidoglykanbiosynthese und die Verfügbarkeit von extrazellulärem Lipid II geben.

#### 4.8 Die Störung der Zellteilung oder der Zellverlängerung hat keine Auswirkung auf die Phosphorylierung von ReoM

Die Verortung der PASTA-eSTKs an den Zellteilungsstellen sowie Phosphorylierungssubstrate, die mit dem Divisom oder Elongasom assoziiert sind, deuten darauf hin, dass die Regulation der Peptidoglykanbiosynthese in Koordination mit dem Zellzyklus stattfindet (Kang *et al.*, 2005, Thakur & Chakraborti, 2006, Sun *et al.*, 2010, Pompeo *et al.*, 2015, Hardt *et al.*, 2017, Pompeo *et al.*, 2018, Kaur *et al.*, 2019, Sun *et al.*, 2023).

Die Transglykosylasen FtsW1 und das PBPB2 werden für die Zellteilung benötigt (Rismondo *et al.*, 2015, Rismondo *et al.*, 2019). RodA1 und PBPB1 hingegen sind für das laterale Zellwachstum verantwortlich (Rismondo *et al.*, 2015, Rismondo *et al.*, 2019, Liu *et al.*, 2021). Das Genom von *L. monocytogenes* 10403S codiert drei *rodA* Homologe und zwei *ftsW* Homologe, wobei sich *ftsW1* als essentiell herausgestellt hat (Rismondo *et al.*, 2019). Weiterhin ist die Anwesenheit von RodA1 allein ausreichend, um die Zellform von *L. monocytogenes* zu erhalten (Rismondo *et al.*, 2019). Die Depletion dieser wichtigen Transglykosylasen und Penicillin-bindenden Proteine der Zellteilung und Zellverlängerung führte nicht zur Veränderung der ReoM-Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp. Daraus kann geschlossen werden, dass die Enzyme bei der Regulation der Peptidoglykanbiosynthese durch ReoM keine Rolle spielen. Dieses Ergebnis wird auch dadurch gestützt, dass selbst das Fehlen anderer, nicht essentieller Proteine des Divisoms (DivIVA, PBPA1, SepF, ZapA, MinCD, MinC, MinJ), das zum Teil zu schweren Störungen im Ablauf der Zellteilung führt, keinen Einfluss auf die ReoM-Phosphorylierung zeigte. Die Ergebnisse passen zu Beobachtungen in *B. subtilis*, wo die PASTA-eSTK PrkC u. a. eine Rolle in anderen Prozessen, wie der Biofilm- und Sporenbildung zugeordnet wird (Gaidenko *et al.*, 2002, Madec *et al.*, 2002, Shah *et al.*, 2008).

#### 4.9 GpsB ist ein Aktivator von PrkA

Bereits in *E. faecalis* und *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass GpsB die Aktivität der korrespondierenden PASTA-eSTK erhöht (Pompeo *et al.*, 2015, Pompeo *et al.*, 2018, Minton *et al.*, 2022, VanZeeland *et al.*, 2023). Dies geschieht in *B. subtilis* allerdings nur während des Zellwachstums. In der

stationären Wachstumsphase soll die Aktivität der PASTA-eSTK durch extrazelluläre Peptidoglykanfragmente stimuliert werden (Pompeo *et al.*, 2018). In *E. faecalis* wurde postuliert, dass IreK nicht nur durch extrazelluläre Signale aktiviert wird, sondern, dass ein weiterer Signalgeber die Aktivität der Kinase in Bezug auf Zellwachstum und Zellteilung steuert (Labbe & Kristich, 2017). In *S. pneumoniae* weisen GpsB und die PASTA-eSTK StkP verschiedene Lokalisierungsmuster auf, die sich aber in jedem Stadium des Zellzyklus überschneiden (Tsui *et al.*, 2014, Rued *et al.*, 2017). In *L. monocytogenes* reduzierte die Abwesenheit von GpsB die Phosphorylierung von ReoM. Die Abnahme der ReoM-Phosphorylierung in der  $\Delta$ *gpsB*-Mutante konnte beobachtet werden, wenn keine Anreicherung von MurA durch die artifizielle Überproduktion des Proteins oder die Störung der Proteolyse von MurA erfolgte. Selbst wenn ReoM-His in der  $\Delta$ *gpsB*-Mutante überproduziert wurde, konnte die Verminderung der ReoM-Phosphorylierung noch nachgewiesen werden. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen MurA, ReoM und PrkA ist also vermutlich nicht die Ursache für die verminderte ReoM-Phosphorylierung. Daher ist anzunehmen, dass GpsB für die vollständige PrkA-Aktivität notwendig ist. Die zusätzliche Deletion von *prpC*, also das Fehlen der Phosphatase, ergab, dass PrkA auch ohne GpsB eine Restaktivität aufweist, da in diesem Stammhintergrund wieder phosphoryliertes ReoM nachweisbar war. Außerdem war es nicht möglich *prkA* $\Delta$ C- und  $\Delta$ *gpsB*-Deletionen zu kombinieren (Daten nicht gezeigt), da die Aktivität von PrkA $\Delta$ C bei gleichzeitigem Fehlen von GpsB vermutlich so stark reduziert wird, dass sie mit dem Fehlen von PrkA gleichgesetzt werden kann.

Die Hypothese, dass GpsB die PASTA-eSTK PrkA aktiviert, wird dadurch unterstützt, dass die  $\Delta$ *gpsB*-Mutante und die *prkA* $\Delta$ C-Mutante ähnliche Phänotypen ausbildeten. Die Reduktion der ReoM-Phosphorylierung durch das Fehlen von GpsB war stärker als durch das Fehlen der PASTA-Domänen von PrkA, weshalb die  $\Delta$ *gpsB*-Mutante vermutlich auch stärkere Phänotypen als die *prkA* $\Delta$ C-Mutante aufwies. Beide Stämme, also die *prkA* $\Delta$ C-Mutante und die  $\Delta$ *gpsB*-Mutante zeigten kein Wachstum bei 42 °C. Bei dieser erhöhten Wachstumstemperatur wird die ClpCP-Protease verstärkt synthetisiert (Rouquette *et al.*, 1996, Nair *et al.*, 2000). Da gleichzeitig die ReoM-Phosphorylierung in beiden Mutanten reduziert ist, findet vermutlich eine deutlich

gesteigerte MurA-Proteolyse statt, die kein Wachstum mehr erlaubt. Dies erklärt auch, warum die Suppressoren der  $\Delta gpsB$ -Mutante bei 42 °C Mutationen akkumulierten, die den Abbau von MurA verringerten oder inhibierten (Rismondo *et al.*, 2016a, Wamp *et al.*, 2020, Wamp *et al.*, 2022). Auch die geringere Ceftriaxonresistenz der  $prkA\Delta C$ -Mutante und  $\Delta gpsB$ -Mutante lässt sich durch eine gesteigerte MurA-Proteolyse in Folge der verringerten ReoM-Phosphorylierung erklären. Der Abbau von MurA führt vermutlich zu einer verminderten Peptidoglykanbiosynthese, wodurch Zellwandschäden nicht mehr ausgeglichen werden können. Darüber hinaus sollte nicht unerwähnt bleiben, dass das Fehlen von GpsB die Aktivität von PBPA1 stört (Rismondo *et al.*, 2016b). Auch dadurch können möglicherweise negative Auswirkungen auf das Wachstum und die Ceftriaxonresistenz der  $\Delta gpsB$ -Mutante entstanden sein.

Die  $prkA\Delta C$ -Mutante und die  $\Delta gpsB$ -Mutante waren außerdem resistenter gegenüber Lysozym als der Wildtypstamm. Die Resistenz der  $\Delta gpsB$ -Mutante gegenüber Lysozym wird auf eine Interaktion des Proteins mit PBPA1 und der Peptidoglykan-*N*-Deacetylase PgdA zurückgeführt. Der Proteinkomplex moduliert die Aktivität von PgdA (Rismondo *et al.*, 2018). Es ist nicht bekannt, ob PrkA eine Rolle in diesem Proteinnetzwerk spielt. Die Ergebnisse, die auch eine erhöhte Lysozymresistenz der  $prkA\Delta C$ -Mutante zeigten, deuten darauf hin. Möglicherweise führt aber auch die verringerte Peptidoglykanbiosynthese der  $prkA\Delta C$ -Mutante bei gleichbleibender PgdA-Menge dazu, dass sich das Verhältnis zwischen Substrat (Peptidoglykan) und PgdA zugunsten von PgdA verschiebt. Dadurch wird möglicherweise der Anteil an *N*-deacetyliertem Peptidoglykan erhöht und als Folge die Lysozymresistenz gesteigert.

Die alleinige Deletion von *gpsB* führt zu Wachstums-, Zellteilungs- und Zellwanddefekten. Die Zellen der  $\Delta gpsB$ -Mutante sind dadurch geringfügig länger als Wildtypzellen (Rismondo *et al.*, 2016b). Auch Zellen der  $\Delta divIVA$ -Mutante weisen einen Zellteilungsdefekt auf, der auf eine gestörte Exkretion von Autolysinen und eine Fehlregulation der Zellteilung zurückzuführen ist (Halbedel *et al.*, 2012, Kaval *et al.*, 2014). Die gleichzeitige Deletion beider Gene (*divIVA* und *gpsB*) verstärkte diesen Zellteilungsdefekt und führte zu signifikant verlängerten Zellen. Daraus wurde geschlossen, dass sich die Funktionen von GpsB und DivIVA bei der Zellteilung überschneiden (Rismondo *et al.*, 2016b). Da

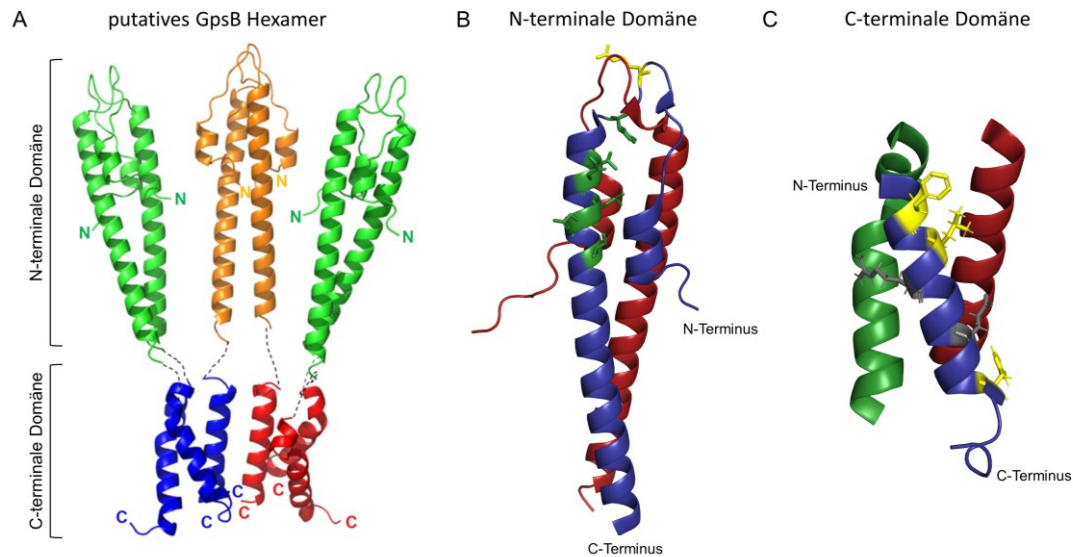
auch bei der Kombination der *prkAΔC*- und *ΔdivIVA*-Deletionen eine signifikante Zellverlängerung im Vergleich zu den Einzeldelentionsmutanten beobachtet wurde, könnte PrkA ebenfalls in den Prozess der Zellteilung involviert sein. Ob es sich dabei um eine strukturelle oder regulatorische Funktion von PrkA handelt, muss noch geklärt werden. In *S. pneumoniae* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass GpsB notwendig für die Phosphorylierung von StkP-Substraten wie DivIVA ist. Dadurch ist StkP Teil der Regulation der ellipsoiden Pneumokokkenzellform (Fleurie *et al.*, 2014).

4.10 Für die Aktivierung von PrkA muss GpsB in der Lage sein, eine Hexamerstruktur zu bilden

Für GpsB sind bisher nur Interaktionspartner identifiziert worden, die sich innerhalb der Zytoplasmamembran befinden oder daran gebunden sind (Halbedel & Lewis, 2019). Diese Interaktionen werden durch die N-terminale Domäne von GpsB vermittelt, die auch für die Membranbindung von GpsB notwendig ist (vgl. Abb.: 33) (Cleverley *et al.*, 2016, Rismondo *et al.*, 2016b, Cleverley *et al.*, 2019). GpsB-Varianten, die in ihrer Interaktion mit der Zytoplasmamembran oder PBPA1 beeinträchtigt sind, weisen ein Wachstumsdefizit auf (vgl. Abb.: 33 A & B) (Rismondo *et al.*, 2016b). Dieses ist jedoch nicht auf eine verringerte PrkA-Aktivität zurückzuführen, da in Stämmen, die diese GpsB-Varianten synthetisierten, keine Verringerung der ReoM-Phosphorylierung beobachtet wurde. Die Ursache des Wachstumsdefizits ist vermutlich auf eine Aktivitätsänderung von PBPA1 durch die Störung der Interaktion mit GpsB zurückzuführen (Rismondo *et al.*, 2016b). Der N-Terminus von GpsB ist also wahrscheinlich nicht an der Interaktion mit PrkA beteiligt, und auch die Membranbindung scheint nicht relevant für die Aktivierung von PrkA zu sein. Darüber hinaus wurde GpsB als Phosphorylierungsziel von PASTA-eSTKs beschrieben. In *E. faecalis* wurden acht mögliche Phosphorylierungsstellen von GpsB identifiziert (Iannetta *et al.*, 2021). Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von GpsB, IreK zu aktivieren, durch die Phosphorylierung der Aminosäuren S80 und T84 beeinträchtigt wird (VanZeeland *et al.*, 2023). Auch in GpsB aus *B. subtilis* wurde eine Aminosäure (T75) identifiziert, durch deren Phosphorylierung die PrkC-Kinaseaktivität reduziert wird (Pompeo *et al.*, 2015). Wurde in *L. monocytogenes* die äquivalente Aminosäure (T88) durch eine

Aminosäure ersetzt, die eine Phosphorylierung imitiert (T88D), so wurde GpsB fast vollständig inaktiviert, was sich durch ein vermindertes Wachstum zeigte (Cleverley *et al.*, 2016). Diese GpsB-Substitution führte auch zu einer sehr geringen Reduktion der ReoM-Phosphorylierung. Es könnte also sein, dass auch GpsB T88D die Aktivität von PrkA verringert. Die phosphoablative Variante (GpsB T88A) zeigte dagegen wie in *B. subtilis* keinen Phänotyp (Pompeo *et al.*, 2015, Cleverley *et al.*, 2016).

Alle C-terminalen Substitutionen in GpsB (*L. monocytogenes*), die für die Hexamerbildung notwendig sind, führten zu einem Wachstumsdefizit, das dem der *gpsB*-Deletion entsprach (vgl. Abb.: 33 C) (Cleverley *et al.*, 2016, Rismondo *et al.*, 2016b). Diese Substitutionen beeinträchtigten auch die ReoM-Phosphorylierung. Es ist daher anzunehmen, dass die Oligomerisierung von GpsB zu einem Hexamer für die Aktivierung von PrkA notwendig ist. Möglicherweise interagieren die beiden Proteine auch mittels der C-terminalen Domäne von GpsB. Interessant ist, dass das Fehlen des GpsB-Analog DivIVA keine Verringerung der ReoM-Phosphorylierung verursachte. Die Proteine GpsB und DivIVA ähneln sich in ihrer Struktur und vor allem die N-terminale Domäne ist konserviert (Rismondo *et al.*, 2016b). Im Vergleich zum C-Terminus von DivIVA ist die C-terminale Domäne von GpsB jedoch verkürzt (Rismondo *et al.*, 2016b). Bei DivIVA vermittelt die C-terminale Domäne Interaktionen mit zytosolischen Proteinen (van Baarle *et al.*, 2013, Halbedel & Lewis, 2019). Die strukturell unterschiedlichen C-Termini von GpsB und DivIVA könnten also erklären, warum DivIVA die Phosphorylierung von ReoM nicht beeinflusst.



**Abbildung 33: Proteinstruktur von GpsB aus *B. subtilis*.**

(A) Putatives GpsB Hexamer (Cleverley *et al.*, 2016).

(B) GpsB N-Terminus als Dimer (PDB:4UG3) (Rismondo *et al.*, 2016b). In Gelb sind Aminosäuren markiert, die die Membranbindung vermitteln: R23 (R25). Grün markiert sind Aminosäuren, die die Interaktion mit PBPA1 vermitteln: Y25 (Y27), V30 (V32), D31 (D33), L34 (L36), D35 (D37), I38 (I40). In Klammern sind die korrespondierenden Aminosäuren aus *L. monocytogenes* vermerkt.

