

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Hana Kotková**

**Obecná stresová odpověď u *Staphylococcus aureus***  
**a její uplatnění při hyperosmotickém stresu**

General stress response in *Staphylococcus aureus*  
and its role in adaptation to hyperosmotic stress

Bakalářská práce

Školitel: **RNDr. Irena Lichá, CSc.**

Praha, 2017

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.5.2017

podpis

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat RNDr. Ireně Liché, CSc. za věnovaný čas, vstřícnost a odborné připomínky, které přispěly ke vzniku této bakalářské práce. Děkuji také své rodině za velkou podporu během celého studia.

# OBSAH

**Abstrakt**

**Abstract**

**Seznam zkratek**

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Odpověď na hyperosmotický stres</b> .....	<b>3</b>
2.1	Transportéry K <sup>+</sup> iontů .....	3
2.1.1	Kdp ATPázový systém.....	4
2.1.2	Ktr systém .....	5
2.2	Transportéry kompatibilních solutů .....	7
2.2.1	Transportéry pro prolin .....	7
2.2.2	Transportéry pro glycin betain .....	8
<b>3</b>	<b>Obecná stresová odpověď <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>9</b>
3.1	Objevy alternativních sigma podjednotek RNA polymerázy .....	9
3.2	Indukce obecné stresové odpovědi a její regulace .....	9
3.3	SigB-závislé geny .....	16
3.3.1	Počet SigB-závislých genů a jejich rozdělení .....	16
3.3.2	Geny pod SigB kontrolou.....	17
<b>4</b>	<b>Účast SigB v hyperosmotickém stresu</b> .....	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>28</b>

## ABSTRAKT

Hyperosmotický stres indukuje u halotolerantní bakterie *Staphylococcus aureus* stresovou odpověď, která jí pomáhá přežít i takové osmotické podmínky, které jsou pro většinu bakterií inhibující. Stresové odpovědi *S. aureus* zahrnují obecnou stresovou odpověď, která se aktivuje rychle na široké spektrum stresů, a je zajištěna expresí genů indukovaných prostřednictvím alternativní sigma B podjednotky RNA polymerázy (SigB), a více specifické odpovědi, které u hyperosmotického stresu souvisí s transportéry draselných iontů a transportéry kompatibilních solutů. Také některé faktory virulence (např. adhezivní Ehb protein) umožňují bakterii *S. aureus* přežít hyperosmotický stres v rámci hostitele a napomáhají tak jeho kolonizaci. V současnosti se ukazuje, že obecná stresová odpověď se přímo i nepřímo účastní specifické stresové adaptace prostřednictvím Kdp transportního systému pro draslík (Kdp transportéru) i transportérů kompatibilních solutů (PutP a OpuD). Exprese Kdp transportéru a velkého Ehb proteinu *S. aureus* je nepřímo závislá na SigB přes regulační systémy virulence Agr nebo ArlRS. Na osídlení hostitelských nik s nízkou vodní aktivitou může mít dále vliv tvorba biofilmu, na které se SigB významně podílí. Hyperosmotický stres aktivací SigB tedy spouští komplexní odpověď, která souvisí nejen s odpovědí na stres, ale také s virulencí a metabolismem této podmíněně patogenní bakterie.

**Klíčová slova:** *Staphylococcus aureus*, osmoadaptace, obecná stresová odpověď, SigB, virulence

## ABSTRACT

Hyperosmotic stress induces a stress response in a halotolerant bacteria *Staphylococcus aureus* that helps it to survive even the osmotic conditions that are inhibiting for most of the bacteria. Stress responses of *S. aureus* include a general stress response that activates rapidly on a wide range of stresses and is ensured by expression of genes induced by an alternative sigma B subunit of RNA polymerase (SigB), and more specific responses to hyperosmotic stress associated with transporters of potassium and transporters of compatible solutes. Also, some virulence factors (such as the adhesive Ehb protein) allow *S. aureus* to survive hyperosmotic stress within the host, thereby helping to colonize it. It is currently known that the general stress response directly and indirectly participates in the specific stress adaptation through the Kdp transport system for potassium (Kdp transporter) and transporters of compatible solutes (PutP and OpuD). Expression of the Kdp transporter and the large *S. aureus* Ehb protein is SigB dependent, via Agr or ArlRS virulence regulator systems. The formation of a biofilm, in which SigB is significantly involved, may also enable to colonize host niches with low water activity. Hyperosmotic stress by triggering SigB initiates a complex response that is associated not only with the response to stress but also with the virulence and metabolism of this opportunistic pathogenic bacteria.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, osmoadaptation, general stress response, SigB, virulence

## SEZNAM ZKRATEK

<b>SigB</b>	Alternativní sigma B faktor, podjednotka sigma B RNA polymerázy
<b><math>\Delta sigB</math></b>	Delece genu <i>sigB</i>
<b>Agr systém</b>	Doplňkový genový regulační systém účastnící se regulace exprese genů virulence (Accessory gene regulator system)
<b>ArlRS</b>	Dvoukomponentní systém účastnící se regulace exprese genů virulence (ArlS histidinová kináza, ArlR regulátor)
<b>c-di-AMP</b>	Cyklický diadenosin monofosfát
<b>Ebh</b>	Extracelulárně vázící se proteinový homolog (extracellular-binding protein homolog)
<b>GFP</b>	Zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
<b>KdpDE</b>	Dvoukomponentní systém aktivující transportní systém pro draslík a regulátor virulentních faktorů <i>S. aureus</i> (KdpD histidinová kináza, KdpE regulátor)
<b>KdpFABC</b>	Vysokoafinitní transportér pro K <sup>+</sup> ionty
<b>Ktr systém</b>	Nízkoafinitní transportér pro K <sup>+</sup> ionty
<b>MazEF</b>	Toxin antitoxin systém (MazE antitoxin, MazF toxin)
<b>OpuC</b>	Transportér kompatibilních solutů glycin betainu, cholinu, prolinu a karnitinu (OpuCA je ATP-vazebná komponenta tohoto transportéru)
<b>OpuD</b>	Transportér kompatibilních solutů glycin betainu a prolinu
<b>ProP</b>	Nízkoafinitní transportér pro prolin
<b>PutP</b>	Vysokoafinitní transportér pro prolin
<b>QS</b>	Quorum sensing
<b>RNAIII</b>	Transkript Agr systému s regulační i kódující funkcí vytvářený z promotoru P3
<b>Rot</b>	Represor toxinů (repressor of toxins)
<b><i>rsb</i> geny (<i>rsbU</i>, <i>rsbW</i>, <i>rsbV</i> a další)</b>	Geny regulující SigB (Regulator of Sigma B)
<b>SarA</b>	Stafylokokový doplňkový genový regulátor (Staphylococcal accessory gene regulator)
<b>SCV</b>	„Trpasličí“ kolonie (Small colony variants)
<b>Spa</b>	Stafylokokový protein A ( <i>Staphylococcus</i> protein A)
<b>TA</b>	Toxin-antitoxin systém
<b>UV</b>	Ultrafialové záření (ultraviolet light)

# 1 ÚVOD

Život každé bakterie doprovází stresové situace, kdy se i takto jednoduchý organismus musí vypořádat s působením vnějších podmínek, které jsou ve většině případů nepříznivé a nestálé.

Patogenní organismy, mezi které patří i *Staphylococcus aureus*, musí čelit navíc imunitnímu systému, solné bariéře v žaludku a nedostatku vodní aktivity na povrchu kůže. Schopnost vypořádat se s hyperosmotickým stresem je tedy zásadní pro kolonizaci hostitele a také pro mezi-hostitelský přenos, neboť *S. aureus* dokáže úspěšně přežít i v nízké vodní aktivitě na různých površích. Zásadou osmoadaptivních strategií je *S. aureus* jedna z nejvíce halotolerantních eubakterií (Vijaranakul et al. 1995) a úspěšným lidským kolonizátorem. Její konkurenční výhodou oproti jiným bakteriím je schopnost přežití při vodní aktivitě do 0,86. (Scott 1953)

Nicméně adaptace k jakémukoliv stresu, včetně hyperosmotického, je složitým a provázaným mechanismem, jemuž dosud nebylo zcela porozuměno. Výzkum odpovědi na hyperosmotický stres začal objevy transportérů specifické odpovědi, které transportem látek přes membránu udržují homeostázu buňky. Tyto systémy jsou označovány jako *mnohonásobné specifické transportní systémy* (multiple specific uptake systems). (shrnutí v Gründling 2013)

Na začátku dvacátého století byla u *Bacillus subtilis* objevena tzv. obecná stresová odpověď (shrnutí v review Hecker et al. 2007), což vedlo k novému náhledu na stresové odpovědi bakterií, ale i k pochopení regulace genů či celých operonů v rámci celkového metabolismu bakterií. Tato adaptace podle posledních výzkumů nastává stochasticky u buněk, u kterých již před vystavením stresu byly alespoň z části nastartovány stresové odpovědi. ( Mitchell et al. 2009; Locke et al. 2011). Po vystavení stresu právě tyto buňky přežívají a dávají vznik podobně adaptovaným buňkám, ostatní nepřízpusobené buňky jsou nepříznivými podmínkami zahubeny.

Po objevu obecné stresové odpovědi u *B. subtilis* se hledaly geny obecné stresové dráhy i u dalších bakterií, včetně *S. aureus*. Výzkumy potvrdily, že i u této podmíněně patogenní bakterie jsou některé tyto geny kódovány (Wu et al. 1996). Avšak v průběhu detailnějších studií se zjistila značná odlišnost obecných stresových odpovědí na několika úrovních. Především je tato odlišnost důležitá na úrovni operonu stresového sigma B faktoru (SigB), kdy některé geny nalezené u *B. subtilis* v *sigB* operonu *S. aureus* chybí, na úrovni regulační, neboť je indukována jinými mechanismy, ale i funkční, protože má

oproti *B. subtilis* význam v expresi virulentních faktorů. (shrnutí v review Hecker et al. 2007)

Obecná stresová odpověď, jak bylo zjištěno u *B. subtilis*, působí v širším smyslu a umožňuje buňkám nescifickou a preventivní ochranu bez ohledu na stres, který její indukci vyvolal. (shrnutí v review Hecker et al. 2007) Pod kontrolou alternativního SigB faktoru, který spouští obecnou stresovou odpověď, mohou být i některé komponenty specifické stresové odpovědi. Každá takto komplexní dráha musí být však na různých úrovních regulována, neboť je indukce odpovídající stresové odpovědi v nestresových podmínkách pro buňku nevýhodná. Je tedy dosud nevyřešenou otázkou, zda, a případně jakým způsobem, je možné obecnost či specifitu stresové odpovědi u bakterií regulovat. (Young et al. 2013)

Přestože mnoho vědců doposud vnímalo význam SigB *S. aureus* ve stresové adaptaci spíše jako vedlejší vzhledem k důležitosti SigB ve virulenci, jsou tyto funkce na různých úrovních propojené. Prokázání souvislosti adaptace na stres a virulence je důležité pro pochopení schopnosti patogena kolonizovat svého hostitele, a tudíž pro vývoj metod, jak by se mohlo kolonizaci zabránit. U *S. aureus* se také prokázal vliv SigB, na odolnost ke glykopeptidovým antibiotikům (vancomycin a teicoplanin), a rovněž k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům (methicilin, oxacilin). (Wu et al. 1996; Sieradzki & Tomasz 1998; Singh et al. 2003; Galbusera et al. 2011, Zhang et al. 2016) Kromě toho má pravděpodobně SigB význam v nastolení perzistence. (Tuchscherer et al. 2015) Vzhledem k rozšířeným rezistencím se v současné době stafylokoková onemocnění stávají obtížněji léčitelnými (shrnutí v review Chambers & Deleo 2009) a porozumění těmto mechanismům je zásadní pro další vývoj léčebných postupů. Takové metody by mohly být založeny na syntéze molekul, které by cíleně bránily aktivaci SigB, a tím by snižovaly odolnost bakterií ke stresům. (shrnutí v review Guldimann, 2016)

Cílem této práce je shrnout nejnovější poznatky o adaptaci *S. aureus* na hyperosmotický stres a porovnat úlohu specifických adaptací a obecné stresové odpovědi, jejíž úloha byla doposud prokazována pouze ve virulenci této podmíněně patogenní bakterie.

## 2 ODPOVĚĎ NA HYPEROSMOTICKÝ STRES

Hyperosmotický stres představuje stres, který je spojen s nízkou vodní aktivitou, obecněji nedostatkem využitelné vody pro bakterie, což může být způsobeno vysokou koncentrací solí nebo cukrů v médiu. V takovém prostředí rychle dochází k dehydrataci buňky vlivem výtoku vody do vnějšího prostředí. Postupně se snižuje turgorový tlak, dochází k inhibici celé řady procesů zahrnující buněčné dělení a replikaci DNA a v extrémních případech může hyperosmotické prostředí vyvolat až plazmolýzu buňky.

Po vystavení bakterií hyperosmotickému stresu dochází k rychlé adaptační odpovědi, která spočívá v akumulaci draselných iontů ( $K^+$  iontů), které jsou poté vyměňovány za malé nenabitě molekuly, tzv. kompatibilní soluty. Kompatibilní soluty jsou v závislosti na okolních podmínkách transportovány z vnějšího prostředí nebo *de novo* vytvářeny uvnitř buněk. Tyto soluty mají ochrannou buněčnou funkci tím, že stabilizují strukturu proteinů, chrání ji před denaturací nebo nesprávným sbalením, a tak udržují správnou enzymatickou aktivitu těchto proteinů. (shrnutí v review Lucht & Bremer 1994 a Sleator & Hill 2002)

Zprvu bych proto chtěla uvést transportéry *S. aureus*, které se podílejí na úvodní specifické odpovědi na hyperosmotický stres. Avšak význam těchto transportérů je často propojen i s jinými funkcemi u této bakterie.

### 2.1 Transportéry $K^+$ iontů

První výzkumy transportérů  $K^+$  iontů byly provedeny u *Escherichia coli*, později u *B. subtilis*, což jsou však organismy s nízkou tolerancí k hyperosmotickému stresu. (shrnutí v Gründling 2013) Není proto překvapením, že při výzkumu transportérů  $K^+$  iontů halotolerantní bakterie *S. aureus* a jejich porovnáváním s modelovými organismy se nacházely určité odlišnosti.