(C) GpsB C-Terminus als Trimer (PDB: 5AN5) (Rismondo *et al.*, 2016b). Aminosäuren, die die Oligomerisierung vermitteln sind farblich markiert. In Gelb: F78 (F91), L81 (L94), F92 (F105). In Grau: R83 (R96), E88 (E101) (Cleverley *et al.*, 2016, Rismondo *et al.*, 2016b). In Klammern sind die korrespondierenden Aminosäuren aus *L. monocytogenes* vermerkt.

#### 4.11 Die Wachstumsphasenabhängige Reduktion der PG-Biosynthese wird von PrpC kontrolliert

In *E. faecalis* konnte bereits gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der PASTA-eSTK IreK und des ReoM-Homologs IreB in der stationären Phase abnimmt (Labbe & Kristich, 2017). Eine vermutlich damit verbundene Abnahme der intrazellulären MurAA-Menge in der stationären Wachstumsphase wurde etwas später nachgewiesen (Mascari *et al.*, 2023). Diese Ergebnisse konnten in *L. monocytogenes* bestätigt werden. In der späten stationären Wachstumsphase wurde ebenfalls eine Abnahme der ReoM-Phosphorylierung beobachtet, die mit einem Abbau von MurA einherging. Dagegen spielte die Wachstumstemperatur für die Phosphorylierung von ReoM keine Rolle, obwohl die Synthese von ClpCP temperaturabhängig reguliert wird. (Rouquette *et al.*, 1996, Nair *et al.*, 2000). Neu ist, dass diese Abnahme der ReoM-Phosphorylierung in der stationären Phase PrpC-abhängig ist, da sie nach der Depletion von PrpC nicht mehr

nachweisbar war. Möglicherweise reagiert das Regulationssystem damit auf einen Nährstoffmangel, der bei hoher Zelldichte auftreten kann. Als Folge wird die Aktivität oder Synthese von PrpC erhöht, um den Abbau von MurA zu steigern. Dadurch wird die Peptidoglykanbiosynthese gedrosselt und Energie und Ressourcen gespart. Gleichzeitig werden auch das Zellwachstum und die Zellvermehrung reduziert. Um festzustellen, ob Nährstoffmangel ein Signalgeber ist, könnte die ReoM-Phosphorylierung in Stämmen untersucht werden, die in einem definierten Minimalmedium kultiviert wurden. Bezüglich der Synthese von PrpC ist bisher nur bekannt, dass in *B. subtilis* die Expression von *prpC* während der exponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase konstant ist (Obuchowski *et al.*, 2000). Untersuchungen zur Expression von *prpC* in *L. monocytogenes* könnten Aufschluss darüber geben, ob die Regulation an die Aktivität oder an die Proteinmenge von PrpC gekoppelt ist. Zusätzlich lässt sich nicht ausschließen, dass auch die Aktivität der PASTA-eSTK PrkA in der stationären Wachstumsphase reduziert ist. Um dies ermitteln zu können, ist eine andere Methode notwendig. In Frage käme beispielsweise die direkte Analyse der Autophosphorylierung von PrkA mittels Phospho-*tag* SDS-Gel, die auch bei *E. faecalis* verwendet wurde (Labbe & Kristich, 2017).

Interessant ist auch, dass die intermediäre Phosphorylierungsform von ReoM in allen Wachstumsstadien abnimmt, wenn PrpC depletiert ist. Hierbei könnte es sich eine weitere Komponente der Regulation handeln, die es zu untersuchen gilt.

#### 4.12 ReoM steuert primär den Abbau von MurA

Die Proteomdaten geben einen Hinweis darauf, welche zytoplasmatischen Proteine in den Stämmen LMSW30 ( $\Delta$ *reoM*) und LMJR138 ( $\Delta$ *c/pC*) in der logarithmischen Wachstumsphase im Vergleich zum Wildtypstamm angereichert sind oder *de novo* synthetisiert wurden. Der Nachweis einer signifikanten Akkumulation von MurA in beiden Stämmen ist ein guter Hinweis darauf, dass das Experiment trotz der hohen Empfindlichkeit der Methode und der damit verbundenen hohen Fehlerquote korrekte Daten liefern konnte. Allerdings konnte in beiden Stämmen nur eine ca. 2-fache Anreicherung von MurA nachgewiesen werden, während Analysen mittels Westernblot und Immundektion eine mindestens 5-fache Anreicherung im Vergleich zum Wildtyp zeigten (Wamp *et*

*al.*, 2020). Insgesamt wurden nur wenige Proteine identifiziert, die sowohl in der  $\Delta$ reoM- als auch in der  $\Delta$ clpC-Mutante angereichert waren oder *de novo* synthetisiert wurden. Davon lassen einige, wie CmoJ und FlgC, keinen direkten Bezug zur Peptidoglykanbiosynthese erkennen. Auffallend war aber die starke Anreicherung von FlgC, allerdings mit großen Unterschieden in der Intensität zwischen den Replikaten. Es könnte ein erster Eindruck gewonnen werden, ob die Geißelbildung in den Mutanten verändert ist, indem die Zellmotilität untersucht wird.

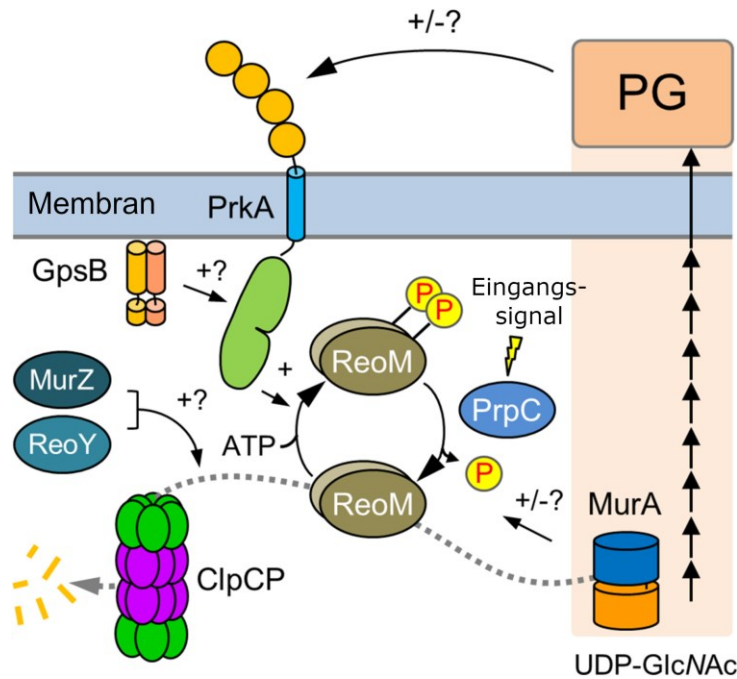
In beiden Stämmen akkumulierte außerdem die Endopeptidase CwhA (p60). Ein zweites Peptidoglykan-lytisches Protein, Lmo2504, konnte zusätzlich in beiden Stämmen *de novo* nachgewiesen werden. Das Gen von Lmo2504 befindet sich in *L. monocytogenes* direkt hinter *spl* (p45). p45 besitzt strukturelle Ähnlichkeit zu p60, weshalb dem Protein ebenfalls eine Endopeptidasefunktion zugeschrieben wird (Schubert *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu weist Lmo2504 nur eine geringe Sequenzidentität mit p45 und p60 auf (26,63 % und 17,46 % CLUSTAL O (1.2.4) *multiple sequence alignment*). Die lytische Aktivität von Lmo2504 muss also noch experimentell verifiziert werden. Bekannt ist bisher nur, dass das Protein zur Biofilmbildung beiträgt (Lourenço *et al.*, 2013). Auch die Akkumulation beider Proteine, p45 und p60, in  $\Delta$ reoM- und  $\Delta$ clpC-Mutanten müsste noch experimentell bestätigt werden. In *M. tuberculosis* konnte bereits ein Zusammenhang zwischen einem Peptidoglykan-lytischen Protein und der Regulation der Peptidoglykanbiosynthese erbracht werden: Die Amidase CwhM wird durch die PASTA-eSTK PknB phosphoryliert und aktiviert daraufhin allosterisch MurA (Boutte *et al.*, 2016, Turapov *et al.*, 2018).

Auffallend war auch, dass ReoY in der  $\Delta$ clpC-Mutante um das 8-fache und statistisch signifikant angereichert war. Die Herstellung eines Antiserums gegen ReoY ermöglichte die Verifizierung der Akkumulation des Proteins in diesem Stamm. Es wird vermutet, dass ReoY als Adapterprotein von ClpC fungiert, da bereits in BACTH-Experimenten eine Interaktion mit dieser ATPase nachgewiesen wurde (Wamp *et al.*, 2020). Die Proteomdaten unterstützen damit die Idee, dass ReoY ein Adapterprotein von ClpC ist und erweitern sie, indem sie zeigen, dass ReoY auch von ClpCP abgebaut wird. Für die Erkennung von Substraten durch Proteasekomplexe gibt es verschiedene Sequenzen, die

sowohl in der N-terminalen als auch in der C-terminalen Region oder einem internen Bereich des Substrats lokalisiert sein können (Flynn *et al.*, 2003, Kirstein *et al.*, 2009). Das Adapterprotein von ClpC in *B. subtilis*, MecA, besitzt beispielsweise zwei Domänen: Die N-terminale Domäne interagiert mit dem zu proteolysierenden Substrat während die C-terminale Domäne einen Komplex mit ClpC bildet und die ATPase aktiviert (Persuh *et al.*, 1999). Wie ReoY wird auch MecA durch ClpCP abgebaut. Mittels Größenausschlusschromatographie konnten stabile MecA-ClpC-Komplexe identifiziert werden (Kirstein *et al.*, 2006). Möglicherweise können solche direkten Interaktionen auch zwischen ReoY und ClpC nachgewiesen werden. Allerdings ähnelt die Aminosäuresequenz von ReoY der von MecA kaum (22,39 % CLUSTAL O (1.2.4) *multiple sequence alignment*), so dass auch ein anderer Mechanismus zugrunde liegen könnte.

Im Großen und Ganzen fehlen noch Folgeexperimente, die die Proteomdaten verifizieren und erweitern. Die Tatsache, dass insgesamt sehr wenige Überschneidungen zwischen der  $\Delta reoM$ - und  $\Delta clpC$ -Mutante gefunden wurden, lässt die vorsichtige Vermutung zu, dass ReoM vor allem als Regulator der MurA-Degradation wirkt.

Unterstützt wird diese Annahme auch dadurch, dass die Phosphorylierung von ReoM von der Interaktion des Proteins mit MurA abhängt (vgl. Abschn.: 3.2.4). Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit weitere Faktoren identifiziert werden, die die Phosphorylierung von ReoM beeinflussen. Diese Erkenntnisse tragen auch zum Verständnis der Funktionsweise des Regulationsweges bei. Zur Veranschaulichung sind diese und weitere Ergebnisse der Arbeit, sowie die daraus gezogenen Schlüsse in der folgenden Abbildung (Abb.: 34) zusammengefasst.



**Abbildung 34: Modell zur Kontrolle des Abbaus von MurA durch die PrkA-abhängige Phosphorylierung von ReoM (Rothe *et al.*, 2024 (angepasst)).**

Das ReoM-Dimer wird durch die PASTA-eSTK PrkA phosphoryliert. Dadurch wird die Interaktion von ReoM mit MurA gestört und der Abbau von MurA verhindert (Wamp *et al.*, 2020). Für eine Phosphorylierung von ReoM auf Wildtypniveau ist das als Hexamer vorliegende Zellteilungspotein GpsB notwendig, welches vermutlich die Kinase PrkA aktiviert (diese Arbeit). Die Phosphorylierung von ReoM wird durch die Phosphatase PrpC entfernt (Wamp *et al.*, 2020). Nicht-phosphoryliertes ReoM ist in der Lage mit MurA zu interagieren und leitet den Abbau von MurA durch den Proteasekomplex ClpCP ein, wodurch die Peptidoglykanbiosynthese verringert wird (Wamp *et al.*, 2020). Eine Reduktion der ReoM-Phosphorylierung findet unter Laborbedingungen in der stationären Wachstumsphase statt (diese Arbeit). Dazu ist die Anwesenheit der Phosphatase PrpC notwendig, deren Aktivität sich möglicherweise als Antwort auf noch unbekannte Signale in der stationären Wachstumsphase erhöht (diese Arbeit). Auch eine intrazelluläre Anreicherung von MurA reduziert die ReoM-Phosphorylierung (diese Arbeit). Dazu muss MurA mit ReoM interagieren können, die Substrate UDP-GlcNAc und PEP binden können und katalytisch aktiv sein (diese Arbeit). Es handelt sich hierbei vermutlich um einen Kontrollmechanismus, der auf einem Mengengleichgewicht zwischen ReoM und MurA beruht und dafür sorgt, dass unvorteilhaft hohe MurA-Mengen abgebaut werden. Dafür spricht auch, dass in diesem Zusammenhang keine Anpassung der Kinaseaktivität von PrkA durch extrazelluläre Signalmoleküle wie Lipid II nachgewiesen werden konnte (diese Arbeit). An der Degradation von MurA sind neben ReoM auch ReoY und MurZ beteiligt (Rismondo *et al.*, 2016a, Wamp *et al.*, 2020). ReoY wird durch die ClpCP-Protease abgebaut und könnte als Adapterprotein von ClpC fungieren (Wamp *et al.*, 2020, diese Arbeit). Weiterhin offene Fragen sind mit einem „?“ gekennzeichnet.

## Literaturverzeichnis

- Abrams, A. (1958) O-acetyl groups in the cell wall of *Streptococcus faecalis* J. Biol. Chem. **230**: 949-959.
- Adam, A., Petit, J.F., Wietzerbin-Falszpan, J., Sinay, P., Thomas, D.W., and Lederer, E. (1969) L'acide N-glycolyl-muramique, constituant des parois de *Mycobacterium smegmatis*: Identification par spectrometrie de masse. FEBS Lett. **4**: 87-92.
- Adam, M., Fraipont, C., Rhazi, N., Nguyen-Distèche, M., Lakaye, B., Frère, J.M., Devreese, B., van Beeumen, J., van Heijenoort, Y., van Heijenoort, J., and Ghuysen, J.M. (1997) The bimodular G57-V577 polypeptide chain of the class B penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* catalyzes peptide bond formation from thioesters and does not catalyze glycan chain polymerization from the lipid II intermediate. J. Bacteriol. **179**: 6005-6009.
- Addinall, S.G., Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1996) FtsZ ring formation in *fts* mutants. J. Bacteriol. **178**: 3877-3884.
- Adler, H.I., Fisher, W.D., Cohen, A., and Hardigree, A.A. (1967) Miniature *Escherichia coli* cells deficient in DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences **57**: 321-326.
- Araki, Y., Nakatani, T., Hayashi, H., and Ito, E. (1971) Occurrence of non-N-substituted glucosamine residues in lysozyme-resistant peptidoglycan from *Bacillus cereus* cell walls. Biochem. Biophys. Res. Commun. **42**: 691-697.
- Armstrong, J., Baddiley, J., Buchanan, J., Carss, B., and Greenberg, G. (1958) Isolation and structure of ribitol phosphate derivatives (teichoic acids) from bacterial cell walls. Journal of the Chemical Society (Resumed): 4344-4354.
- Armstrong, J.J., Baddiley, J., Buchanan, J.G., Davison, A.L., Kelemen, M.V., and Neuhaus, F.C. (1959) Teichoic acids from bacterial walls: Composition of teichoic acids from a number of bacterial walls. Nature **184**: 247-248.
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Débarbouillé, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 6887-6891.
- Arslan, F., Meynet, E., Sunbul, M., Sipahi, O.R., Kurtaran, B., Kaya, S., Inkaya, A.C., Pagliano, P., Sengoz, G., Batirel, A., Kayaaslan, B., Yıldız, O., Güven, T., Türker, N., Midi, İ., Parlak, E., Tosun, S., Erol, S., Inan, A., Oztoprak, N., Balkan, I., Aksoy, Y., Ceylan, B., Yilmaz, M., and Mert, A. (2015) The clinical features, diagnosis, treatment, and prognosis of neuroinvasive listeriosis: a multinational study. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **34**: 1213-1221.
- Arthur, M., Molinas, C., and Courvalin, P. (1992) The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. J. Bacteriol. **174**: 2582-2591.
- Atsushi, M., Soon-Kwang, H., Hiroshi, I., Sueharu, H., and Teruhiko, B. (1994) Phosphorylation of the AfsR protein involved in secondary metabolism in *Streptomyces* species by a eukaryotic-type protein kinase. Gene **146**: 47-56.
- Aubry, C., Goulard, C., Nahori, M.-A., Cayet, N., Decalf, J., Sachse, M., Boneca, I.G., Cossart, P., and Dussurget, O. (2011) OatA, a peptidoglycan O-

- acetyltransferase involved in *Listeria monocytogenes* immune escape, is critical for virulence. *The Journal of Infectious Diseases* **204**: 731-740.
- van Baarle, S., Celik, I.N., Kaval, K.G., Bramkamp, M., Hamoen, L.W., and Halbedel, S. (2013) Protein-Protein interaction domains of *Bacillus subtilis* DivIVA. *J. Bacteriol.* **195**: 1012-1021.
- Bachmann, B.J. (1983) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiological Reviews* **47**: 180-230.
- Badet-Denisot, M.-A., Fernandez-Herrero, L.A., Berenguer, J., Ooi, T., and Badet, B. (1997) Characterization of L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amidotransferase from an extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **337**: 129-136.
- Badet, B., Vermoote, P., Haumont, P.Y., Lederer, F., and Le Goffic, F. (1987) Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry* **26**: 1940-1948.
- Badet, B., Vermoote, P., and Le Goffic, F. (1988) Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by N3-fumaroyl-L-2, 3-diaminopropionic derivatives. *Biochemistry* **27**: 2282-2287.
- Bakardjiev, A.I., Theriot, J.A., and Portnoy, D.A. (2006) *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. *PLoS Path.* **2**: e66.
- Balogh, D., Eckel, K., Fetzer, C., and Sieber, S.A. (2022) *Listeria monocytogenes* utilizes the ClpP1/2 proteolytic machinery for fine-tuned substrate degradation at elevated temperatures. *RSC Chemical Biology* **3**: 955-971.
- Banla, I.L., Kommineni, S., Hayward, M., Rodrigues, M., Palmer, K.L., Salzman, N.H., and Kristich, C.J. (2017) Modulators of *Enterococcus faecalis* cell envelope integrity and antimicrobial resistance influence stable colonization of the mammalian gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **86**: 10.1128/iai.00381-00317.
- Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., and Blanot, D. (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 168-207.
- Barthe, P., Mukamolova, G.V., Roumestand, C., and Cohen-Gonsaud, M. (2010) The structure of PknB extracellular PASTA domain from *Mycobacterium tuberculosis* suggests a ligand-dependent kinase activation. *Structure* **18**: 606-615.
- Battesti, A., and Gottesman, S. (2013) Roles of adaptor proteins in regulation of bacterial proteolysis. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**: 140-147.
- Bécavin, C., Bouchier, C., Lechat, P., Archambaud, C., Creno, S., Gouin, E., Wu, Z., Kühbacher, A., Brisse, S., Pucciarelli, M.G., García-del Portillo, F., Hain, T., Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Lecuit, M., Pizarro-Cerdá, J., Moszer, I., Bierne, H., and Cossart, P. (2014) Comparison of widely used *Listeria monocytogenes* strains EGD, 10403S, and EGD-e highlights genomic differences underlying variations in pathogenicity. *mBio* **5**: 10.1128/mbio.00969-00914.
- Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., and Veening, J.-W. (2012) Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: E905-E913.
- Bendezú, F.O., Hale, C.A., Bernhardt, T.G., and de Boer, P.A.J. (2009) RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. *The EMBO Journal* **28**: 193-204-204.

- Benson, T.E., Marquardt, J.L., Marquardt, A.C., Etzkorn, F.A., and Walsh, C.T. (1993) Overexpression, purification, and mechanistic study of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase. *Biochemistry* **32**: 2024-2030.
- Bera, A., Biswas, R., Herbert, S., and Götz, F. (2006) The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infect. Immun.* **74**: 4598-4604.
- Bi, E., and Lutkenhaus, J. (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161-164.
- Birk, M.S., Ahmed-Begrich, R., Tran, S., Elsholz, A.K.W., Frese, C.K., and Charpentier, E. (2021) Time-resolved proteome analysis of *Listeria monocytogenes* during infection reveals the role of the AAA+ chaperone ClpC for host cell adaptation. *mSystems* **6**: 10.1128/msystems.00215-00221.
- Birmingham, C.L., Canadien, V., Kaniuk, N.A., Steinberg, B.E., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2008) Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature* **451**: 350-354.
- Boneca, I.G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.-A., Sousa, S., Lecuit, M., Psylinakis, E., Bouriotis, V., Hugot, J.-P., Giovannini, M., Coyle, A., Bertin, J., Namane, A., Rousselle, J.-C., Cayet, N., Prévost, M.-C., Balloy, V., Chignard, M., Philpott, D.J., Cossart, P., and Girardin, S.E. (2007) A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 997-1002.
- Born, P., Breukink, E., and Vollmer, W. (2006) *In vitro* synthesis of cross-linked murein and its attachment to sacculi by PBP1A from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**: 26985-26993.
- Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D.H., and Mengin-Lecreux, D. (2007) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 208-233.
- Boutte, C.C., Baer, C.E., Papavinasasundaram, K., Liu, W., Chase, M.R., Meniche, X., Fortune, S.M., Sassetti, C.M., Ioerger, T.R., and Rubin, E.J. (2016) A cytoplasmic peptidoglycan amidase homologue controls mycobacterial cell wall synthesis. *eLife* **5**: e14590.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bramkamp, M., Emmins, R., Weston, L., Donovan, C., Daniel, R.A., and Errington, J. (2008) A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol. Microbiol.* **70**: 1556-1569.
- Brandish, P.E., Kimura, K.I., Inukai, M., Southgate, R., Lonsdale, J.T., and Bugg, T.D. (1996) Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 1640-1644.
- Briley Jr, K., Prepiak, P., Dias, M.J., Hahn, J., and Dubnau, D. (2011) Retracted: Maf acts downstream of ComGA to arrest cell division in competent cells of *B. subtilis*. *Mol. Microbiol.* **81**: 23-39.

- Brown, E.D., Vivas, E.I., Walsh, C.T., and Kolter, R. (1995) MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 4194-4197.
- Brumfitt, W., Wardlaw, A.C., and Park, J.T. (1958) Development of lysozyme-resistance in *Micrococcus lysodieticus* and its association with an increased 0-acetyl content of the cell wall. *Nature* **181**: 1783–1784.
- Brzozowski, R.S., Huber, M., Burroughs, A.M., Graham, G., Walker, M., Alva, S.S., Aravind, L., and Eswara, P.J. (2019) Deciphering the role of a SLOG superfamily protein YpsA in Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology* **10**.
- Buddelmeijer, N., and Beckwith, J. (2002) Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 553-557.
- Bycroft, B.W., and Shute, R.E. (1985) The molecular basis for the mode of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of resistance. *Pharmaceutical Research* **2**: 3-14.
- Camberg, J.L., Hoskins, J.R., and Wickner, S. (2009) ClpXP protease degrades the cytoskeletal protein, FtsZ, and modulates FtsZ polymer dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 10614-10619.
- Camberg, J.L., Hoskins, J.R., and Wickner, S. (2011) The interplay of ClpXP with the cell division machinery in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **193**: 1911-1918.
- Camilli, A., Goldfine, H., and Portnoy, D.A. (1991) *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *The Journal of experimental medicine* **173**: 751-754.
- Carballido-López, R., and Formstone, A. (2007) Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 611-616.
- Carballido-López, R., Formstone, A., Li, Y., Ehrlich, S.D., Noirot, P., and Errington, J. (2006) Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev. Cell* **11**: 399-409.
- Chan, H., Taib, N., Gilmore, M.C., Mohamed, A.M.T., Hanna, K., Luhur, J., Nguyen, H., Hafiz, E., Cava, F., Gribaldo, S., Rudner, D., and Rodrigues, C.D.A. (2022) Genetic screens identify additional genes implicated in envelope remodeling during the engulfment stage of *Bacillus subtilis* sporulation. *mBio* **13**: e01732-01722.
- Charlier, C., Perrodeau, É., Leclercq, A., Cazenave, B., Pilmis, B., Henry, B., Lopes, A., Maury, M.M., Moura, A., Goffinet, F., Dieye, H.B., Thouvenot, P., Ungeheuer, M.-N., Tourdjman, M., Goulet, V., de Valk, H., Lortholary, O., Ravaut, P., Lecuit, M., Hausfater, P., Pourriat, J.-L., Casalino, E., Riou, B., Pateron, D., Yéni, P., Bricaire, F., Ville, Y., Azria, E., Dommergues, M., Bergmann, J.-F., Wolff, M., Mira, J.-P., Guillevin, L., Zuber, M., Abasse, S., Abergane, S., Abgueguen, P., Abokasem, A., Abraham, B., Ache-Papillon, C., Adam, P., Adam, M.-N., Adhoute, X., Adoue, D., Afi, M., Afroukh, N., Agha-Mir, I., Aissa, N., Aissaoui, L., Akerman, G., Akkari, A., Al Chaar, M., Al Freijat, F., Al-Jalaby, B., Albert, D., Albertini, M.-T., Albinet, H., Alfonsi, G., Ali, Y., Chaouche, Z.-E.A., Allart, A., Alric, L., Améri, A., Amoura, Z., Ampère, A., Amroun, H., Ananivi, A., Ancelin, P., André, T., Andremont, A., Andreotti, D., Andriamane, H., Andriau, C., Anglaret, H., Anguel, N., Annaix, V., Anteur, W., Anuset, D., Aoudia, O., Arabi, M., Archambaud, M., Archambaud, M., Ardiet, E., Argaud, L., Arista, S., Arlet, G., Armengaud, J., Arnal, J.-M., Arnault, I.,

- Arsène, O., Assaf, Z., Assi, A., Assouline, D., Astruc, D., Aubard, Y., Aubert, C., Aubry, J.-P., Auburtin, M., Aucher, P., Audeguy, P., *et al.* (2017) Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases* **17**: 510-519.
- Chen, G.Y., Pensinger, D.A., and Sauer, J.-D. (2017) *Listeria monocytogenes* cytosolic metabolism promotes replication, survival, and evasion of innate immunity. *Cell. Microbiol.* **19**: e12762.
- Claessen, D., Emmins, R., Hamoen, L.W., Daniel, R.A., Errington, J., and Edwards, D.H. (2008) Control of the cell elongation–division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **68**: 1029-1046.
- Cleveland, D.W., and Sullivan, K.F. (1985) Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 331-366.
- Cleverley, R., and Lewis, R. (2015) EzrA: a spectrin-like scaffold in the bacterial cell division machinery. *Microb Cell* **2**: 59-61.
- Cleverley, R.M., Barrett, J.R., Baslé, A., Bui, N.K., Hewitt, L., Solovyova, A., Xu, Z.-Q., Daniel, R.A., Dixon, N.E., Harry, E.J., Oakley, A.J., Vollmer, W., and Lewis, R.J. (2014) Structure and function of a spectrin-like regulator of bacterial cytokinesis. *Nature Communications* **5**: 5421.
- Cleverley, R.M., Rismondo, J., Lockhart-Cairns, M.P., Van Bentum, P.T., Egan, A.J., Vollmer, W., Halbedel, S., Baldock, C., Breukink, E., and Lewis, R.J. (2016) Subunit arrangement in GpsB, a regulator of cell wall biosynthesis. *Microb. Drug Resist.* **22**: 446-460.
- Cleverley, R.M., Rutter, Z.J., Rismondo, J., Corona, F., Tsui, H.-C.T., Alatawi, F.A., Daniel, R.A., Halbedel, S., Massidda, O., Winkler, M.E., and Lewis, R.J. (2019) The cell cycle regulator GpsB functions as cytosolic adaptor for multiple cell wall enzymes. *Nature Communications* **10**: 261.
- Collins, B., Curtis, N., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, P.R. (2010a) The ABC Transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to Nisin, Bacitracin, and various beta-Lactam Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 4416-4423.
- Collins, B., Joyce, S., Hill, C., Cotter, P.D., and Ross, R.P. (2010b) TelA contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to Nisin and other cell wall-acting antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 4658-4663.
- Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D.J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., and Stackebrandt, E. (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **41**: 240-246.
- Comenge, Y., Quintiliani, R., Li, L., Dubost, L., Brouard, J.-P., Hugonnet, J.-E., and Arthur, M. (2003) The CroRS two-component regulatory system is required for intrinsic  $\beta$ -Lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **185**: 7184-7192.
- Cowley, S., Ko, M., Pick, N., Chow, R., Downing, K.J., Gordhan, B.G., Betts, J.C., Mizrahi, V., Smith, D.A., Stokes, R.W., and Av-Gay, Y. (2004) The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth *in vivo*. *Mol. Microbiol.* **52**: 1691-1702.

- Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014) Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ\*. *Molecular & Cellular Proteomics* **13**: 2513-2526.
- Cox, J., and Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**: 1367-1372.
- Curtis, S.J., and Strominger, J.L. (1981) Purification of penicillin-binding protein 2 of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **145**: 398-403.
- Daniel, R.A., Harry, E.J., Katis, V.L., Wake, R.G., and Errington, J. (1998) Characterization of the essential cell division gene *ftsL* (*ylID*) of *Bacillus subtilis* and its role in the assembly of the division apparatus. *Mol. Microbiol.* **29**: 593-604.
- Daniel, R.A., Williams, A.M., and Errington, J. (1996) A complex four-gene operon containing essential cell division gene *pbpB* in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**: 2343-2350.
- van de Beek, D., Brouwer, M., Hasbun, R., Koedel, U., Whitney, C.G., and Wijdicks, E. (2016) Community-acquired bacterial meningitis. *Nature Reviews Disease Primers* **2**: 16074.
- van de Beek, D., Brouwer, M.C., Thwaites, G.E., and Tunkel, A.R. (2012) Advances in treatment of bacterial meningitis. *The Lancet* **380**: 1693-1702.
- van de Velde, S., Carryn, S., van Bambeke, F., Hill, C., Tulkens, P.M., and Sleator, R.D. (2009) Penicillin-binding Proteins (PBP) and Lmo0441 (a PBP-like protein) play a role in Beta-lactam sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *Gut Pathogens* **1**: 23.
- Den Blaauwen, T., Aarsman, M.E.G., Vischer, N.O.E., and Nanninga, N. (2003) Penicillin-binding protein PBP2 of *Escherichia coli* localizes preferentially in the lateral wall and at mid-cell in comparison with the old cell pole. *Mol. Microbiol.* **47**: 539-547.
- Dramsi, S., and Cossart, P. (2003) Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line. *Infect. Immun.* **71**: 3614-3618.
- Drevets, D.A., Sawyer, R.T., Potter, T.A., and Campbell, P.A. (1995) *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* **63**: 4268-4276.
- Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K.M., and Msadek, T. (2008) A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalkR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Mol. Microbiol.* **70**: 1307-1322.
- Dubrac, S., Boneca Ivo, G., Poupel, O., and Msadek, T. (2007) New insights into the Walk/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**: 8257-8269.
- Duman, R., Ishikawa, S., Celik, I., Strahl, H., Ogasawara, N., Troc, P., Löwe, J., and Hamoen, L.W. (2013) Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: E4601-E4610.
- Edwards, D.H., and Errington, J. (1997) The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol. Microbiol.* **24**: 905-915.