Podle Grahama a jeho spolupracovníků vede vystavení bakterií *S. aureus* prostředí o různých koncentracích NaCl ke kolísání buněčných zásob  $K^+$  iontů, nicméně u enterobakterií se hladina  $K^+$  iontů mění proporčně ke změnám osmolarity média. (Meury et al. 1985; Graham & Wilkinson 1992) Předpokládá se proto, že koncentrace  $K^+$  iontů je v buňce *S. aureus* konstitutivně vysoká bez ohledu na osmotický stres, avšak při hyperosmotickém stresu dochází ke zvýšenému příjmu  $K^+$  iontů z prostředí, a tyto ionty jsou následně vyměňovány za kompatibilní soluty. (Christian & Waltho 1964; Graham & Wilkinson 1992) Později byly u *S. aureus* objeveny následující transportéry pro draslík: Kdp transportní systém, nejlépe prostudovaný u *E. coli*, a Ktr systém, charakteristický pro *B. subtilis*. (Kuroda et al. 2001; Price-Whelan et al. 2013; Corrigan et al. 2013; Gries

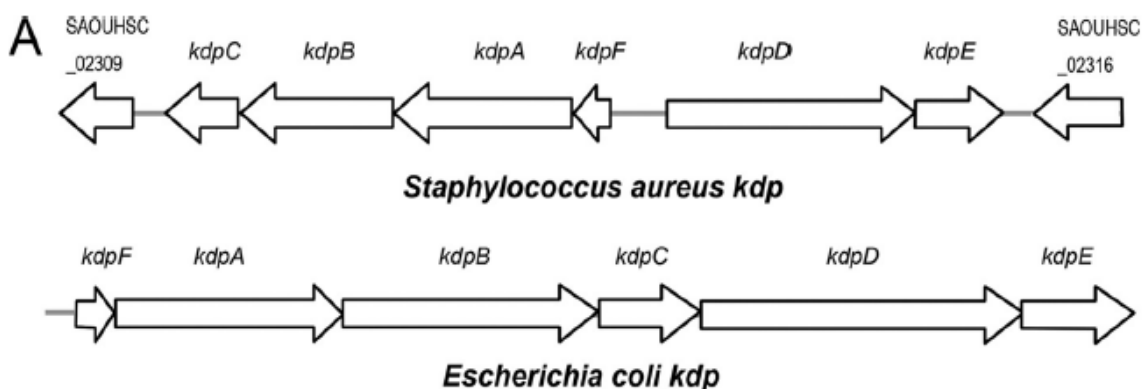
et al. 2013) Vše proto nasvědčuje tomu, že *S. aureus* sdílí transportéry dvou zcela odlišných druhů bakterií.

### 2.1.1 Kdp ATPázový systém

Kdp ATPázový systém je široce rozšířený KdpFABC komplex, který byl prvně identifikován u *E. coli*, ale poté byly jeho homology objeveny bioinformaticky i u různě nepříbuzných druhů, u grampozitivních, gramnegativních bakterií i u archeae a u sinic, kde byly objeveny dokonce dva *kdp* operony. (Ballal 2005; shrnuto v Gründling 2013). I přes značné rozšíření se předpokládá, že rodina Kdp ATPáz je mnohem méně přenášena horizontálním přenosem než jiné rodiny P-ATPáz vzhledem k mnohaposjednotkovému složení Kdp systému. (shrnuté v review Chan et al. 2010)

Jedná se o vysokoafinitní multikomponentní transportér, který je poháněn hydrolyzou ATP. Jeho exprese je regulována histidinovou kinázou KdpD a regulátorem KdpE. Tyto dva geny tvoří tzv. dvoukomponentní systém. U *E. coli* za nízkých externích koncentrací  $K^+$  iontů (menších než 2 mM) nebo za hyperosmotického stresu KdpD fosforyluje KdpE a ten aktivuje transkripci *kdpFABC*. Za vysokých externích koncentrací  $K^+$  iontů jsou *kdp* operony u všech objevených organismů reprimovány. (shrnuté v Gründling 2013 a v review Ballal et al. 2007)

Také u *S. aureus* je KdpDE dvoukomponentním systémem a má význam v expresi *kdpFABC* operonu. Jak je patrné z obrázku 1, operon nalezený u *S. aureus* se liší od *E. coli* umístěním genů v genomu, kdy *kdpDE* je umístěn v reverzní orientaci proti směru transkripce od *kdpFABC*. (Xue et al. 2011) Z toho vyplývá, že transkripce Kdp systému *S. aureus* je řízena ze dvou divergentních promotorů.

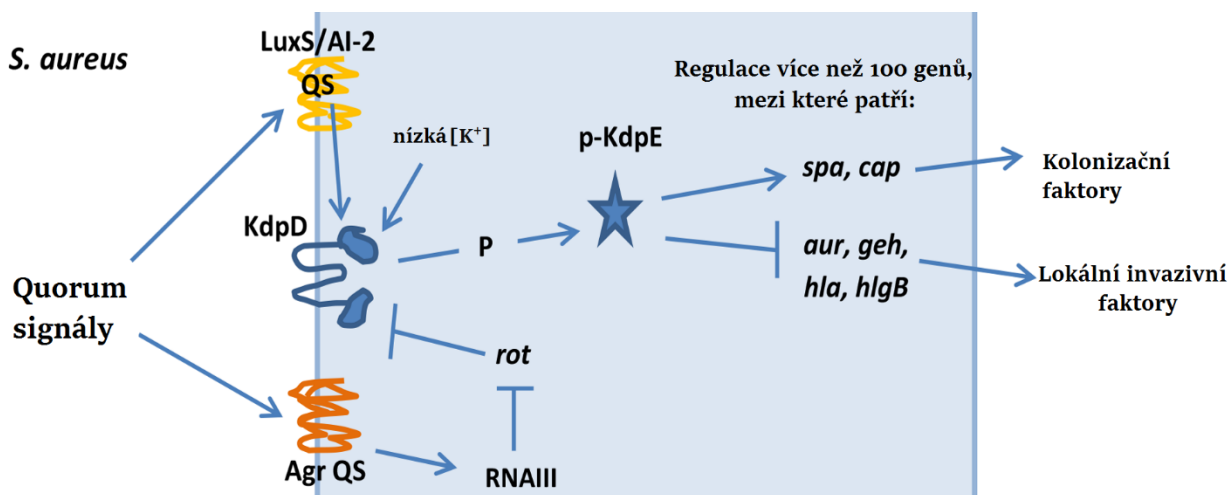


Obrázek 1: Porovnání *kdp* operonů *S. aureus* a *E. coli* (Xue et al. 2011)

Xue a kol. objevili, že na rozdíl od *E. coli* KdpE *S. aureus* na základě signálu z KdpD vždy (za nízké i vysoké koncentrace  $K^+$  iontů) reprimuje transkripci *kdpFABC*. To vedlo k otázkám, zda vůbec nebo za jakých podmínek je KdpDE spojen s transportem

$K^+$  iontů. (Xue et al. 2011) Avšak následující studií se účast KdpDE v aktivaci transkripce *kdpFABC* potvrdila, neboť KdpE aktivoval transkripci *kdpFABC* operonu za hyperosmotického stresu (2 M NaCl, sacharózy, nikoliv však v přítomnosti 2 M KCl). (Price-Whelan et al. 2013) Také se nedávno ukázalo, že doména univerzálního stresového proteinu (USP) histidinové kinázy KdpD *S. aureus* váže cyklický diadenosin monofosfát (c-di-AMP) a v této formě inhibuje transkripci operonu *kdpFABC*. (Moscoso et al. 2016)

Detailnější studium KdpDE dvoukomponentního systému *S. aureus* dále ukázalo jeho úlohu v regulaci transkripce virulentních genů *spa* (kódující stafylokokový protein A), *cap* (kódující enzym syntézy polysacharidové kapsuly), *hla* (kódující alfa hemolysin), *aur* (kódující aureolysin), *geh* (kódující lipázu) a *hlgB* (kódující komponentu B gama hemolysinu). Jak je znázorněno na obrázku 2, histidinová kináza KdpD odpovídá též na signál bakteriální density přes systémy quorum sensing (QS). KdpE následně reguluje dalších přibližně 100 genů, především virulentních faktorů. (Xue et al. 2011) To může být výsledkem druhově specifické adaptace, protože evolučně je význam KdpDE v homeostáze  $K^+$  iontů starší než jeho uplatnění ve virulenci. (Freeman et al. 2013) Jak je vidět na obrázku 2 a bude uvedeno v následujících kapitolách, je KdpDE mimo jiné pod kontrolou Agr QS (doplňkového genového regulačního systému závislého na quorum sensing) (Xue et al. 2011), který je regulován alternativním SigB faktorem. (Bischoff et al. 2001) KdpDE tak může být prostředníkem mezi SigB a hyperosmotickým stresem.



Obrázek 2: Účast KdpDE ve virulenci a schéma regulace KdpDE (přeloženo podle Freeman et al. 2013)

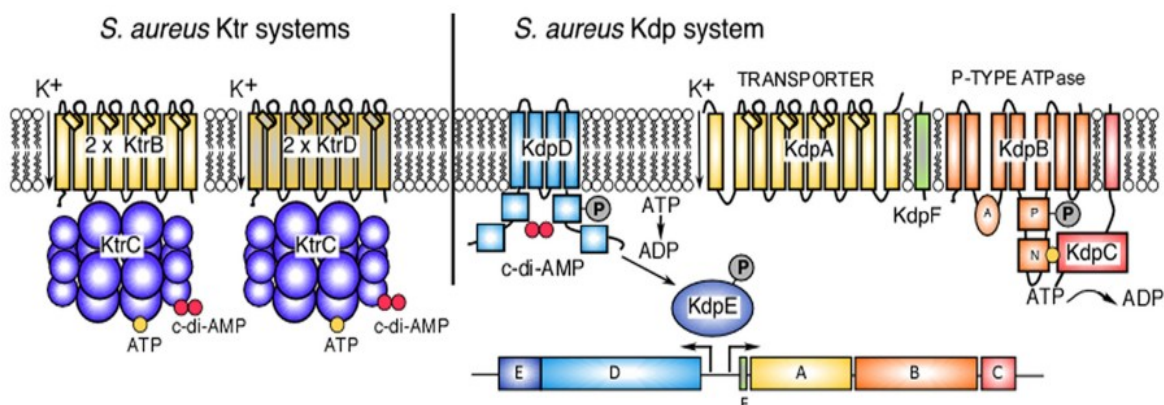
### 2.1.2 Ktr systém

Podle prvotních studií Ktr systém *S. aureus* kóduje nízkoafinitní transportér pro  $K^+$  ionty. (Price-Whelan et al. 2013) Bioinformaticky byly objeveny dva proteiny se sekvenční podobností okolo 50 % proteinům KtrB a KtrD *B. subtilis*. Třetím objeveným

proteinem je KtrA, někdy označovaný KtrC, obsahující vazebné místo pro c-di-AMP (viz obrázek 3), který po vazbě c-di-AMP inhibuje příjem  $K^+$  iontů. KtrA je tudíž regulačním proteinem, který ovlivňuje aktivitu transportéru KtrB a KtrD. Tyto tři geny leží odděleně na chromozomu a celý tento unikátní systém je zřejmě konzervovaný u rodu *Staphylococcus*. (Corrigan et al. 2013; Gries et al. 2013; Gries et al. 2016)

Gries a jeho kolegové v práci z roku 2013 potvrdili tento systém jako hlavní pro příjem draselných iontů v alkalickém prostředí a nízké hladině draslíku. Příjem  $K^+$  iontů prostřednictvím Ktr systému je důležitý pro udržování membránového potenciálu a regulaci buněčného osmotického tlaku. Kdp systém je zde uváděn jako sekundární, jehož vliv na hladinu  $K^+$  iontů je v těchto podmínkách spíše zanedbatelný. (Gries et. al, 2013).

Struktura dvou systémů pro transport  $K^+$  iontů u *S. aureus* je ukázána na obrázku 3.



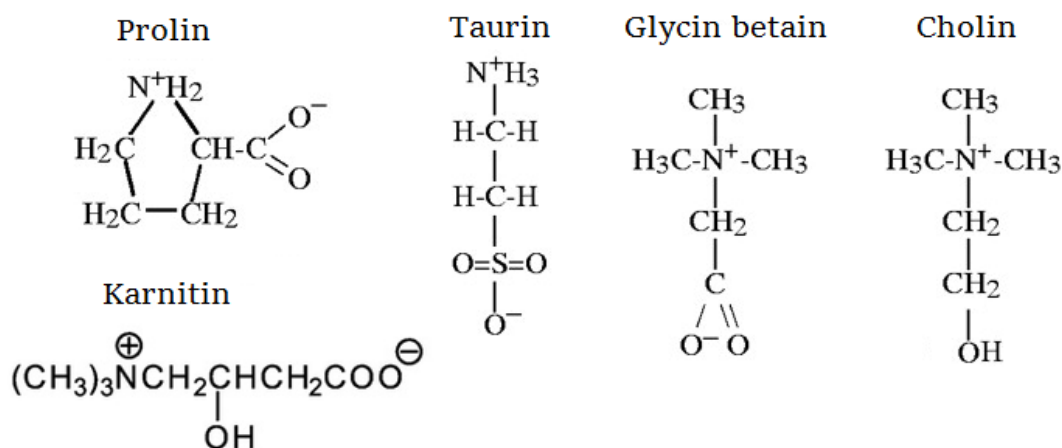
Obrázek 3: Draslíkové transportéry *S. aureus* (Gründling 2013)

Ktr systém má dimerické membránové komponenty KtrB a KtrD a cytoplazmatický oktamer KtrC (někdy označovaný jako KtrA) (vlevo). Aktivita tohoto transportéru je regulována vazbou ATP a c-di-AMP na podjednotku KtrC, na rozdíl od Kdp systému však u Ktr nedochází k hydrolyze ATP.

Kdp dvoukomponentní systém obsahuje senzorovou histidinovou kinázu KdpD a regulátor KdpE, který aktivuje transkripci *kdpFABC* operonu (vpravo). KdpA je membránová komponenta, která přenáší draslík. KdpB je ATPáza P typu, hydrolyzou ATP poskytuje energii pro přenos  $K^+$  iontů. KdpC je zakotven transmembránově svým N-terminálním helixem a zřejmě zvyšuje afinitu KdpB pro ATP. KdpF je malý hydrofobní protein s jedinou transmembránovou doménou, který zajišťuje stabilitu celého Kdp komplexu. (shrnuto v Gründling 2013)

## 2.2 Transportéry kompatibilních solutů

Mezi hlavní kompatibilní soluty *S. aureus* patří L-prolin, taurin, glycin betain (popř. cholin, který je oxidován na glycin betain) a karnitin. (Graham & Wilkinson 1992; Vilhelmsson & Miller 2002) Jejich vzorce jsou ukázány na obrázku 4.



Obrázek 4: Vzorce nejčastějších kompatibilních solutů *S. aureus* (upraveno a přeloženo podle Yancey 2005 a Lever & Slow 2010)

### 2.2.1 Transportéry pro prolin

Graham a jeho spolupracovníci potvrdili prolin jako významný osmoprotektant bakterie *S. aureus*. Radioaktivně značený prolin přidali do substrátu s NaCl a sledovali jeho rychlou akumulaci do buněk. (Graham & Wilkinson 1992) Akumulace prolinu probíhá ihned v prvních okamžicích po vystavení hyperosmotickému stresu, prolin je proto jeden z prvních osmolytů reagujících na hyperosmotický stres. (Townsend & Wilkinson 1992)

U *S. aureus* byly na začátku 90. let identifikovány 2 typy transportérů pro prolin – nízkoafinitní a vysokoafinitní. Pro oba systémy platí, že jsou závislé na nízkých koncentracích sodných iontů (milimolárních), ačkoliv vysokoafinitní je stimulován nízkou koncentrací Na<sup>+</sup> více než nízkoafinitní. Oba dva jsou také v porovnání s jinými systémy (např. ProP *E. coli*) poměrně specifické pro prolin (Bae & Miller 1992; Townsend & Wilkinson 1992)

Vysokoafinitním systémem *S. aureus* je PutP, který je ze 49 % homologní k transportéru PutP *E. coli*. (Wengender & Miller 1995) Pozdější poznatky však dávají do vztahu tento vysokoafinitní systém *S. aureus* s transportérem OpuE *B. subtilis*, protože stejně jako u OpuE *B. subtilis* je jeho transkripce řízena alternativním SigB faktorem. (von Blohn et al. 1997; Schwan et al. 2006) V prvních studiích se spekovalo, že účelem

PutP je též poskytovat prolin jako zdroj uhlíku a dusíku, neboť většina kmenů *S. aureus* je auxotrofní pro prolin a musí jej importovat z prostředí. (Gladstone 1937; Bae & Miller 1992) Transportovat prolin je tak zřejmě důležité ze dvou důvodů: z důvodu ochrany před hyperosmotickým stresem a z nutriční potřeby.