- Egan, A.J.F., Errington, J., and Vollmer, W. (2020) Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nature Reviews Microbiology* **18**: 446-460.
- Eiamphungporn, W., and Helmann, J.D. (2008) The *Bacillus subtilis*  $\sigma$ M regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Mol. Microbiol.* **67**: 830-848.
- Elfmann, C., Zhu, B., Stülke, J., and Halbedel, S. (2023) ListiWiki: A database for the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Med. Microbiol.* **313**: 151591.
- Elsholz, A.K.W., Birk, M.S., Charpentier, E., and Turgay, K., (2017) Functional diversity of AAA+ protease complexes in *Bacillus subtilis*. In: Front Mol Biosci. pp. 44.
- Emami, K., Guyet, A., Kawai, Y., Devi, J., Wu, L.J., Allenby, N., Daniel, R.A., and Errington, J. (2017) RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway. *Nature Microbiology* **2**: 16253.
- Emanuele, J.J., Jin, H., Yanchunas, J., and Villafranca, J.J. (1997) Evaluation of the kinetic mechanism of *Escherichia coli* uridine diphosphate-N-acetylmuramate:l-alanine ligase. *Biochemistry* **36**: 7264-7271.
- Errington, J., and Wu, L.J. (2017) Cell cycle machinery in *Bacillus subtilis*. *Subcell Biochem* **84**: 67-101.
- Eschenburg, S., Priestman, M., and Schönbrunn, E. (2005) Evidence that the Fosfomycin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) is essential for product release. *J. Biol. Chem.* **280**: 3757-3763.
- Eskandarian, H.A., Impens, F., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Cossart, P., and Hamon, M.A. (2013) A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. *Science* **341**: 1238858.
- Espaze, E.P., and Reynaud, A.E. (1988) Antibiotic susceptibilities of *Listeria*: *In vitro* studies. *Infection* **16**: S160-S164.
- Eswara, P.J., Brzozowski, R.S., Viola, M.G., Graham, G., Spanoudis, C., Trebino, C., Jha, J., Aubee, J.I., Thompson, K.M., Camberg, J.L., and Ramamurthi, K.S. (2018) An essential *Staphylococcus aureus* cell division protein directly regulates FtsZ dynamics. *eLife* **7**: e38856.
- Eswaramoorthy, P., Erb, M.L., Gregory, J.A., Silverman, J., Pogliano, K., Pogliano, J., and Ramamurthi, K.S. (2011) Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates min activity in *Bacillus subtilis*. *mBio* **2**: e00257-00211.
- Eugster, M.R., Haug, M.C., Huwiler, S.G., and Loessner, M.J. (2011) The cell wall binding domain of *Listeria* bacteriophage endolysin PlyP35 recognizes terminal GlcNAc residues in cell wall teichoic acid. *Mol. Microbiol.* **81**: 1419-1432.
- Fabret, C., and Hoch James, A. (1998) A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: Implications for anti-infective therapy. *J. Bacteriol.* **180**: 6375-6383.
- Fillgrove, K.L., Pakhomova, S., Newcomer, M.E., and Armstrong, R.N. (2003) Mechanistic diversity of Fosfomycin resistance in pathogenic microorganisms. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 15730-15731.
- Fillgrove, K.L., Pakhomova, S., Schaab, M.R., Newcomer, M.E., and Armstrong, R.N. (2007) Structure and mechanism of the genomically encoded

- Fosfomycin resistance protein, FosX, from *Listeria monocytogenes*. *Biochemistry* **46**: 8110-8120.
- Fischer, M.A., Engelgeh, T., Rothe, P., Fuchs, S., Thürmer, A., and Halbedel, S. (2022) *Listeria monocytogenes* genes supporting growth under standard laboratory cultivation conditions and during macrophage infection. *Genome Res.* **32**: 1711-1726.
- Fiuza, M., Canova, M.J., Patin, D., Letek, M., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Mateos, L.M., Mengin-Lecreulx, D., Molle, V., and Gil, J.A. (2008a) The MurC ligase essential for peptidoglycan biosynthesis is regulated by the serine/threonine protein kinase PknA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **283**: 36553-36563.
- Fiuza, M., Canova, M.J., Zanella-Cléon, I., Becchi, M., Cozzzone, A.J., Mateos, L.M., Kremer, L., Gil, J.A., and Molle, V. (2008b) From the characterization of the four serine/threonine protein kinases (PknA/B/G/L) of *Corynebacterium glutamicum* toward the role of PknA and PknB in cell division. *J. Biol. Chem.* **283**: 18099-18112.
- Fleurie, A., Cluzel, C., Guiral, S., Freton, C., Galisson, F., Zanella-Cleon, I., Di Guilmi, A.-M., and Grangeasse, C. (2012) Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **83**: 746-758.
- Fleurie, A., Manuse, S., Zhao, C., Campo, N., Cluzel, C., Lavergne, J.-P., Freton, C., Combet, C., Guiral, S., Soufi, B., Macek, B., Kuru, E., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V., Di Guilmi, A.-M., Claverys, J.-P., Galinier, A., and Grangeasse, C. (2014) Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet.* **10**: e1004275.
- Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.-I., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP Protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol. Cell* **11**: 671-683.
- Formstone, A., Carballido-López, R., Noirot, P., Errington, J., and Scheffers, D.-J. (2008) Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190**: 1812-1821.
- Foulquier, E., Pompeo, F., Byrne, D., Fierobe, H.-P., and Galinier, A. (2020) Uridine diphosphate N-acetylglucosamine orchestrates the interaction of GlmR with either YvcJ or GlmS in *Bacillus subtilis*. *Scientific Reports* **10**: 15938.
- Fraipont, C., Alexeeva, S., Wolf, B., van der Ploeg, R., Schloesser, M., den Blaauwen, T., and Nguyen-Distèche, M. (2011) The integral membrane FtsW protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a subcomplex in *Escherichia coli*. *Microbiology* **157**: 251-259.
- Fukuchi, K., Kasahara, Y., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S., and Ogasawara, N. (2000) The essential two-component regulatory system encoded by *yycF* and *yycG* modulates expression of the *ftsAZ* operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **146**: 1573-1583.
- Gaidenko, T.A., Kim, T.-J., and Price, C.W. (2002) The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **184**: 6109-6114.
- Gaillard, J.-L., Berche, P., Frehel, C., Gouln, E., and Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein

- reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**: 1127-1141.
- Galyov, E.E., Håkansson, S., Forsberg, Å., and Wolf-Watz, H. (1993) A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature* **361**: 730-732.
- Gamba, P., Hamoen, L.W., and Daniel, R.A. (2016) Cooperative recruitment of FtsW to the division site of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology* **7**.
- Gamba, P., Veening, J.-W., Saunders, N.J., Hamoen, L.W., and Daniel, R.A. (2009) Two-Step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *J. Bacteriol.* **191**: 4186-4194.
- Gandhi, M., and Chikindas, M.L. (2007) Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 1-15.
- Garde, S., Chodiseti, P.K., and Reddy, M. (2021) Peptidoglycan: Structure, synthesis, and regulation. *EcoSal Plus* **9**.
- Gee, C.L., Papavinasasundaram, K.G., Blair, S.R., Baer, C.E., Falick, A.M., King, D.S., Griffin, J.E., Venghatakrishnan, H., Zukauskas, A., Wei, J.-R., Dhiman, R.K., Crick, D.C., Rubin, E.J., Sassetti, C.M., and Alber, T. (2012) A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in *Mycobacteria*. *Science Signaling* **5**: ra7-ra7.
- Gerth, U., Kock, H., Kusters, I., Michalik, S., Switzer, R.L., and Hecker, M. (2008) Clp-dependent proteolysis down-regulates central metabolic pathways in glucose-starved *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190**: 321-331.
- Ghuysen, J.-M. (1994) Molecular structures of penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactamases. *Trends Microbiol.* **2**: 372-380.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.-D., Fsihi, H., Portillo, F.G.-D., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.-M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueño, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Pérez-Díaz, J.-C., Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.-A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852.
- Glomski, I.J., Decatur, A.L., and Portnoy, D.A. (2003) *Listeria monocytogenes* mutants that fail to compartmentalize listerolysin O activity are cytotoxic, avirulent, and unable to evade host extracellular defenses. *Infect. Immun.* **71**: 6754-6765.
- Goffin, C., and Ghuysen, J.-M. (1998) Multimodular penicillin-binding proteins: An enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1079-1093.
- Göpel, Y., Lüttmann, D., Heroven, A.K., Reichenbach, B., Dersch, P., and Görke, B. (2010) Common and divergent features in transcriptional control of the homologous small RNAs GlmY and GlmZ in *Enterobacteriaceae*. *Nucleic Acids Res.* **39**: 1294-1309.
- Göpel, Y., Papenfort, K., Reichenbach, B., Vogel, J., and Görke, B. (2013) Targeted decay of a regulatory small RNA by an adaptor protein for RNase E and counteraction by an anti-adaptor RNA. *Genes Dev.* **27**: 552-564.

- Gordon, E., Mouz, N., Duée, E., and Dideberg, O. (2000) The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J. Mol. Biol.* **299**: 477-485.
- Gottesman, S. (2003) Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **19**: 565-587.
- Gottesman, S., Clark, W.P., de Crecy-Lagard, V., and Maurizi, M.R. (1993) ClpX, an alternative subunit for the ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence and *in vivo* activities. *J. Biol. Chem.* **268**: 22618-22626.
- Gottschalk, S., Bygebjerg-Hove, I., Bonde, M., Nielsen, P.K., Nguyen, T.H., Gravesen, A., and Kallipolitis, B.H. (2008) The two-component system CesRK controls the transcriptional induction of cell envelope-related genes in *Listeria monocytogenes* in response to cell wall-acting antibiotics. *J. Bacteriol.* **190**: 4772-4776.
- Goulet, V., Hebert, M., Hedberg, C., Laurent, E., Vaillant, V., De Valk, H., and Desenclos, J.-C. (2011) Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* **54**: 652-660.
- Groisman, E.A. (2016) Feedback control of two-component regulatory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**: 103-124.
- Gueiros-Filho, F.J., and Losick, R. (2002) A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev.* **16**: 2544-2556.
- Guffey, A.A., and Loll, P.J. (2021) Regulation of resistance in Vancomycin-resistant *Enterococci*: The VanRS two-component system. *Microorganisms* **9**: 2026.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2006) Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 2824-2828.
- Gunetilleke, K.G., and Anwar, R.A. (1968) Biosynthesis of uridine diphospho-N-acetylmuramic acid: II. Purification and properties of pyruvate-uridine diphospho-N-acetylglucosamine transferase and characterization of uridine diphospho-N-acetylenolpyruvylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **243**: 5770-5778.
- Halbedel, S., Hahn, B., Daniel, R.A., and Flieger, A. (2012) DivIVA affects secretion of virulence-related autolysins in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **83**: 821-839.
- Halbedel, S., Kawai, M., Breitling, R., and Hamoen, L.W. (2014) SecA is required for membrane targeting of the cell division protein DivIVA *in vivo*. *Frontiers in Microbiology* **5**.
- Halbedel, S., and Lewis, R.J. (2019) Structural basis for interaction of DivIVA/GpsB proteins with their ligands. *Mol. Microbiol.* **111**: 1404-1415.
- Hall, C.L., Lytle, B.L., Jensen, D., Hoff, J.S., Peterson, F.C., Volkman, B.F., and Kristich, C.J. (2017) Structure and dimerization of IreB, a negative regulator of Cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Mol. Biol.* **429**: 2324-2336.
- Hall, C.L., Tschannen, M., Worthey, E.A., and Kristich, C.J. (2013) IreB, a Ser/Thr Kinase substrate, influences antimicrobial resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 6179-6186.

- Hammond, L.R., White, M.L., and Eswara, P.J. (2019) ¡vIVA la DivIVA! *J. Bacteriol.* **201**: 10.1128/jb.00245-00219.
- Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**: 423-434.
- Hamon, M.A., Batsché, E., Régnault, B., Tham, T.N., Seveau, S., Muchardt, C., and Cossart, P. (2007) Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 13467-13472.
- Hara, H., and Suzuki, H. (1984) A novel glycan polymerase that synthesizes uncross-linked peptidoglycan in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **168**: 155-160.
- Hardt, P., Engels, I., Rausch, M., Gajdiss, M., Ulm, H., Sass, P., Ohlsen, K., Sahl, H.-G., Bierbaum, G., Schneider, T., and Grein, F. (2017) The cell wall precursor lipid II acts as a molecular signal for the Ser/Thr kinase PknB of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* **307**: 1-10.
- Harry, E., Monahan, L., and Thompson, L., (2006) Bacterial cell division: The mechanism and its precision. In: *Int. Rev. Cytol.*: Academic Press, pp. 27-94.
- Heesemann, J. (1993) Resistenzmechanismen gegen Betalaktamantibiotika. *Infection* **21**: S4-S9.
- Heidrich, C., Templin, M.F., Ursinus, A., Merdanovic, M., Berger, J., Schwarz, H., De Pedro, M.A., and Höltje, J.-V. (2001) Involvement of N-acetylmuramyl-l-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**: 167-178.
- van Heijenoort, J. (1998) Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **54**: 300-304.
- Helmann, J.D. (2016) *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors and defense of the cell envelope. *Curr. Opin. Microbiol.* **30**: 122-132.
- Henriques, A.O., Glaser, P., Piggot, P.J., and Moran Jr, C.P. (1998) Control of cell shape and elongation by the *rodA* gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **28**: 235-247.
- Hof, H., Nichterlein, T., and Kretschmar, M. (1997) Management of listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 345-357.
- Höltje, J.-V., and Tuomanen, E.I. (1991) The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections *in vivo*. *Microbiology* **137**: 441-454.
- Horsburgh, M.J., and Moir, A. (1999)  $\sigma^M$ , an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol. Microbiol.* **32**: 41-50.
- Horwich, A.L., Weber-Ban, E.U., and Finley, D. (1999) Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 11033-11040.
- Hove-Jensen, B. (1992) Identification of tms-26 as an allele of the *gcaD* gene, which encodes N-acetylglucosamine 1-phosphate uridylyltransferase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**: 6852-6856.
- Hvorup, R.N., Winnen, B., Chang, A.B., Jiang, Y., Zhou, X.-F., and Saier Jr, M.H. (2003) The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* **270**: 799-813.

- Iannetta, A.A., Minton, N.E., Uitenbroek, A.A., Little, J.L., Stanton, C.R., Kristich, C.J., and Hicks, L.M. (2021) IreK-mediated, cell wall-protective phosphorylation in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Proteome Research* **20**: 5131-5144.
- Inoue, A., Murata, Y., Takahashi, H., Tsuji, N., Fujisaki, S., and Kato, J.-i. (2008) Involvement of an essential gene, *mviN*, in murein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**: 7298-7301.
- Ishino, F., Park, W., Tomioka, S., Tamaki, S., Takase, I., Kunugita, K., Matsuzawa, H., Asoh, S., Ohta, T., and Spratt, B.G. (1986) Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and rodA protein. *J. Biol. Chem.* **261**: 7024-7031.
- Jackson, S.G., Zhang, F., Chindemi, P., Junop, M.S., and Berti, P.J. (2009) Evidence of kinetic control of ligand binding and staged product release in MurA (enolpyruvyl UDP-GlcNAc synthase)-catalyzed reactions. *Biochemistry* **48**: 11715-11723.
- Jacobs, C., Frère, J.-M., and Normark, S. (1997) Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-Lactam resistance in Gram-negative bacteria. *Cell* **88**: 823-832.
- Jensen, S.O., Thompson, L.S., and Harry, E.J. (2005) Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-ring assembly. *J. Bacteriol.* **187**: 6536-6544.
- Jervis, A.J., Thackray, P.D., Houston, C.W., Horsburgh, M.J., and Moir, A. (2007) SigM-responsive genes of *Bacillus subtilis* and their promoters. *J. Bacteriol.* **189**: 4534-4538.
- Jolly, L., Ferrari, P., Blanot, D., van Heijenoort, J., Fassy, F., and Mengin-Lecreulx, D. (1999) Reaction mechanism of phosphoglucosamine mutase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **262**: 202-210.
- Jones, G., and Dyson, P. (2006) Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of Gram-positive peptidoglycan: Inside versus outside. *J. Bacteriol.* **188**: 7470-7476.
- Jones, L.J.F., Carballido-López, R., and Errington, J. (2001) Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- Jones, S., and Portnoy, D.A. (1994) Characterization of *Listeria monocytogenes* pathogenesis in a strain expressing perfringolysin O in place of listeriolysin O. *Infect. Immun.* **62**: 5608-5613.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**: 583-589.
- Kahan, F.M., Kahan, J.S., Cassidy, P.J., and Kropp, H. (1974) The mechanism of action of Fosfomycin (Phosphonomycin). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **235**: 364-386.

- Kahne, S.C., and Darwin, K.H. (2021) Structural determinants of regulated proteolysis in pathogenic bacteria by ClpP and the proteasome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **67**: 120-126.
- Kalamorz, F., Reichenbach, B., März, W., Rak, B., and Görke, B. (2007) Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **65**: 1518-1533.
- Kamisango, K.-i., Saiki, I., Tanio, Y., Okumura, H., Araki, Y., Sekikawa, I., Azuma, I., and Yamamura, Y. (1982) Structures and biological activities of peptidoglycans of *Listeria monocytogenes* and *Propionibacterium acnes*. *The Journal of Biochemistry* **92**: 23-33.
- Kang, C.-M., Abbott, D.W., Park, S.T., Dascher, C.C., Cantley, L.C., and Husson, R.N. (2005) The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes Dev.* **19**: 1692-1704.
- Katis, V.L., Harry, E.J., and Wake, R.G. (1997) The *Bacillus subtilis* division protein DivIC is a highly abundant membrane-bound protein that localizes to the division site. *Mol. Microbiol.* **26**: 1047-1055.
- Kaur, P., Rausch, M., Malakar, B., Watson, U., Damle, N.P., Chawla, Y., Srinivasan, S., Sharma, K., Schneider, T., Jhingan, G.D., Saini, D., Mohanty, D., Grein, F., and Nandicoori, V.K. (2019) LipidII interaction with specific residues of *Mycobacterium tuberculosis* PknB extracytoplasmic domain governs its optimal activation. *Nature Communications* **10**: 1231.
- Kaval, K.G., Rismondo, J., and Halbedel, S. (2014) A function of DivIVA in *Listeria monocytogenes* division site selection. *Mol. Microbiol.* **94**: 637-654.
- Kawai, Y., Daniel, R.A., and Errington, J. (2009) Regulation of cell wall morphogenesis in *Bacillus subtilis* by recruitment of PBP1 to the MreB helix. *Mol. Microbiol.* **71**: 1131-1144.
- Kaya, S., Araki, Y., and Ito, E. (1985) Characterization of a novel linkage unit between ribitol teichoic acid and peptidoglycan in *Listeria monocytogenes* cell walls. *Eur. J. Biochem.* **146**: 517-522.
- Kelliher, J.L., Grunenwald, C.M., Abrahams, R.R., Daanen, M.E., Lew, C.I., Rose, W.E., and Sauer, J.-D. (2021) PASTA kinase-dependent control of peptidoglycan synthesis via ReoM is required for cell wall stress responses, cytosolic survival, and virulence in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Path.* **17**: e1009881.
- Kennelly, P.J. (2002) Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**: 1-8.
- Khan, M.A., Durica-Mitic, S., Göpel, Y., Heermann, R., and Görke, B. (2020) Small RNA-binding protein RapZ mediates cell envelope precursor sensing and signaling in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* **39**: e103848.
- Khelef, N., Lecuit, M., Buchrieser, C., Cabanes, D., Dussurget, O., and Cossart, P. (2006) *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. *The prokaryotes* **4**: 404-476.
- Kibbe, W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**: W43-W46.
- Kim, D.H., Lees, W.J., Kempell, K.E., Lane, W.S., Duncan, K., and Walsh, C.T. (1996) Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase

- (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic Fosfomycin. *Biochemistry* **35**: 4923-4928.
- Kirstein, J., Dougan, D.A., Gerth, U., Hecker, M., and Turgay, K. (2007) The tyrosine kinase McsB is a regulated adaptor protein for ClpCP. *The EMBO Journal* **26**: 2061-2070-2070.
- Kirstein, J., Molière, N., Dougan, D.A., and Turgay, K. (2009) Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 589-599.
- Kirstein, J., Schlothauer, T., Dougan, D.A., Lilie, H., Tischendorf, G., Mogk, A., Bukau, B., and Turgay, K. (2006) Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *The EMBO Journal* **25**: 1481-1491.
- Kock, H., Gerth, U., and Hecker, M. (2004) MurAA, catalysing the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is a target of Clp-dependent proteolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **51**: 1087-1102.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992) *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* **68**: 521-531.
- Konovalova, A., Søgaaard-Andersen, L., and Kroos, L. (2014) Regulated proteolysis in bacterial development. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**: 493-522.
- Koopmans, M.M., Brouwer, M.C., Vázquez-Boland, J.A., and Beek, D.v.d. (2023) Human Listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **36**: e00060-00019.
- Kortebi, M., Milohanic, E., Mitchell, G., Péchoux, C., Prevost, M.-C., Cossart, P., and Bierne, H. (2017) *Listeria monocytogenes* switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cells. *PLoS Path.* **13**: e1006734.
- Krawczyk-Balska, A., and Markiewicz, Z. (2016) The intrinsic cephalosporin resistome of *Listeria monocytogenes* in the context of stress response, gene regulation, pathogenesis and therapeutics. *J. Appl. Microbiol.* **120**: 251-265.
- Krekel, F., Oecking, C., Amrhein, N., and Macheroux, P. (1999) Substrate and inhibitor-induced conformational changes in the structurally related enzymes UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS). *Biochemistry* **38**: 8864-8878.
- Kruse, T., Møller-Jensen, J., Løbner-Olesen, A., and Gerdes, K. (2003) Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* **22**: 5283-5292.
- Kuhlmann, N.J., and Chien, P. (2017) Selective adaptor dependent protein degradation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **36**: 118-127.
- Kuk, A.C.Y., Hao, A., and Lee, S.-Y. (2022) Structure and mechanism of the lipid flippase MurJ. *Annu. Rev. Biochem.* **91**: 705-729.
- Kumar, S., Rubino, F.A., Mendoza, A.G., and Ruiz, N. (2019) The bacterial lipid II flippase MurJ functions by an alternating-access mechanism. *J. Biol. Chem.* **294**: 981-990.
- Kuru, E., Hughes, H.V., Brown, P.J., Hall, E., Tekkam, S., Cava, F., de Pedro, M.A., Brun, Y.V., and VanNieuwenhze, M.S. (2012) *In situ* probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids. *Angewandte Chemie International Edition* **51**: 12519-12523.

- Labbe, B.D., and Kristich, C.J. (2017) Growth- and stress-induced PASTA kinase phosphorylation in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **199**: 10.1128/jb.00363-00317.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lebreton, A., Lakisic, G., Job, V., Fritsch, L., Tham, T.N., Camejo, A., Mattei, P.-J., Regnault, B., Nahori, M.-A., Cabanes, D., Gautreau, A., Ait-Si-Ali, S., Dessen, A., Cossart, P., and Bierne, H. (2011) A bacterial protein targets the BAHD1 chromatin complex to stimulate type III interferon response. *Science* **331**: 1319-1321.
- Leitão, E., Catarina Costa, A., Brito, C., Costa, L., Pombinho, R., Cabanes, D., and Sousa, S. (2014) *Listeria monocytogenes* induces host DNA damage and delays the host cell cycle to promote infection. *Cell Cycle* **13**: 928-940.
- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L.J., Errington, J., Marenduzzo, D., and Hamoen, L.W. (2009) Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *The EMBO Journal* **28**: 2272-2282.
- Levin, P.A., Kurtser, I.G., and Grossman, A.D. (1999) Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 9642-9647.
- Levin, P.A., and Losick, R. (1994) Characterization of a cell division gene from *Bacillus subtilis* that is required for vegetative and sporulation septum formation. *J. Bacteriol.* **176**: 1451-1459.
- Liger, D., Masson, A., Blanot, D., van Heijenoort, J., and Parquet, C. (1996) Study of the overproduced uridine-diphosphate-N-acetylmuramate:l-alanine ligase from *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* **2**: 25-27.
- Lim, S., Chung, D.R., Kim, Y.-S., Sohn, K.M., Kang, S.-J., Jung, S.-I., Kim, S.-W., Chang, H.H., Lee, S.S., Bae, I.-G., Moon, C., Rhee, J.-Y., Lee, J.S., Ki, H.K., Kim, H.A., Ryu, S.Y., Yeom, J.-S., Son, J.S., Moon, S.-y., Kwon, K.T., Lee, H., Heo, S.T., Kang, C.-I., Peck, K.R., and Song, J.-H. (2017) Predictive risk factors for *Listeria monocytogenes* meningitis compared to pneumococcal meningitis: a multicenter case–control study. *Infection* **45**: 67-74.
- Lima, A., Durán, R., Schujman, G.E., Marchissio, M.J., Portela, M.M., Obal, G., Pritsch, O., de Mendoza, D., and Cerveñansky, C. (2011) Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: Biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *Journal of Proteomics* **74**: 1720-1734.
- Liu, H., and Naismith, J.H. (2008) An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol.* **8**: 91.
- Liu, X., Biboy, J., Consoli, E., Vollmer, W., and den Blaauwen, T. (2021) MreC and MreD balance the interaction between the elongasome proteins PBP2 and RodA. *PLoS Genet.* **16**: e1009276.
- Lombana, T.N., Echols, N., Good, M.C., Thomsen, N.D., Ng, H.-L., Greenstein, A.E., Falick, A.M., King, D.S., and Alber, T. (2010) Allosteric activation mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* receptor Ser/Thr protein kinase, PknB. *Structure* **18**: 1667-1677.
- Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E., and Buttner, M.J. (1994) Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of

- eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 7573-7577.
- Lourenço, A., de Las Heras, A., Scotti, M., Vazquez-Boland, J., Frank Joseph, F., and Brito, L. (2013) Comparison of *Listeria monocytogenes* exoproteomes from biofilm and planktonic state: Lmo2504, a protein associated with biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 6075-6082.
- Lovering, A.L., Safadi, S.S., and Strynadka, N.C.J. (2012) Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. *Annu. Rev. Biochem.* **81**: 451-478.
- Löwe, J., and Amos, L.A. (1998) Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-206.
- Ludwig, W., Schleifer, K.-H., and Whitman, W.B., (2009) "*Listeriaceae*" *fam. nov.*, p. 244-257. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Lutkenhaus, J., Pichoff, S., and Du, S. (2012) Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. *Cytoskeleton* **69**: 778-790.
- Lutkenhaus, J.F., Wolf-Watz, H., and Donachie, W.D. (1980) Organization of genes in the *ftsA-envA* region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new *fts* locus (*ftsZ*). *J. Bacteriol.* **142**: 615-620.
- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., and Séror, S. (2002) Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol. Microbiol.* **46**: 571-586.
- Maestro, B., Novaková, L., Heseck, D., Lee, M., Leyva, E., Mobashery, S., Sanz, J.M., and Branny, P. (2011) Recognition of peptidoglycan and  $\beta$ -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase StkP from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Lett.* **585**: 357-363.
- Mahmoud, S.A., and Chien, P. (2018) Regulated proteolysis in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **87**: 677-696.
- Malet, J.K., Cossart, P., and Ribet, D. (2017) Alteration of epithelial cell lysosomal integrity induced by bacterial cholesterol-dependent cytolysins. *Cell. Microbiol.* **19**: e12682.
- Manuse, S., Fleurie, A., Zucchini, L., Lesterlin, C., and Grangeasse, C. (2015) Role of eukaryotic-like serine/threonine kinases in bacterial cell division and morphogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**: 41-56.
- Marquardt, J.L., Brown, E.D., Lane, W.S., Haley, T.M., Ichikawa, Y., Wong, C.-H., and Walsh, C.T. (1994) Kinetics, stoichiometry, and identification of the reactive thiolate in the inactivation of UDP-GlcNAc enolpyruvoyl transferase by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry* **33**: 10646-10651.
- Marquardt, J.L., Brown, E.D., Walsh, C.T., and Anderson, K.S. (1993) Isolation and structural elucidation of a tetrahedral intermediate in the UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvoyl transferase enzymic pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 10398-10399.
- Marquardt, J.L., Siegele, D.A., Kolter, R., and Walsh, C.T. (1992) Cloning and sequencing of *Escherichia coli murZ* and purification of its product, a UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase. *J. Bacteriol.* **174**: 5748-5752.
- Marquis, H., Doshi, V., and Portnoy, D.A. (1995) The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of

- Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect. Immun.* **63**: 4531-4534.
- Marshall, W.F., and Blair, J.E. (1999) The Cephalosporins. *Mayo Clinic Proceedings* **74**: 187-195.
- Marston, A.L., and Errington, J. (1999) Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol. Microbiol.* **33**: 84-96.
- Marston, A.L., Thomaidēs, H.B., Edwards, D.H., Sharpe, M.E., and Errington, J. (1998) Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev.* **12**: 3419-3430.
- Maruyama, I.N., Yamamoto, A.H., and Hirota, Y. (1988) Determination of gene products and coding regions from the *murE-murF* region of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 3786-3788.
- Mascari, C.A., Djorić, D., Little, J.L., and Kristich, C.J. (2022) Use of an interspecies chimeric receptor for inducible gene expression reveals that metabolic flux through the peptidoglycan biosynthesis pathway is an important driver of Cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **204**: e00602-00621.
- Mascari, C.A., Little, J.L., and Kristich, C.J. (2023) PASTA-kinase-mediated signaling drives accumulation of the peptidoglycan synthesis protein MurAA to promote cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **120**: 811-829.
- Mata, M.T., Baquero, F., and Pérez-Díaz, J.C. (2000) A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**: 185-188.
- Matsuzawa, H., Hayakawa, K., Sato, T., and Imahori, K. (1973) Characterization and genetic analysis of a mutant of *Escherichia coli* K-12 with rounded morphology. *J. Bacteriol.* **115**: 436-442.
- McLauchlin, J. (1990) Human listeriosis in Britain, 1967–85, a summary of 722 cases: 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol. Infect.* **104**: 181-189.
- McLauchlin, J., and Low, J.C. (1994) Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. *The Veterinary record* **135**: 615-617.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., and Jewell, K. (2004) *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* **92**: 15-33.
- Meeske, A.J., Riley, E.P., Robins, W.P., Uehara, T., Mekalanos, J.J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A.C., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2016) SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* **537**: 634-638.
- Meeske, A.J., Sham, L.-T., Kimsey, H., Koo, B.-M., Gross, C.A., Bernhardt, T.G., and Rudner, D.Z. (2015) MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 6437-6442.
- Mengaud, J., Chenevert, J., Geoffroy, C., Gaillard, J.L., and Cossart, P. (1987) Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *Listeria monocytogenes*: listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin. *Infect. Immun.* **55**: 3225-3227.

- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mège, R.-M., and Cossart, P. (1996) E-Cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**: 923-932.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1993) Identification of the *glmU* gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 6150-6157.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1994) Copurification of glucosamine-1-phosphate acetyltransferase and N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase activities of *Escherichia coli*: characterization of the *glmU* gene product as a bifunctional enzyme catalyzing two subsequent steps in the pathway for UDP-N-acetylglucosamine synthesis. *J. Bacteriol.* **176**: 5788-5795.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1996) Characterization of the essential gene *glmM* encoding phosphoglucosamine Mutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**: 32-39.
- Mengin-Lecreulx, D., Parquet, C., Desviat, L.R., Plá, J., Flouret, B., Ayala, J.A., and van Heijenoort, J. (1989) Organization of the *murE-murG* region of *Escherichia coli*: identification of the *murD* gene encoding the D-glutamic-acid-adding enzyme. *J. Bacteriol.* **171**: 6126-6134.
- Mercer, K.L.N., and Weiss, D.S. (2002) The *Escherichia coli* cell division protein FtsW is required to recruit its cognate transpeptidase, FtsI (PBP3), to the division site. *J. Bacteriol.* **184**: 904-912.
- Merle-Melet, M., Dossou-Gbete, L., Maurer, P., Meyer, P., Lozniewski, A., Kuntzburger, O., Wéber, M., and Gérard, A. (1996) Is amoxicillin-cotrimoxazole the most appropriate antibiotic regimen for listeria meningoencephalitis? Review of 22 cases and the literature. *J. Infect.* **33**: 79-85.
- Minkowski, P., Staeger, H., Groscurth, P., and Schaffner, A. (2001) Effects of trimethoprim and co-trimoxazole on the morphology of *Listeria monocytogenes* in culture medium and after phagocytosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**: 185-193.
- Minton, N., Djorić, D., Little, J., and Kristich, C.J. (2022) GpsB promotes PASTA kinase signaling and cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **204**: e00304-00322.
- Mir, M., Asong, J., Li, X., Cardot, J., Boons, G.-J., and Husson, R.N. (2011) The extracytoplasmic domain of the *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr Kinase PknB binds specific muropeptides and is required for PknB localization. *PLoS Path.* **7**: e1002182.
- Mizyed, S., Oddone, A., Byczynski, B., Hughes, D.W., and Berti, P.J. (2005) UDP-N-acetylmuramic acid (UDP-MurNAc) is a potent inhibitor of MurA (Enolpyruvyl-UDP-GlcNAc synthase). *Biochemistry* **44**: 4011-4017.
- Monk, I.R., Gahan, C.G.M., and Hill, C. (2008) Tools for Functional Postgenomic Analysis of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 3921-3934.
- Muchová, K.n., Kutejová, E., Scott, D.J., Brannigan, J.A., Lewis, R.J., Wilkinson, A.J., and Barák, I. (2002) Oligomerization of the *Bacillus subtilis* division protein DivIVA. *Microbiology* **148**: 807-813.
- Mukherjee, A., Dai, K., and Lutkenhaus, J. (1993) *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 1053-1057.

- Mukherjee, A., and Lutkenhaus, J. (1998) Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *The EMBO Journal* **17**: 462-469.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., and Inouye, M. (1991) A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell* **67**: 995-1006.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., and Swann, M.B.R. (1926) A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology* **29**: 407-439.
- Mylonakis, E., Hohmann, E.L., and Calderwood, S.B. (1998) Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*: 33 years' experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine* **77**: 313-336.
- Mylonakis, E., Paliou, M., Hohmann, E.L., Calderwood, S.B., and Wing, E.J. (2002) Listeriosis during pregnancy: A case series and review of 222 Cases. *Medicine* **81**: 260-269.
- Nair, S., Derré, I., Msadek, T., Gaillot, O., and Berche, P. (2000) CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **35**: 800-811.
- Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V., and Berche, P. (1999) ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **31**: 185-196.
- Nanninga, N. (1998) Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 110-129.
- Newton, G.G.F., and Abraham, E.P. (1955) Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- $\alpha$ -aminoadipic acid. *Nature* **175**: 548-548.
- Nielsen, P.K., Andersen, A.Z., Mols, M., van der Veen, S., Abee, T., and Kallipolitis, B.H. (2012) Genome-wide transcriptional profiling of the cell envelope stress response and the role of LisRK and CesRK in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **158**: 963-974.
- Nikitas, G., Deschamps, C., Disson, O., Niault, T., Cossart, P., and Lecuit, M. (2011) Transcytosis of *Listeria monocytogenes* across the intestinal barrier upon specific targeting of goblet cell accessible E-cadherin. *J. Exp. Med.* **208**: 2263-2277.
- Nováková, L., Sasková, L., Pallová, P., Janeček, J., Novotná, J., Ulrych, A., Echenique, J., Trombe, M.-C., and Branny, P. (2005) Characterization of a eukaryotic type serine/threonine protein kinase and protein phosphatase of *Streptococcus pneumoniae* and identification of kinase substrates. *The FEBS Journal* **272**: 1243-1254.
- Obuchowski, M., Madec, E., Delattre, D., Boël, G., Iwanicki, A., Foulger, D., and Séror, S.J. (2000) Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. *J. Bacteriol.* **182**: 5634-5638.
- Oliva, M.A., Halbedel, S., Freund, S.M., Dutow, P., Leonard, T.A., Veprintsev, D.B., Hamoen, L.W., and Löwe, J. (2010) Features critical for membrane binding revealed by DivIVA crystal structure. *The EMBO Journal* **29**: 1988-2001.
- Oren, A., and Garrity, G.M. (2021) Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **71**.