Nízkoafinitní systém má širší substrátovou specificitu a kromě L-prolinu může transportovat také D-prolin a jejich další deriváty. (Townsend & Wilkinson 1992) Podle pozdějších prací má funkci i v přenosu glycin betainu. (Pourkomialian 1998) Je funkčním homologem ProP *E. coli* a ProU *Salmonella typhimurium* se srovnatelnou afinitou k prolinu a s podobnou funkcí. Důležitou odlišností od jeho homologa u *E. coli* ale je, že optimální aktivita transportéru ProP *S. aureus* je v rozmezí 0,75 – 1 M NaCl, je tedy aktivován hyperosmotickým stresem. (Bae & Miller 1992)

### 2.2.2 Transportéry pro glycin betain

Pro transport glycin betainu byly objeveny dva transportéry, podobně jako u prolinu, jeden nízkoafinitní a jeden vysokoafinitní. Vysokoafinitní systém pro glycin betain je méně stimulován hyperosmotickým stresem a je velmi specifický pro svůj substrát glycin betain, avšak bylo prokázáno, že nízkoafinitní systém může transportovat také prolin. (Bae & Miller 1992; Pourkomialian & Booth 1992) Pourkomialian ze svých výsledků nakonec vyhodnotil, že je tento nízkoafinitní systém pro glycin betain identický s nízkoafinitním systémem pro prolin a označil ho jako glycin betain/prolinový transportér (BPII). (Pourkomialian & Booth 1992; Pourkomialian 1998) Transport obou nejdůležitějších kompatibilních solutů je z toho důvodu vzájemně ovlivňován.

Skupina vědců Miller a kol. potvrdila glycin betain jako převládající kompatibilní solut uvnitř bakterie *S. aureus* a zdůraznila, že jde o nejsilnější osmoprotektant této bakterie. (Miller et. al., 1991) Jak se pozdějšími studii ukázalo, glycin betain má zcela zásadní vliv pro růst buněk *S. aureus* ve vysoké koncentraci NaCl (2,5 M), neboť zvyšuje růstovou rychlost buněk rostoucích v takovém prostředí, umožňuje jim zachovat původní velikost a též opravuje zkrácené mezipeptidové můstky v buněčné stěně. (Vijaranakul et al. 1995) U žádného jiného osmoprotektantu takové funkce dosud nebyly prokázány, a proto je glycin betain v buňce *S. aureus* nenahraditelný.

### 3 OBECNÁ STRESOVÁ ODPOVĚĎ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Obecná stresová odpověď zajišťuje u bakterií komplexní ochranu buňky proti širokému spektru stresů. Je nastartována zvýšením exprese alternativního SigB faktoru, který poté řídí transkripci SigB-závislých genů. Podjednotka RNA polymerázy SigB je kódována genem *sigB*, který je u *B. subtilis* i *S. aureus* umístěný v operonu *rsb* genů (regulátorů SigB) podílejících se na regulaci aktivace SigB. (shrnutí v review Hecker et al. 2007)

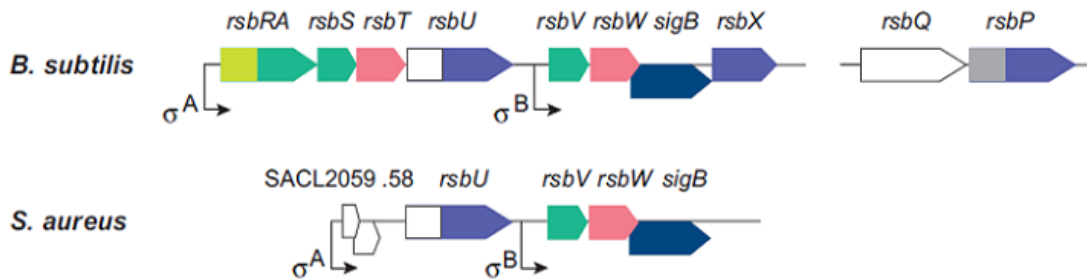
#### 3.1 Objevy alternativních sigma podjednotek RNA polymerázy

Modelovým organismem pro zkoumání alternativních faktorů je *B. subtilis*, u kterého byl v roce 1979 jako první objeven SigB faktor (Haldenwang & Losick 1979), a poté následovaly objevy dalších sigma faktorů u *B. subtilis* i u jiných bakterií. U *Staphylococcus aureus* byly doposud identifikovány čtyři sigma podjednotky: SigA (housekeeping podjednotka), SigB (úloha v obecné stresové odpovědi) (Wu et al. 1996) a později SigH (úloha v přirozené kompetenci) (Morikawa et al. 2003) a SigS (předpokládaná funkce ve stresových odpovědích a patogenezi) (Shaw et al. 2008). Podjednotka SigB je dosud nejprozkoumanější, výzkumy u patogenní bakterie *S. aureus* však zjistily jen malou podobnost s modelovým SigB *B. subtilis*. (Bischoff et al. 2004)

#### 3.2 Indukce obecné stresové odpovědi a její regulace

Podle dosavadních poznatků je obecná stresová odpověď *S. aureus* indukována alkalickým a oxidativním stresem, vysokou teplotou,  $MnCl_2$ , a NaCl. (Kullik et al. 1998; Giachino et al. 2001; Senn et al. 2005; Pané-Farré et al. 2006) Na rozdíl od *B. subtilis* však snižování zásob ATP (hladovění) a ethanolový stres není signálem pro aktivaci SigB, což pravděpodobně souvisí s odlišností operonu *sigB*. (Chan et al. 1998; Hecker et al. 2007)

Operon alternativního sigma faktoru *S. aureus* se odlišuje od *B. subtilis*, tím, že postrádá geny pro tzv. stresozóm *rsbR*, *rsbS* a *rsbT* a také pro fosfatázu *rsbP* a hydrolázu *rsbQ*, které jsou u *B. subtilis* zapojeny v odpovědi na nutriční stres. (Pané-Farré et al. 2006). *SigB* operon *S. aureus* obsahuje geny *rsbU*, *rsbV*, *rsbW*, *sigB*, shodné s operonem *B. subtilis*, ale navíc obsahuje geny pro toxin-antitoxin systém *mazE* a *mazF* (viz obrázek 5). (Wu et al. 1996; Donegan & Cheung 2009) U *B. subtilis* je *sigB* operon řízen ze dvou promotorů SigA-závislého a SigB-závislého, u *S. aureus* jsou promotory tři (viz obrázek 7 na straně 13). (Donegan & Cheung 2009)



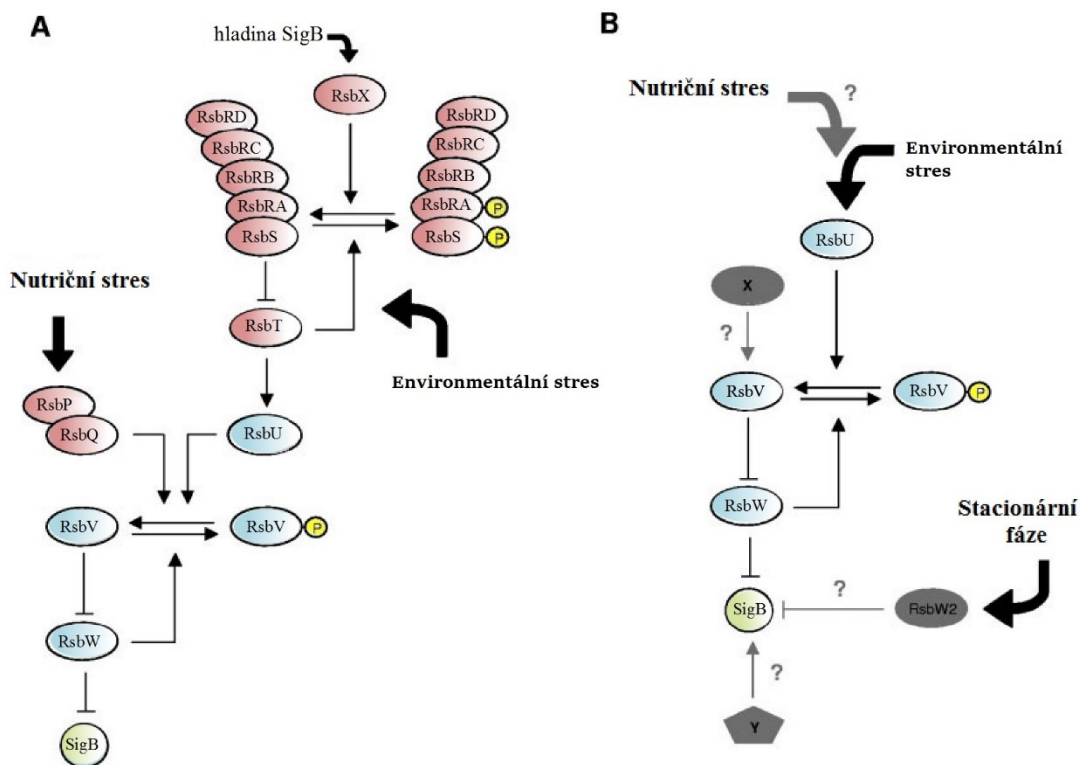
Obrázek 5: Porovnání *sigB* operonů *B. subtilis* a *S. aureus* (Hecker et al. 2007)  
SACL2059 a SACL2058 jsou dva později objevené geny *mazE* a *mazF*

Giachino a jeho kolegové dokázali u *S. aureus*, že pro spuštění dráhy je zásadní fosfatáza RsbU, protože fenotypový projev její delecce byl podobný fenotypovému projevu delecce celého operonu ( $\Delta$ *rsbUVWsigB*), a to vedlo ke snížení odpovědi na výše uvedené stresové stimuly. (Giachino et al. 2001)

RsbW je potvrzen jako anti-sigma faktor a účastní se negativní posttranslační regulace vazbou na SigB. (Miyazaki et al. 1999) Tento faktor se podobně jako u *B. subtilis* váže na SigB nebo na anti-anti-sigma faktor RsbV, pokud je RsbV defosforylován. RsbU defosforyluje RsbV na serinu (Ser57) a ten potom vyvazuje RsbW z komplexu RsbW-SigB. Tomuto mechanismu se říká partnerské přepínání. SigB se uvolní, váže se ke katalytickému jádru RNA polymerázy a tento komplex poté zahajuje transkripci SigB-závislých genů. (Senn et al. 2005; Hecker et al. 2007, Pané-Farré et al. 2009) Podobně jako u *B. subtilis* je tudíž RsbU *S. aureus* nepřímý pozitivní regulátor SigB. (Senn et al. 2005) Způsob jeho aktivace se ale u těchto dvou grampozitivních bakterií zásadně liší, porovnání jednotlivých drah aktivace je ukázáno na obrázku 6. Při nutričním stresu u *B. subtilis* RsbU není aktivován a jeho funkci zastává fosfatáza RsbP. (Hecker et al. 2007)

Na obrázku 6 je uvedena komplexní regulace, přes kterou se komponenty stresozómu u *B. subtilis* (RsbS, RsbT a RsbR) účastní aktivace RsbU. Proto nastaly spekulace ohledně aktivace RsbU u *S. aureus*, který komponenty stresozómu postrádá. Vzhledem k tomu, že zvýšená exprese RsbU může vést k okamžité aktivaci SigB, předpokládalo se, že RsbU nemusí vyžadovat aktivátor odpovídající na stresový stimul. Podle jiné hypotézy je fosfatázová aktivita RsbU kontrolována regulačním mechanismem v odpovědi na stres, což je podpořeno tím, že množství RsbU se během růstového cyklu příliš nemění. (Senn et al. 2005) Někteří vědci také uvažovali, že při indukci SigB-závislých genů záleží především na dostupnosti katalytického jádra RNA polymerázy k SigB, než na kontrole fosfatázové aktivity RsbU a modelu partnerského přepínání. Kompetice mezi podjednotkami SigA a SigB o katalytické jádro RNA

polymerázy tak může být další způsob nepřímé regulace aktivace SigB-závislých genů. (Pané-Farré et al. 2009)



Obrázek 6: Porovnání regulace SigB u *B. subtilis* (A) a *S. aureus* (B) (upraveno a přeloženo podle Senn et al. 2005)

Zásadním rozdílem v operonu *S. aureus* je přítomnost dvou krátkých genů *mazE* a *mazF* umístěných před operonem *rsbUVW-sigB*, s jehož transkripcí jsou tyto geny propojeny, jak je ukázáno na obrázku 7 (strana 13). (Wu et al. 1996; Donegan & Cheung 2009)

Geny *mazE* a *mazF* kódují toxin-antitoxin systém (TA), který je u všech bakterií z rodu *Staphylococcus* asociován s *rsbUVW-sigB* operonem. (Schuster et al. 2015) Tento TA systém vykazuje určité sekvenční i funkční podobnosti se systémem MazEF *E. coli*. (Kullik et al. 1998; Fu et al. 2007) Nedávnou strukturní studií bylo objeveno, že nejbližším homologem MazF toxinu *S. aureus* je YdcE, toxin TA systému YdcDE *B. subtilis*, se kterým MazF *S. aureus* sdílí 64% sekvenční identitu. (Pellegrini et al. 2005; Zorzini et al. 2014) MazEF se vyskytuje také u bakterie *Listeria monocytogenes*, u které jsou geny pro tento systém rovněž lokalizovány v *sigB* operonu. (Schmitter 2014) Současné výzkumy však naznačují, že tyto TA systémy nemají stejnou funkci. MazEF *L. monocytogenes* totiž nemá vliv na geny v *sigB* operonu, jako je tomu u *S. aureus*, ale

namísto toho ovlivňuje expresi SigB-závislých genů *opuCA* (kódující ATP vazebnou doménu OpuC transportéru), *lmo0880* (kódující proteinový prekurzor asociovaný s buněčnou stěnou) a možná dalších dosud neidentifikovaných SigB-závislých genů. Operon *sigB* a TA systém MazEF tedy zřejmě nejsou u *Listeria monocytogenes* přímo spřaženy. (Curtis et al. 2017)

MazE *S. aureus* je nestabilním antitoxinem s krátkým poločasem rozpadu (18 min), který váže a inaktivuje stabilní toxin MazF. (Donegan & Cheung 2009; Donegan et al. 2010) MazE je odstraňován proteázou ClpCP (kaseinolytickou proteázou obsahující podjednotky C a P), což bylo dokázáno tak, že kmeny s delecí v *clpC* a *clpP* genu vykazovaly vyšší stabilitu MazE produktu. (Donegan et al. 2010)