- Orsi, R.H., den Bakker, H.C., and Wiedmann, M. (2011) *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**: 79-96.
- Orsi, R.H., Liao, J., Carlin, C.R., and Wiedmann, M. (2023) Taxonomy, ecology, and relevance to food safety of the genus *Listeria* with a particular consideration of new *Listeria* species described between 2010 and 2022. *Mbio*: e00938-00923.
- Paracuellos, P., Ballandras, A., Robert, X., Kahn, R., Hervé, M., Mengin-Lecreulx, D., Cozzzone, A.J., Duclos, B., and Gouet, P. (2010) The extended conformation of the 2.9-Å crystal structure of the Three-PASTA Domain of a Ser/Thr Kinase from the human pathogen *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* **404**: 847-858.
- Paradis-Bleau, C., Markovski, M., Uehara, T., Lupoli, T.J., Walker, S., Kahne, D.E., and Bernhardt, T.G. (2010) Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell* **143**: 1110-1120.
- Pares, S., Mouz, N., Pétillet, Y., Hakenbeck, R., and Dideberg, O. (1996) X-ray structure of *Streptococcus pneumoniae* PBP2x, a primary penicillin target enzyme. *Nat. Struct. Biol.* **3**: 284-289.
- Patel, V., Wu, Q., Chandrangsou, P., and Helmann, J.D. (2018) A metabolic checkpoint protein GlmR is important for diverting carbon into peptidoglycan biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* **14**: e1007689.
- Patrick, J.E., and Kearns, D.B. (2008) MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **70**: 1166-1179.
- Payie, K.G., Strating, H., and Clarke, A.J. (1996) The role of O-Acetylation in the metabolism of peptidoglycan in *Providencia stuartii*. *Microb. Drug Resist.* **2**: 135-140.
- Pelegri n, I., Moragas, M., Suárez, C., Ribera, A., Verdaguer, R., Martínez-Yelamos, S., Rubio-Borrego, F., Ariza, J., Viladrich, P.F., and Cabellos, C. (2014) *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis in adults: analysis of factors related to unfavourable outcome. *Infection* **42**: 817-827.
- Pensinger, D.A., Boldon, K.M., Chen, G.Y., Vincent, W.J.B., Sherman, K., Xiong, M., Schaenzer, A.J., Forster, E.R., Coers, J., Striker, R., and Sauer, J.-D., (2016) The *Listeria monocytogenes* PASTA kinase PrkA and its substrate YvcK are required for cell wall homeostasis, metabolism, and virulence. In: *PLoS Path.*, pp. e1006001.
- Pensinger, D.A., Gutierrez, K.V., Smith, H.B., Vincent, W.J.B., Stevenson, D.S., Black, K.A., Perez-Medina, K.M., Dillard, J.P., Rhee, K.Y., Amador-Noguez, D., Huynh, T.N., and Sauer, J.-D. (2023) *Listeria monocytogenes* GlmR is an accessory uridylyltransferase essential for cytosolic survival and virulence. *mBio* **14**: e00073-00023.
- Pereira Sandro, F.F., Goss, L., and Dworkin, J. (2011) Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **75**: 192-212.
- Perry, S.E., and Edwards, D.H. (2004) Identification of a polar targeting determinant for *Bacillus subtilis* DivIVA. *Mol. Microbiol.* **54**: 1237-1249.
- Persuh, M., Mandic-Mulec, I., and Dubnau, D. (2002) A MecA paralog, YpbH, binds ClpC, affecting both competence and sporulation. *J. Bacteriol.* **184**: 2310-2313.

- Persuh, M., Turgay, K., Mandic-Mulec, I., and Dubnau, D. (1999) The N- and C-terminal domains of MecA recognize different partners in the competence molecular switch. *Mol. Microbiol.* **33**: 886-894.
- Pichoff, S., and Lutkenhaus, J. (2005) Tethering the Z ring to the membrane through a conserved membrane targeting sequence in FtsA. *Mol. Microbiol.* **55**: 1722-1734.
- Pillich, H., Loose, M., Zimmer, K.-P., and Chakraborty, T. (2012) Activation of the unfolded protein response by *Listeria monocytogenes*. *Cell. Microbiol.* **14**: 949-964.
- Pinto, D., São-José, C., Santos, M.A., and Chambel, L. (2013) Characterization of two resuscitation promoting factors of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **159**: 1390-1401.
- Pizarro-Cerdá, J., and Cossart, P. (2018) *Listeria monocytogenes*: cell biology of invasion and intracellular growth. *Microbiology Spectrum* **6**: 10.1128/microbiolspec.gpp1123-0013-2018.
- Pompeo, F., Byrne, D., Mengin-Lecreulx, D., and Galinier, A. (2018) Dual regulation of activity and intracellular localization of the PASTA kinase PrkC during *Bacillus subtilis* growth. *Scientific Reports* **8**: 1660.
- Pompeo, F., Foulquier, E., Serrano, B., Grangeasse, C., and Galinier, A. (2015) Phosphorylation of the cell division protein GpsB regulates PrkC kinase activity through a negative feedback loop in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **97**: 139-150.
- Prokop, A., Gouin, E., Villiers, V., Nahori, M.-A., Vincentelli, R., Duval, M., Cossart, P., and Dussurget, O. (2017) OrfX, a nucleomodulin required for *Listeria monocytogenes* virulence. *mBio* **8**: 10.1128/mbio.01550-01517.
- Promadej, N., Fiedler, F., Cossart, P., Dramsi, S., and Kathariou, S. (1999) Cell wall teichoic acid glycosylation in *Listeria monocytogenes* serotype 4b requires *gtcA*, a novel, serogroup-specific gene. *J. Bacteriol.* **181**: 418-425.
- Radoshevich, L., and Cossart, P. (2018) *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**: 32-46.
- Rae, C.S., Geissler, A., Adamson, P.C., and Portnoy, D.A. (2011) Mutations of the *Listeria monocytogenes* peptidoglycan N-deacetylase and O-acetylase result in enhanced lysozyme sensitivity, bacteriolysis, and hyperinduction of innate immune pathways. *Infect. Immun.* **79**: 3596-3606.
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., and Brisse, S. (2008) A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Path.* **4**: e1000146.
- Ramamurthi, K.S., and Losick, R. (2009) Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 13541-13545.
- Reichenbach, B., Maes, A., Kalamorz, F., Hajnsdorf, E., and Görke, B. (2008) The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of *glmS* expression and is subject to regulation by polyadenylation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **36**: 2570-2580.
- Rismondo, J., Bender Jennifer, K., and Halbedel, S. (2016a) Suppressor mutations linking *gpsB* with the first committed step of peptidoglycan biosynthesis in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **199**: 10.1128/jb.00393-00316.

- Rismondo, J., Cleverley, R.M., Lane, H.V., Großhennig, S., Steglich, A., Möller, L., Mannala, G.K., Hain, T., Lewis, R.J., and Halbedel, S. (2016b) Structure of the bacterial cell division determinant GpsB and its interaction with penicillin-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **99**: 978-998.
- Rismondo, J., Halbedel, S., and Gründling, A. (2019) Cell shape and antibiotic resistance are maintained by the activity of multiple FtsW and RodA enzymes in *Listeria monocytogenes*. *mBio* **10**: 10.1128/mbio.01448-01419.
- Rismondo, J., Möller, L., Aldridge, C., Gray, J., Vollmer, W., and Halbedel, S. (2015) Discrete and overlapping functions of peptidoglycan synthases in growth, cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **95**: 332-351.
- Rismondo, J., Wamp, S., Aldridge, C., Vollmer, W., and Halbedel, S. (2018) Stimulation of PgdA-dependent peptidoglycan N-deacetylation by GpsB-PBP A1 in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **107**: 472-487.
- Rohde, M. (2019) The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiology Spectrum* **7**: 10.1128/microbiolspec.gpp1123-0044-2018.
- Rohs, P.D.A., Buss, J., Sim, S.I., Squyres, G.R., Srisuknimit, V., Smith, M., Cho, H., Sjodt, M., Kruse, A.C., Garner, E.C., Walker, S., Kahne, D.E., and Bernhardt, T.G. (2018) A central role for PBP2 in the activation of peptidoglycan polymerization by the bacterial cell elongation machinery. *PLoS Genet.* **14**: e1007726.
- Rothe, P., Wamp, S., Rosemeyer, L., Rismondo, J., Doellinger, J., Gründling, A. and Halbedel, S. (2024), Cytosolic factors controlling PASTA kinase-dependent ReoM phosphorylation. *Mol Microbiol*, **122**: 514-533.
- Rothfield, L., Taghbalout, A., and Shih, Y.-L. (2005) Spatial control of bacterial division-site placement. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 959-968.
- Rouquette, C., De Chastellier, C., Nair, S., and Berche, P. (1998) The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Mol. Microbiol.* **27**: 1235-1245.
- Rouquette, C., Ripio, M.-T., Pellegrini, E., Bolla, J.-M., Tascon, R.I., Vázquez-Boland, J.-A., and Berche, P. (1996) Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **21**: 977-987.
- Rubino, F.A., Kumar, S., Ruiz, N., Walker, S., and Kahne, D.E. (2018) Membrane potential is required for MurJ function. *J. Am. Chem. Soc.* **140**: 4481-4484.
- Rued, B.E., Zheng, J.J., Mura, A., Tsui, H.-C.T., Boersma, M.J., Mazny, J.L., Corona, F., Perez, A.J., Fadda, D., Doubravová, L., Buriánková, K., Branny, P., Massidda, O., and Winkler, M.E. (2017) Suppression and synthetic-lethal genetic relationships of  $\Delta$ *gpsB* mutations indicate that GpsB mediates protein phosphorylation and penicillin-binding protein interactions in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* **103**: 931-957.
- Ruggiero, A., Squeglia, F., Marasco, D., Marchetti, R., Molinaro, A., and Berisio, R. (2011) X-ray structural studies of the entire extracellular region of the serine/threonine kinase PrkC from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **435**: 33-41.

- Ruiz, N. (2008) Bioinformatics identification of MurJ (MviN) as the peptidoglycan lipid II flippase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 15553-15557.
- Sacco, E., Hugonnet, J.-E., Josseume, N., Cremniter, J., Dubost, L., Marie, A., Patin, D., Blanot, D., Rice, L.B., Mainardi, J.-L., and Arthur, M. (2010) Activation of the l,d-transpeptidation peptidoglycan cross-linking pathway by a metallo-d,d-carboxypeptidase in *Enterococcus faecium*. *Mol. Microbiol.* **75**: 874-885.
- Salazar, C., and Höfer, T. (2006a) Competition effects shape the response sensitivity and kinetics of phosphorylation cycles in cell signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1091**: 517-530.
- Salazar, C., and Höfer, T. (2006b) Kinetic models of phosphorylation cycles: A systematic approach using the rapid-equilibrium approximation for protein–protein interactions. *BioSyst.* **83**: 195-206.
- Samba-Louaka, A., Pereira, J.M., Nahori, M.-A., Villiers, V., Deriano, L., Hamon, M.A., and Cossart, P. (2014) *Listeria monocytogenes* dampens the DNA damage response. *PLoS Path.* **10**: e1004470.
- Samba-Louaka, A., Stavru, F., and Cossart, P. (2012) Role for telomerase in *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* **80**: 4257-4263.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Samland, A.K., Amrhein, N., and Macheroux, P. (1999) Lysine 22 in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase from *Enterobacter cloacae* is crucial for enzymatic activity and the formation of covalent adducts with the substrate phosphoenolpyruvate and the antibiotic Fosfomycin. *Biochemistry* **38**: 13162-13169.
- Samland, A.K., Etezady-Esfarjani, T., Amrhein, N., and Macheroux, P. (2001) Asparagine 23 and aspartate 305 are essential residues in the active site of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase from *Enterobacter cloacae*. *Biochemistry* **40**: 1550-1559.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences* **74**: 5463-5467.
- Santos, V.T.d., Bisson-Filho, A.W., and Gueiros-Filho, F.J. (2012) DivIVA-mediated polar localization of ComN, a posttranscriptional regulator of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **194**: 3661-3669.
- Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2011) AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu. Rev. Biochem.* **80**: 587-612.
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 234-258.
- Schlech, W.F. (2019) Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiology Spectrum* **7**: 10.1128/microbiolspec.gpp1123-0014-2018.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., and Broome, C.V. (1983) Epidemic Listeriosis — Evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.* **308**: 203-206.
- Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews* **36**: 407-477.

- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Krekel, F., Luger, K., and Amrhein, N. (2000) Role of the loop containing residue 115 in the induced-fit mechanism of the bacterial cell wall biosynthetic enzyme MurA. *Biochemistry* **39**: 2164-2173.
- Schönbrunn, E., Sack, S., Eschenburg, S., Perrakis, A., Krekel, F., Amrhein, N., and Mandelkow, E. (1996) Crystal structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase, the target of the antibiotic fosfomycin. *Structure* **4**: 1065-1075.
- Schönbrunn, E., Svergun, D.I., Amrhein, N., and Koch, M.H.J. (1998) Studies on the conformational changes in the bacterial cell wall biosynthetic enzyme UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase (MurA). *Eur. J. Biochem.* **253**: 406-412.
- Schubert, K., Bichlmaier, A.M., Mager, E., Wolff, K., Ruhland, G., and Fiedler, F. (2000) P45, an extracellular 45 kDa protein of *Listeria monocytogenes* with similarity to protein p60 and exhibiting peptidoglycan lytic activity. *Arch. Microbiol.* **173**: 21-28.
- Schulz, L.M., Rothe, P., Halbedel, S., Gründling, A., and Rismondo, J. (2022) Imbalance of peptidoglycan biosynthesis alters the cell surface charge of *Listeria monocytogenes*. *The Cell Surface* **8**: 100085.
- Schumacher, M.A., Lee, J., and Zeng, W. (2016) Molecular insights into DNA binding and anchoring by the *Bacillus subtilis* sporulation kinetochore-like RacA protein. *Nucleic Acids Res.* **44**: 5438-5449.
- Scortti, M., Lacharme-Lora, L., Wagner, M., Chico-Calero, I., Losito, P., and Vázquez-Boland, J.A. (2006) Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial *in vitro*–*in vivo* paradox. *Nat. Med.* **12**: 515-517.
- Shah, I.M., Laaberki, M.-H., Popham, D.L., and Dworkin, J. (2008) A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* **135**: 486-496.
- Sham, L.-T., Butler, E.K., Lebar, M.D., Kahne, D., Bernhardt, T.G., and Ruiz, N. (2014) MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* **345**: 220-222.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000) InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-510.
- Shi, L., Potts, M., and Kennelly, P.J. (1998) The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 229-253.
- Shockman, G.D., Daneo-Moore, L., Kariyama, R., and Massidda, O. (1996) Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microb. Drug Resist.* **2**: 95-98.
- Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S. (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**: a000414.
- Skarzynski, T., Mistry, A., Wonacott, A., Hutchinson, S.E., Kelly, V.A., and Duncan, K. (1996) Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Structure* **4**: 1465-1474.

- Smith, T.J., Blackman, S.A., and Foster, S.J. (2000) Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* **146**: 249-262.
- Spratt, B.G. (1975) Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **72**: 2999-3003.
- Squeglia, F., Marchetti, R., Ruggiero, A., Lanzetta, R., Marasco, D., Dworkin, J., Petoukhov, M., Molinaro, A., Berisio, R., and Silipo, A. (2011) Chemical basis of peptidoglycan discrimination by PrkC, a key kinase involved in bacterial resuscitation from dormancy. *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 20676-20679.
- Stavru, F., Bouillaud, F., Sartori, A., Ricquier, D., and Cossart, P. (2011) *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 3612-3617.
- Stoker, N.G., Pratt, J.M., and Spratt, B.G. (1983) Identification of the *rodA* gene product of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **155**: 854-859.
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C.-L., Yin, X.-F., Ge, R., Zhang, L.-H., and He, Q.-Y. (2010) Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Proteome Research* **9**: 275-282.
- Sun, Y., Hürlimann, S., and Garner, E. (2023) Growth rate is modulated by monitoring cell wall precursors in *Bacillus subtilis*. *Nature Microbiology* **8**: 469-480.
- Swaminathan, B., and Gerner-Smidt, P. (2007) The epidemiology of human listeriosis. *Microb. Infect.* **9**: 1236-1243.
- Taguchi, A., Welsh, M.A., Marmont, L.S., Lee, W., Sjodt, M., Kruse, A.C., Kahne, D., Bernhardt, T.G., and Walker, S. (2019) FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein. *Nature Microbiology* **4**: 587-594.
- Takada, H., and Yoshikawa, H. (2018) Essentiality and function of WalK/WalR two-component system: the past, present, and future of research. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **82**: 741-751.
- Taku, A., and Fan, D.P. (1976) Identification of an isolated protein essential for peptidoglycan synthesis as the N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **251**: 6154-6156.
- Tasara, T., and Stephan, R. (2006) Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *J. Food Prot.* **69**: 1473-1484.
- Tavares, J.R., de Souza, R.F., Meira Guilherme Louzada, S., and Gueiros-Filho, F., J. (2008) Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome. *J. Bacteriol.* **190**: 7096-7107.
- Tayeh, M.A., Dotson, G.D., Clemens, J.C., and Woodard, R.W. (1995) Overproduction and one-step purification of *Escherichia coli* UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl reductase. *Protein Expression Purif.* **6**: 757-762.
- van Teeffelen, S., Wang, S., Furchtgott, L., Huang, K.C., Wingreen, N.S., Shaevitz, J.W., and Gitai, Z. (2011) The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 15822-15827.

- Temple, M.E., and Nahata, M.C. (2000) Treatment of Listeriosis. *Annals of Pharmacotherapy* **34**: 656-661.
- Thakur, M., and Chakraborti, P.K. (2006) GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA *J. Biol. Chem.* **281**: 40107-40113.
- Thomaides, H.B., Freeman, M., Karoui, M.E., and Errington, J. (2001) Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes Dev.* **15**: 1662-1673.
- Thønnings, S., Knudsen, J.D., Schønheyder, H.C., Søgaaard, M., Arpi, M., Gradel, K.O., Østergaard, C., Østergaard, C., Arpi, M., Gradel, K.O., Jensen, U.S., Thønnings, S., Knudsen, J.D., Koch, K., Pinholt, M., Smit, J., Schønheyder, H.C., and Søgaaard, M. (2016) Antibiotic treatment and mortality in patients with *Listeria monocytogenes* meningitis or bacteraemia. *Clin. Microbiol. Infect.* **22**: 725-730.
- Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **109**: 1597-1608.
- Tipper, D.J., and Strominger, J.L. (1965) Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **54**: 1133-1141.
- Todd Rose, F.O., Darnell, R.L., Morris, S.M., Rose, O.E., Paxie, O., Campbell, G., Cook, G.M., and Gebhard, S. (2023) The two-component system CroRS acts as a master regulator of cell envelope homeostasis to confer antimicrobial tolerance in the bacterial pathogen *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **120**: 408-424.
- Troxler, R., von Graevenitz, A., Funke, G., Wiedemann, B., and Stock, I. (2000) Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**: 525-535.
- Tsui, H.-C.T., Boersma, M.J., Vella, S.A., Kocaoglu, O., Kuru, E., Peceny, J.K., Carlson, E.E., VanNieuwenhze, M.S., Brun, Y.V., Shaw, S.L., and Winkler, M.E. (2014) Pbp2x localizes separately from Pbp2b and other peptidoglycan synthesis proteins during later stages of cell division of *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* **94**: 21-40.
- Tsui, H.-C.T., Joseph, M., Zheng, J.J., Perez, A.J., Manzoor, I., Rued, B.E., Richardson, J.D., Branny, P., Doubravová, L., Massidda, O., and Winkler, M.E. (2023) Negative regulation of MurZ and MurA underlies the essentiality of GpsB- and StkP-mediated protein phosphorylation in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol.* **120**: 351-383.
- Turapov, O., Forti, F., Kadhim, B., Ghisotti, D., Sassine, J., Straatman-Iwanowska, A., Bottrill, A.R., Moynihan, P.J., Wallis, R., Barthe, P., Cohen-Gonsaud, M., Ajuh, P., Vollmer, W., and Mukamolova, G.V. (2018) Two faces of CwlM, an essential PknB substrate, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Reports* **25**: 57-67.e55.
- Turgay, K., Hahn, J., Burghoorn, J., and Dubnau, D. (1998) Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *The EMBO Journal* **17**: 6730-6738-6738.

- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M.Y., Geiger, T., Mann, M., and Cox, J. (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* **13**: 731-740.
- Typas, A., Banzhaf, M., van den Berg van Saparoea, B., Verheul, J., Biboy, J., Nichols, R.J., Zietek, M., Beilharz, K., Kannenberg, K., von Rechenberg, M., Breukink, E., den Blaauwen, T., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2010) Regulation of peptidoglycan synthesis by outer-membrane proteins. *Cell* **143**: 1097-1109.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2012) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 123-136.
- Urban, J.H., and Vogel, J. (2008) Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate *glmS* mRNA translation. *PLoS Biol.* **6**: e64.
- Vadia, S., Arnett, E., Haghighat, A.-C., Wilson-Kubalek, E.M., Tweten, R.K., and Seveau, S. (2011) The pore-forming toxin listeriolysin O mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes. *PLoS Path.* **7**: e1002356.
- VanZeeland, N.E., Schultz, K.M., Klug, C.S., and Kristich, C.J. (2023) Multisite phosphorylation regulates GpsB function in Cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis*. *J. Mol. Biol.* **435**: 168216.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., and Velankar, S. (2021) AlphaFold protein structure database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* **50**: D439-D444.
- Varley, A.W., and Stewart, G.C. (1992) The *divIVB* region of the *Bacillus subtilis* chromosome encodes homologs of *Escherichia coli* septum placement (*minCD*) and cell shape (*mreBCD*) determinants. *J. Bacteriol.* **174**: 6729-6742.
- Vazquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., and Cossart, P. (1992) Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **60**: 219-230.
- Vollmer, W. (2008) Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 287-306.
- Vollmer, W., and Bertsche, U. (2008) Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 1714-1734.
- Vollmer, W., Blanot, D., and De Pedro, M.A. (2008a) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 149-167.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008b) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 259-286.
- Wachi, M., Doi, M., Okada, Y., and Matsushashi, M. (1989) New *mre* genes *mreC* and *mreD*, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **171**: 6511-6516.

- Wamp, S., Rothe, P., Stern, D., Holland, G., Döhling, J., and Halbedel, S. (2022) MurA escape mutations uncouple peptidoglycan biosynthesis from PrkA signaling. *PLoS Path.* **18**: e1010406.
- Wamp, S., Rutter, Z.J., Rismondo, J., Jennings, C.E., Möller, L., Lewis, R.J., and Halbedel, S. (2020) PrkA controls peptidoglycan biosynthesis through the essential phosphorylation of ReoM. *eLife* **9**: e56048.
- Wang, M., Wamp, S., Gibhardt, J., Holland, G., Schwedt, I., Schmidtke, K.-U., Scheibner, K., Halbedel, S., and Commichau, F.M. (2022) Adaptation of *Listeria monocytogenes* to perturbation of c-di-AMP metabolism underpins its role in osmoadaptation and identifies a fosfomycin uptake system. *Environ. Microbiol.* **24**: 4466-4488.
- Wanke, C., Falchetto, R., and Amrhein, N. (1992) The UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyl-transferase of *Enterobacter cloacae* Molecular cloning, sequencing of the gene and overexpression of the enzyme. *FEBS Lett.* **301**: 271-276.
- Waxman, D.J., and Strominger, J.L. (1980) Sequence of active site peptides from the penicillin-sensitive D-alanine carboxypeptidase of *Bacillus subtilis*. Mechanism of penicillin action and sequence homology to beta-lactamases. *J. Biol. Chem.* **255**: 3964-3976.
- Winkler, M.E., Joseph, M., and Tsui, H.-C.T. (2023) Secrets of getting started: Regulation of the first committed step of peptidoglycan synthesis by protein phosphorylation in *Enterococcus* and other Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **120**: 805-810.
- Winkler, W.C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J.A., and Breaker, R.R. (2004) Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **428**: 281-286.
- Winslow, D.L., and Pankey, G.A. (1982) In vitro activities of trimethoprim and sulfamethoxazole against *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **22**: 51-54.
- Wittig, I., and Schägger, H. (2005) Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* **5**: 4338-4346.
- Wojtkowiak, D., Georgopoulos, C., and Zylicz, M. (1993) Isolation and characterization of ClpX, a new ATP-dependent specificity component of the Clp protease of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **268**: 22609-22617.
- Wu, L.J., and Errington, J. (2004) Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. *Cell* **117**: 915-925.
- Yanouri, A., Daniel, R.A., Errington, J., and Buchanan, C.E. (1993) Cloning and sequencing of the cell division gene pbpB, which encodes penicillin-binding protein 2B in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 7604-7616.
- Yeats, C., Finn, R.D., and Bateman, A. (2002) The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 438-440.
- Yeom, J., Wayne, K.J., and Groisman, E.A. (2017) Sequestration from protease adaptor confers differential stability to protease substrate. *Mol. Cell* **66**: 234-246. e235.
- Young, K.D. (2003) Bacterial shape. *Mol. Microbiol.* **49**: 571-580.
- Young, K.D. (2006) The selective value of bacterial shape. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 660-703.
- Zawadzka-Skomił, J., Markiewicz, Z., Nguyen-Distèche, M., Devreese, B., Frère, J.-M., and Terrak, M. (2006) Characterization of the bifunctional

- glycosyltransferase/acyltransferase penicillin-binding protein 4 of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **188**: 1875-1881.
- Zeiler, E., Braun, N., Böttcher, T., Kastenmüller, A., Weinkauf, S., and Sieber, S.A. (2011) Vibralactone as a tool to study the activity and structure of the ClpP1P2 complex from *Listeria monocytogenes*. *Angewandte Chemie International Edition* **50**: 11001-11004.
- Zeiler, E., List, A., Alte, F., Gersch, M., Wachtel, R., Poreba, M., Drag, M., Groll, M., and Sieber, S.A. (2013) Structural and functional insights into caseinolytic proteases reveal an unprecedented regulation principle of their catalytic triad. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 11302-11307.
- Zhang, L., Wang, Y., Liu, D., Luo, L., Wang, Y., and Ye, C. (2018) Identification and characterization of *als* genes involved in D-allose metabolism in lineage II strain of *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Microbiology* **9**.
- Zheng, J., Wu, Y., Lin, Z., Wang, G., Jiang, S., Sun, X., Tu, H., Yu, Z., and Qu, D. (2020) ClpP participates in stress tolerance, biofilm formation, antimicrobial tolerance, and virulence of *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiol.* **20**: 30.
- Zhu, J.-Y., Yang, Y., Han, H., Betzi, S., Olesen, S.H., Marsilio, F., and Schönbrunn, E. (2012) Functional consequence of covalent reaction of phosphoenolpyruvate with UDP-*N*-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (MurA). *J. Biol. Chem.* **287**: 12657-12667.
- Zucchini, L., Mercy, C., Garcia, P.S., Cluzel, C., Gueguen-Chaignon, V., Galisson, F., Freton, C., Guiral, S., Brochier-Armanet, C., Gouet, P., and Grangeasse, C. (2018) PASTA repeats of the protein kinase StkP interconnect cell constriction and separation of *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Microbiology* **3**: 197-209.

## Anhang

|                       |                                                               |     |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|-----|
| sp P0A749 MURA_ECOLI  | -MDKFRVQGPTKLQGEVTISGAKNAALPILFAALLAEEPV-EIQNVPKLKDVDTSMKLLS  | 58  |
| sp Q8Y4C4 MURA1_LISMO | -MEKIIVRGGKQLNGSVKMEGAKNAVLPVIAATLLASKGTSVLKNVNLSDVFTINEVLK   | 59  |
| sp Q8Y4A2 MURA2_LISMO | MTDRLIIQGGKKLSGTLQVDGAKNSAVALIPAAILAESEV-VLEGLPDISDVYTLTDILE  | 59  |
|                       | ::: ::* .::.* : :.*****::: :: *::*... . :.:*...** * .:*.:     |     |
| sp P0A749 MURA_ECOLI  | QLGAKVE-RNGSVHIDARDVNVFCAPYDLVKTMRASIWALGPLVARFGQGQVSLPGGCTI  | 117 |
| sp Q8Y4C4 MURA1_LISMO | YLNADVSVFNDEVTVDATGEITSDAPFEYVRKMRASIVVMGPLLARTGSARVALPGGCAI  | 119 |
| sp Q8Y4A2 MURA2_LISMO | ELGGSVRYDNKTAIIDPTDMLSMPLPSGNVKKLRASYLLMGAMLGRFCKAVIGLPGGCYL  | 119 |
|                       | *...* * . :* . * *:::*** :* :..* .. :.***** :                 |     |
| sp P0A749 MURA_ECOLI  | GARPVDLHISGLEQLGATIKLEEGYVKASVDGRLKGAHIVMDKVSVGATVTIMCAATLAE  | 177 |
| sp Q8Y4C4 MURA1_LISMO | GSRPVDLHLKGFEAMGAVVKIENGYIEATAE-KLVGAKVYLDFPSVGATQNIMMAATLAE  | 178 |
| sp Q8Y4A2 MURA2_LISMO | GPRPIDQHIKGFEALGAKVTNEQGAIYLRAD-ELKGARIYLDVVSVGATINIMLA AVRAK | 178 |
|                       | * **:* *:.*** :** :. *** : .: .* ***: :* ***** .** ** .* :    |     |

**Abbildung 35: Proteinsequenzvergleich von MurA und MurZ aus *L. monocytogenes* mit MurA aus *E. coli*.**

Die Aminosäuresequenz von MurA aus *L. monocytogenes* ist als Q8Y4C4/MURA1\_LISMO bezeichnet, die Sequenz von MurZ aus *L. monocytogenes* hat die Bezeichnung Q8Y4A2/MURA2\_LISMO und MurA aus *E. coli* heißt in der Abbildung P0A749/MURA\_ECOLI. Der Sequenzvergleich wurde mit CLUSTAL O (1.2.4) durchgeführt und das Cystein im katalytischen Zentrum der Proteine ist grau hinterlegt.