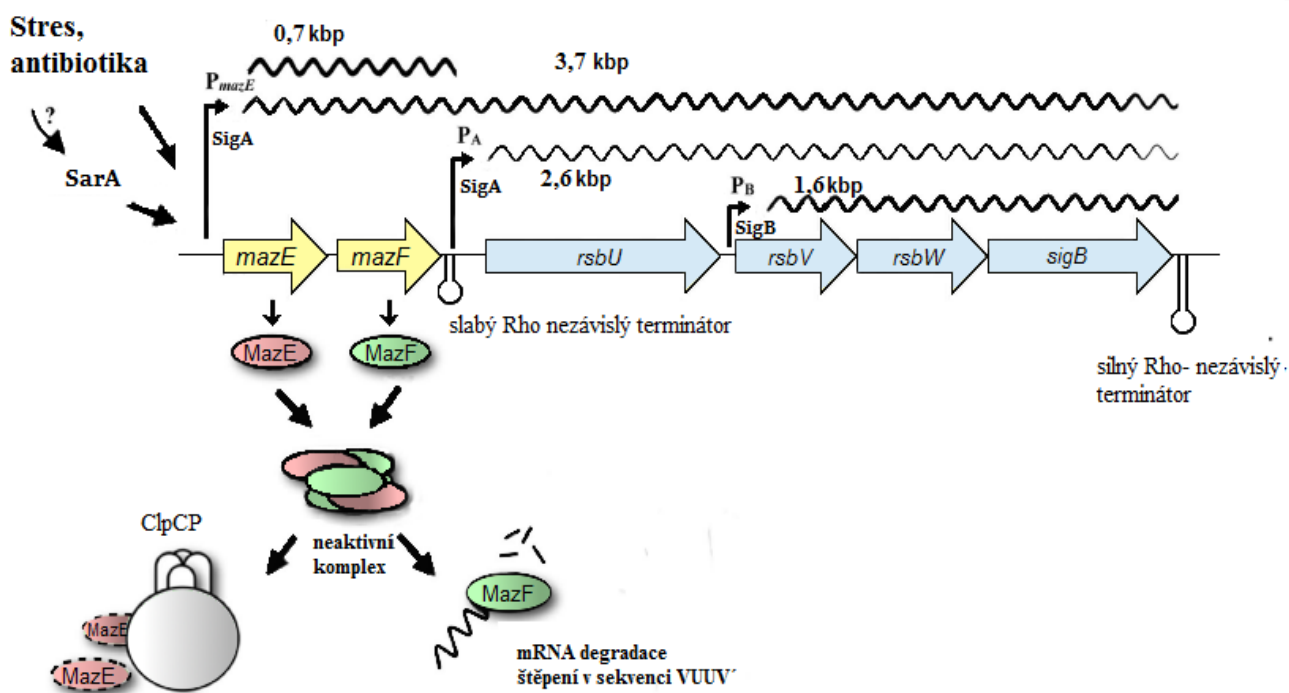
Pokud MazE chybí, MazF není inhibován a štěpí dostupnou mRNA v konkrétní sekvenci (viz obrázek 7). (Fu et al. 2007; Donegan & Cheung 2009) Tato sekvence je často bohatá na uracil, podle jedné práce MazF štěpí sekvence VUUV' (kde V a V' může být jakákoliv jiná báze než U, V a V' se mohou lišit) (Fu et al. 2009), podle jiné práce MazF štěpí v sekvenci UACAU. (Zhu et al. 2009) Některé geny obsahují sekvenci UACAU, popř. VUUV', s větší pravděpodobností, a proto jsou mRNA těchto genů citlivější ke štěpení MazF. (Fu et al. 2009; Zhu et al. 2009; Schuster et al. 2015)

Mezi geny obsahující vysoký počet UACAU sekvencí patří u *S. aureus* *sraP* (kódující na serin-bohatý povrchový adhezín krevních destiček) a také další geny, které mají souvislost s virulencí, například gen *spa* (kódující stafylokokový protein A). Schuster a kol. ve svých pokusech ukázali, že MazF může štěpit také *rsbW* mRNA, avšak vytvořením mutantů RsbW fúzí s GFP a měřením fluorescence nebyla zaznamenána výrazná změna v množství proteinu RsbW. MazF má tak zřejmě funkci pouze k doladování genové exprese RsbW. Ke stejnému závěru vedlo i otestování virulentního faktoru Spa shodným experimentem. (Zhu et al. 2009; Schuster et al. 2015) Jinou studií naopak bylo dokázáno, že MazF cílí na *sigB*, *hla* a *spa* mRNA (viz obrázek 8 na straně 14), protože obsahují s větší frekvencí VUUV' sekvence. (Fu et al. 2009)

Štěpení mRNA MazF toxinem v nepřítomnosti MazE vede primárně k zastavení růstu, proteosyntéza je štěpením mRNA zpomalena a buňka musí investovat energii do ochrany důležitých genových transkriptů, jako jsou mRNA esenciálních genů *recA* (kódující rekombinázu A), *gyrB* (kódující podjednotku B DNA gyrázy) nebo *sarA* (kódující stafylokokový doplňkový genový regulátor). Uvádí se, že zmíněná ochrana je zprostředkována určitými RNA vazebnými proteiny, které se váží na dané mRNA a zabraňují štěpení ve specifické sekvenci endoribonukleázou MazF. Účinek toxinu MazF proto nevede ihned ke smrti bakteriální buňky, ale díky ochraně esenciálních genů

dochází pouze k zastavení růstu a obnovením produkce MazE antitoxinu může růst pokračovat. (Fu et al. 2007; Fu et al. 2009)

Transkripce genů *mazE* a *mazF* je řízena ze SigA-závislého promotoru *PmazE*, který vytváří dva různé transkripty: 0,7 kbp *mazEF* transkript, kdy se přepíše pouze TA systém ukončený slabým *rho*-nezávislým terminátorem, kterým se RNA polymeráza může prociťt dále a vytvořit 3,7 kbp dlouhý transkript *mazEF-rsbUVW-sigB*. Dalším promotorem, jak je vidět na obrázku 7, je také SigA-závislý promotor, který vytváří 2,6 kbp *rsbUVW-sigB* transkript a třetím SigB-závislý promotor, ze kterého se transkribuje *rsbVW-sigB* transkript o délce 1,6 kbp. (Senn et al. 2005; Donegan & Cheung 2009) Vzhledem ke kotranskripci *mazEF* s *rsbUVW-sigB* se předpokládá, že *PmazE* je vyžadován pro úplnou aktivitu SigB *S. aureus*. (Donegan & Cheung 2009) *In vitro* studie ukázaly, že za solného a teplotního stresu promotor *PmazE* (označovaný v práci Senn a jejích kolegů z roku 2005 jako Sig<sub>p1</sub>) je oproti zbývajícím dvěma promotorům aktivní především během časných růstových fázích, avšak množství SigB zůstává zásluhou ostatních promotorů v průběhu celého růstového cyklu konstantní. (Senn et al. 2005)

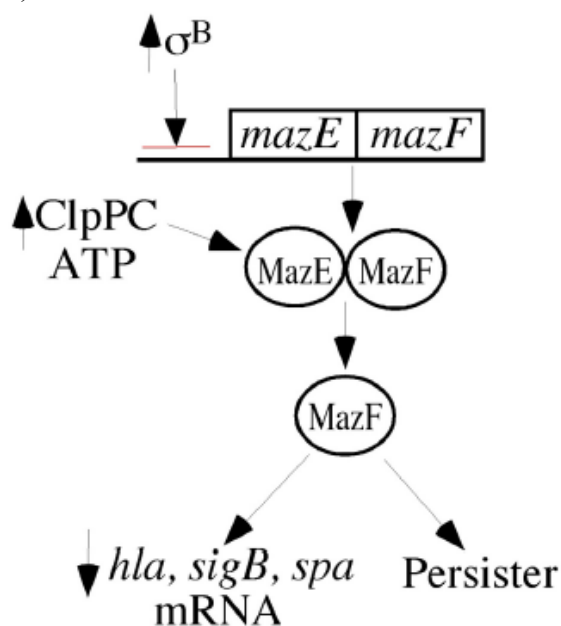


Obrázek 7: MazEF systém a navrhovaný systém regulace *sigB* operonu (upraveno a přeloženo podle Donegan et al. 2009)

Promotor *PmazE* je negativně ovlivňován produktem genu *sigB*, avšak přímá represe *PmazE* SigB je nepravděpodobná, protože *PmazE* je SigA-závislý promotor. Proto je represe zřejmě zprostředkovaná nepřímo SigB-závislým regulátorem. To, že je *PmazE* reprimován SigB-závislým regulátorem, a nikoliv antitoxinem MazE, se zdá překvapivé, neboť mnoho TA systémů je schopno autoregulace, kdežto MazEF *S. aureus* pravděpodobně nikoliv. (Donegan & Cheung 2009)

Pozitivně je *PmazE* regulován proteinem SarA, významným regulátorem exprese genů virulence, který se přímo váže na repetice okolo promotorových -10 a -35 SigA-vazebných sekvencí. (Donegan & Cheung 2009) SarA je však kromě toho součástí SigB regulonu, kdy SigB pozitivně reguluje SarA. (Deora et al. 1997) SigB a SarA se tak navzájem ovlivňují.

V práci vědců Donegan & Cheung se také potvrdilo, že vystavení *S. aureus* některým antibiotikům vede ke stimulaci transkripce TA systému MazEF. (Donegan & Cheung 2009) Později bylo zjištěno, že kmen s delecí TA systému ( $\Delta mazEF$ ) vykazoval větší citlivost k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům. (Schuster et al. 2015) Příčina této vlastnosti TA systému MazEF *S. aureus* není známa, avšak s ohledem na MazEF *E. coli* se pracovalo s hypotézou, že TA systém *S. aureus* bude mít význam v nastolení perzistence. (Schuster et al. 2015) U *E. coli* se ribonukleázy TA systémů účastní globální inhibice translace proteinů a nastolení dormance vedoucí k perzistenci. (Maisonneuve et al. 2011) Také obrázek 8 pochází z review, které předpokládá účast MazEF *S. aureus* v perzistenci. (Proctor et al. 2014)



Obrázek 8: Shrnutí regulace MazEF TA systému *S. aureus* (upraveno podle Proctor et al. 2014)

Ze současných studií naopak může vyplývat, že TA systémy *S. aureus* nemusejí mít na vznik perzisterů vliv, neboť delece všech TA systémů (včetně MazEF) neovlivnila hladinu perzisterů. (Conlon et al. 2016) I přesto je pravděpodobné, že tento TA systém může perzistenci ovlivňovat v jiných specifických podmínkách, nebo že u *S. aureus* nemusejí být některé TA systémy dosud známy.

### 3.3 SigB-závislé geny

Již s prvními objevy alternativního SigB faktoru u *S. aureus* se začalo ověřovat, zda geny SigB-závislé u *B. subtilis*, jsou totožné u této patogenní bakterie.

#### 3.3.1 Počet SigB-závislých genů a jejich rozdělení

V první studii, kterou provedla skupina Gertze, bylo objeveno 27 SigB-závislých genů *S. aureus*, z nichž 20 bylo homologních s geny *B. subtilis*, ale jen 7 z nich byly rovněž známé SigB-závislé geny. (Gertz et al. 2000) Z výsledků transkriptomické analýzy třech různých kmenů *S. aureus* publikované v roce 2004 je počet genů ovlivněných SigB stanoven na více než 250. (Bischoff et al. 2004) Avšak počet těchto genů se v průběhu dalších výzkumů lišil, což je dáno tím, že mnoho jich je SigB-závislých jen za určitých podmínek, například v alkalickém stresu nebo v dané růstové fázi, nebo jsou ovlivněny SigB faktorem nepřímo. (Pané-Farré et al. 2006) Odlišné výsledky transkriptomických studií mohou být také způsobeny použitím různých kmenů *S. aureus*. (Pfortner et al. 2014)

Další rozsáhlou transkriptomickou studií z roku 2006 bylo identifikováno 122 SigB-závislých genů za podmínek alkalického stresu zahrnující geny kódující proteiny pro syntézu buněčné stěny, geny kódující regulační proteiny, podjednotky enzymů metabolických drah či podjednotky transportních systémů a také proteiny účastníci se proteinové degradace. (Pané-Farré et al. 2006) Jedním ze SigB-závislých transportérů je Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, který je důležitý pro udržování pH v alkalických podmínkách a účastní se detoxikace Na<sup>+</sup> a Li<sup>+</sup> iontů. (Gertz et al. 2000; Pané-Farré et al. 2006; Cebrián et al. 2015) V téže studii je také potvrzen pozitivní vliv SigB na gen pro katalázu (*katA*), která je důležitá pro odpověď na oxidativní stres. (Pané-Farré et al. 2006)

V nedávné době se přibližný počet genů v SigB regulonu *S. aureus* odhadoval na 200, u *B. subtilis* na 150. (shrnutí v review Guldemann et al. 2016) V roce 2016 bylo v SigB regulonu *S. aureus* objeveno dalších 86 genů. (Mäder et al. 2016) Je však zřejmé, že geny pod kontrolou SigB se navzájem liší mezi *B. subtilis* a *S. aureus*, kdy překryv SigB regulonů u těchto bakterií je pouze 12 % (Pané-Farré et al. 2006), což je dáno jejich odlišnými životními strategiemi.

Určit počet genů závislých na SigB je tudíž velmi obtížné, a i dnes se počty uváděné v literatuře značně liší. Některé SigB-regulované geny totiž nemusí obsahovat SigB-závislé promotory, ale mohou být ovlivňovány nepřímo přes účast SigB-závislých regulačních faktorů. (Pané-Farré et al. 2006; Nielsen et al. 2011) Kromě toho mohou být geny řízeny z několika různě regulovaných promotorů podobně jako v případě regulace

*sigB* operonu samotného. V transkriptomické analýze u *B. subtilis* bylo zjištěno, že 46 % všech kódujících sekvencí *B. subtilis* je transkribováno z více než jednoho promotoru. (Nicolas et al. 2012) U *S. aureus* byl nalezen počet kódujících sekvencí 2836, z nichž je 22 % transkribováno z více než jednoho promotoru. (Mäder et al. 2016) To značí obrovskou komplexní regulační síť propojující nejrůznější stresové, virulentní i metabolické dráhy.

Některé starší práce naznačovaly, že promotory, které SigB rozpoznává, jsou si u *S. aureus* a *B. subtilis* sekvenčně podobné. (Homerova et al. 2004) Avšak vzhledem k rozdílným fyziologickým funkcím alternativních SigB faktorů u těchto bakterií se expresní profily SigB-závislých transkripčních jednotek značně liší. Aktivace SigB-závislých promotorů *S. aureus* není omezena na stresové podmínky jako u *B. subtilis*, ale je obecněji vázána na stacionární fázi. Regulon SigB *S. aureus* i v nestresových podmínkách vykazuje významnější bazální aktivitu než u *B. subtilis*. Expresní vzory SigB-regulovaných genů vykazovaly u *S. aureus* větší variabilitu než u *B. subtilis*. (Mäder et al. 2016)

Young se svými spolupracovníky ve své práci (2013) zabývající se vztahem mezi obecnou a specifickou odpovědí u *B. subtilis* rozdělili geny stresové odpovědi do 3 skupin:

- 1) SigB-závislé operony stresové odpovědi
- 2) SigB-nezávislé operony stresové odpovědi
- 3) Operony SigB-závislé, které lze aktivovat i jiným způsobem, pomocí jiného specifického regulátoru

(Young et al. 2013)

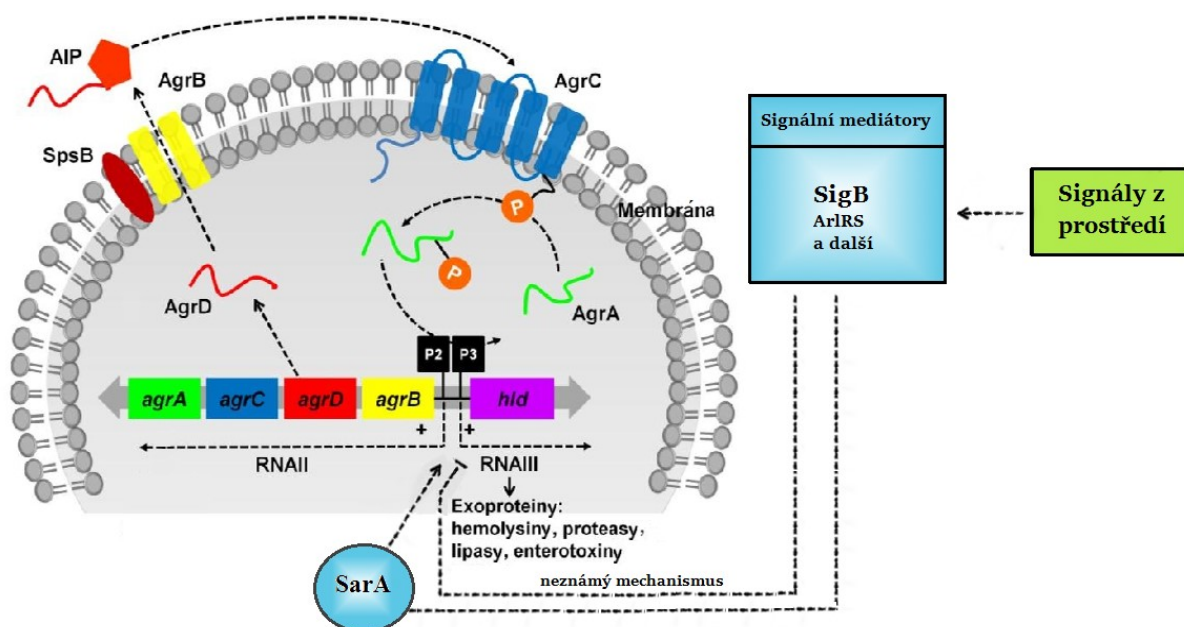
Geny řízené ze SigB-závislého promotoru, jsou tedy ovlivněny SigB přímo, avšak SigB nemusí být jediným induktorem a tyto geny mohou být řízeny i z jiných promotorů. Geny, které nemají SigB-závislý promotor, ale jsou regulovány regulátory, v jejichž kaskádě je alespoň jeden gen SigB-závislý, jsou ovlivněny nepřímo. Ve starší literatuře, kde se závislost prokazovala pouze delecí genu *sigB*, není vždy toto rozdělení jednoznačné.

### 3.3.2 Geny pod SigB kontrolou

Jeden z prvních pozorovaných fenotypů u deletantů  $\Delta sigB$  *S. aureus* byla výrazná redukce pigmentace bakteriálních kolonií, což vedlo k objevu, že geny pro biosyntézu oranžového karotenoidu stafyloxantinu jsou SigB-závislé. (Kullik et al. 1998) Bylo

dokázáno, že syntéza stafyloxantinu má protektivní účinek proti UV záření a pigmentované bakterie *S. aureus* přežívají po vystavení dennímu světlu déle. (Giachino et al. 2001) Existují také experimenty, které pracují s hypotézou, že karotenoidy *S. aureus* jsou i virulentním faktorem, neboť chrání bakterii před zabitím fagocyty prostřednictvím oxidačního vzplanutí. (Liu et al. 2005)

Ještě dříve byl jako SigB-závislý gen ověřen globální regulátor SarA, u kterého SigB faktor řídí transkripci z P3 promotoru *sar* lokusu. (Cheung & Projan 1994; Deora et al. 1997) SarA je pozitivní regulátor transkripce z obou (P2 i P3) promotorů *agr* lokusu a váže se do oblasti mezi těmito promotory. (Cheung et al. 1997; Chien & Cheung 1998) Agr regulační systém je závislý také na regulaci prostřednictvím QS a pod jeho kontrolou je řada genů virulentních faktorů. (shrnuto v review Yarwood & Schlievert 2003) Mechanismus regulace Agr systémem je ukázán na obrázku 9.



Obrázek 9: Agr systém *S. aureus* a jeho regulace (Kong et al. 2016 přeloženo, upraveno podle Yarwood & Schlievert 2003)

Regulační oblast *agr* operonu obsahuje 2 promotory: P2, který iniciuje vznik RNAII transkriptu, a P3, kterým začíná RNAIII transkript. Součástí RNAII transkriptu jsou geny *agrB*, *agrD*, *agrC* a *agrA*. AgrCA tvoří dvoukomponentní systém, ve kterém AgrC kóduje histidinovou kinázu, která je aktivována po vazbě iniciačního peptidu AIP (Auto inducing peptide). AIP je na základě buněčné denzity vytvářen integrální membránovou endopeptidázou AgrB z AgrD. AgrC se po vazbě AIP autofosforyluje a následně fosforyluje AgrA, který aktivuje P2 a P3-řízenou transkripci. RNAIII kóduje *hld* gen (delta hemolysin) a také moduluje expresi genů závislých na Agr systému. (shrnuto v review Yarwood & Schlievert 2003 a Kong et al. 2016) SigB přes SarA pozitivně reguluje transkripci *agr* operonu, nebo samotný SigB neznámým mechanismem inhibuje transkripci RNAIII. (Bischoff et al. 2001)

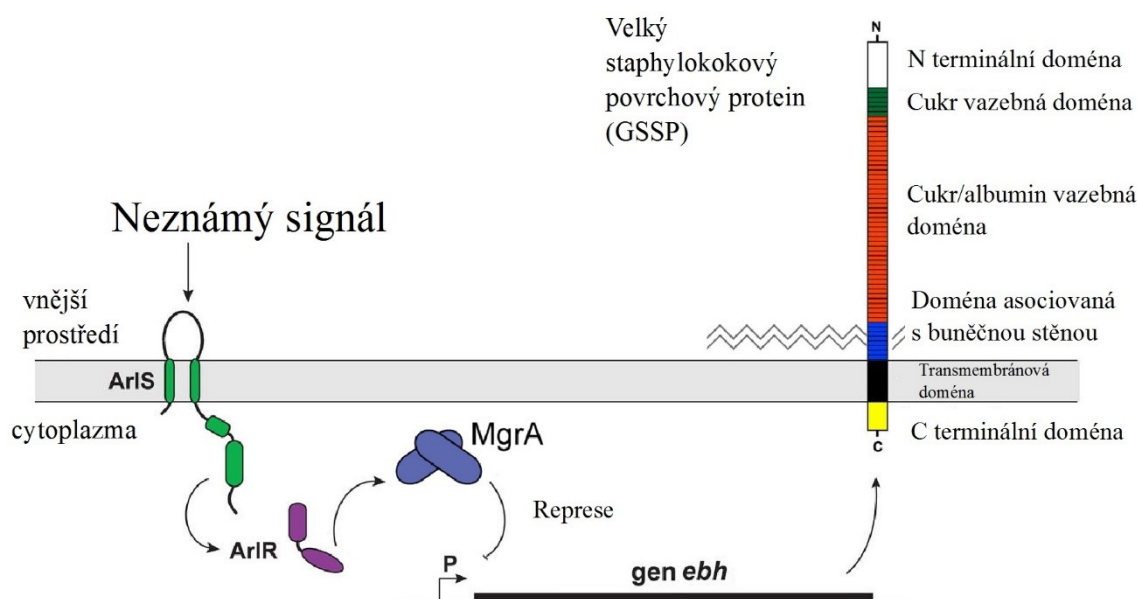
Výsledky dalších studií potvrdily, že Agr systém pozitivně ovlivňuje transkripci dvoukomponentního systému KdpDE, který u *S. aureus* může být dalším regulátorem virulence a má význam v hyperosmotickém stresu v transkripci *kdpFABC*, genů pro Kdp transportér. Pozitivní regulace KdpDE prostřednictvím Agr systému je pravděpodobně zprostředkována přes RNAIII transkript a probíhá přes represi translace regulátoru Rot. Rot se *in vitro* specificky váže do promotoru *PkdpD* a inhibuje jej. (Xue et al. 2011) RNAIII způsobuje translační represi *rot* mRNA tak, že svou 3' koncovou doménou tuto mRNA váže a působí tak jako antisense RNA. (Boisset et al. 2007) Schéma této regulace je ukázána na obrázku 2 (strana 5). Rot (repressor toxinů) je DNA-vazebný protein (Mcnamara et al. 2000), který se dále podílí na aktivaci transkripce *spa* (Saïd-Salim et al. 2003) a represi exprese  $\alpha$ -toxinu *S. aureus* (Mcnamara et al. 2000). Nově bylo potvrzeno, že Rot je také důležitým regulátorem tvorby biofilmu, kdy podpoří tvorbu biofilmu represí sekretovaných proteáz štěpících složky biofilmové matrix. (Mootz et al. 2016).

Mezi geny pravděpodobně regulované globálním regulačním systémem Agr patří také obrovský 1,1 MDa protein Ebh *S. aureus* (extracelulárně-vážíci se proteinový homolog), který je kódovaný největším genem v genomu *S. aureus*. Má funkci v přichycení k hostitelským proteinům mezibuněčné hmoty (ECM) a počítá se tudíž k virulentním faktorům. (Kuroda et al. 2001; Clarke et al. 2002) Ebh se slabými iontovými silami váže na lidský fibronectin, jedná se tedy o fibronectin-vazebný povrchový protein. (Clarke et al. 2002; Cheng et al. 2014) Podle práce z roku 2008 Kurody a jeho spolupracovníků je ale také jednou z jeho funkcí tolerance k přechodnému hyperosmotickému stresu. Předpokládá se, že Ebh doména vytváří můstek mezi buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou a tímto spojením zabraňuje plazmolýze, ke které za hyperosmotických podmínek může dojít. (Kuroda et al. 2008). Propojení plazmatické membrány a buněčné stěny tímto proteinem je možné vidět na obrázku 10.

Na příkladu Ebh proteinu i systému Kdp lze ukázat, jak spolu virulence i adaptace k hyperosmotickému stresu úzce souvisejí a jak provázané a složité tyto mechanismy jsou. Kromě významu Ebh v kolonizaci hostitelských nik může mít tento velký protein funkci i v syntéze peptidoglykanu a rezistenci k antibiotikům. (Cheng et al. 2014)

Nicméně mechanismus regulace exprese Ebh prostřednictvím Agr systému navrhovaný ve starší práci (Clarke et al. 2002) dosud není znám. Clarke a jeho kolegové sledovali fúzi *lacZ* s *ebh* (*ebh::lacZ*) zvýšenou  $\beta$ -galaktosidázovou aktivitu u *agr* mutantů, což vedlo k závěru, že Agr systém reprimuje *ebh*. (Clarke et al. 2002) Nedávnou studií však bylo zjištěno, že gen *ebh* je také reprimován dvoukomponentním systémem ArIRS

(viz obrázek 10), který je též důležitým regulačním systémem virulence. (Fournier & Hooper 2000; Walker et al. 2013) Jak bylo nedávno dokázáno mechanismus represe *ebh* systémem ArlRS probíhá přes regulátor MgrA, jehož transkripce je aktivována tímto dvoukomponentním systémem. (Crosby et al. 2016) Bischoff a jeho kolegové již dříve ve své práci (2004) navrhli, že ArlRS může být přímo nebo nepřímo ovlivňován SigB faktorem. (Bischoff et al. 2004) I když se v některých studiích přímá SigB závislost nepotvrdila (Meier et al. 2007), v doplňujících datech transkriptomické studie (2016) byl před *arlRS* objeven SigB-závislý promotor. (Mäder et al. 2016)



Obrázek 10: Regulace exprese Ebh proteinu (přeloženo podle Walker et al. 2013, upraveno podle Crosby et al. 2016)

V návaznosti na objev souvislosti SigB a virulence byl SigB několikrát potvrzen jako významný aktivátor tvorby biofilmu. (Lauderdale et al. 2009; Mitchell et al. 2013) U bakterií může mít tvorba biofilmu ochrannou funkci proti environmentálním změnám. Mitchell a další vědci tvorbu biofilmu zkoumali u „trpasličích kolonií“ (SCV, small colony variants) a objevili souvislost s chronickými infekcemi častými u pacientů s cystickou fibrózou. Zvýšené hyperosmotické prostředí především v dýchacích cestách pacientů způsobené zvýšeným vylučováním iontů z buněk je výhodné pro kolonizaci bakteriemi *S. aureus*. (Mitchell et al. 2013) Účast SigB jako rozhodujícího faktoru pro vstup buněk do stavu tzv. perzistence je nyní velmi studována. U mutantů  $\Delta$ sigB totiž byla pozorována redukováná schopnost tvorby SCV, což mělo vliv na úplné vyléčení

z hostitelských buněk. (Tuchscherr et al. 2015) Terapeutické přístupy zaměřené na SigB ve spojení s tradičními antibiotiky by tak mohly vést k novým léčebným metodám chronických onemocnění způsobených bakterií *S. aureus*. (Mitchell et al. 2013) V současné době se ukazuje, že aktivace Agr systému je nezbytná pro akutní fáze infekce, ale v chronických fázích musí být Agr umlčen, aby mohla být navozena perzistence. Na umlčení může mít vliv právě SigB, který má negativní účinek na Agr systém. (Bischoff et al. 2001; Tuchscherr et al. 2015,)

Dále bylo prokázáno, že SigB může ovlivňovat syntézu kapsuly, dalšího virulentního faktoru. V roce 2009 vědci objevili, že globální regulátor Spo-VG, který ovlivňuje tvorbu polysacharidového pouzdra, je pod kontrolou SigB. (Schulthess et al. 2009) Následně se také ukázalo, že se SigB váže do promotorové oblasti genu *rbsR*, a tím aktivuje expresi regulátoru RbsR. RbsR následně interaguje s RNA polymerázou a spouští za účasti dalších proteinů *cap* mRNA transkripci, tzn. transkripci genů pro syntézu kapsuly. RbsR se také účastní jako negativní regulátor *rbsUDK* operonu, který kóduje transportér pro příjem ribosy. (Lei & Lee 2015) Z toho vyplývá, že SigB může mít vliv i na metabolismus pentóz.

Výše zmíněný regulátor Spo-VG je transkribovaný ze SigB-závislého operonu *yabJ-spoVG*. (Meier et al. 2007) Delece tohoto lokusu vedla u MRSA (methicilin-rezistentních kmenů *S. aureus*) a GISA (kmenů *S. aureus* rezistentních ke všem glykopeptidovým antibiotikům) ke snížení rezistence k methicilinu, ale také k vancomycinu, teicoplaninu a dalším glykopeptidovým antibiotikům. Dá se předpokládat, že velmi rozšířená stafylokoková odolnost k antibiotikům může být mimo jiné ovlivňována genovými produkty *yabJ-spoVG* regulovanými přes SigB dráhu. (Schulthess et al. 2009) Na podobných výzkumech dosud pracuje mnoho vědeckých skupin, avšak konkrétní geny této dráhy dosud nebyly objeveny.

## 4 ÚČAST SigB V HYPEROSMOTICKÉM STRESU

Studie stresových odpovědí nejen u bakterií vedly k vytvoření modelu tzv. environmentální anticipace, podle něhož organismy stres předvídají, to znamená, že spouští expresi některých genů, i když stres ještě není přítomen, ale pravděpodobně se brzy vyskytne. (Mitchell et al. 2009) Nastartování anticipace expresí genů obecných stresových odpovědí u mikroorganismů zřejmě probíhá stochasticky, jak již bylo navrženo u *B. subtilis* (Locke et al. 2011) a zmíněno v úvodu této práce. I když kolonie bakterií obsahuje identickou genetickou informaci, liší se právě stochastickým nastartováním exprese některých genů a díky této buněčné heterogenitě dokáže jistá část populace přežít i velmi nepříznivé podmínky. (Elowitz 2002)

Podle výzkumů u *B. subtilis* je specifičnost či obecnost stresové odpovědi řízena na základě síly a náhlosti přichozícího stresu. Zjistilo se, že náhlý a rychlý stres vede k indukci obecné stresové odpovědi, ale při postupném stresu se zapíná odpověď více specifická a obecná stresová odpověď při něm nemusí být vůbec použita. (Young et al. 2013) Pokud tento mechanismus platí i u *S. aureus*, což dosud nebylo zkoumáno, pak je účast SigB v hyperosmotickém stresu důležitá především při náhlém a silném stresu, jakým může být třeba osídlení nových hostitelských nik. To, že tyto adaptace mohou probíhat podobně u *B. subtilis* a *S. aureus*, již naznačuje jedna z novějších prací, podle které může i SigB *S. aureus* poskytovat adaptaci k NaCl při rychlém zvýšení NaCl koncentrace v prostředí. (Cebrián et al. 2015)

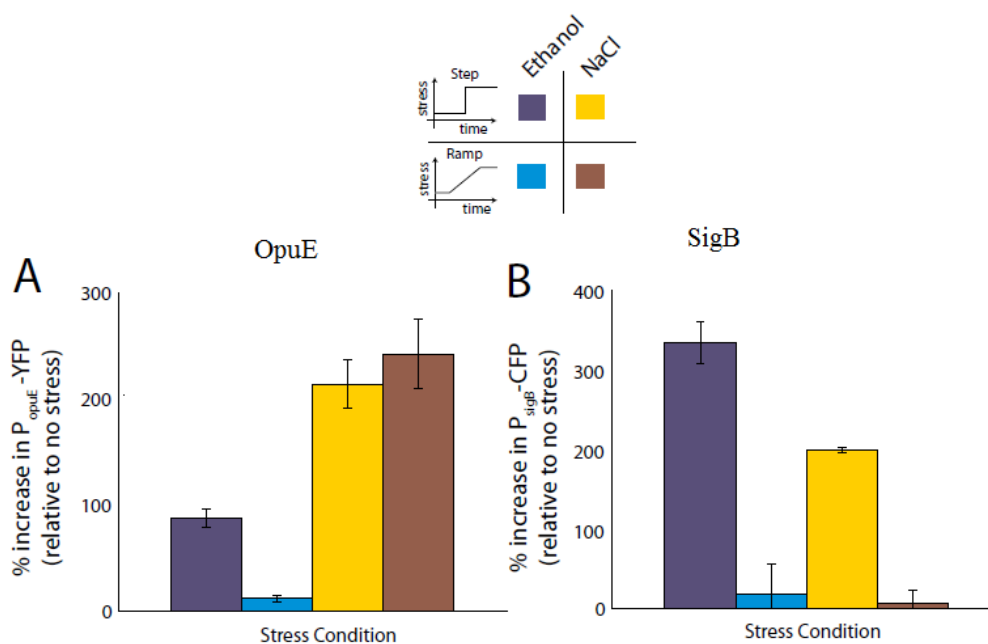
Autoři jedné z prvních studií SigB faktoru *S. aureus* nepozorovali u buněk po osmotickém šoku (2 M NaCl) během exponenciální fáze zvýšenou SigB odpověď. (Chan et al. 1998) To vyvolalo pochybnosti, zda hyperosmotický stres má vliv na indukci *sigB* operonu. Později byla pozorována indukce exprese 3,6 kbp a 1,6 kbp transkriptů *sigB* operonu po vystavení 2 M NaCl (Senn et al. 2005) a byl také prokázán vliv SigB na růstovou rychlost v NaCl koncentracích. Překvapivě se zjistilo, že  $\Delta sigB$  měla za nižšího hyperosmotického prostředí (při 1,36 M a 1 M NaCl) spíše pozitivní vliv na růstovou rychlost a přítomnost alternativního SigB faktoru neposkytovala za takových podmínek růstovou výhodu. To může být dáno do souvislosti s tím, že SigB sice poskytuje ochranu proti stresu, ale na úkor zpomalení růstové rychlosti vzhledem ke kompetici mezi sigma podjednotkami RNA polymerázy. (Cebrián et al. 2015)

Možnými propojeními mezi SigB a hyperosmotickým stresem mohou být nepřímé vlivy SigB na Agr systém, pod jehož kontrolou, jak již bylo popsáno výše, může být gen pro Ebh protein a také geny pro dvoukomponentní systém KdpDE. (Clarke et al. 2002; Xue et al. 2011) Kromě toho však může být význam SigB v hyperosmotickém stresu

založen na regulaci exprese transportérů kompatibilních solutů tímto alternativním faktorem, což bylo dosud dokázáno pro jeden z transportérů *L. monocytogenes*. (Fraser et al. 2003; Sue et al. 2003) V následujících odstavcích bych se chtěla věnovat právě poznatkům o regulaci transportérů kompatibilních solutů a jejich vztahu k SigB faktoru.

Analýzou northern blot se zjistilo, že transkripce *opuE*, genu pro vysokoafinitní systém pro prolin u *B. subtilis*, je zvýšena během hyperosmotického šoku a tento systém tedy zajišťuje adaptaci k hyperosmotickému stresu u *B. subtilis*. Gen *opuE* obsahuje dva promotory, z nichž jeden je SigA-závislý a druhý SigB-závislý, oba přispívají k transkripci *opuE*, ale každý má jiný význam v regulaci tohoto genu v odpověď na hyperosmotický stres. (Spiegelhalter & Bremer 1998) Pokusem provedeným fúzí *opuE* *B. subtilis* se žlutým fluorescenčním proteinem vědci Young a jeho kolegové dokázali, že transkripce *opuE* je aktivována rychlým i postupným hyperosmotickým stresem, ale v případě jiných stresů, jako je například ethanolový, je aktivována jen rychlou a náhlou změnou podmínek.

Pouze rychlá a náhlá změna podmínek indukuje obecnou stresovou odpověď. (Young et al. 2013) Obecně je výsledek tohoto pokusu představen na obrázku 11.



Obrázek 11: Výsledek pokusu u *B. subtilis* prokazující vztah specifické a obecné stresové odpovědi

- A) Transkripce *OpuE* transportéru byla slabě indukována náhlým ethanolovým (2 %) stresem, silně pak postupným i náhlým solným stresem (0,36 M NaCl)
- B) SigB se aktivoval náhlými stresy ethanolovým (2 %) i solným (0,36 M NaCl), což potvrzuje závislost SigB na síle a náhlosti stresu (Young et al. 2013)

*PutP*, homolog *opuE B. subtilis*, kóduje vysokoafinitní prolinovou permeázu u *S. aureus*. (Bae & Miller 1992; Schwan et al. 2006) Již studie z 90. let potvrdily jeho vztah *in vivo* k virulenci (Bayer et al. 1999), což mohlo být prvním náznakem souvislosti s alternativním SigB faktorem. Expres *putP* je nejvyšší v nízké koncentraci prolinu a vysoké koncentraci NaCl za předpokladu, že jde o *sigB* deleční mutanty. To vede k závěru, že alternativní SigB faktor má zřejmě negativní význam v *putP* regulaci *S. aureus*. Pozitivně je *putP* regulován specifickými regulátory NaCl-indukovaným proteinem (NI) a prolin-indukovaným proteinem (PI). Aktivace *putP S. aureus in vivo* v nakažených lidských a myších tkání touto bakterií byla nejvyšší v tkáních močového traktu. Toto prostředí se vyznačuje právě vysokou koncentrací NaCl a nízkou hladinou prolinu. Dá se proto předpokládat, že PutP je esenciální pro přežití *S. aureus in vivo*. (Schwan et al. 2006)

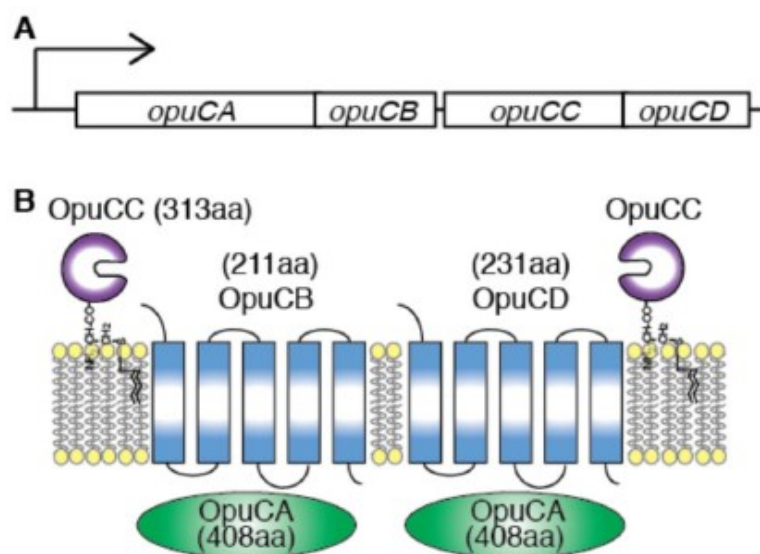
Regulace *putP S. aureus* se tedy pravděpodobně podobá regulaci *opuE B. subtilis* tím, že jsou oba tyto geny závislé na SigB, avšak odlišným způsobem. SigB vyvolává represi *putP S. aureus*, avšak indukci *opuE B. subtilis* (Spiegelhalter & Bremer 1998; Schwan et al. 2006) Mechanismus represe genu *putP S. aureus* prostřednictvím alternativního SigB faktoru však zůstává neznámý. Je ale pravděpodobné, že je *putP* regulován přes SigB nepřímo, protože analýzou promotorů nebyl objeven v blízkosti *putP* SigB-závislý promotor. (Mäder et al. 2016) Až na tuto regulaci, *putP* sdílí též značné strukturní a funkční podobnosti s *putP E. coli*. (Wengender & Miller 1995)

*OpuD B. subtilis* kóduje transportér pro glycin betain. (Kappes & Kempf 1996) První zmínky o vztahu *opuD S. aureus* k SigB pochází z několika studií, kdy se tento gen ve dvou z nich objevil na seznamu genů pod kontrolou SigB faktoru. (Giachino et al. 2001; Bischoff et al. 2004; Homerova et al. 2004) Pané-Farré a jeho kolegové však zjistili, že *S. aureus* kóduje 2 geny příbuzné *opuD B. subtilis*. Transkriptomickou analýzou objevili, že pouze jeden z nich je SigB-závislý. (Pané-Farré et al. 2006) Tuto hypotézu potvrdila i studie, ve které se objevily domnělé geny *opuD*, SigA-závislý, a *opuD2*, u něhož byl nalezen SigB-závislý promotor. (Mäder et al. 2016)

Jedna z prací více identifikovala *opuD S. aureus*, homologní k *opuD B. subtilis*, její výsledky však naznačily odlišnost transportérů u těchto bakterií. Gen *opuD S. aureus* na rozdíl od *B. subtilis* kóduje nízkoafinitní transportér pro prolin, který je aktivován hyperosmotickým stresem a vysokými koncentracemi prolinu. Podle výsledků studie gen pro tento systém, na rozdíl od *opuD B. subtilis*, je nezávislý na alternativním SigB faktoru. (Wetzel et al. 2011) *In vivo* transport prolinu u bakterií s delecí *opuD* nebyl

významně narušen (Wetzel et al. 2011), na rozdíl od PutP tedy OpuD může mít v kolonizaci hostitele jen minoritní význam.

Transportér OpuC *S. aureus* je kódován operonem *opuCABCD*, ze kterého se exprimují 4 proteiny OpuCA, OpuCC, OpuCB a OpuCD (Schuster et al. 2016) představující typický ABC transportér (viz obrázek 12), který byl poprvé popsán u *L. monocytogenes*. (Fraser et al. 2000)



Obrázek 12: A) Operon transportéru OpuC *S. aureus*

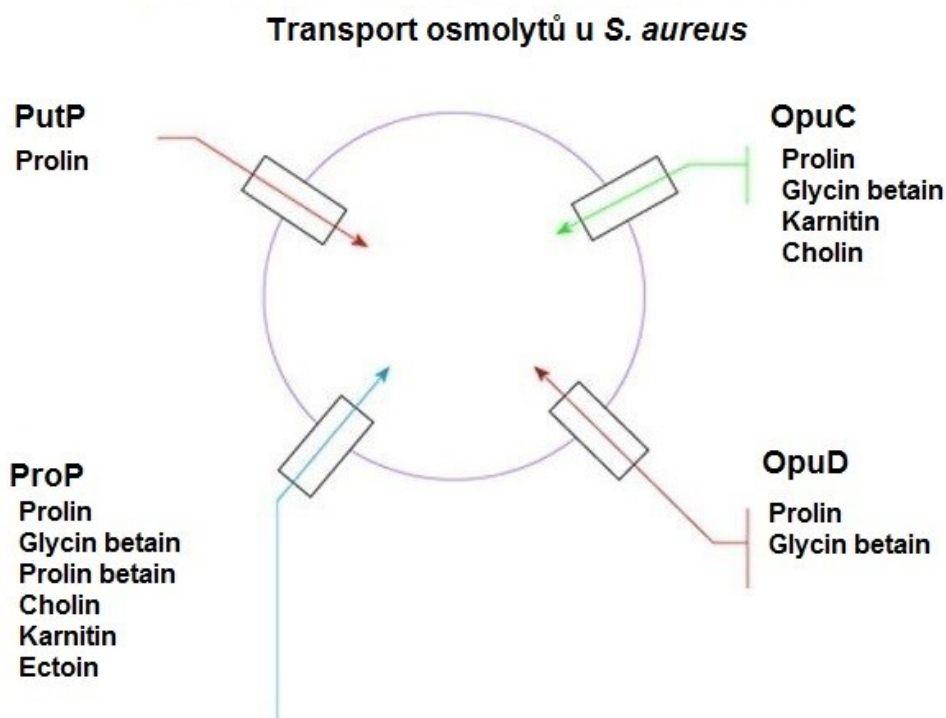
B) Struktura ABC transportéru OpuC *S. aureus*

(Schuster et al. 2016)

Podobnost těchto proteinů s OpuCABCD *L. monocytogenes* je kolem 61 %. (Kiran et al. 2009) U *S. aureus* OpuC přenáší cholin, glycin betain a prolin, ale význam má též v přenosu karnitinu. (Kiran et al. 2009; Schuster et al. 2016) Kiran a jeho spolupracovníci potvrdili účast OpuC *S. aureus* v osmotoleranci, poněvadž růst deletantů *opuC* ( $\Delta opuC$ ) byl v hyperosmotickém prostředí narušen a tyto mutanty byly defektní v transportu osmoprotektantu cholinu do buňky. Kromě toho tyto mutanty vykazovaly narušenou aktivaci Agr systému, což odhaluje možný význam OpuC ve virulenci. (Kiran et al. 2009) V nedávném výzkumu bylo zjištěno, že OpuCA (ATP-vazebná doména OpuC transportéru), je regulována vazbou c-di-AMP, podobně jako tomu je u Kdp a Ktr systému, a vazbou c-di-AMP na OpuCA je inhibován příjem karnitinu (Schuster et al. 2016) I přesto regulace exprese jednotlivých proteinů OpuC transportéru *S. aureus* nebyla dosud plně odhalena, ale je dlouho známo, že u *L. monocytogenes* je *opuCA* SigB-závislý. (Sue et al. 2003) Jak již bylo zmíněno v kapitole 3 (strana 12), je *opuCA*

*L. monocytogenes* také pod přímou kontrolou MazEF TA systému. (Curtis et al. 2017) Nicméně podle dosavadních poznatků *opuCA* *S. aureus* neobsahuje SigB-závislý promotor. (Mäder et al. 2016)

Podle recentních bioinformatických dat je možné usoudit, že u *S. aureus* se vyskytují 4 transportéry pro kompatibilní soluty (viz obrázek 13), z nichž pouze u *putP* byla prokázána závislost na alternativním SigB faktoru, i když neobsahuje SigB-závislý promotor. (Schwan et al. 2006; Mäder et al. 2016; Schwan & Wetzel 2016) Pravděpodobně je proto regulován nepřímo jiným neobjeveným mechanismem. U dále neidentifikovaném genu *opuD2* je regulace SigB faktorem předpokládána, neboť jeho transkripce je pravděpodobně řízena ze SigB-závislého promotoru. (Pané-Farré et al. 2006; Mäder et al. 2016) U dalších transportérů kompatibilních solutů OpuC a ProP *S. aureus* zatím závislost na SigB nebyla zkoumána.



Obrázek 13: Transportní systémy kompatibilních solutů u *S. aureus* (upraveno a přeloženo podle Schwan & Wetzel 2016)

## 5 ZÁVĚR

Obecná stresová odpověď je rozšířena v rámci patogenních i nepatogenních bakterií, ačkoliv se její podoba i funkce mezi zkoumanými druhy značně odlišuje. U podmíněně patogenní bakterie *Staphylococcus aureus* má podjednotka RNA polymerázy SigB vliv na regulaci virulentních faktorů a nastolení intracelulární perzistence. Dosud objevené poznatky by proto mohly být užitečné pro léčbu stafylokokových akutních i chronických onemocnění. Význam SigB v odpověď na hyperosmotický stres, je z toho důvodu méně zkoumán, ačkoliv s kolonizací hostitele úzce souvisí. Ve své práci jsem se chtěla zaměřit právě na poznatky vztahu obecné stresové odpovědi a specifické odpovědi na hyperosmotický stres, které se v literatuře objevují.

Nepřímo přes virulentní regulační systém Agr, který je pod kontrolou SigB, je regulována transkripce *kdpDE* operonu. KdpDE se podílí během hyperosmotického stresu na aktivaci transkripce *kdpFABC*, operonu kódujícího vysokoafinitní transportér  $K^+$  iontů u *S. aureus*. Pod stejným regulačním systémem Agr je pravděpodobně i velký Ebh protein protínající membránu a buněčnou stěnu *S. aureus*, který drží tyto komponenty během hyperosmotického stresu a zabraňuje plazmolýze. Navíc je transkripce *ebh* ovlivňována dvoukomponentním systémem ArlRS, který je pravděpodobně přímo pod kontrolou alternativního SigB faktoru. Vysokoafinitní transportér PutP, který u *S. aureus* transportuje osmoprotektant prolin, je zřejmě ovlivněn negativně a nepřímo SigB a jeho přítomnost je důležitá pro přežití *S. aureus* v hostiteli. Prostřednictvím SigB je pravděpodobně regulován i jeden z genů homologní ke genu transportéru kompatibilních solutů OpuD *B. subtilis*. V adaptaci na environmentální stres má úlohu také tvorba biofilmu, na níž se SigB významně podílí.

Tyto poznatky mohou být důkazem souvislosti alternativního SigB faktoru a specifické adaptace k hyperosmotickému stresu. Zda u *S. aureus* skutečně záleží na intenzitě a náhlosti hyperosmotického stresu, jak bylo dokázáno pro *B. subtilis*, a na jakých dalších úrovních regulace tento vztah spočívá, je otázkami budoucích studií. I když studie vztahů mezi obecnou a specifickou stresovou odpovědí prozatím u *S. aureus* chybí, tyto budoucí výzkumy budou založeny na porovnávání se závěry, které vyplývají z výzkumů na modelové a příbuzné bakterii *B. subtilis*. Další výzkum je také žádoucí v oblasti regulace transportérů uplatňujících se při hyperosmotickém stresu a dalších virulentních regulátorů umožňujících kolonizaci bakterií *S. aureus* v hypersmotickém prostředí.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Bae, J. & Miller, K. J., (1992)** Identification of two proline transport systems in *Staphylococcus aureus* and their possible roles in osmoregulation, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(2), 471–475.
2. **Ballal, A., Basu, B., Apte, S. K., (2007)** The Kdp-ATPase system and its regulation, *Journal of Bioscience*, **32**, 559–568
3. **Ballal, A., Shree, K., Apte, S. K., (2005)** Differential expression of the two *kdp* operons in the nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31, *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(9), 5297–5303.
4. **Bayer, A. S., Coulter, S. N., Stover, C. K. & Schwan, W. R., (1999)** Impact of the high-affinity proline permease gene (*putP*) on the virulence of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *Infection and Immunity*, **67**(2), 740–744.
5. **Bischoff, M., Dunman, P., Kormanec, J., Macapagal, D., Murphy, E., Mounts, W., Berger-Bächli, B., Projan, S., (2004)** Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus*  $\sigma^B$  regulon. *Journal of Bacteriology*, **186**(13), 4085–4099.
6. **Bischoff, M., Entenza, J. M. & Giachino, P., (2001)** Influence of a functional *sigB* operon on the global regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **183**(17), 5171–5179.
7. **Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E., Fechter, P., Bendridi, N., Possedko, M., Chevalier, C., Helfer, A. C., Benito, Y., Jacquier, A., et al., (2007)** *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes and Development*, **21**(11), 1353–1366.
8. **Cebrián, G., Arroyo, C., Condón, S., Mañas, P., (2015)** Osmotolerance provided by the alternative sigma factors  $\sigma^B$  and *rpoS* to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* is solute dependent and does not result in an increased growth fitness in NaCl containing media. *International Journal of Food Microbiology*, **214**, 83–90.
9. **Clarke, S. R., Harris, L. G., Richards, R. G., & Foster, S. J., (2002)** Analysis of Ehb, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, **70**(12), 6680–6687.
10. **Conlon, B. P., Rowe, S. E., Gandt, A. B., Nuxoll, A. S., Donegan, N. P., Zalis, E. A., Clair, G., Adkins, J. N., Cheung, A. L., Lewis, K., (2016)** Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nature Microbiology*, **1**(16051).
11. **Corrigan, R. M., Campeotto, I., Jeganathan, T., Roelofs, K. G., Lee, V. T., & Gründling, A., (2013)** Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(22), 9084–9089.
12. **Crosby, H. A., Schlievert, P. M., Merriman, J. A., King, J. M., Salgado-Pabón, W., & Horswill, A. R., (2016)** The *Staphylococcus aureus* global regulator MgrA modulates clumping and virulence by controlling surface protein expression. *PLoS Pathogens*, **12**(5), 1–31.

13. **Curtis, T., Takeuchi, I., Gram, L., & Knudsen, G. M., (2017)** The influence of the Toxin/Antitoxin *mazEF* on growth and survival of *Listeria monocytogenes* under stress. *Toxins*, **9**(1), 31.
14. **Deora, R., Tseng, T. & Misra, T.K., (1997)** Alternative transcription factor SigmaSB of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus *sa*. *Journal of Bacteriology*, **179**(20), 6355–6359.
15. **Donegan, N.P., Thompson, E. T., Fu, Z., & Cheung, A. L., (2010)** Proteolytic regulation of toxin-antitoxin systems by ClpPC in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **192**(5), 1416–1422.
16. **Donegan, N. P. & Cheung, A. L., (2009)** Regulation of the *mazEF* toxin-antitoxin module in *Staphylococcus aureus* and its impact on *sigB* expression. *Journal of Bacteriology*, **191**(8), 2795–2805.
17. **Elowitz, M. B., Levine, A. J., Siggia, E. D., Swain, P. S., (2002)** Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, **297**, 1183–1187.
18. **Fournier, B., & Hooper, D. C., (2000)** A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **182**(14), 3955–3964.
19. **Fraser, K. R., Harvie, D., Coote, P. J., & O’Byrne, C. P., (2000)** Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(11), 4696–4704.
20. **Fraser, K. R., Sue, D., Wiedmann, M., Boor, K., & O’Byrne, C. P., (2003)** Role of  $\sigma^B$  in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of *opuC* is  $\sigma^B$  dependent. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(4), 2015–2022.
21. **Freeman, Z. N., Dorus, S. & Waterfield, N. R., (2013)** The KdpD/KdpE two-component system: integrating K<sup>+</sup> homeostasis and virulence. *PLoS Pathogens*, **9**(3), e1003201.
22. **Fu, Z., Donegan, N. P., Memmi, G., & Cheung, A. L., (2007)** Characterization of MazFSa, an endoribonuclease from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **189**(24), 8871–8879.
23. **Fu, Z., Tamber, S., Memmi, G., Donegan, N. P., & Cheung, A. L., (2009)** Overexpression of MazFSa in *Staphylococcus aureus* induces bacteriostasis by selectively targeting mRNAs for cleavage. *Journal of Bacteriology*, **191**(7), 2051–2059.
24. **Galbusera, E., Renzoni, A., Andrey, D. O., Monod, A., Barras, C., Tortora, P., Polissi, A., Kelley, W. L., (2011)** Site-specific mutation of *Staphylococcus aureus* VraS reveals a crucial role for the VraR-VraS sensor in the emergence of glycopeptide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**(3), 1008–1020.
25. **Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A.-K., Tischer, K., Scharf, C., Hacker, J., Hecker, M., (2000)** Characterization of the  $\sigma^B$  regulon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **182**(24), 6983–6991.
26. **Giachino, P., Engelmann, S. & Bischoff, M., (2001)**  $\sigma^B$  activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **183**(6), 1843–1852.

27. **Gladstone, G. P., (1937)** The nutrition of *Staphylococcus aureus*; nitrogen requirements. *British Journal of Experimental Pathology*, **18**(4), 322–333.
28. **Graham, J. E. & Wilkinson, B. J., (1992)** *Staphylococcus aureus* osmoregulation: Roles for choline, glycine betaine, proline, and taurine. *Journal of Bacteriology*, **174**(8), 2711–2716.
29. **Gries, C. M., Bose, J. L., Nuxoll, A. S., Fey, P. D., & Bayles, K. W., (2013)** The Ktr potassium transport system in *Staphylococcus aureus* and its role in cell physiology, antimicrobial resistance, and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, **89**(4), 760–773.
30. **Gries, C. M., Sadykov, M. R., Bullock, L. L., Chaudhari, S. S., Thomas, V. C., Bose, J. L., & Bayles, K. W., (2016)** Potassium uptake modulates *Staphylococcus aureus* metabolism. *mSphere*, **1**(3), e00125–16.
31. **Gründling, A., (2013)** Potassium uptake systems in *Staphylococcus aureus*: New stories about ancient systems. *mBio*, **4**(5), e00784–13.
32. **Guldimann, C., Boor, K. J., Wiedmann, M., Guariglia-Oropeza, V., (2016)** Resilience in the face of uncertainty: Sigma factor B fine-tunes gene expression to support homeostasis in gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **82**(15), 4456–4469.
33. **Haldenwang, W. G. & Losick, R., (1979)** A modified RNA polymerase transcribes a cloned gene under sporulation control in *Bacillus subtilis*. *Nature*, **282**, 256–260
34. **Hecker, M., Pané-Farré, J. & Völker, U., (2007)** SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **61**, 215–36.
35. **Homerova, D., Bischoff, M., Dumolin, A., Kormanec, J., (2004)** Optimization of a two-plasmid system for the identification of promoters recognized by RNA polymerase containing *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor  $\sigma^B$ . *FEMS Microbiology Letters*, **232**(2), 173–179.
36. **Chambers, H. F. & Deleo, F. R., (2009)** Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, **7**(9), 629–41.
37. **Chan, H., Babayan, V., Blyumin, E., Gandhi, C., Hak, K., Harake, D., Kumar, K., Lee, P., Li, T. T., Liu, H. Y., et al., (2010)** The P-Type ATPase superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **19**(1–2), 5–104.
38. **Chan, P. F., Foster, S. J., Ingham, E., & Clements, M. O., (1998)** The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor  $\sigma^B$  controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse model. *Journal of Bacteriology*, **180**(23), 6082–6089.
39. **Cheng, A. G., Missiakas, D. & Schneewind, O., (2014)** The giant protein Ehb is a determinant of *Staphylococcus aureus* cell size and complement resistance. *Journal of Bacteriology*, **196**(5), 971–981.
40. **Cheung, A. L., Bayer, M. G. & Heinrichs, J. H., (1997)** *Sar* genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAIII in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **179**(12), 3963–3971.

41. **Cheung, A. L. & Projan, S. J., (1994)** Cloning and sequencing of sarA of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of agr. *Journal of Bacteriology*, **176**(13), 4168–4172.
42. **Chien, Y. & Cheung, A. L., (1998)** Molecular interactions between two global regulators,. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**(5), 2645–2652.
43. **Christian, J. H. & Waltho, J., (1964)** The composition of *Staphylococcus aureus* in relation to the water activity of the growth medium. *Journal of General Microbiology*, **35**, 205–213.
44. **Kappes, R. M., Kempf, B., & Bremer, E., (1996)** Three transport systems for the osmoprotectant glycine betaine operate in *Bacillus subtilis* :Characterization of OpuD. *Journal of Bacteriology*, **178**(17), 5071–5079.
45. **Kiran, M. D., Akiyoshi, D. E., Giacometti, A., Cirioni, O., Scalise, G., Balaban, N., (2009)** OpuC-an ABC transporter that is associated with *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *The International Journal of Artificial Organs*, **32**(9), 600–10.
46. **Kong, C., Neoh, H. M. & Nathan, S., (2016)** Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins*, **8**(3), 1–21.
47. **Kullik, I., Giachino, P., & Fuchs, T., (1998)** Deletion of the alternative sigma factor  $\sigma^B$  in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *Journal of Bacteriology*, **180**(18), 4814–4820.
48. **Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai Y., et al., (2001)** Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **357**(9264), 1225–40.
49. **Kuroda, M., Tanaka, Y., Aoki, R., Shu, D., Tsumoto, K., Ohta, T. (2008)** *Staphylococcus aureus* giant protein Ehb is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **374**(2), 237–241.
50. **Lauderdale, K. J., Boles, B. R., Cheung, A. L., and Horswill, A. R, (2009)** Interconnections between SigmaB, agr, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infection and Immunity*, **77**(4), 1623–1635.
51. **Lei, M. G. & Lee, C. Y., (2015)** RbsR activates capsule but represses *rbsUDK* operon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **197**(23), 3666–3675.
52. **Lever, M. & Slow, S., (2010)** The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clinical Biochemistry*, **43**(9), 732–744.
53. **Liu, G. Y., Essex, A., Buchanan, J. T., Datta, V., Hoffman, H. M., Bastian, J. F., Fierer J., Nizet, V., (2005)** *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *The Journal of Experimental Medicine*, **202**(2), 209–15.
54. **Locke J. C. W., Young, J. W., Fontes, M., Jiménez, M. J. H., & Elowitz, M. B., (2011)** Stochastic pulse regulation in bacterial stress response. *Science*, **334**(6054), 366–369.
55. **Lucht, J. M. & Bremer, E., (1994)** Adaptation of *Escherichia coli* to high osmolarity environments: Osmoregulation of the high-affinity glycine betaine transport system ProU. *FEMS Microbiology Reviews*, **14**(1), 3–20.
56. **Mäder, U., Nicolas, P., Depke, M., Pané-Farré, J., Debarbouille, M., van der Kooi-Pol, M. M., Guérin, C., Dérozier, S., Hiron A., Jarmer H., et al., (2016)** *Staphylococcus*

- aureus* transcriptome architecture: from laboratory to infection-mimicking conditions. *PLoS Genetics*, **12**(4), 1–32.
57. **Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J., Jørgensen, M. G., Gerdes, K., (2011)** Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(32), 13206–13211.
  58. **Mcnamara, P. J., Milligan-Monroe, K. C., Khalili, S., Proctor, R. A., (2000)** Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **182**(11), 3197–3203.
  59. **Meier, S., Goerke, C., Wolz, C., Seidl, K., Homerova, D., Schulthess, B., Kormanec, J., Berger-Bächli, B., Bischoff, M., (2007)**  $\sigma^B$  and the  $\sigma^B$ -dependent *arlRS* and *yabJ-spoVG* loci affect capsule formation in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, **75**(9), 4562–4571
  60. **Meury, J., Robin, A. & Monnier-Champeix, P., (1985)** Turgor-controlled  $K^+$  fluxes and their pathways in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, **151**(3), 613–619.
  61. **Miller, K. J., Zelt, S. C. & Bae, J. H., (1991)** Glycine betaine and proline are the principal compatible solutes of *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, **23**, 131–137.
  62. **Mitchell, A., Romano, G. H., Groisman, B., Yona, A., Dekel, E., Kupiec, M., Dahan, O., Pilpe, Y., (2009)** Adaptive prediction of environmental changes by microorganisms. *Nature*, **460**(7252), 220–4.
  63. **Mitchell, G., Fugère, A., Pépin Gaudreau, K., Brouillette, E., Frost, E. H., Cantin, A. M., & Malouin, F., (2013)** SigB is a dominant regulator of virulence in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *PLoS ONE*, **8**(5), 1–14.
  64. **Miyazaki, E., Chen, J.-M., Ko, C., & Bishai, W. R., (1999)** The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (*orf159*) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *Journal of Bacteriology*, **181**(9), 2846–2851.
  65. **Mootz, J. M., Benson, M. A., Heim, C. E., Crosby, H. A., Kavanaugh, J. S., Dunman, P. M., Kielian, T., Torres, V. J., Horswill, A. R., (2016)** Rot is a key regulator of *Staphylococcus aureus* biofilm formation, *Molecular Microbiology*, **96**(2), 388–404.
  66. **Morikawa, K., Inose, Y., Okamura, H., Maruyama, A., Hayashi, H., Takeyasu, K., Ohta, T., (2003)** A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: Functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes to Cells*, **8**(8), 699–712.
  67. **Moscoso, J. A., Schramke, H., Zhang, Y., Tosi, T., Dehbi, A., Jung, K., & Gründling, A., (2016)** Binding of cyclic di-AMP to the *Staphylococcus aureus* sensor kinase KdpD occurs via the universal stress protein domain and downregulates the expression of the Kdp potassium transporter. *Journal of Bacteriology*, **198**(1), 98–110.
  68. **Nicolas, P., Mäder, U., Dervyn, E., Rochat, T., Leduc, A., Pigeonneau, N., Bidnenko, E., Marchadier, E., Hoebeke, M., Aymerich, S., et al., (2012)** Condition-Dependent Transcriptome Architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*, **1103**(March), 1103–1106.
  69. **Nielsen, J. S., Christiansen, M. H., Bonde, M., Gottschalk, S., Frees, D., Thomsen, L. E., Kallipolitis, B. H., (2011)** Searching for small  $\sigma^B$ -regulated genes in *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology*, **193**(1), 23–34.

70. Pané-Farré, J., Jonas, B., Förstner, K., Engelmann, S., Hecker, M., (2006) The  $\sigma^B$  regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *International Journal of Medical Microbiology*, **296**(4–5), 237–258.
71. Pané-Farré, J., Jonas, B., Hardwick, S. W., Gronau, K., Lewis, R. J., Hecker, M., Engelmann, S., (2009) Role of RsbU in controlling SigB activity in *Staphylococcus aureus* following alkaline stress. *Journal of Bacteriology*, **191**(8), 2561–2573.
72. Pellegrini, O., Mathy, N., Gogos, A., Shapiro, L., Condon, C., (2005) The *Bacillus subtilis* *ydcDE* operon encodes an endoribonuclease of the MazF/PemK family and its inhibitor. *Molecular Microbiology*, **56**(5), 1139–1148.
73. Pförtner, H., Burian, M. S., Michalik, S., Depke, M., Hildebrandt, P., Dhople, V. M., Pané-Farré, J., Hecker, M., Schmidt, F., Völker, U., (2014) Activation of the alternative sigma factor SigB of *Staphylococcus aureus* following internalization by epithelial cells - An in vivo proteomics perspective. *International Journal of Medical Microbiology*, **304**(2), 177-187.
74. Pourkomialian, B., (1998) Possible link between a 35 kDa membrane protein and osmolyte transport in *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, **26**(2), 149–152.
75. Pourkomialian, B. & Booth, I. R., (1992) Glycine betaine transport by *Staphylococcus aureus*: evidence for two transport systems and for their possible roles in osmoregulation. *Journal of General Microbiology*, **138**(12), 2515–2518.
76. Price-Whelan, A., Poon, C. K., Benson, M. A., Eidem, T. T., Roux, C. M., Boyd, J. M., Dunman, P. M., Torres, V. J., Krulwich, T. A., (2013) Transcriptional profiling of *Staphylococcus aureus* during growth in 2 M NaCl leads to clarification of physiological roles for Kdp and Ktr K<sup>+</sup> uptake systems. *mBio*, **4**(4), 1–11.
77. Proctor, R. A., Kriegeskorte, A., Kahl, B. C., Becker, K., Löffler, B., & Peters, G., (2014) *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **4**, 99.
78. Saïd-Salim, B., Dunman, P. M., McAleese, F. M., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P. J., Arvidson S, Foster, T. J., Projan, S, J., Kreiswirth, B. N., (2003) Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *Journal of Bacteriology*, **185**(2), 610–619.
79. Scott, W. J., (1953) Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30° C. *Australian Journal of Biological Sciences*, **6**(4), 549–564.
80. Senn, M. M., Giachino, P., Homerova, D., Steinhuber, A., Strassner, J., Kormanec, J., Flückiger, U., Berger-Bächli, B., Bischoff, M., (2005) Molecular analysis and organization of the  $\sigma^B$  operon in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, **187**(23), 8006–8019.
81. Shaw, L. N., Lindholm, C., Prajsnar, T. K., Miller, H. K., Brown, M. C., Golonka, E., Stewart, G. C., Tarkowski, A., Potempa, J., (2008) Identification and characterization of  $\sigma^S$ , a novel component of the *Staphylococcus aureus* stress and virulence responses. *PLOS ONE*, **3**(12).

82. **Schmitter, S., (2014)** Role of a Toxin-Antitoxin system in *L. monocytogenes*. Doctoral and Habilitation Thesis. *Swiss Federal Institute of Technology in Zürich (ETHZ)*, Zürich (Switzerland)
83. **Schulthess, B., Meier, S., Homerova, D., Goerke, C., Wolz, C., Kormanec, J., Berger-Bächli, B., Bischoff, M., (2009)** Functional characterization of the  $\sigma^B$ -dependent *yabJ-spoVG* operon in *Staphylococcus aureus*: Role in methicillin and glycopeptide resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(5), 1832–1839.
84. **Schuster, C. F., Bellows, L. E., Tosi, T., Campeotto, I., Corrigan, R. M., Freemont, P., Gründling, A., (2016)** The second messenger c-di-AMP inhibits the osmolyte uptake system OpuC in *Staphylococcus aureus*. *Science signaling*, **9**(441), p.ra81.
85. **Schuster, C. F., Mechler, L., Nolle, N., Krismer, B., Zelder, M.-E., Götz, F., & Bertram, R., (2015)** The MazEF Toxin-antitoxin system alters the  $\beta$ -lactam susceptibility of *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE*, **10**(5), 1–22.
86. **Schwan, W. R., Lehmann, L., & McCormick, J., (2006)** Transcriptional activation of the *Staphylococcus aureus putP* gene by low-proline-high osmotic conditions and during infection of murine and human tissues. *Infection and immunity*, **74**(1), 399–409.
87. **Schwan, W. R. & Wetzler, K. J., (2016)** Osmolyte transport in *Staphylococcus aureus* and the role in pathogenesis. *World Journal of Clinical Infectious Diseases*, **6**(2), 22–27
88. **Sieradzki, K. & Tomasz, A., (1998)** Suppression of glycopeptide resistance in a highly teicoplanin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus* by transposon inactivation of genes involved in cell wall synthesis. *Microbial Drug Resistance*, **4**, 159–168.
89. **Singh, V. K., Schmidt, J. L., Jayaswal, R.K., Wilkinson B.J., (2003)** Impact of sigB mutation on *Staphylococcus aureus* oxacillin and vancomycin resistance varies with parental background and method of assessment. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **21**(3), 256–261.
90. **Sleator, R. D. & Hill, C., (2002)** Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, **26**(1), 49–71.
91. **Spiegelhalter, F. & Bremer, E., (1998)** Osmoregulation of the opuE proline transport gene from *Bacillus subtilis*: Contributions of the sigma A- and sigma B-dependent stress-responsive promoters. *Molecular Microbiology*, **29**(1), 285–296.
92. **Sue, D., Boor, K. J. & Wiedmann, M., (2003)**  $\sigma^B$ -dependent expression patterns of compatible solute transporter genes *opuCA* and *lmo1421* and the conjugated bile salt hydrolase gene *bsh* in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, **149**(11), 3247–3256.
93. **Townsend, D. E., & Wilkinson, B. J., (1992)** Proline transport in *Staphylococcus aureus*: a high-affinity system and a low-affinity system involved in osmoregulation. *Journal of Bacteriology*, **174**(8), 2702–2710.
94. **Tuchscherr, L., Bischoff, M., Lattar, S. M., Noto Llana, M., Pförtner, H., Niemann, S., Geraci, J., Van de Vyver, H., Fraunholz, M. J., Cheung, A. L., et al., (2015)** Sigma factor SigB is crucial to mediate *Staphylococcus aureus* adaptation during chronic infections. *PLoS Pathogens*, **11**(4).
95. **Von Blohn, C., Kempf, B., Kappes, R. M., Bremer, E., (1997)** Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Molecular microbiology*, **25**, 175–187.

96. **Vijaranakul, U., Nadakavukaren, M. J., de Jonge, B. L., Wilkinson, B. J., & Jayaswal, R. K., (1995)** Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine. *Journal of Bacteriology*, *177*(17), 5116–5121.
97. **Vilhelmsson, O. & Miller, K.J., (2002)** Humectant permeability influences growth and compatible solute uptake by *Staphylococcus aureus* subjected to osmotic stress. *Journal of Food Protection*, *65*(6), 1008–15.
98. **Walker, J. N., Crosby, H. A., Spaulding, A. R., Salgado-Pabón, W., Malone, C. L., Rosenthal, C. B., Schlievert P. M., Boyd J. M., Horswill, A. R., (2013)** The *Staphylococcus aureus* ArIRS two-component system is a novel regulator of agglutination and pathogenesis. *PLoS Pathogens*, *9*(12), e1003819.
99. **Wengender, P. A. & Miller, K. J., (1995)** Identification of a PutP proline permease gene homolog from *Staphylococcus aureus* by expression cloning of the high-affinity proline transport system in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(1), 252–259.
100. **Wetzel, K. J., Bjorge, D. & Schwan, W. R., (2011)** Mutational and transcriptional analyses of the *Staphylococcus aureus* low-affinity proline transporter OpuD during in vitro growth and infection of murine tissues. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *61*(3), 346–355.
101. **Wu, S., De Lencastre, H. & Tomasz, A., (1996)** Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: Molecular cloning and DNA sequencing. *Journal of Bacteriology*, *178*(20), 6036–6042.
102. **Xue, T., You, Y., Hong, D., Sun, H., & Sun, B., (2011)** The *Staphylococcus aureus* KdpDE two-component system couples extracellular K<sup>+</sup> sensing and agr signaling to infection programming. *Infection and Immunity*, *79*(6), 2154–2167.
103. **Yancey, P. H., (2005)** Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology*, *208*(Pt 15), 2819–2830.
104. **Yarwood, J. M., & Schlievert, P. M. (2003)** Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(11), 1620–1625.
105. **Young, J. W., Locke, J. C. W. & Elowitz, M. B., (2013)** Rate of environmental change determines stress response specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 4140–4145.
106. **Zhang, S., Shu, X. & Sun, B., (2016)** SigmaB regulates *ccrAB* expression and *SCCmec* excision in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, *306*(6), 406–414.
107. **Zhu, L., Inoue, K., Yoshizumi, S., Kobayashi, H., Zhang, Y., Ouyang, M., Kato, F., Sugai, M., Inouye, M., (2009)** *Staphylococcus aureus* MazF specifically cleaves a pentad sequence, UACAU, which is unusually abundant in the mRNA for pathogenic adhesive factor SraP. *Journal of Bacteriology*, *191*(10), 3248–3255.
108. **Zorzini, V., Buts, L., Sleutel, M., Garcia-Pino, A., Talavera, A., Haesaerts, S., De Greve, H., Cheung, A., van Nuland, N. A., Loris, R., (2014)** Structural and biophysical characterization of *Staphylococcus aureus* SaMazF shows conservation of functional dynamics. *Nucleic Acids Research*, *42*(10), 6709–6725.