**Tabelle 19: Im Vergleich zu EGD-e signifikant veränderte Proteine in LMJR138 ( $\Delta c/pC$ )**

| Uniprot ID | Locus ID            | Beschreibung <sup>#</sup>     | Kategorie/Funktion <sup>#</sup> | Veränderung LMJR138/EGD-e (log <sub>2</sub> ) | Veränderung LMSW30/EGDe (log <sub>2</sub> ) | ANOVA   | T-Test EGD-e LMJR138 | T-Test EGD-e LMSW30 |
|------------|---------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|
| Q8Y5Y2     | <i>Imo1921/reoY</i> | Regulator der ClpCP Aktivität | Cephalosporin-Resistenz         | 3,03                                          | 0,22                                        | 6,9E-03 | 2,9E-03              | 8,3E-01             |

| Uniprot ID | Locus ID             | Beschreibung <sup>#</sup>                                                                                                       | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                             | Veränderung LMJR138/EGD-e (log <sub>2</sub> ) | Veränderung LMSW30/EGDe (log <sub>2</sub> ) | ANOVA   | T-Test EGD-e LMJR138 | T-Test EGD-e LMSW30 |
|------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|
| Q8Y4T9     | <i>Imo2343/cmoJ</i>  | mögliche Coenzym F420-abhängige N5,N10-Methylen-Tetrahydromethanopterin-Reduktase und verwandte Flavin-abhängige Oxidoreduktase | Energieproduktion und -konversion                                           | 1,27                                          | 0,68                                        | 9,8E-02 | 3,0E-03              | 5,8E-01             |
| Q8YAR4     | <i>Imo0051/agrA</i>  | Reaktionsregulator des Kompetenz-regulons ComE                                                                                  | Transkription; Signaltransduktion; Zwei-Komponenten-Systeme; Quorum sensing | 1,26                                          | -0,20                                       | 1,9E-04 | 8,4E-04              | 1,5E-01             |
| Q8Y4C4     | <i>Imo2526/murA</i>  | UDP-N-Acetylglukosamin-1-Carboxyvinyltransferase                                                                                | Zellwand-/Membranbiosynthese; Peptidoglykanbio-synthese                     | 1,22                                          | 1,03                                        | 1,5E-03 | 3,0E-03              | 4,7E-03             |
| Q8Y786     | <i>Imo1406/pflB</i>  | Pyruvat-Formiat-Lyase                                                                                                           | Energieproduktion und -konversion                                           | 1,07                                          | -0,31                                       | 3,2E-04 | 1,3E-03              | 1,2E-01             |
| Q8Y6A9     | <i>Imo1782/xth</i>   | mögliche Exodesoxyribonuklease III                                                                                              | Replikation, Rekombination und Reparatur                                    | 0,77                                          | 0,06                                        | 6,1E-02 | 4,4E-03              | 8,6E-01             |
| Q8Y6H3     | <i>Imo1713/mreBH</i> | Stäbchenformbestimmendes Protein                                                                                                | Zellform; Kontrolle des Zellzyklus, Mitose und Meiose                       | 0,76                                          | 0,54                                        | 1,1E-03 | 2,5E-03              | 2,7E-03             |

| Uniprot ID | Locus ID            | Beschreibung <sup>#</sup>                                                                                        | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                               | Veränderung LMJR138/EGD-e (log <sub>2</sub> ) | Veränderung LMSW30/EGDe (log <sub>2</sub> ) | ANOVA   | T-Test EGD-e LMJR138 | T-Test EGD-e LMSW30 |
|------------|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|
| Q8Y6X8     | <i>Imo1553/hemL</i> | Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase                                                                          | Coenzymtransport und -metabolismus; Biosynthese von Häm/ Sirohäm              | 0,69                                          | 0,23                                        | 7,0E-02 | 3,2E-03              | 5,8E-01             |
| Q8Y8D4     | <i>Imo0974/dltA</i> | D-Alanin-Poly(phosphoribitol)-Ligase-Untereinheit 1                                                              | Zellwandsynthese, Biosynthese von Lipoteichoinsäure                           | 0,67                                          | -0,39                                       | 1,9E-03 | 4,8E-03              | 1,1E-01             |
| Q8Y5U4     | <i>Imo1961</i>      | mögliche Thioredoxin-Reduktase                                                                                   | Posttranslationale Modifikation, Proteinumsatz, Chaperone                     | 0,66                                          | -0,32                                       | 1,2E-01 | 7,3E-03              | 4,0E-01             |
| Q8Y8T3     | <i>Imo0811</i>      | mögliche Vorstufe der Kohlensäure-anhydrase                                                                      | anorganischer Ionentransport und Metabolismus                                 | 0,60                                          | -0,20                                       | 1,9E-02 | 5,1E-03              | 4,8E-01             |
| Q8Y532     | <i>Imo2244</i>      | unbekannt; ähnelt der ribosomalen großen Untereinheit Pseudouridin-Synthase D, <i>Bacillus subtilis</i> YhcT-Typ | Translation; rRNA-Modifikation und -Reifung                                   | -0,59                                         | -0,15                                       | 1,1E-01 | 9,7E-03              | 3,3E-01             |
| Q8Y5Y5     | <i>Imo1918/ytfP</i> | mögliche NAD(FAD)-verwertende Dehydrogenase                                                                      | unbekannt                                                                     | -0,66                                         | -0,18                                       | 5,8E-02 | 8,3E-03              | 3,5E-01             |
| Q8Y449     | <i>Imo2611/adk</i>  | Adenylatkinase                                                                                                   | Nukleotidtransport und -metabolismus; Biosynthese/Erwerb von Purinnukleotiden | -0,67                                         | 0,01                                        | 8,1E-04 | 2,9E-03              | 9,9E-01             |

| Uniprot ID | Locus ID            | Beschreibung <sup>#</sup>                          | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                                                        | Veränderung LMJR138/EGD-e (log <sub>2</sub> ) | Veränderung LMSW30/EGDe (log <sub>2</sub> ) | ANOVA   | T-Test EGD-e LMJR138 | T-Test EGD-e LMSW30 |
|------------|---------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|
| Q8Y3P9     | <i>Imo2785/kat</i>  | Katalase                                           | anorganischer Ionentransport und Metabolismus; Phosphoproteine, Phosphorylierung an einem Thr/Ser-Rest | -0,78                                         | -0,37                                       | 1,0E-02 | 4,1E-03              | 1,1E-01             |
| Q8Y6C6     | <i>Imo1764/purD</i> | Phosphoribosylamin-Glycin-Ligase                   | Nukleotidtransport und -metabolismus; Biosynthese/Erwerb von Purinnukleotiden                          | -0,86                                         | -0,05                                       | 3,9E-03 | 3,4E-03              | 5,9E-01             |
| Q8YAF1     | <i>Imo0178</i>      | möglicher Transkriptions-regulator der ROK-Familie | Transkription; Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel                                                 | -0,87                                         | -0,48                                       | 1,2E-01 | 1,2E-03              | 1,6E-01             |
| Q8Y4S3     | <i>Imo2359</i>      | mögliche Cof-ähnliche Hydrolase                    | unbekannt                                                                                              | -1,03                                         | -0,24                                       | 4,6E-02 | 8,2E-03              | 2,6E-01             |
| Q8Y737     | <i>Imo1485</i>      | mögliche Methyltransferase                         | Biosynthese sekundärer Metabolite, Transport und Katabolismus                                          | -1,06                                         | -0,30                                       | 7,9E-02 | 3,9E-03              | 3,0E-01             |
| Q8Y617     | <i>Imo1885/xpt</i>  | Xanthin-Phosphoribosyltransferase                  | Nukleotidtransport und -metabolismus; Biosynthese/Erwerb von Purinnukleotiden                          | -1,14                                         | -0,26                                       | 2,7E-02 | 2,5E-04              | 4,1E-01             |

| Uniprot ID | Locus ID             | Beschreibung <sup>#</sup> | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                                    | Veränderung LMJR138/EGD-e (log <sub>2</sub> ) | Veränderung LMSW30/EGDe (log <sub>2</sub> ) | ANOVA   | T-Test EGD-e LMJR138 | T-Test EGD-e LMSW30 |
|------------|----------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|
| Q8Y663     | <i>Imo1837/ pyrC</i> | Dihydroorotase            | Nukleotidtransport und -metabolismus; Biosynthese/Erwerb von Pyrimidin-Nukleotiden | -2,20                                         | -0,95                                       | 5,9E-03 | 4,7E-03              | 1,1E-01             |

<sup>#</sup>Informationen von <https://listiwiki.uni-goettingen.de> (Elfmann *et al.*, 2023)

**Tabelle 20: Im Vergleich zu EGD-e signifikant veränderte Proteine in LMSW30 ( $\Delta$ reoM)**

| Uniprot ID | Locus ID             | Beschreibung <sup>#</sup>                        | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                                                                                                     | Veränderung LMJR138/EGD-e (log <sub>2</sub> ) | Veränderung LMSW30/EGDe (log <sub>2</sub> ) | ANOVA   | T-Test EGD-e LMJR138 | T-Test EGD-e LMSW30 |
|------------|----------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|
| Q8Y9A5     | <i>Imo0627</i>       | Peptidoglykan-gebundenes Protein                 | unbekannt                                                                                                                                           | 0,91                                          | 1,83                                        | 5,5E-03 | 8,5E-02              | 2,8E-03             |
| P21171     | <i>Imo0582 /cwhA</i> | Invasionsassoziierte sekretierte Endopeptidase   | Zellwand-/Membranbiosynthese; Autolytische Aktivität, die für die Peptidoglykan-synthese erforderlich ist (Zellverlängerung); Zellwandabbau/-umsatz | 0,48                                          | 1,19                                        | 8,3E-03 | 6,2E-02              | 8,1E-03             |
| Q8Y4C4     | <i>Imo2526 /murA</i> | UDP-N-Acetylglukosamin-1-Carboxyvinyltransferase | Zellwand-/Membranbiosynthese; Peptidoglykan-biosynthese                                                                                             | 1,22                                          | 1,03                                        | 1,5E-03 | 3,0E-03              | 4,7E-03             |
| Q8Y9E8     | <i>Imo0581 /ywbD</i> | mögliche Methyltransferase                       | Translation; rRNA-Modifikation und Reifung                                                                                                          | -0,21                                         | 0,81                                        | 8,4E-04 | 3,8E-01              | 1,1E-03             |

| Uniprot ID | Locus ID                       | Beschreibung <sup>#</sup>                                                                   | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                                                                             | Veränderung LMJR138/EGD-e (log <sub>2</sub> ) | Veränderung LMSW30/EGDe (log <sub>2</sub> ) | ANOVA   | T-Test EGD-e LMJR138 | T-Test EGD-e LMSW30 |
|------------|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------|---------------------|
| Q8Y9T0     | <i>Imo0443</i>                 | möglicher Zellhüllen-assoziiierter Transkriptionsabschwächer LytR-CpsA-Psr, Unterfamilie F1 | Transkription; Membranproteine                                                                                              | 0,10                                          | 0,68                                        | 5,8E-03 | 2,6E-01              | 7,2E-03             |
| P65770     | <i>Imo1586</i><br><i>/nadF</i> | anorganisches Polyphosphat/ATP-NAD-Kinase                                                   | Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel; Biosynthese von Cofaktoren; Biosynthese von NAD(P)                                 | -0,65                                         | -0,61                                       | 2,0E-02 | 4,5E-02              | 3,6E-03             |
| Q8YAE7     | <i>Imo0183</i>                 | mögliche Alpha-Glucosidase                                                                  | Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel; Verwertung von spezifischen Kohlenstoffquellen; Verwertung von Stärke/Maltodextrin | -0,33                                         | -0,64                                       | 1,6E-02 | 2,1E-01              | 1,8E-03             |
| Q8Y6X4     | <i>Imo1557</i><br><i>/hemA</i> | Glutamyl-tRNA-Reduktase                                                                     | Coenzymtransport und -metabolismus; Biosynthese von Häm/Sirohäm                                                             | 1,09                                          | -0,87                                       | 7,9E-04 | 1,8E-02              | 7,0E-03             |
| P0DJP1     | <i>Imo1469</i><br><i>/rpsU</i> | 30S ribosomales Protein S21                                                                 | Translation; Ribosomale Proteine                                                                                            | -0,22                                         | -1,18                                       | 1,7E-02 | 5,0E-01              | 3,7E-03             |

<sup>#</sup> Informationen von <https://listiwiki.uni-goettingen.de> (Elfmann *et al.*, 2023)

Tabelle 21: *De novo*-synthetisierte Proteine in LMJR138 ( $\Delta clpC$ )

| Uniprot ID | Locus ID            | Produkt <sup>#</sup>                                                  | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                                                                                                            | Mittelwert der korrigierten LFQ* Intensitäten |
|------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Q92D15     | <i>Imo1007</i>      | unbekannt                                                             | unbekannt                                                                                                                                                  | 16820000                                      |
| Q8Y8G4     | <i>Imo0940</i>      | unbekannt                                                             | unbekannt                                                                                                                                                  | 6946300                                       |
| Q8Y4C8     | <i>Imo2522</i>      | <i>resuscitation promoting factor</i><br>(Pinto <i>et al.</i> , 2013) | Zellwand-/Membranbiosynthese;<br>Zellwandabbau/-umsatz, Autolyse;<br>Cephalosporin-Resistenz                                                               | 2335003                                       |
| Q8Y8Q0     | <i>Imo0846</i>      | mögliche Excinuklease ABC Untereinheit C                              | Replikation, Rekombination und Reparatur                                                                                                                   | 1988567                                       |
| Q8Y978     | <i>Imo0655</i>      | mögliche Serin/Threonine<br>Proteinphosphatase                        | Mechanismen der Signaltransduktion                                                                                                                         | 1752043                                       |
| Q8Y8J4     | <i>Imo0907</i>      | mögliche Phosphoglycerat-Mutase                                       | Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel                                                                                                                    | 1618570                                       |
| Q8Y4K1     | <i>Imo2437</i>      | unbekannt                                                             | unbekannt                                                                                                                                                  | 1556220                                       |
| Q8Y6K5     | <i>Imo1679/metC</i> | Cystathionin-Beta-Lyase                                               | Transport und Stoffwechsel von<br>Aminosäuren; Biosynthese/Erwerb von<br>Aminosäuren; Biosynthese/Erwerb von<br>Cystein und Methionin/ S-Adenosylmethionin | 1479333                                       |
| Q8Y9R4     | <i>Imo0459</i>      | unbekannt                                                             | unbekannt                                                                                                                                                  | 1223333                                       |
| Q8Y8V4     | <i>Imo0788</i>      | möglicher Aktivator der (R)-2-<br>Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase     | Lipidtransport und -stoffwechsel                                                                                                                           | 1136957                                       |
| Q8Y5U2     | <i>Imo1963/timB</i> | Tartrolon B ABC-Transporter                                           | Export von antimikrobiellen Substanzen;<br>Resistenz gegen das Makrodiolid-<br>Antibiotikum Tartrolon B                                                    | 1042380                                       |
| Q8Y4E2     | <i>Imo2504</i>      | mögliches Peptidoglykan-lytisches Protein<br>P45                      | Zellwand-/Membranbiosynthese;<br>Zellwandabbau/-umsatz; Autolyse                                                                                           | 998173                                        |
| Q8Y589     | <i>Imo2180</i>      | unbekannt                                                             | unbekannt                                                                                                                                                  | 988853                                        |

| Uniprot ID | Locus ID            | Produkt <sup>#</sup>                     | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                                                                                                       | Mittelwert der korrigierten LFQ* Intensitäten |
|------------|---------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Q8Y400     | <i>Imo2678/kdpE</i> | möglicher DNA-Bindungsreaktionsregulator | Transkription;<br>Signaltransduktionsmechanismen;<br>Transkriptionsfaktoren und ihre Kontrolle,<br>Reaktionsregulatoren des<br>Zweikomponentensystems | 930653                                        |
| Q8Y736     | <i>Imo1487</i>      | mögliche Hydrolase (HAD-Superfamilie)    | Coenzymtransport und -metabolismus                                                                                                                    | 794333                                        |
| Q8Y7J5     | <i>Imo1282/yneQ</i> | unbekannt                                | unbekannt                                                                                                                                             | 783033                                        |

<sup>#</sup>Informationen von <https://listiwiki.uni-goettingen.de> (Elfmann *et al.*, 2023); \*Korrigierte LFQ-Intensitäten: Die Summe der drei gemessenen Intensitäten pro Stamm (3 biologische Replikate) wurden durch die Anzahl der jeweiligen einzigartigen Peptide dividiert. Bei Werten, die unterhalb des Schwellenwertes von 250000 lagen, wurde eine Null eingetragen.

**Tabelle 22: De novo-synthetisierte Proteine in LMSW30 ( $\Delta$ reoM)**

| Uniprot ID | Locus ID            | Produkt <sup>#</sup>                                     | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                  | Mittelwert der korrigierten LFQ* Intensitäten |
|------------|---------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Q8Y8G4     | <i>Imo0940</i>      | unbekannt                                                | unbekannt                                                        | 28596133                                      |
| Q8Y5Q7     | <i>Imo1999</i>      | mögliche Glucosamin-Fructose-6-Phosphat-Aminotransferase | Zellwand-/Membranbiosynthese                                     | 2199467                                       |
| Q8Y905     | <i>Imo0737</i>      | mögliche D-Allose-Kinase (Zhang <i>et al.</i> , 2018)    | Translation; unbekannte Funktion                                 | 2073633                                       |
| Q8Y9R4     | <i>Imo0459</i>      | unbekannt                                                | unbekannt                                                        | 1484500                                       |
| Q8Y4E2     | <i>Imo2504</i>      | mögliches Peptidoglykan-lytisches Protein p45            | Zellwand-/Membranbiosynthese;<br>Zellwandabbau/-umsatz; Autolyse | 1196927                                       |
| Q8YAA8     | <i>Imo0243/sigH</i> | RNA-Polymerase-Faktor Sigma70                            | Transkription; Sigma Faktoren                                    | 1169520                                       |

| Uniprot ID | Locus ID       | Produkt <sup>#</sup>                           | Kategorie/Funktion <sup>#</sup>                                                            | Mittelwert der korrigierten LFQ* Intensitäten |
|------------|----------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Q8Y8K1     | <i>Imo0900</i> | unbekannt                                      | unbekannt                                                                                  | 1055667                                       |
| Q8Y3W7     | <i>Imo2712</i> | unbekannt                                      | Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel;<br>Pentose-Phosphat-Weg                           | 894807                                        |
| Q8Y4K1     | <i>Imo2437</i> | unbekannt                                      | unbekannt                                                                                  | 879827                                        |
| Q8Y8I4     | <i>Imo0918</i> | mögliches PRD/PTS-System IIA 2-Domänen-Protein | Transkription; Kohlenhydrattransport und -stoffwechsel;<br>Signaltransduktionsmechanismen; | 737800                                        |

<sup>#</sup>Informationen von <https://listiwiki.uni-goettingen.de> (Elfmann *et al.*, 2023); \*Korrigierte LFQ-Intensitäten: Die Summe der drei gemessenen Intensitäten pro Stamm (3 biologische Replikate) wurden durch die Anzahl der jeweiligen einzigartigen Peptide dividiert. Bei Werten, die unterhalb des Schwellenwertes von 250000 lagen, wurde eine Null eingetragen.

## Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift