

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Institute für Infektionsmedizin
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ. –Prof. Dr. med. M. Herrmann

**Einfluss verschiedener Nährmedien auf die Expression der
Adhäsionsproteine Eap und Emp in *S. aureus***

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2008**

vorgelegt von
Nina Kawasaki
geb. am 01.10.1978 in Meerbusch-Lank

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	6
1.1	deutsch.....	6
1.2	englisch.....	8
2	Einleitung.....	10
2.1	Familie der Staphylokokken.....	10
2.2	Genom.....	11
2.3	Zellwand.....	11
2.4	Kapsel.....	12
2.5	Oberflächenproteine.....	12
2.6	Toxine.....	12
2.7	Enzyme und andere Komponenten.....	13
2.8	Epidemiologie der <i>S. aureus</i> Erkrankungen.....	14
2.9	Erkrankungen.....	15
2.9.1	Invasive Form.....	15
2.9.2	Toxinbedingte Form.....	15
2.9.3	Übergangsformen zwischen invasiven und toxinbedingten Erkrankungen.....	16
2.10	Behandlung von <i>S. aureus</i> Erkrankungen.....	16
2.11	Genexpression.....	16
2.11.1	Accessory gene regulator (= <i>agr</i>).....	17
2.11.2	<i>S. aureus</i> exoprotein expression (= <i>sae</i>).....	18
2.11.3	Staphylococcal accessory regulator (= <i>sarA</i>).....	18
2.12	Eap und Emp.....	19
2.12.1	Eap.....	19
2.12.2	Emp.....	23
3	Ziel.....	24
4	Material und Methoden.....	25
4.1	Materialien.....	25
4.1.1	Nährmedien.....	25
4.1.2	Bakterienstämme, Plasmide und Primer.....	28
4.2	Methoden.....	30
4.2.1	Kultivierung und Konservierung von Bakterien.....	30

4.2.2	Methoden für Arbeiten mit Nukleinsäuren	30
4.2.3	<i>gfp-lux</i> -Reporter-Gen Assay	38
4.2.4	Isolierung und Kontrolle von Proteinen aus Staphylokokken.....	39
4.2.5	SDS Extraktion von Zellwandproteinen	39
4.2.6	pH-Messungen	41
5	Ergebnisse	43
5.1	Herstellung von Newman + pEmp-gfp-lux	43
5.1.1	DH5a + pEmp-gfp-lux	43
5.1.2	Sequenzanalyse	44
5.1.3	Transformation in Staphylokokken.....	45
5.2	Newman Wachstumskurven.....	47
5.3	<i>gfp-lux</i> Reporter Gen Analysen und pH Bestimmung in Basismedien	50
5.4	Untersuchung der Zellwandprotein- und der sezernierten Proteinmenge	58
5.5	<i>gfp-lux</i> Reporter Gen Analysen in modifizierten Basismedien	59
5.6	Newman Aconitase Mutant.....	65
5.6.1	Selektion einer Insertionsmutante	66
6	Diskussion	68
6.1	Wahl des Reporter-Gen-Assay	68
6.2	Resultate	69
6.2.1	Wachstum von <i>S. aureus</i> Newman in verschiedenen Nährmedien.....	69
6.2.2	<i>Eap</i> und <i>emp</i> Expression in verschiedenen Nährmedien	69
6.2.3	Acetat Messung	77
6.2.4	Newman <i>acnA</i> Mutant.....	78
6.2.5	Untersuchungen der Zellwandproteine von Newman	79
7	Literaturverzeichnis	81
8	Publikationen.....	89
	Danksagung	90
	Curriculum vitae.....	91

Abkürzungsverzeichnis

acnA	Akonitase
AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom
APC	antigen präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
Bfgf	‘basic fibroblast growth factor’
BHI	‘Brain Heart Infusion’
Bla	β-Laktamase
BLAST	‘basic local alignment search tool’
Bp	Basenpaare
cMRSA	‘community’ (ambulant) Meticillin resistenter <i>S. aureus</i>
DNA	Desoxyribonuklein-Säure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Eap	Extrazelluläres adhäsions- Protein
Emp	extrazelluläres Matrix-Protein-Binder
EB	Elution Buffer
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanidintriphosphat
HPLC	‘High Performance Liquid Chromatography’
ICAM-1	‘intercellular adhesion molecule-1’
IL-2	Interleukin-2
kDa	Kilo Dalton
LB	Lennox Broth
MAP	MHC analoges Protein
MBB	‘Modified Basic Broth’
MDB	‘membrane desalting buffer’
MHB	‘Müller Hinton Broth’
MHC	‘Major-Histocompatibility complex’
MRSA	Methicillin resistenter <i>S. aureus</i>
MSCRAMM	‘Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules’
NB	‘Nutrient Broth’
OD	Optische Dichte
PBMC	‘Peripheral Blood Mononuclear Cell’

PCR	Polymerase Ketten Reaktion
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	‘Realtime’-PCR
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
SDS	‘sodium dodecyl sulfate’
SERAM	‘Secretable Expanded Repertoire Adhesion Molecule's’
SSSS	‘Staphylococcal Scalded Skin Syndrome’
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TF	‘Tissue factor’
THB	‘Todd Hewit Broth’
TNF	Tumornekrosefaktor
TSB	‘Tryptic Soy Broth’
VEGF	‘Vascular endothelial growth factor’

1 Zusammenfassung

1.1 deutsch

S. aureus ist ein hoch virulentes Pathogen. Es wird sowohl nosokomial als auch ambulant erworben und kann eine große Anzahl von zum Teil lebensbedrohlichen Erkrankungen verursachen. Um seinen Wirt kolonisieren und infizieren zu können, ist der Erreger mit verschiedenen Virulenzfaktoren ausgestattet, zu denen unter anderem auch die in dieser Arbeit besonders adressierten sezernierten Adhäsine, das ‚extrazelluläre Adhäsivprotein‘ (Eap) und das ‚extrazelluläre Matrixbindeprotein‘ (Emp) zählen. Wesentliche Informationen über die Bedeutung von Staphylokokken-Virulenzfaktoren haben sich auf der Grundlage von in vitro Untersuchungen ergeben. Für diese Untersuchungen werden neben definierten Kulturmedien typischerweise standardisierte komplexe Medien (Basismedien) verwendet. Da unter anderem die Expressionskinetiken der Virulenzfaktoren – abhängig von der wachstumsphasenabhängigen globalen *S. aureus* Regulation – jedoch wesentlich auch von der Wahl des komplexen Mediums abhängt, war es die Aufgabenstellung dieser Dissertation, das Expressionsverhalten der hier besonders interessierenden Proteine Eap und Emp in unterschiedlichen Nährmedien zu untersuchen.

Zunächst wurde von *S. aureus* in verschiedenen Basismedien eine Wachstumskurve erstellt. Hierbei zeigten sich keine besonders hervorzuhebenden Unterschiede im Wachstum. Lediglich *S. aureus* Stamm Newman tritt – sofern in MBB angezogen - etwas früher in die stationäre Phase ein als in den anderen Medien, und Glukosesupplementierung lässt diesen Stamm insgesamt schneller wachsen. Im nächsten Schritt wurden in den Basis- und modifizierten Basismedien die *eap* und *emp* Expression mit Hilfe des *gfp-lux* Reporter Systems untersucht. Mit einem geeigneten Bisluminometer wurde die Bioluminescens, welche die Genexpression widerspiegeln soll, gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Nährmedien einen positiven bzw. negativen Effekt auf die Expression von *eap* und *emp* ausüben. Im Verhältnis zu MBB führte eine Kultivierung in TSB, BHI und NB zu einer verminderten Expression dieser Gene, wohingegen eine Kultivierung in THB zu einer erhöhten Expression führte. Betrachtet man alle Daten, lässt sich die Aussage treffen, dass die Wahl des Basismediums auf die Expression von *eap* und *emp* in Stamm Newman einen deutlichen Einfluss hat.

In einigen dieser analysierten Basismedien ist Glukose enthalten, welches durch die Bildung saurerer Metabolite im Rahmen des Karbohydrat Katabolismus zu einer Ansäuerung des Mediums führt. Es ist bekannt, dass die Ansäuerung von Medien Auswirkung auf die globale *S. aureus* Genregulation hat. Insbesondere die Expression des Regulators *sae*, eines für die

Expression von *eap* und *emp* relevanten Regulators, kann hierdurch nachdrücklich beeinflusst werden. Daher wurden in weiteren Experimenten Veränderungen des pH-Wertes in den glukosehaltigen Basismedien zu unterschiedlichen Zeiten der Kultivierung gemessen. Die pH-Werte fielen in BHI, TSB und NB im Laufe von 3 Stunden Inkubationszeit und näherten sich dabei an einen pH-Wert ~ 6 an. Interessanterweise fielen die pH-Werte bei Anzucht von *S. aureus* Newman in den Medien TSB und NB auch noch in den folgenden Stunden, wohingegen das Medium BHI basischer wurde.

Bei der aeroben Metabolisierung von Glukose entsteht immer Acetat, das von den Bakterien ans Medium abgegeben wird. Im weiteren Verlauf kann das möglicherweise wieder zu einer Beeinflussung auf die Expression verschiedener Gene führen, weshalb in ausgewählten Basismedien der Acetatgehalt bestimmt wurde. In MBB akkumulierte Acetat während der exponentiellen Phase und wurde dann in der postexponentiellen Phase aufgebraucht. In BHI und TSB kam es bis zum zweiten Messpunkt (6 Stunden) zu einer Anreicherung mit Acetat, das dann wiederum bis zum dritten Messpunkt (10 Stunden) im Medium nicht mehr nachweisbar war. In THB hingegen kam es zu einer kontinuierlichen Acetatanreicherung, und Acetat war auch nach 24 Stunden im Medium immer noch nachweisbar. Weitere Untersuchungen wurden angestrebt mit der Überlegung, dass die Metabolisierung von Acetat im Medium einen funktionellen Zitratzyklus erfordert. Um diese Frage zu adressieren, wurde die Herstellung einer *S. aureus* defizient in dem Zitratzyklus-Enzym Aconitase durch eine Mutante *acnA* angestrebt; die Herstellung einer Doppel-, 'cross-over' Insertionsmutante gelang jedoch nicht.

Die gewonnenen Reporter-gen-Expressionsdaten wurden nachfolgend durch semiquantitative Bestimmung mit der jeweiligen Proteinmenge von Eap und Emp zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten in den verschiedenen Basismedien korreliert. Hier zeigten sich jedoch keine Übereinstimmungen der Daten. Mögliche Erklärungsansätze dafür wären, dass Gen-Expression nicht gleich ein Protein hervorbringen muss, dass das gewählte Reporter-Gen-Verfahren ungeeignet ist oder sich nur für Messungen innerhalb eines bestimmten Zeitrahmens eignet. Des Weiteren kann es auf Grund unterschiedlichen ATP-Gehalts bei unterschiedlicher Stoffwechselaktivität des Erregers entsprechend seiner Umgebung zu Artefakten bei der Erhebung der Lumineszenzdaten gekommen sein. Es ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau zu erörtern, weshalb sich die Daten nicht decken, was allerdings einen Anreiz für weitere Untersuchungen gibt.

1.2 englisch

S. aureus is a highly virulent pathogen. It can be acquired either as a nosocomial or community-acquired infection and is responsible for a large number of sometimes life-threatening diseases. To infect and colonize its host, *S. aureus* is equipped with different virulence factors, including the secreted adhesins specifically addressed in this work, the extracellular adherence protein (Eap) and the extracellular matrix binding protein (Emp). Substantial information about the importance of staphylococcal virulence factors has been obtained from in vitro studies. For these investigations standardized complex media are typically used. Since the expression kinetics of the virulence factors is dependent on the growth phase-dependent regulation of *S. aureus* global regulators, which in turn may be influenced by components of the complex media, the aim of this dissertation was to investigate the expression patterns of *eap* and *emp* in different growth media.

To begin, a growth curve of *S. aureus* Newman in the different media was performed. There were no substantial differences in growth in the different media. Minor differences included Newman entering the stationary phase a little earlier in MBB than in other media, while glucose supplementation made Newman grow faster. The next step was to analyse *eap* and *emp* expression in the different media using the *gfp-lux* reporter system. With an appropriate luminometer, bioluminescence, which was used as the reporter of gene expression, was measured. It was shown that different culture media can exert a positive or negative effect on the expression of *eap* and *emp*. In comparison to MBB, growth in TSB, BHI and NB decreased expression of these genes, whereas growth in THB increased gene expression. Taken together, it can be said that the choice of growth medium can significantly influence expression of *eap* and *emp*.

Some of the complex media examined in this work contain glucose, which following carbohydrate catabolism, can lead to acidification of the growth medium. It is known that the acidification of media can affect *S. aureus* global gene regulation. In particular, the expression of the regulator *sae*, which is essential for the expression of *eap* and *emp*, is strongly affected. Therefore, in further experiments changes in pH in glucose-containing media was examined at different time points. The pH values of BHI, TSB and NB after a 3 hour incubation period was around 6. Interestingly, the pH of TSB and NB media containing *S. aureus* Newman fell in the following hours, whereas in BHI the medium became more basic.

Aerobic metabolism of glucose always results in the accumulation of acetate in the growth medium. Because this acetate could influence gene expression, the amount of acetate produced by *S. aureus* Newman in the different growth media was assessed. In MBB acetate accumulated during the exponential phase but by the post-exponential phase was exhausted. In BHI and TSB acetate accumulated up to the second time point (6 hours) acetate, but it was no longer detectable at the third time point (10 hours). In THB on the other hand, there was a continuous accumulation of acetate, which was still detectable even after 24h. Based on the hypotheses that the accumulation of acetate was indicative of an inactive TCA cycle and that TCA cycle activity may influence *eap* expression, an attempt to investigate the role of the TCA cycle in *eap* regulation was made by generating an aconitase mutant in Newman. However, generation of this mutant was unsuccessful.

The reporter obtained expression data were followed up with a semi-quantitative determination of the amount of Eap produced at different time points in the various media. However, this data did not correspond to what was seen with the reporter gene assay. One explanation for this is that gene expression is not equivalent to protein production, or that the selected reporter gene is unsuitable, or that it is only suitable for measurements within a certain time frame. As bioluminescence is dependent on the energy status of the bacteria, which could be affected by the different growth media, it is possible that artefacts were introduced into the bioluminescence data. However, the reasons for the data not correlating are beyond the scope of the current investigations.

2 Einleitung

Staphylococcus aureus ist ein grampositives Bakterium, dessen krankmachende Bedeutung sowohl im humanpathogenen als auch im veterinärmedizinischen Bereich seit seiner Erstbeschreibung bekannt ist. Die ersten entsprechenden Studien datieren aus den 80er Jahren des 19. Jahrhunderts; bis heute ist die Bedeutung des Erregers jedoch ungebrochen. Der Erreger wird nosokomial, meistens schon mit Resistenz gegen mehrere Antibiotika, oder ambulant erworben. Etwa 30 % der Bevölkerung sind konstant mit *S. aureus* kolonisiert; in den meisten Fällen (bei gesunden Personen) geht eine solche Kolonisierung jedoch nicht mit dem Auftreten einer akuten Erkrankung einher. Das Krankheitsspektrum des Erregers reicht von Lebensmittelvergiftungen, Abszessen, lokalen Wundinfektionen bis hin zur Sepsis, welche unabhängig vom Resistenzspektrum des Erregers fulminant verlaufen und damit kurzfristig lebensbedrohliche Ausmaße annehmen kann. Die Vielseitigkeit und Häufigkeit von *S. aureus* Erkrankungen erfordern eine möglichst detaillierte Kenntnis der Virulenzmechanismen des Erregers und der Pathomechanismen der Erkrankung, um daraus neue Ansätze zur Prophylaxe und Therapie dieser Infektionen abzuleiten.

2.1 Familie der Staphylokokken

Staphylokokken gehören, neben den Streptokokken, in der Humanmedizin zu den wichtigsten Vertretern grampositiver Kokken. Sie gehören in die Familie der *Micrococcaceae*, zu der zum Beispiel auch *Micrococcus* spp. und *Stomatococcus* spp. zählen.

Staphylokokken (Haufenkokken) erscheinen unter dem Mikroskop betrachtet als grampositive Kugelbakterien. Sie teilen sich in allen Raumebenen, sind unbeweglich und liegen daher in traubenförmiger Anordnung vor. Ihr Durchmesser beträgt in etwa 1 µm. Staphylokokken werden in koagulasepositive, zu denen *S. aureus* gehört, und koagulasenegative, zu denen *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. warneri* und 16 weitere Stämme gehören, unterteilt. Unter den Staphylokokken kommt klinisch *S. aureus* eine besondere Bedeutung zu, da dieser Erreger deutlich virulenter als die koagulase-negativen Spezies ist und damit in besonderem Masse zu Morbidität und Mortalität beiträgt.

Staphylokokken sind nicht anspruchsvoll und lassen sich gut in einfachen und komplexen Nährmedien anzüchten. Das Temperaturoptimum zum Wachstum ist seinem Haupt-Wirt, dem Säugetier, angepasst und liegt bei ca. 37 ° C. Staphylokokken bilden porzellanweiße bis goldgelbe Kolonien, die auf Blutagarplatten zum Teil Hämolyseeigenschaften aufweisen. Die Identifizierung von Staphylokokken erfolgt heutzutage durch mikrobiologische

Routinelaborverfahren, die neben den Grundcharakteristika wie Morphologie, Katalase- und Koagulase-Verhalten charakteristische StoffwechsellLeistungen, Oberflächenmerkmale, und für bestimmte Fragestellungen auch molekularbiologische Analysen beinhalten.

Die weiteren Ausführungen beziehen sich auf die in dieser Arbeit besonders untersuchte Spezies, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (= *S. aureus*)

2.2 Genom

Das Genom von *S. aureus* besteht aus einem zirkulären Chromosom von ungefähr 2.8 Mbp, welches Prophagen, Transposons, integrierte Plasmide und *S. aureus* Pathogenitätsinseln (SaPI) sowie weitere *S. aureus* Genominseln (vSa) enthält. Einige SaPI sind stammspezifisch, wie SaPI4, während andere bei allen Stämmen vorgefunden werden, wie vSa α . Die SaPI sind genetisch mobile Elemente, welche unter anderem die Sequenz für Superantigene enthalten. Des Weiteren besitzt der Erreger auch extrachromosomale DNA. Der genetische Kode der Antibiotikaresistenzen und auch der Virulenzfaktoren befindet sich auf dem Chromosom und auf der extrachromosomalen DNA. *S. aureus* ist befähigt zum horizontalen Gentransfer mit anderen grampositiven Erregern; ein solcher Austausch kann u.a. im Rahmen einer Transduktion durch lytische Bakteriophagen erfolgen (Holden et. al., 2004).

2.3 Zellwand

Die Zellwand besteht hauptsächlich aus Peptidoglykanen und wird auch als Murein bezeichnet. Die Peptidoglykanschicht enthält Polysaccharidketten, bestehend aus Untereinheiten von N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure. Die Aminosäureseitenketten des N-Acetylglukosamin werden durch die Transpeptidasen (auch benannt als Penicillin-Binde-Proteine (PBPs)) und Ausbildung einer Pentaglycin-Brücke zwischen den D-Ala-D-Ala-Resten quervernetzt. Hierdurch entsteht die polymerisierte Zellwand als singuläres, das Bakterium umhüllende, Molekül.

Die Peptidoglykane haben ähnliche Wirkungen wie Endotoxine. Sie veranlassen die Makrophagen Zytokine zu produzieren, aktivieren das Komplementsystem und führen zur Aggregation der Blutplättchen. Die verschiedenen *S. aureus* Stämme weisen in der Struktur der Peptidoglykane Unterschiede auf. Diese Unterschiede sind möglicherweise mit dafür verantwortlich, dass es eine große Bandbreite in der Verursachung und dem klinischen Verlauf von Verbrauchskoagulopathien gibt (Kessler CM et. al., 1991).

Neben dem Peptidoglykan enthält die grampositive Zellwand Teichonsäuren, von denen die Lipoteichonsäure einen Membrananker besitzt, während die Wandteichonsäure kovalent an die Peptidoglykanschicht gebunden ist. Darüber hinaus finden sich diverse Proteine, welche zum

Teil als Virulenzfaktoren zum Schutz vor Phagozytose, Adhärenz etc. fungieren. Ein Beispiel ist das Protein A (näheres in Kapitel 3.5), welches die Antiphagozytose-Eigenschaften der Staphylokokken vermittelt. Dies kommt dadurch zustande, dass Protein A die Fc Abschnitte der Immunglobuline binden kann. Der Fc Abschnitt kann nicht mehr von den Makrophagen gebunden werden und wird als Opsonin unbrauchbar (Patti JM et. all, 1994).

2.4 Kapsel

Einige Staphylokokken produzieren eine Mikro kapsel aus Polysacchariden, welche die Bakterien vor der Phagozytose schützt. Bisher wurden 11 Serotypen identifiziert. In 75 % der *S. aureus* Infektionen ist Typ 5 und Typ 8 anzutreffen. Bei den meisten Methicillin-resistenten Staphylokokken wurde der Typ 5 isoliert. Bei 4 der beschriebenen 11 Typen, konnte die chemische Zusammensetzung und deren Einordnung weiter aufgeklärt werden, darunter Typ5 und Typ 8 (Lee JC, 1996).

2.5 Oberflächenproteine

Die Adhäsion an Zelloberflächen oder implantierten Materialien ist ein wesentlicher Schritt bei der Invasion des Erregers. Sie erfolgt über spezifische Oberflächenproteine oder durch eine Interaktion von Oberflächenproteinen mit Wirts-eigenen Proteinen wie dem von Willebrand Faktor, Fibronectin, Fibrinogen und Kollagen (Höök und Foster, 1998). Die Oberflächenproteine ähneln sich in manchen Punkten in ihrem Aufbau. Zum Beispiel besitzen sie am N-terminalen Ende eine Signalsequenz, die zur Sekretion des Proteins benötigt wird. Eine Ligandenbindungs-Domäne am N terminalen Ende einiger Oberflächenproteine macht diese zu so genannten Adhäsionsmolekülen. Es werden zwei Typen Oberflächenproteine von *S. aureus* produziert (Übersicht in: Navarre und Schneewind, 1999). Ein Typ dieser Oberflächenproteine ist kovalent an die Staphylokokken Zelloberfläche gebunden (Mazmanian et al, 1999), wird als ‚microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules‘ (MSCRAMM) bezeichnet und stellt Brücken zwischen dem Bakterium und seiner Wirtszelle her (Sinha et al, 1999). Hierzu zählen unter anderem das Protein A, die Fibronectin-Binde-Proteine A und B, und Clumping Faktor A und B. Die zweite Gruppe ist nicht kovalent mit der Zelloberfläche verbunden. In diese Gruppe gehören das Fibrinogen-Binde Protein (Palma et al, 2001), die Koagulase (Boden und Flock, 1989), sowie Eap und Emp (siehe Kapitel 3.12).

2.6 Toxine

Die unterschiedlichen Toxine werden auf Grund ihres auslösenden Mechanismus in verschiedene Gruppen eingeteilt.

Zelltoxine (zu dieser Gruppe gehört das 33 kD alpha Toxin, welches zur Zerstörung von Zellen führt und darüber zur Manifestation eines Sepsis Syndroms beitragen kann (Bhakdi and Tranum-Jensen, 1991; Walev et al, 1995).

- Pyrogene Toxine, die wie Superantigene wirken. Sie binden direkt an MHC II Proteine, was zur starken Zytokinfreisetzung und T-Zellproliferation führt (Marrak P. et al, 1990).
- Die Enterotoxine besitzen unterschiedliche Domänen, die für zwei unterschiedliche Erkrankungen verantwortlich sind. Das ist zum einen das Toxic Shock Syndrom und zum anderen die Lebensmittelvergiftung (Harris et al, 1993). Das Toxin, das das TSS auslöst hat strukturelle Ähnlichkeit zu den Enterotoxinen B und C. In 20 % der isolierten *S. aureus* Fälle wurde es nachgewiesen (Marrak P. et al, 1990).
- Exfoliativ Toxine sind epidermolytische Toxine. Hierzu gehört das Exfoliativ Toxin A und B. Sie bewirken eine blasenförmige Abhebung der Haut (Gentilhomme E. et al, 1990). Exfoliativ Toxine sind inaktivierte Serinproteasen, welche durch bestimmte epidermale Kofaktoren aktiviert werden oder Serinproteasen umliegender Zellen aktivieren (Ladhani S. et al, 1999). Diese Serinproteasen führen aufgrund ihrer außerordentlichen zielgerichteten molekularen Spezifität innerhalb der Desmosomen zu einer Aufspaltung des Haftproteins Desmoglein 1. Die Zell-Zell Kontakte des Stratum granulosum der Epidermis lösen sich auf und es kommt zu einer nicht-entzündlichen Auflockerung der Zellverbände mit Spaltbildung, die eine Ablösung der oberen verhornten Epidermisschichten bewirkt und als schlaaffe Blasenbildung in Erscheinung tritt (Dermatologie und Venerologie, 5. Auflage Springer). Ein Krankheitsbild ist das Staphylokokken Scaled Skin Syndrom. Hiervon sind meist Säuglinge und Kleinkinder betroffen.

2.7 Enzyme und andere Komponenten

Neben den bereits genannten Proteinen bildet *S. aureus* noch eine Vielzahl an Enzymen. Hierzu gehören u.a. die Protease und die Lipase. Hyaluronidase vermittelt Gewebszerstörung und Ausbreitung in Körpergewebe. Hämolytine dienen zur Auflösung von Erythrozyten aber auch von Parenchymzellen. β -Lactamasen inaktivieren Penicillin. Koagulase bildet mit Prothrombin das sogenannte „Staphthrombin“, das auch ohne Prothrombin-Aktivierung durch Fibrinogen-Spaltung Fibrin polymerisiert. Koagulase ist wahrscheinlich wesentlich an der Abszesswand-Bildung mitbeteiligt. Fibrinolyse löst die Fibrinbildung durch Plasminaktivierung und ist damit ebenfalls an der Ausbreitung im Gewebe beteiligt.

2.8 Epidemiologie der *S. aureus* Erkrankungen

S. aureus besiedelt beim Menschen die verschiedensten Stellen auf der Haut und Schleimhaut. Man findet den Erreger im Bereich der Nasenvorhöfe, in der Axilla, in der Vagina, im Mund-Rachenbereich und auf geschädigter Haut (Noble WC et al, 1967; Casewell MW et al, 1986). Der Mensch ist ein natürliches Reservoir für dieses Bakterium. 30-50 % gesunder Menschen sind unbemerkt mit *S. aureus* besiedelt und 10 - 20 % sind dauerhaft kolonisiert (Casewell MW et al, 1986; Sanford MD et al, 1994). Eine Kolonisation geht mit einem erhöhten Risiko für die Person, an einer Infektion zu erkranken, einher. Immunschwache Menschen sind natürlich besonders gefährdet. Beispiele sind Typ I Diabetiker, Drogensüchtige, die sich ihre Drogen über die Venen verabreichen, chirurgische Patienten, AIDS Patienten und Menschen mit qualitativ oder quantitativ veränderten Leukozyten.

Die Zahlen der ambulant und nosokomial erworbenen *S. aureus* Infektionen, steigt seit den letzten 20 Jahren an. Eine Erhebung aus den Jahren 1990 bis 1992 ergab, dass der Erreger der Hauptverursacher von nosokomial erworbenen Pneumonien und chirurgischen Wundinfektionen ist. Als Verursacher von Sepsis steht er dabei an zweiter Stelle, gleich nach den koagulase negativen Staphylokokken (Emori TG et al, 1994).

In nahezu allen Ländern, insbesondere auch in Deutschland, im Anstieg befindlich sind nosokomiale Infektionen mit Methicillin resistenten Staphylokokken (MRSA). Im Krankenhausbereich allgemein, besonders jedoch auf Intensivstationen, aber auch im Altenheim- und Pflegeheim-Bereich sind diese Stämme immer öfter anzutreffen und stellen für den Patient eine erhebliche Gefahr dar, vor allem dann, wenn sie auch noch andere Resistenzen aufweisen (Panilio A et al, 1992). 1990 waren 1,7 % der koagulase positiven Staphylokokken gegen Methicillin resistent. 2004 waren es dann schon 22,6 % (Paul Ehrlich Gesellschaft). Unter den ambulant erworbenen Stämmen findet sich auch immer öfter MRSA (cMRSA) (Moreno et al, 1995). cMRSA weisen ein geringeres Resistenzpotential bei nicht β -Laktamantibiotika gegenüber nosokomial erworbenen MRSA auf. Das für die β -Laktam Resistenz verantwortliche *mec* Gen kodiert das Penicillin-binde-Protein 2a und liegt auf einem mobilen genetischem Element, auch bekannt als Staphylokokken Kassetten Chromosom (SCC*mec*), von denen fünf Typen bisher sequenziert wurden. SCC*mec* IV und V, welche kleiner ausfallen und ein großen Teil der nicht β -Laktam Antibiotikaresistenz verloren haben, werden vor allem bei cMRSA gefunden (Daum et al, 2002). Als Risikofaktoren für den Erwerb eines cMRSA gelten intravenöser oder intranasaler Drogenmissbrauch, Haushalt mit mehr als drei Familienmitgliedern, niedriger sozioökonomischer Status, Aufenthalt des Kindes in einer Kindertagesstätte, Erhalt einer Tätowierung auf der Straße oder im Gefängnis, Aufenthalt im

Gefängnis oder sonstiger Arrestanstalten, Obdachlosigkeit, Streetworker, Militärpersonal, HIV Infektion, sexueller Kontakt (Bratu et al, 2006; Cook, Furuya, Larson, Vasquez & Lowy, 2007; Johnston et al, 2006; Miller et al, 2007; Stemper et al, 2006).

2.9 Erkrankungen

Es gibt eine Vielzahl an Krankheitsbildern die durch eine *S. aureus* Infektion hervorgerufen werden. Bei der Therapie muss die Ätiologie mit einbezogen werden. Die Infektionen werden in drei Gruppen unterteilt, welche Unterschiede in der Therapie aufweisen.

2.9.1 Invasive Form

Das morphologische Korrelat einer Invasion mit *S. aureus* zeigt sich in der Bildung von Abszessen der Haut und den Schleimhäuten oder auch an inneren Organen, in Folge einer Sepsis. Ohne frühzeitige Antibiotikatherapie, aber auch unter Therapie, kann es in Folge zum septischen Schock oder als Spätfolge zu einer Endokarditis kommen.

Bei einer Invasion bindet *S. aureus* über Adhäsionsproteine an die Rezeptoren der Endothelzellen und wird folgend phagozytiert (Ogawa SK et al, 1985). Das intrazelluläre Milieu schützt den Erreger vor dem Immunsystem des Wirtes. Das intraendotheliale Zellmilieu ermöglicht sogar die Bildung kleiner Kolonien, die ``small colony variants`` genannt werden (Vesga et al, 1996). Diese Faktoren unterstützen, dass es zu persistierenden oder rezidivierenden Erkrankungen kommen kann (Proctor et al, 1995). Mehrere Komponenten von *S. aureus* sind in der Lage eine Sepsis mit anschließendem Multiorganversagen zu induzieren (Bone et al, 1994). Tiermodelle haben gezeigt, dass Peptidoglykan vor allem in Verbindung mit der Lipoteichonsäure zu ähnlichen Reaktionen wie Endotoxin führt (Spika et al, 1982; De Kimpe et al, 1995). Besonders wichtig ist ein frühes Erkennen der Invasion, die sofortige Therapieeinleitung mit Antibiotika zur Erregerbekämpfung und die Einleitung einer symptomatischen Therapie.

2.9.2 Toxinbedingte Form

Erkrankungen können auch erregerunabhängig ausgelöst werden. Lebensmittelvergiftungen, wie die Staphylokokken Enteritis, werden hierzu gezählt und sind rein Toxin vermittelt. Es ist eine ungefährliche Form einer durch Toxin vermittelten Erkrankung und verläuft selbstlimitierend. Die Therapie ist rein symptomatisch mit Ausgleich von Flüssigkeits- und Elektrolytverlust. Die Kardinalsymptome sind Durchfall, Übelkeit und Erbrechen.

2.9.3 Übergangsformen zwischen invasiven und toxinbedingten Erkrankungen

Zu den Übergangsformen gehören das Skaled Skin Syndrom (SSS) auch bezeichnet als Dermatitis exfoliativa und das Toxic Shock Syndrom (TSS). Bei ersterem sind fast immer, aber nicht nur, Säuglinge und Kleinkinder betroffen. Es wird durch das Exfoliatin Toxin verursacht. Fieber und Erythem treten unvermittelt auf. Diese Erkrankung heilt in der Regel schnell ab. Neben der Antibiotika Therapie muss auch eine symptomatische Behandlung der begleitenden Flüssigkeits- und Elektrolytverluste erfolgen.

Das Toxische Schocksyndrom wird durch das Toxic Schock Syndrom Toxin I (TSST I) verursacht, welches nur ca. 1 % der Erreger besitzen. Es kommt zu plötzlich einsetzenden Brechdurchfällen, hohem Fieber, Hautrötung und –ablösung und einer starken oder weniger starken Sepsis, die auch lebensbedrohlich verlaufen kann.

2.10 Behandlung von *S. aureus* Erkrankungen

Staphylokokken werden mit β -Lactamantibiotika wie Penicilline, Cephalosporine, Peneme und Monobactame behandelt. Mittel der Wahl ist Penicillin G. β -Laktame stören die nur bei Bakterien Zellen vorkommende Mureinsynthese. Somit wird im Idealfall der gewöhnliche Zellstoffwechsel nicht verändert. Tatsächlich müssen immer öfter andere Antibiotika als die β -Laktame wegen Resistenzen zum Einsatz kommen. Dazu gehören Doxycyclin, bei dem 2004 nur 1.3 % der Staphylokokken eine Resistenz aufwiesen, Cotrimoxazol, mit nur 1 % Resistenz 2004, Teicoplanin und Vancomycin, mit nur 1 % Resistenz 2004 und auch Clindamycin, Gentamicin und Amicacin können zum Einsatz kommen (Zahlen von der Paul Ehrlich Gesellschaft). Eines der neuen Antibiotika ist Linezolid, das erste Antibiotika aus der Klasse der Oxazolidinone, welches ein Wirkspektrum sowohl gegen *S. aureus* als auch gegen andere gram positive Erreger aufweist (Halle E. et al, 2002). Daptomycin, ein Lipopeptid Antibiotika, wird bereits erfolgreich bei der Behandlung von Knocheninfektionen eingesetzt (Veena Venugopalan and Martin 2007). Zukünftig werden auch, noch in Entwicklung stehende, Antibiotika zur Verfügung stehen. Ein Beispiel ist das Ceftobiprol (Cephalosporin), welches sich noch in der Phase III Studie befindet, aber bisher Erfolg versprechend, innerhalb der Studie, gegen MRSA zum Einsatz kommt (Basilea Pharmaceutica AG).

2.11 Genexpression

Ein komplexes, bis heute nicht vollständig untersuchtes und verstandenes Netzwerk von Regulatoren steuert die Transkription und Expression der verschiedenen Virulenzfaktoren in *S. aureus*. Dieses komplexe System ist ein Ausdruck der hohen Anpassungsfähigkeit des Erregers

an extrem unterschiedliche Umgebungs- und Umweltbedingungen und gleichzeitig zur konzertierten Optimierung der Überlebens- und Vermehrungsbedingungen. Ein Versuch auch nur einer Zusammenfassung der von vielen Arbeitsgruppen in den vergangenen Jahrzehnten erhobenen Erkenntnisse zu diesem Thema würde den Fokus dieser Arbeit deutlich überschreiten; es wird deshalb für das vertiefende Verständnis auf eine Reihe in letzter Zeit erschienener ausgezeichnete Übersichtsarbeiten verwiesen (u.a.: Arvidson und Tegmark, 2001; Cheung and Zhang, 2002; Cheung et al, 2002; Cheung et al 2004; Novick, 2003). Im Nachfolgenden soll jedoch eine Zusammenfassung der wichtigsten Regulatoren und Genexpressions-Bedingungen, die für die Fragestellung dieser Arbeit relevant sind, erfolgen.

2.11.1 Accessory gene regulator (= *agr*)

Es handelt sich bei diesem Regulator um ein „Quorum sensing System“, das Einfluss auf mehrere Virulenzfaktoren ausübt. Es wird beim Übergang von der exponentiellen Phase in die stationäre Phase aktiviert und vermittelt den Wechsel der Expression von Genen, die für die Oberflächenproteine kodieren, hin zur vermehrten Expression von Genen, die für Exoproteine kodieren (Projan and Novick, 1997).

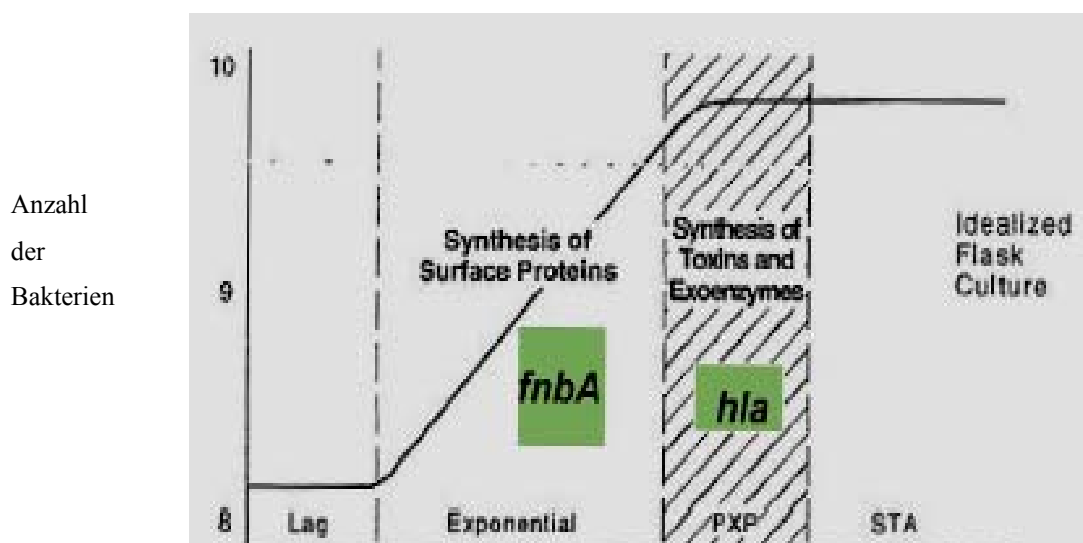


Abbildung 1 : schematische Darstellung einer bakteriellen Wachstumskurve (Cheung et al. 2002)

Das *agr* Gen beeinflusst zusammen mit dem *sae* Gen und dem *sar* Gen die Expression von Eap (extracellular adherence protein). Die *agr* Region besteht aus divergenten Operonen. Diese werden durch die Promoter P_2 und P_3 kontrolliert. P_2 besteht aus *agrBCDA* und kodiert für die Transkription von RNA II. RNA III ist das Effektormolekül des *agr*-Locus. P_3 kodiert für das Transkript von RNA III (Yarwood et al, 2004). Die höchsten Konzentrationen von RNAIII liegen

zwischen der spätexponentiellen Phase und der stationären Phase des Kulturwachstums vor. Der genaue Mechanismus, mit dem RNAIII die Effektorgen-Expression vermittelt, ist bisher unklar, jedoch weisen neueste Befunde darauf hin, dass RNAIII die Translation eines wichtigen pleiotropen Transkriptionsfaktors, des ‚repressors of toxins‘ (Rot) inhibiert (Geisinger et al, 2006). Auch weitere Befunde weisen auf eine Funktion von RNAIII auf die Translation eher denn auf die Transkription von Effektormolekülen hin (Huntzinger et al, 2005).

2.11.2 *S. aureus* exoprotein expression (= *sae*)

Neben *agr* ist *sae* ein wichtiger globaler Zwei-Komponenten Regulator der Expression von Virulenzfaktoren. Eine *sae* Mutante ist defizient in der Bildung einer Reihe von Exoproteinen (Giraud et al, 1994, 1999). Der *sae* Locus besteht aus vier Open reading frames. Zwei davon kodieren für ein typisches Zweikomponentensystem (Novick and Jiang, 2003; Steinhuber et al, 2003). Eine *sae* Mutation hat keine Auswirkung auf die Expression von *agr* und *sarA*. *Sae* selbst wird durch *agr* aktiviert, der genaue Mechanismus ist allerdings noch unbekannt (Giraud et al, 2003). Experimentelle Infektionsmodelle weisen darauf hin, dass *sae* in vivo als Virulenzfaktor angesehen werden kann (Rampone et al, 1996; Benton et al, 2004; Goerke et al, 2001).

2.11.3 Staphylococcal accessory regulator (= *sarA*)

Dieses regulatorische Gen kodiert für ein einzelnes DNA Bindeprotein, SarA. Das *sarA* Gen gehört zu einer größeren Familie von *sar* –homologen Regulatoren (Review von Cheung and Zhang, 2002; Cheung et al, 2004) und wurde 1992 als erster und prominenter Vertreter dieser Regulator-Familie von Cheung & Mitarbeitern beschrieben (Cheung et al, 1992). Das vollständige *sarA* Gen enthält drei verschiedene Promotoren, die wiederum drei unterschiedlich lange, überlappende Transkripte erzeugen, *sarA* P1, *sarA* P3 und *sarA* P2 (Bayer et al, 1996). *sarA* P1 und *sarA* P2 erscheinen vorwiegend in der exponentiellen Phase, während *sarA* P3 in der stationären Phase vermehrt exprimiert wird (Bayer et al, 1996; Manna et al, 1998; Blevins et al, 2002). Alle drei Transkripte enden an derselben Terminationssequenz (Bayer et al, 1996; Blevins et al, 1999). In den letzten Jahren fand man noch viele andere Sar Homologe. Man bezeichnet sie als die SarA Protein Familie.

sarA reguliert die Transkription von RNA III, indem ein Protein (SarA) gebildet wird, das an *agr* P₃ bindet und dadurch die Transkription von RNA III erhöht wird (Heinrichs et al, 1996; Cheung et al, 1997; Chien and Cheung, 1998; Chien et al, 1998). SarA vermittelt seine Wirkung aber nicht nur über das *agr* System, sondern auch in *agr* unabhängiger Weise. Ein Beispiel sind die über *agr* regulierten FnBPs, welche aber auch *agr* unabhängig durch SarA reguliert werden

(Saravia-Otten et al, 1997; Wolz et al, 2000). Eine Mutation im *agr* Locus hatte bisher keinen erkennbaren Effekt auf die *sarA* Transkription (Cheung et al, 1997; Horsburgh et al, 2002).

2.12 Eap und Emp

Eap und Emp gehören mit zu einer Gruppe von „Sezernierten Adhäsions- Proteinen“ mit breitem Bindungsrepertoire (SERAM) (Chavakis et al, 2005), zu denen unter anderem auch die Koagulase (Coa) und das Fibrinogen-Binde Protein (Efb) zählen. Alles deutet darauf hin, dass diese Proteine mit an der Pathogenität von *S. aureus* beteiligt sind (Review von Chavakis et al. 2005). Die genannten Proteine sind beteiligt an der Adhäsion, Invasion und interagieren mit dem Immunsystem des Wirts. Lee et al. (2002) und Athanasopoulos et al. (2006) beschrieben einen Zusammenhang zwischen Eap und einer gestörten Wundheilung bei chronischen Infektionen. Es liegen bereits einige Daten von Eap in Bezug auf seine Funktionen in vivo vor (Review von Harraghy et al.; 2005), aber noch wissen wir wenig über seine Regulation oder unter welchen Bedingungen es von *S. aureus* produziert wird. Noch weniger wissen wir über das dem Eap sehr ähnliche Protein Emp.

2.12.1 Eap

In den neunziger Jahren wurde Eap von mehreren unabhängigen Forschungsgruppen entdeckt und benannt. Boden & Flock (1992) fanden Eap mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. Map wird es von der Gruppe Johnsson et al (1995) genannt, weil es analog zu MHC Molekülen ist. Palma et al (1999) charakterisierten das von Boden und Flock (1992) beschriebene Protein und bezeichneten es Eap. Hussain et al (2001) untersuchte 140 klinische *S. aureus* Isolate und teilt Eap in drei Gruppen, anhand der Größe der kodierenden Sequenz basierend auf dem PCR Fragment, ein. Gruppe I hat ein 1,8 kb PCR Produkt, Gruppe II hat ein 2 kb PCR Produkt und die Gruppe III hat ein 2,4 kb PCR Produkt. Die Hussain Gruppe (2001) konnte zeigen, dass die stärkste Eap Expression durch Newman im Vergleich zu anderen Stämmen erfolgt. Der Hintergrund für diesen Unterschied ist bisher noch unklar. Eap wird am stärksten in der spät exponentiellen Phase des Wachstums gebildet und scheint *agr* und *sar* reguliert zu sein (Dunman et al, 2001).

Protein Struktur

Das 72 kDa Protein, von FDA574, erstmals von Jonsson et al (1995) charakterisiert, besteht aus 689 Aminosäuren inklusive der Signal Sequenz. Dabei fällt besonders die sich sechs Mal wiederholende Domäne aus 110 Aminosäuren auf. Des Weiteren existieren noch untergeordnete Domänen, die eine hohe Ähnlichkeit zu den N terminalen β -Ketten der MHC II Moleküle

aufweisen. Daher auch die Bezeichnung durch Jonsson et al (1995) als Map (MHC analogous Protein). Eap zählt zu den nicht kovalent an die Zellmembran gebundenen Oberflächenproteinen (siehe Kapitel 3.5), da ihm das für diese Proteine typische LPXTG, welches zum Verankern des Proteins in der Zellwand genutzt wird, fehlt (Mazmanian et al, 1999) und es sich mit Hilfe von LiCl aus der Zellwand herauslösen lässt (McGavin et al, 1993), womit die nicht kovalente Verbindung gezeigt werden konnte.

Bisher wurden sieben Plasmaproteine gefunden an die Eap binden kann (Palma et al, 1999). Die Eap Bindung an Vitronectin ist eine spezielle Interaktion zwischen Proteinen, welche sowohl mit dem natürlichen als auch mit dem rekombinant hergestellten Eap funktioniert, was andere Proteine mit der selben Größe und dem selben Gewicht nicht können (Jonsson et al, 1995). Eap kann direkt an ein weiteres Eap Molekül binden und Oligomere bilden (Palma et al, 1999). Auf dieser Erkenntnis beruht die Aussage, dass Eap mit an der Bakterienaggregation beteiligt ist. Hussain et al (2002) zeigte mit Newman und dessen Eap Minus-Mutante, dass eine externe Zugabe von Eap eine Agglutination begünstigt und postuliert die Unabhängigkeit einer Bakterienaggregation durch die endogene Eap Produktion.

Adhäsive-Funktionen von Eap

Frühere Eap-Analysen zeigen ein breites Eap-Bindungsspektrum mit einer Affinität zur Extrazellulären Matrix und Plasmaproteinen auf. Versuche mit Newman und Philips Eap Minus-Mutanten wurden unabhängig durchgeführt (Hussain et al, 2002; Kreikemeyer et al, 2002). Es gab keine Unterschiede in Bezug auf die Plasmaproteinbindung, wie zum Beispiel mit Fibronectin, Fibrinogen (Chavakis et al, 2002; Hussain et al, 2002; Kreikemeyer et al, 2002) oder Vitronectin (Kreikemeyer et al, 2002). Die Plasmaproteinbindung wird anscheinend hauptsächlich von anderen Adhäsionsproteinen übernommen, wie dem Fibronectin-Bindeprotein, das für die Bindung von Plasmaproteinen bedeutsamer ist als Eap, wohl aufgrund höherer Affinität. Wird dieses Protein entfernt, führt das zu einem 40 % Rückgang der Plasmaproteinbindung (Dziewanowska et al, 1999). Dadurch wird deutlich, dass *S. aureus* noch eine Vielzahl anderer, sich in ihrer Funktion überlappenden, Adhäsionsproteine haben muss. Durch das Erzeugen von doppelt- oder dreifach- Minusmutanten, kann vielleicht geklärt werden, inwiefern Eap an der Plasmaproteinbindung beteiligt ist.

Ungewöhnlicher Weise kann Eap auch wieder zurück an die Zelloberfläche binden. Von außen zugegebenes Eap kann entweder an endogen produziertes und bereits an der Zelloberfläche gebundenes Eap binden oder aber es bindet an eine andere Oberflächenstruktur. Dieses Phänomen ist unabhängig davon, ob endogen Eap produziert wird (Hussain et al, 2002). Man geht davon aus, dass es verschiedene Oberflächenstrukturen mit unterschiedlichen

Affinitäten zu Eap gibt, an die Eap binden kann. Bisher bekannt ist eine neutrale Phosphatase (Flock and Flock, 2001) und noch zwei weitere Oberflächenproteine (Kreikemeyer et al, 2002). Bisher ungeklärt ist, welche Rolle diese Anzahl von verschiedenen Bindungen von Eap mit der Zellwand und mit sich selbst spielt. Man kann drüber spekulieren, ob es einen Beitrag zu dem Aufbau der komplexen Kolonisationen leistet, und / oder ob es mit zu deren Stabilität während einer Infektion beiträgt.

Es gibt auch Berichte über die Notwendigkeit des Vorhandenseins von Eap bei der ICAM-1 abhängigen Verbindung von *S. aureus* an Endothelzellen (Chavakis et al, 2002).

Eap und Eukaryontenzellen

S. aureus benötigt Eap um sich an Fibroblasten und an Epithelzellen anzuheften, wie von Hussain et al (2002), Kreikemeyer et al (2002) und Hagggar et al (2003) gezeigt. Es kommt zu einer Reduktion der Interaktionen, bis zu 80% bei der Bindung an Epithelzellen (Kreikemeyer et al, 2002), wenn man einen Eap Minusmutanten einsetzt. Wird von extern Eap wieder beigelegt, dann nimmt die Bindung von *S. aureus* an Fibroblasten und Epithelzellen sowohl bei dem Minusmutanten als auch bei dem Wildtyp zu (Hussain et al, 2002). Die Eap Bindung an die Zelloberfläche der Staphylokokken ist demnach unabhängig von der endogenen Eap Produktion. Es kommen folglich Strukturen auf der Zelloberfläche von *S. aureus* vor, die Eap erkennen und binden können. Setzt man Eap Antikörper ein, dann sinkt die Fähigkeit von *S. aureus* Newman sich an Fibroblasten und Epithelzellen zu binden (Hussain et al, 2002).

Die Rückbindefähigkeit von Eap an *S. aureus* und die Notwendigkeit von Eap für den Erreger sich an Zellen zu haften, lässt die Schlussfolgerung zu, dass Eap als eine Art Brücke zwischen der Zelle und dem Bakterium fungiert.

ICAM-1 befindet sich auf Endothelzellen und bindet Eap, dadurch wird die Anheftung von Monozyten an den endothelialen Zellverband geblockt (Chavakis et al, 2002). ICAM-1 kommt auch bei Fibroblasten und Epithelzellen vor. Noch lässt sich keine Aussage machen, ob ICAM-1 als Rezeptor für Eap fungiert oder ob andere Moleküle für die Bindung verantwortlich sind.

Eap und Invasion von *S. aureus*

S. aureus ist nicht nur ein extrazellulär anzutreffender Mikroorganismus, er besitzt auch die Fähigkeit, von nicht professionellen Phagozyten internalisiert zu werden (Dziewanowska et al, 1999). Studien belegen, dass der Wildtyp Newman sich viel effizienter internalisieren lässt, als die isogene Deletionsmutante, defizient in *eap*. Durch Zugabe von externem Eap kann bei beiden Stämmen die Internalisierung erhöht werden. Werden Eap Antikörper hinzugefügt, kommt es zu

einer reduzierten Internalisierung (Haggart et al, 2003). Daraus kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass Eap einen wichtigen Beitrag bei der Internalisierung von *S. aureus* in MRC-5 und HACAT Zellen leistet. In einer anderen Studie wurde allerdings gezeigt, dass die *eap* Deletionsmutanten alle von den HEp-2 Zellen internalisiert wurden, jedoch nicht alle vom Wildtyp (Kreikemeyer et al, 2002). Dieser Unterschied kommt möglicherweise durch die Benutzung unterschiedlicher Stämme (Newman & Philips) zustande, welche unterschiedliche Mengen an Eap produzieren.

Eap als Pathogenitätsfaktor

Die Bindung von Eap an ICAM-1 hindert Leukozyten daran, an das Endothel zu binden und in das umliegende Gewebe einzuwandern. Es wurde auch gezeigt, dass Eap die Neutrophilenrekrutierung bei Peritonitis verhindert. Es hat somit auch die Eigenschaft antiinflammatorisch zu wirken. Die ICAM-1 Interaktionen blockieren die Leukozytenreaktionen und hemmen die Rekrutierung der Neutrophilen, was möglicherweise eine Supprimierung des Immunsystems zur Folge hat (Chavakis et al, 2002). Eap spielt somit vielleicht eine wesentliche Rolle bei der Entstehung einer *S. aureus* Infektion. Weitere Analysen sind erforderlich, um die Bedeutung von Eap bei diesem ätiopathogenetischen Mechanismus abzuklären.

Lee et al (2002) zeigte hingegen in Tierversuchen, dass in der initialen Phase einer *S. aureus* Infektion mit Eap Deletionsmutanten und Eap Wildtyp keine wesentlichen Unterschiede im Bild der Erkrankung zu erkennen sind. 21 Tage nach der Infektion jedoch zeigte sich, dass die mit dem Wildtyp infizierten Mäuse an Gewicht verlieren und sich nicht wieder erholen, wohingegen die mit Deletionsmutanten infizierten Mäuse ihr Ausgangsgewicht wieder erlangen. 8 Wochen danach haben 57 % von den Eap positiven Mäusen Herzabszesse, jedoch keine der Mäuse aus der Eap negativen Gruppe.

Immunmodulation

Man geht davon aus, dass Eap die T- Zellantwort beeinflusst. Ebenso ist mittlerweile bekannt, dass Eap auch in der Lage ist die Th 1 und die Th 2 Antwort zu modulieren. Wird die Th 1 Antwort verschoben in Richtung einer Th 2 Antwort, dann begünstigt das das Wachstum von *S. aureus*, da weniger Interferon gamma ausgeschüttet wird. Durch die Verringerung der Interferon gamma Sekretion geht die phagozytotische Aktivität zurück und *S. aureus* wird nicht mehr vollständig aus dem Körper entfernt (Lee et al, 2002). Das kann dann wiederum zur Entwicklung chronischer Krankheiten führen.

Durch Ablenkung einer zellvermittelten Immunantwort wird das Überleben des Erregers innerhalb einer Zelle möglicherweise deutlich erhöht und könnte so chronische Infektionen verursachen.

Geht die Balance zwischen humoraler über Th 2 und zellulärer über Th 1 gesteuerte Antwort verloren, kann möglicher Weise eine Immuntoleranz entstehen, die dann eine chronische Infektion begünstigen kann.

2.12.2 Emp

Ein weiteres Adhäsionsprotein, für dessen Expression auch wie bei Eap das *agr* Gen und das *sae* Gen mitverantwortlich ist, ist das 40 kDa SERAM Emp. Man weiß, dass Emp mit Fibronectin, Fibrinogen, Collagen und Vitronectin interagiert. Durch Studien wurde belegt, dass Emp-Mutanten weniger an Fibronectin und Fibrinogen binden als der Wildtyp, so dass eine Rolle bei der Adhäsion wahrscheinlich ist. Man geht aber davon aus, dass Emp ähnlich wie Eap in den Prozess der *S.aureus* Infektion verwickelt ist und auch als ein Virulenzfaktor fungiert, da es ebenso an Fibronectin, Fibrinogen und Vitronectin bindet.

3 Ziel

Ziel dieser Dissertation ist zu untersuchen, inwieweit der Einsatz spezifischer Nährmedien und die dadurch identifizierten Veränderungen der Umgebungsbedingungen Einfluss auf die Expression von *eap* und *emp* nehmen. Weiter wird untersucht, in welcher Phase des Wachstums beide Gene maximal exprimiert werden. Die komplexe Regulation der *Eap*-Expression ist offensichtlich bedeutsam bei der Anpassung von *S. aureus* an unterschiedliche Umweltbedingungen innerhalb und außerhalb des Wirts. Für *in vitro*-Untersuchungen wird diesen unterschiedlichen Umweltbedingungen klassischerweise durch den Einsatz verschiedener komplexer Nährmedien Rechnung getragen.

Aufgabe dieser Promotionsarbeit war daher, die Transkription von *eap* und *emp* als Modellgenen für pathogenetisch bedeutsame SERAM-Proteine in Abhängigkeit der verwendeten Kulturmedien zu untersuchen. Medienabhängige Expressionsunterschiede können uns dabei aufgrund der unterschiedlichen Medienzusammensetzung wertvolle Aufschlüsse über die komplexen Bedingungen der *eap* und *emp* Regulation liefern. Mit diesen so gewonnenen Ergebnissen kann auch ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die mit unterschiedlichen Medien gearbeitet haben, erfolgen.

Insgesamt erhoffen wir uns mit diesen Untersuchungen Hinweise auf die Adaptationsfähigkeit der Virulenz-Genexpression von *S. aureus* unter unterschiedlichen Umgebungsbedingungen und damit auch wichtige Einsichten von Überlebens- und Ausbreitungsstrategie des Erregers aufzudecken. Die Untersuchungen sollen dabei nicht nur ein besseres Verständnis der *eap* Expression ermöglichen, sondern auch weitere Erkenntnisse über das Netzwerk *eap*-assoziiierter Regulatorgene liefern. Solche Erkenntnisse über Faktoren, die eine Expression begünstigen oder im anderen Fall blockieren oder vermindern, können letztlich zur Identifizierung von Faktoren beitragen, deren Beeinflussung bei der Prävention oder Therapie einer *S. aureus* Infektion zum Einsatz kommen könnte.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Nährmedien

In dieser Studie wurde Newman in unterschiedlichen Medien kultiviert und untersucht. Es handelt sich hierbei um Medien, die gewöhnlich für die Kultivierung von Staphylokokken eingesetzt werden. Dazu zählt Modified Basic Broth (MBB; Ohlsen et al., 1997; Harraghy et al. 2005), Brain Heart Infusion (BHI; K. Ohlsen et al., 1997) und Tryptic Soy Broth (TSB; Somerville et al., 2002). Casamino Acids-Yeast Extrakt-Glycerophosphat (CY-) und CY- mit Glukose supplementiert (CY+) wurde von Weinrick et al.(2004) eingesetzt. Rice et al. (2004) benutzten NZYM, welches in dieser Studie noch mit Casamino Säuren supplementiert wurde (NZCYM). Des Weiteren wurden Medien eingesetzt, die typisch für die Kultivierung von *E. coli* benutzt werden aber auch bei Studien mit *S. aureus* zum Einsatz kommen. Müller Hinton Broth (MHB), Lennox Broth (LB; K. Ohlsen et al., 1997) und Nutrient Broth (NB; Kermanshahi and Sailani, 2005) sind als solche vertreten. Auch ein Streptokokken Kultivierungsmedium, Todd-Hewitt Broth (THB; J. M. Yarwood et al., 2002), wurde verwendet.

Ein Teil der Medien konnte als Fertigpulver von der Firma Becton, Dickinson and Company (USA) gekauft werden und musste für den Einsatz nur noch in Wasser gelöst und autoklaviert werden. Dazu zählen: BHI; TSB; CY-; NZYM; LB und MHB. THB wurde bei der Firma OXOID LTD. (England) erworben. Bei den übrigen Medien wurden die Inhaltsstoffe einzeln zusammengeführt. Die Inhaltsstoffe der einzelnen Medien sind in der Tabelle 1 aufgeführt und stammten entweder von Merck, Darmstadt oder von der Firma Becton, Dickinson and Company, USA.

	MBB	TSB	BHI	CY-	CY+	NZCYM	NZYM	NB	MHB	LB	THB
Pepton	10							15			20
Yeast Extract	5			10	10	5	5	3		5	
NaCl	5	5	5	5,9	5,9	5	5	6		5	2
K ₂ HPO ₄	1										
Pancreatic Digest of Casein		17				10	10			10	
Casamino Acids				10	10	1					
Magnesium Sulfat						0,98	0,98				
Glucose		2,5	3		5			1			2
1,5Mβ-Glycerophosphate				40ml	40ml						
Beef Extract									2		
Acid Digest of Casein									17,5		
Soluble Starch									1,5		
Enzym. abgeb. Sojamehl		3									
Dikaliumphosphat		2,5									
Rinderherzinfusion											3,1
Dinatriumhydrogenphosphat			2,5								0,4
Natriumbicarbonat											2,5
Hirn-Herzmuskelinfusion			6								
Peptisch abgeb. Tiergewebe			6								
Pancreatic Digest of Gelatine			14,5								

Tabelle 1: Basismedien mit Inhaltsstoffen in g / L

MBB und THB wurden noch mit zusätzlichen Substanzen wie folgend modifiziert:

MBB:

1,5 % Pepton; 2 % Pepton; 2 % Pepton + 0,5 % Glucose; 30 mM Na Acetat ohne Natrium Chlorid; 30 mM Kalium Acetat ohne Natrium Chlorid; 30 mM Natrium Chlorid; 30 mM Glucose

THB:

ohne Rinderherzinfusion; ohne Rinderherzinfusion mit 1,5 % Pepton; ohne Rinderherzinfusion mit 1 % Pepton;

Alle Medien wurden auf einen pH-Wert von ca. 7,0 eingestellt.

SOC flüssig Medium (pro 1 L):

20 g Bacto Trypton

5 g Bacto Yeast Extrakt

0,5 g NaCl

Alle Inhaltsstoffe auflösen und 10ml 250 mM KCl zugeben.

Autoklavieren und 5 ml 2 M MgCl und 20 ml 1 M Glucose supplementieren.

SMMP:

1,1 ml SSM (2x) 1 M Sucrose, 0,04 M Maleic acid, 0,04 M MgCl, pH 6,5

0,1ml BSA (0,5 %)

0,8 ml PAB (4x) pro 1 L: 1,5 g Beef Extrakt, 1,5 g Yeast Extrakt, 5 g Pepton, 1 g Glucose, 3,5 g NaCl, 3,68 g K₂HPO₄, 1,32 g KH₂PO₄, pH 7

4.1.2 Bakterienstämme, Plasmide und Primer

Bakterien-Stämme	Eigenschaft	Beschreibung
<i>S. aureus</i>		
Newman	Wildtyp	T. Foster, Dublin
RN4220	Restriktion negativer Stamm, 8325 Derivat	Kreiswirth et al. (1983)
<i>E. coli</i>		
XL-10	Klonierungs-Stamm	Stratagene
DH5a	Klonierungs-Stamm	
Plasmid	Eigenschaft	Beschreibung
pPCR Script	<i>E.coli</i> cloning vector, Amp [®]	Stratagene
pKO10	β-galactosidase reporter Plasmid	Ohlsen et al. (1997)
pSB2035	gfp-lux dual reporter Plasmid	Qazi et al. (2001)
pEMP-pKO10	auf <i>hla</i> Promoter klonierter <i>emp</i> Promoter in pKO10	Harraghy 2005
pEMP- <i>SmaI</i>	DNA Fragment, das die <i>emp</i> Promoter Sequenz und einen Teil des PCR Script umfasst	In dieser Studie
pEMP-gfp-lux	auf <i>P3</i> Promoter Platz klonierter <i>emp</i> Promoter in pSB2035	In dieser Studie
pEAP-gfp-lux	auf <i>P3</i> Promoter Platz klonierter <i>eap</i> Promoter in pSB2035	Harraghy 2005

Primer Name	Primer Sequenz	Funktion
eplgF	TTT <u>GAAATTC</u> CACCATCATTATCACTCC	Amplifikation vom <i>eap</i> Promoter <i>EcoRI</i> Schnittstelle ist unterstrichen
eplgR	CAT <u>CCCGGG</u> AAATTATCTCTCCTTTTTTG	Amplifikation vom <i>eap</i> Promoter <i>SmaI</i> Schnittstelle ist unterstrichen
empPF1	ACAGA <u>ATTC</u> AATTATTTATAATGCACC	Amplifikation vom <i>emp</i> Promoter <i>EcoRI</i> Schnittstelle ist unterstrichen
empPR1	CCTAAGCTTTTATATAGACTCAATATTATAAC	Amplifikation vom <i>emp</i> Promoter <i>HindIII</i> Schnittstelle ist unterstrichen
empPR2	CCT <u>CCCGGG</u> TTATATAGACTCAATATTATAAC	Amplifikation vom <i>emp</i> Promoter <i>SmaI</i> Schnittstelle ist unterstrichen
acnA F	TTAGGCTTCAACTTGGTTGG	Anwesenheit der Erythromycin- Kassette überprüfen. Vorwärts-Primer
acnA R	TACCTCGAACCATTACTTCG	Anwesenheit der Erythromycin- Kassette überprüfen. Rückwärts-Primer

4.2 Methoden

4.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

4.2.1.1 In flüssigen Nährmedien

Zur Herstellung wurden 5 ml eines Mediums in ein Reagenzröhrchen gefüllt und im Anschluss mit Bakterien inokuliert. Die Kultur wurde, wenn nicht anders beschrieben, bei 37° C und 150 RPM für 16 Stunden inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Multitron II der Infors AG. In Anwesenheit eines Antibiotikaresistenzmarkers wurde das Medium mit einem Antibiotikum, zwecks Selektion supplementiert. Es wurde Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 5 µg/ml und Erythromycin 10 µg/ml eingesetzt.

4.2.1.2 Auf Nährböden

Es wurden Blutagarplatten, TSB und BHI Platten mit und ohne Antibiotikum verwendet. Die Platten wurden dann, wenn nicht anders erwähnt, bei 37° C für 24 Stunden inkubiert.

4.2.1.3 Glycerol Medium

Bakterienkulturen wurden durch Herstellung 15 % iger Glycerol-Bakterienkulturlösung bei -70° C konserviert.

4.2.1.4 *S. aureus* Wachstumskurven

Die Wachstumskurven wurde mit Newman durchgeführt und somit kein Antibiotikum zugesetzt. Die Übernachtskultur wurde in einem Verhältnis von 1 : 20 mit einem Medium angesetzt. In dem Ansatz wurde dann direkt die optische Dichte bei OD₆₀₀ gemessen und im Anschluss wurde er bei 37° C und 150 RPM bis zur nächsten Messung inkubiert. Die optische Dichte wurde stündlich bestimmt.

4.2.2 Methoden für Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.2.2.1 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

4.2.2.1.1 Plasmid DNA Präparation ohne Kit

Von der Übernachtskultur wurden 1,5ml in ein Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen und dieses für 5 min bei 14000 x g zentrifugiert. Zu den sedimentierten Bakterien wurden dann 100 µl Puffer P1 aus dem Qiagen Miniprep Kit der Qiagen GmbH zum Resuspendieren zugegeben. Für den Start der Zellyse wurden 1 % SDS/0,2 M NaOH beigelegt, dann wurden 150 µl Natriumacetat dazugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 14000 x g

zentrifugiert. Der Überstand kam in ein neues Gefäß plus 2x das Volumen von 100 % igem Ethanol. Der Ansatz blieb 2 min bei Raumtemperatur stehen und anschließend wurde er für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA in 70 % Ethanol resuspendiert und nochmals für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder komplett verworfen und die DNA eine Stunde an der Luft getrocknet.

Im letzten Schritt wurde die DNA mit 30 µl Elution Puffer (10 mM Tris. Cl) aus dem Qiagen Kit resuspendiert. Die DNA wurde bei -20° C aufbewahrt.

4.2.2.1.2 Plasmid DNA Präparation mit Qiagen Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden)

4.2.2.1.2.1 *Escherichia coli* Stämme

Um die Plasmid DNA zu gewinnen wurde von der Übernachtskultur 1,5 ml in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und wie im Protokoll des Kits weiterverarbeitet. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei -20° C.

4.2.2.1.2.2 Staphylokokken Stämme

Die Isolierung der Plasmid DNA von *S. aureus* erfolgte auch hier mit Hilfe des Qiagen Miniprep Kit. Nachdem man 1,5ml einer Übernachtskultur in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert hatte, wurde der Überstand verworfen und die sedimentierten Bakterien mit 250 µl des P1 Puffers resuspendiert. Weiter wurden dann noch 10 µl rekombinantes Lysostaphin (2 mg/ml) zugesetzt und 15 min bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Im nächsten Schritt folgte man dann wieder dem Protokoll des Kits indem 250 µl Puffer P2 beigelegt wurden.

4.2.2.1.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus Staphylokokken Stämmen

Um die genomische DNA (gDNA) aus *S. aureus* zu isolieren wurde der Gram Positive DNA Purification Kit von Epicentre (Biozym) benutzt. 1ml der Übernachtskultur wurde dazu in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und zentrifugiert, der Überstand verworfen und dem Protokoll des Kits gefolgt.

4.2.2.2 Polymerasenkettenreaktion

Sowohl Plasmid DNA als auch chromosomale DNA dienten als Vorlage. Die PCR erfolgte in einem Gene Amp PCR System 9700 von der Firma Applied Biosystem. Die Taq-, die Hercules- (Stratagene) und die Vent (New England Biolabs) Polymerase wurden eingesetzt.

Die PCR Reaktionen setzen sich wie folgt zusammen:

Primer 1	(60 pmol/ μ l)	1	μ l
Primer 2	(60 pmol/ μ l)	1	μ l
dNTP	(5 mM each)	2	μ l
10x Puffer		5	μ l
DNA		1	μ l
Polymerase		0,25	μ l
Magnesiumchlorid (Qiagen 25 mM)		2	μ l

Beim Einsatz der Vent Polymerase wurde das MgCl durch 1 μ l Magnesium Sulfat (50 mM) ersetzt. Das Gemisch muss dann noch bis 50 μ l mit autoklaviertem Wasser aufgefüllt werden.

Ein Amplifikationszyklus sah in der Regel folgendermaßen aus:

94° C	5 Minuten
30 Zyklen 94° C	45 Sekunden (Denaturierung)
55° C	30 Sekunden (Hybridisierung)
72° C	90 Sekunden (Kettenverlängerung)
72° C	10 Minuten

Die Zeit, die für die Kettenverlängerung angesetzt wurde, ist abhängig von der zu erwartenden Größe des PCR-Produkts. Das fertige PCR Produkt wurde bei -20° C aufbewahrt. Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurde die Qualität kontrolliert (vgl. Kapitel 4.2.2.3.2).

4.2.2.3 Analyse von Nukleinsäuren

4.2.2.3.1 Restriktionsanalyse von DNA

Die Restriktionsenzyme und Puffer der Firma Fermentas wurden eingesetzt.

Für eine einfache Analyse wurde folgendes angesetzt:

3-5µl DNA
2 µl Puffer (10x)
0,5µl Restriktionsenzym
x µl H₂O

20 µl

Bei einem „Large Scale Digest“ wurden 30 µl DNA eingesetzt und das Endvolumen auf 50 µl aufgefüllt.

Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Danach wurde der Digest mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese überprüft (vgl. Kapitel 4.2.2.3.2).

4.2.2.3.2 DNA Analyse durch Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde benutzt, um Plasmid DNA, chromosomale DNA und restringierte DNA Fragmente aufzutrennen und zu analysieren.

In dieser Studie wurde immer 0,5 % iges Agarosegel benutzt, das sich aus folgenden Substanzen zusammensetzt:

1x TAE Puffer (2 M Tris, 0,1 M EDTA, 1 M Essigsäure, pH 8,2)
Agarose
Ethidiumbromid mit 0,5 µg/ml Endkonzentration

Das fertig gegossene Gel wurde dann in eine Kammer eingesetzt, in der sich 1x TAE Laufpuffer befand.

Die aufzutragende DNA Lösung wurde wie folgt angesetzt:

für DNA Produkte nach PCR:

10 µl PCR Produkt
10 µl steriles Wasser
4 µl Probenpuffer

für restringierte DNA:

20 µl der Restriktion
4 µl Probenpuffer

Probenpuffer:

0,25 % BB
0,25 % Xylen Cyanol FF
40 % Sucrose in H₂O

Die Auftrennung erfolgte unter einer konstanten Spannung von 120 Volt. Neben der zu analysierenden DNA wurde noch ein Größenstandard (Invitrogen) mit aufgetragen. Mit Hilfe des Ethidiumbromids, welches mit den Nukleinsäuren interkaliert, wurde dann möglich, die DNA Banden unter Ultraviolettlicht zur Fluoreszenz anzuregen und somit sichtbar zu machen. Das Ergebnis wurde dann photographisch festgehalten.

4.2.2.4 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

In Abhängigkeit von der Größe der extrahierenden Banden wurde der QIAquick Gel-Extraktion-Kit, der für kleine Banden bis zu 600 Basenpaaren benutzt werden kann, oder das QIAEX II Agarose-Gel-Extraktion Protokoll, welches für größere Banden geeignet ist, eingesetzt. Die Banden wurden unter Ultraviolettlicht mit einem scharfen Skalpel, aus dem Gel ausgeschnitten. Die nächsten Schritte richten sich nach dem Protokoll des Herstellers des jeweiligen Kits.

4.2.2.5 Reinigen von Nukleinsäuren

4.2.2.5.1 Reinigung von PCR Produkten und Restriktionsfragmenten

Ist die Kontrolle des PCR Produkts durch die Agarosegelelektrophorese zufriedenstellend gewesen und wurde die amplifizierte DNA weiterverwendet, wurde sie mit Hilfe des Strata Prep PCR Purification Kit (Stratagene) von eventuell noch vorhandenen dNTPs etc. befreit. Hierzu wurde mit dem Herstellerprotokoll gearbeitet. Die gereinigte DNA wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20° C aufbewahrt. Wenn die Kontrolle der Restriktion durch Agarosegelelektrophorese zufriedenstellend gewesen ist, wurde mit Hilfe des QI Aquik PCR Purification Kit Protokoll (Qiagen) das Eluat von eventuell vorhandenen Salzen und Puffern befreit. Dieser Schritt war erforderlich, wenn eine erneute Restriktion oder Klonierung von Nukleinsäuren erfolgte.

4.2.2.6 Ligation

4.2.2.6.1 Ligation mit pPCR-Skript-Amp Sk(+) cloning vektor

Der pPCR-Vektor wurde verwendet, um PCR Produkte zu klonen.

Der Ansatz setzt sich folgend zusammen:

1 µl	pPCR-Skript-Amp Sk(+) cloning vektor
1 µl	pPCR-Skript Puffer 10x
0,5 µl	10mM rATP
5,5 µl	PCR Produkt
1 µl	Srf I Restriktionsenzyme
1 µl	T4 DNA Ligase

Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend für 10 min bei 65° C inkubiert. Nach der Transformation (vgl. Kapitel 4.2.2.8) erfolgte die Selektion mit dem blue-/white colonie screening. Die Platten wurden 1 Stunde vor der Inokulation mit 100 µl 2 % X-GAL und 100 µl 1 mM IPTG versehen. Nur weiße Kolonien wurden weiterverwendet.

4.2.2.6.2 Einfache Ligation

Hierzu wurden der Plasmid und der Vektor mittels Restriktion gewonnen. Es wurden unterschiedliche Volumina je DNA auf das Agarosegel aufgetragen, um die Menge der DNA abschätzen zu können. Für den Ligationsansatz muss ein 1: 3 Verhältnis von Vektor zu Plasmid vorliegen.

Der Ansatz für ein Endvolumen von 10 µl setzt sich wie folgt zusammen:

x µl H ₂ O
x µl Plasmid
x µl Vektor
1 µl Ligasen Puffer (10x)
2 µl Ligase (Firma Promega)

Der Ansatz wurde dann für 3 h bei 22° C und 10 min bei 70° C inkubiert.

Der Plasmidvektor hatte einen Antibiotikaresistenzmaker, mit dessen Hilfe sich die Bakterien, welche das rekombinante Plasmid aufgenommen hatten, selektionieren ließen.

4.2.2.7 Herstellung Elektroporations kompetenter Zellen

4.2.2.7.1 *Escherichia coli*

Die Übernachtskultur mit DH5a in BHI wurde 1 : 80 mit BHI verdünnt und 2-3 h bei 37° C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,3 erreicht wurde. Dann wurden die Zellen zu je 20 ml aliquotiert und 10 min bei 3000 RPM zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Bakteriensediment in 3 ml 10 % Glycerol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang mit 3 ml 10 % Glycerol wurde insgesamt drei Mal hintereinander durchgeführt. Das Bakteriensediment wurde, nachdem der flüssige Überstand verworfen wurde, im Restüberstand resuspendiert und bei -70° C konserviert.

4.2.2.7.2 Staphylokokken

Die Übernachtskultur, mit TSB 1 : 50 verdünnt, wurde bei 37° C und 150 RPM solange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,3-0,8 erreicht war.

Ca. x µl wurden entnommen und bei 8000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 x Startvolumen einer 500 mM Sucrose Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde danach mit 1/2 x Volumen einer 500 mM Sucrose Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte erneut ein Zentrifugieren und erneutes Resuspendieren mit 1/10 x Volumen 500 mM Sucrose. Anschließend wurde die Zellsuspension zu 100 µl aliquotiert und bei -70° C aufbewahrt.

4.2.2.8 Transformation mit Hilfe der Elektroporation

4.2.2.8.1 Transformation mit *Escherichia coli*

Das Ligationsprodukt wurde mit sterilem Wasser im Verhältnis 1: 10 gemischt, und 10 µl aus diesem Ansatz wurden mit 40 µl elektroporationskompetenter *E.coli* versetzt.

Die Elektroporation wurde mit einem Genpulser der Firma Biorad mit 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF durchgeführt. Direkt im Anschluss an die Elektroporation wurde zu dem 50 µl Reaktionsgemisch 500 µl SOC flüssig Medium zugesetzt und der Ansatz in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden dann für 1 h bei 37° C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Im Anschluss wurden einmal 100 µl und einmal 200 µl der Reaktion auf mit Antibiotika behandelte Nährböden übertragen und für einen Tag bei 37° C inkubiert.

4.2.2.8.2 Transformation mit Staphylokokken

Die Elektroporation erfolgte mit 10 µl isolierter Plasmid DNA und 40 µl elektroporationskompetenter Staphylokokken im Genpulser II der Firma Biorad mit 2 kV, 100 Ω

und 25 μ F. Vor der Elektroporation wurde der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Elektroporation wurde SMMP (vgl.: Kapitel 4.1.1) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß für 4 Stunden bei 37° C und 150 RPM inkubiert. Danach wurden 100 μ l auf einen mit Antibiotika behandelten Nährboden aufgetragen. Der Rest wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die sedimentierten Bakterien wurden in 100 μ l des obigen Mediums resuspendiert und ebenfalls auf einen mit Antibiotika versetzten Nährboden aufgetragen um sie zu selektionieren. Die Nährböden wurden dann bei 37° C für einen Tag inkubiert.

4.2.2.9 Phagen-Transduktion

Es ist möglich mittels Phagen-Transduktion DNA von einem Bakterium auf ein anderes zu übertragen. Wenn Viren ein Bakterium infizieren, wird das virale Genom in das Wirtsgenom integriert und bei Virusvermehrung (lytische Phase) unter Mitnahme bakterieller-genomischer DNA repliziert. Infizieren solche Viren dann ein anderes Bakterium, gleichen genetischen Hintergrunds, dann wird die DNA aus dem Ausgangs-Stamm mit ins Genom des neuen Wirts übertragen und durch Rekombination inseriert.

4.2.2.9.1 Präparation des Phagenlysats

Phage 85 wurde mit Phagenpuffer (LB Medium + 5 mM Calcium-Chlorid) verdünnt in Verdünnungsreihen von 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Als nächstes wurden 100 μ l des Ansatzes aus Phagenverdünnung mit 300 μ l Bakterien der Übernachtskultur in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Übernachtskultur mit RN4220 + pEmp-gfp-lux wurde vor der Infektion mit Phage 85 zusätzlich mit Calcium-Chlorid auf 5 mM angereichert und 2 min bei 52° C inkubiert. Das LB Softy (LB + 0,6% Agar) wurde auf 65° C erwärmt und mit erwärmten Calcium-Chlorid auf 5 mM gebracht. Jeder Bakterien/Phagen Ansatz wurde mit 4 ml erwärmten LB Softy versehen und auf eine Blutagarplatte aufgetragen. Diese wurden bei 37° C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden auf jede braune Platte (Hinweis auf Bakterienlyse) 2 ml des Phagenpuffers aufgetragen, damit sich die Schicht aus LB Softy und Bakterien wieder verflüssigte. Die flüssige Schicht wurde in ein Röhrchen übertragen und 10 min bei 9000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert und mit einem 0,45 μ m Millipore-Filter gefiltert. Das fertige Phagenlysats wurde bei 4° C konserviert.

4.2.2.9.2 Newman Transduktion

Die Übernachtskultur mit Newman wurde vollständig zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde mit 1 ml TSB resuspendiert. 0,5 ml der resuspendierten

Bakterien wurden mit 0,5 ml Phagenpuffer und 0,5 ml Phagenlysate versetzt und bei 37° C, 150 RPM für zwanzig Minuten inkubiert. Danach wurde 1 ml eiskaltes 20 mM Natrium-Citrat zu den Bakterien-Phagenlysaten gegeben. Der Ansatz wurde zentrifugiert, und erneut wurden 1 ml 20 mM Natrium-Citrat zum Resuspendieren verwendet. Vom Ansatz wurde 0,1 ml auf eine BHI-Platte, mit 20 mM Natrium-Citrat + 5 µg/ml Chloramphenicol, aufgetragen. Die Platte wurde bei 37° C für etwa 36 Stunden inkubiert.

Die so kultivierten Bakterien wurden erneut auf eine 5 mM Calcium-Chlorid BHI-Platte mit 5 µg/ml Chloramphenicol übertragen und wieder für 24 h bei 37° C inkubiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Die so gewonnenen Bakterien wurden in Form von Glycerol-Medium eingefroren und aufbewahrt. Die Transduktion wurde kontrolliert mit einer Plasmid-DNA-Präparation, anschließender PCR, einer Restriktionsanalyse und einer Agarosegelelektrophorese.

4.2.3 *gfp-lux*-Reporter-Gen Assay

Es gibt eine Vielzahl von Reporter-Gen-Untersuchungen, mit denen die Genexpression untersucht werden kann, wie zum Beispiel der β -Galactosidase-Assay, Chloramphenicol-acetyltransferase-Assay (CAT), Green fluorescence protein assay (GFP) und der lux-Assay (Luminescence).

Für diese Studie wurde das *gfp-lux*-Reporter-System verwendet (Qazi et al. 2001). Das bereits früher beschriebene *eap-gfp-lux*-Konstrukt (Harraghy et al.) und das neu konstruierte *emp-gfp-lux*-Konstrukt (in dieser Studie) wurden eingesetzt.

Mit dem „Vektor2“-Platten-Reader der Firma Perkin Elmer wurde die Luminescence gemessen, und es konnten mehrere Ansätze gleichzeitig auf Luminescence und Dichte untersucht und die Werte festgehalten werden. Um die Ergebnisdaten der Luminescence zu standardisieren, wurde der erhaltene Wert durch den Wert der OD₅₉₅ dividiert. Dieser Wert erhält die Einheit RLU (relative Licht-Einheit) und steht für die Gen-Expression.

Es wurde eine Übernachtskultur mit Newman (pEap-gfp-lux bzw. pEmp-gfp-lux) in MBB, sublementiert mit 5 µg/ml Chloramphenicol, angesetzt. Die Medien, in denen die Expression von *eap* und *emp* untersucht werden sollten, wurden auch mit 5 µg/ml Chloramphenicol angereichert. Es wurde dann ein Ansatz aus Übernachtskultur und Medium im Verhältnis 1:100 hergestellt und 200 µl in eine Vertiefung der Platte pipettiert. Jeder Ansatz wurde in dreifacher Bestimmung untersucht. Zusätzlich wurde für jedes eingesetzte Medium eine Negativkontrolle mitgeführt. Eine Kontamination der Medien konnte so ausgeschlossen werden.

Das „Viktor2“-Gerät lief mit einer konstanten Temperatur von 37° C und unter Schütteln. Jede halbe Stunde wurde Dichte und Luminescence detektiert. Die Experimente wurden mehrmals unabhängig von einander durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurde dann der Mittelwert gebildet.

4.2.4 Isolierung und Kontrolle von Proteinen aus Staphylokokken

4.2.5 SDS Extraktion von Zellwandproteinen

Die Bakterien aus der Übernachtskultur wurden mit dem Medium, in dem die Proteinexpression der Bakterien untersucht werden soll, in einem Erlenmeierkolben im Verhältnis 1: 20 angesetzt und bei 37° C unter konstanten Schütteln mit 150 RPM inkubiert, bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Proteinmenge nach der Methode von Hussain et al. (2001) bestimmt werden soll, in unserem Fall nach 3 h, 6 h und 10 h. Die Dichte der Bakterien wurde mittels einer Extinktionsanalyse bestimmt und es wurde das Volumen des Ansatzes weiterverwendet, welches eine OD₆₀₀ von 6 hatte, und dadurch in jeder Probe die gleiche Menge an Bakterien waren. Die Ansätze wurden dann bei 4° C und 6000 x g für 5 min zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 100 µl Extraktionspuffer resuspendiert, bei 95° C für 3 min unter konstantem Schütteln inkubiert und im Anschluss für 3 min bei 4° C und 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 40 µl Probenpuffer in ein frisches Gefäß übertragen und 8 min bei 95° C inkubiert.

2x SDS Extraktionspuffer:

125 mM	Tris HCL, pH 7
2 %	SDS

4x SDS Probenpuffer:

200 mM	Tris HCl, pH 6,8
400 mM	DTT
8 %	SDS
0,4 %	Bromphenolblau
40 %	Glycerin

4.2.5.1 Isolation sezernierter Proteine

Von der Übernachtskultur wurde die OD₆₀₀ mittels Extinktionsanalyse bestimmt. Es wurde mit dem Volumen, das eine OD₆₀₀ von 6 hatte, weitergearbeitet. So hatte jede Probe die gleiche Menge an Bakterien. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß übertragen und mit gleichem Volumen eiskaltem 100 % igem

Ethanol vermischt und für mindestens 6 Stunden oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Danach wurden die Proben für 0,5 Stunden bei 4° C und 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl sterilem Wasser und 40 µl 4x SDS Probenpuffer gelöst. Der Ansatz wurde dann noch für 8 Minuten bei einer Temperatur von 95° C erhitzt.

4.2.5.2 SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Einzelne Polypeptidketten bilden einen Komplex mit den negativ geladenen Natriumdodecylsulfatmolekülen (SDS) und wandern als negativ geladener SDS-Proteinkomplex durch das poröse Polyacrylamidgel. Die Proteine wandern je nach Größe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Gel. Das SDS Polyacrylamidgel setzt sich aus zwei Schichten zusammen. Dem „Seperation Gel“ (Seperationsgel), das die untersten zwei Drittel der Gelkammer ausfüllt und das „Stacking Gel“ (Sammelgel), das das oberste Drittel bildet.

Seperating Gel 10 % :

Acrylamid 30 %	3,3 ml
1M Tris pH 8,8	3,5 ml
H ₂ O	2,6 ml
SDS 20 %	50 µl
APS 10 %	100 µl
Temed	8,3 µl

Das Seperating Gel wurde zuerst in die Gelkammer eingefüllt. Es sollte zwei Drittel ausfüllen.

Stacking Gel 5 %:

Acrylamid 30 %	0,6 ml
1M Tris pH 6,8	0,4 ml
H ₂ O	1,5 ml
SDS 20 %	16 µl
APS 10 %	33,3 µl
Temed	2,7 µl

War das „Seperation Gel“ getrocknet, wurde das „Stacking Gel“ aufgetragen und trocknen gelassen. Als Laufpuffer wurde 1x SDS Puffer benutzt. Von jeder Proteinprobe wurden 34 µl auf das Gel aufgetragen. Um das Ergebnis auswerten zu können, wurde noch 15 µl eines Größenstandards (PAGE Ruler) aufgetragen. Dann wurde das Gel an eine Spannung angeschlossen und für etwa zwei Stunden laufen gelassen. Danach müssen die Banden noch

sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Gel für 0,5 Stunden unter konstanter Ernasserung in 0.05 % Coomassie Farbpuffer inkubiert. Dieser wurde folgend angesetzt (für 1 L):

Coomassie Brilliant Blue	0.5 g
Methanol	500 ml
Wasser	400 ml
Glacial acetic acid	100 ml

Zum Entfärben wurde das Gel 0,5 Stunden in Entfärberlösung inkubiert. Die Entfärberlösung enthält in einem Liter Lösung folgendes:

Methanol	300 ml
Wasser	600 ml
Glacial acetic acid	100 ml

Nach der Entfärberlösung folgte eine Inkubation in einem Wasserbad über Nacht. Das Gel wird dann noch zum Aufbewahren in Zelufan Papier eingearbeitet und getrocknet.

4.2.5.2.1 Messung von Metaboliten Veränderungen in Staphylokokken Kulturen

Die Messungen von Citrat, Ammoniak, Glucose und Essigsäure wurden mit Kits der Firma R-Biopharm AG, Darmstadt durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Hersteller Protokolls. Um mit den Kits zu arbeiten wurden zuvor folgendermaßen Proben hergestellt:

Aus der Übernachtkultur mit Newman und dem Medium, in dem der Metabolismus von Newman untersucht werden soll, wurde ein Ansatz im Verhältnis 1: 20 angesetzt. Der Ansatz wurde bei 37° C unter konstantem Schütteln von 150 RPM bis zum Messzeitpunkt inkubiert, der in dieser Untersuchung nach 3 Stunden, 6 Stunden und 10 Stunden festgelegt wurde. Es wurden 2 ml des Ansatzes in ein Eppendorf Gefäß übertragen und bei 20000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit gleichen Volumen eiskalter 1 M Perchlorischer Säure gemischt. Der Ansatz wurde für 2 min bei 4° C inkubiert und erneut 10 min bei 3000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 2 ml genommen, mit 200 µl 5M KOH vermengt, 15 min bei 4° C inkubiert und im Anschluss 5 min bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß übertragen und bis zur Messung bei 4° C konserviert.

4.2.6 pH-Messungen

Newman wurde über Nacht in MBB kultiviert und dann 1: 20 mit einem Medium verdünnt und bei 37° C und 150 RPM inkubiert. Die pH-Messungen erfolgten nach 3 Stunden, 6 Stunden und 1 Stunde Inkubation mit jeweils 1 ml der Kultur. Vor der Messung erfolgte eine Inkubation

über 10 Minuten bei 72° C. Dadurch wurden die Bakterien abgetötet. Es wurde ein pH-Meter der Firma Radiometer Analytical SA (France) eingesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung von Newman + pEmp-gfp-lux

Für die Untersuchungen der Expression von *emp* fiel die Wahl auf das gleiche Reportergenkonstrukt wie für *eap* (N.Harraghy), da neben den Experimenten mit Newman + pEmp-gfp-lux auch Experimente mit Newman + pEap-gfp-lux durchgeführt wurden. Newman + pEap-gfp-lux lag einsatzbereit vor (N.Harraghy). Im folgenden Kapitel wird die Herstellung des pEmp-gfp-lux Konstruktes näher beschrieben.

5.1.1 DH5a + pEmp-gfp-lux

In früheren Studien wurde der *emp* Promoter bereits in pK010 innerhalb der *EcoRI/HindIII* Seite geklont (N. Harraghy). Um den *emp* Promoter in pSB2035 zu klonen musste die *HindIII* Seite zunächst in eine *SmaI* Seite geändert werden, da pSB2035 nicht über eine *HindIII* Seite verfügt. Dafür musste die pEMP-pK010 Plasmid DNA (N. Harraghy) aus DH5a isoliert werden. Im Anschluss folgte eine PCR mit den Primern empPF1 und empPR2, um den *emp* Promoter für eine Ligation mit pSB2035 zu modifizieren. Das PCR Produkt, die *emp* Promoter Sequenz, wurde mit dem pPCR Skript-Amp Sk(+) cloning vektor ligiert und anschließend durch Elektroporation in DH5a transformiert um subkloniert zu werden. Die positiven Klone wurden mit Hilfe des Blue- and White-Kolonie Screening selektioniert. Der Plasmid pSB2035 (Qazi et al., 2001) enthält die für diese Studie benötigte Reportergensequenz. Oberhalb der *gfp-lux* Sequenz liegt der P3 Promoter, der durch eine *EcoRI* und *SmaI* Schnittstelle begrenzt wird. Der P3 Promoter in pSB2035 sollte nun durch den *emp* Promoter ausgetauscht werden. Das ausgetauschte Produkt ist pEmp-gfp-lux. Für diesen Schritt musste aus Übernachtskulturen von *E.coli* DH5a + pEMP- pPCR Skript-Amp Sk(+) cloning vektor und *E.coli* XLO10 + pSB2035 die Plasmid DNA isoliert werden. Die jeweils gewonnene Plasmid DNA wurde einer Restriktion mit *EcoRI* und *SmaI* unterzogen. Im Anschluss wurden die Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Die *emp* Promoter Sequenz Bande (600bp) und pSB2035 mit *gfp-lux* Sequenz(12 kb) wurden aus dem Gel extrahiert (vgl. Kapitel 4.2.2.4). Mittels Ligation wurden die zwei, mit den gleichen Enzymen geschnittenen, Fragmente dann vereinigt und in DH5a durch Elektroporation transformiert. Die Kontrolle erfolgte mittels Plasmidisolation, PCR und Agarosegelelektrophorese. Abbildung 2 (1-4) zeigt die *emp* Promoter Sequenz nach der Plasmidisolation aus DH5a + pEmp-gfp-lux und PCR.

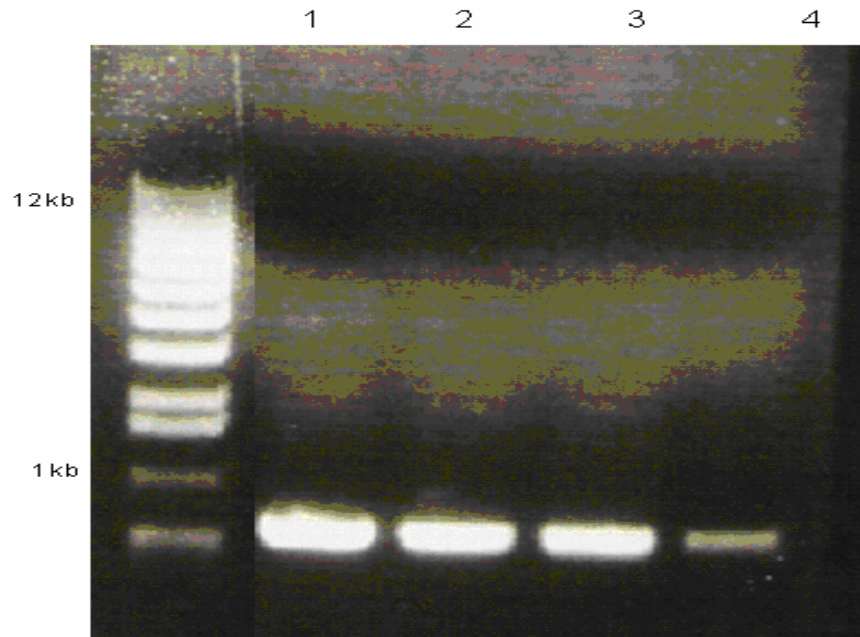


Abbildung 2: 1-4 zeigt die *emp* Promoter Sequenz nach dem aus DH5a + pEmp-gfp-lux die Plasmid DNA isoliert und anschließend eine PCR durchgeführt wurde.

5.1.2 Sequenzanalyse

Bevor das Plasmid pSB2035, das jetzt die *emp-gfp-lux* Sequenz integriert haben sollte, weiter zum klonieren benutzt wurde, wurden 3 µg Plasmid DNA an die Firma MWG BIOTECH AG geschickt. Es muss sicher gestellt sein, dass das Konstrukt korrekt kloniert wurde und der *emp* Promoter auch tatsächlich vorhanden ist.

Mit dem Programm BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) wurde die Sequenz auf ihre Richtigkeit überprüft. Abbildung 3 zeigt das Ergebnis. Die Sequenz des von Willebrand Faktors liegt oberhalb von der *emp* Promoter Sequenz und ist daher in Bild 2 teilweise mit zu sehen. Der Querstrich im ersten Drittel der ersten Zeile, der Analyse mit dem BLAST Programm, ist im Chromatogramm der Sequenzanalyse von der Firma MWG BIOTECH nicht vorhanden. An der Stelle ist im Chromatogramm jedoch ebenfalls ein Adeninrest nachweisbar, sodass von einer korrekten Klonierung der *emp* Promotersequenz im Plasmid auszugehen ist.

```
gi|14132771|gb|AY032850.1| Staphylococcus aureus secreted von Willebrand factor-binding
protein (vwf) gene, complete cds
Length=1740
```

```
Score = 670 bits (338), Expect = 0.0
Identities = 345/346 (99%), Gaps = 1/346 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```

Query 4      AAGTCATGATTTCACACA-CAACGCATCAATCACCAACAACCTTCAAATCACACGCATAATAA 62
            |||
Sbjct 1395   AAGTCATGATTTCACACAACAACGCATCAATCACCAACAACCTTCAAATCACACGCATAATAA 1454

Query 63     TGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGGTTGG 122
            |||
Sbjct 1455   TGTTGTTGAATTTGAAGAAACGTCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGGTTGG 1514

Query 123    TATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAAATTAAGCGTGA 182
            |||
Sbjct 1515   TATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAAATTAAGCGTGA 1574

Query 183    ACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATAAAGA 242
            |||
Sbjct 1575   ACACGTTAGAGAAGCTCAAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATAAAGA 1634

Query 243    CCGAATAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTTTTAA 302
            |||
Sbjct 1635   CCGAATAAATGCACAACAAAAAGTAAATACTTTAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTTTTAA 1694

Query 303    TAAACAAATCAATAAAGTATATAATGGCAAATAATTAATGCATGGC 348
            |||
Sbjct 1695   TAAACAAATCAATAAAGTATATAATGGCAAATAATTAATGCATGGC 1740

```

Abbildung 3: Vergleich der Sequenzanalyse mit BLAST

5.1.3 Transformation in Staphylokokken

Der verifizierte Plasmid pEmp-gfp-lux wurde anschließend in RN4220 durch Elektroporation transformiert. RN4220 + pEmp-gfp-lux wurde mit Phage 85 infiziert und ein Phagenlysat hergestellt (vgl. Kapitel 4.2.2.9.1). Mit dem Phagenlysat wurde Newman infiziert, der dann mehrmals hintereinander auf BHI + CaCl₂ Agar kultiviert wurde (vgl. Kapitel 4.2.2.9.2). Danach wurde mit einer PCR kontrolliert, ob die Transformation von pEmp-gfp-lux in Newman erfolgreich war, und die komplementierten Stämme eingefroren. Eine erneute Restriktionsanalyse wäre wegen der geringen Menge an Plasmid DNA, die *S. aureus* produziert, nicht geeignet gewesen.

Abbildung 4 (1-4) zeigt die *emp* Promotor Sequenz aus Newman nach Plasmid Isolation und PCR.

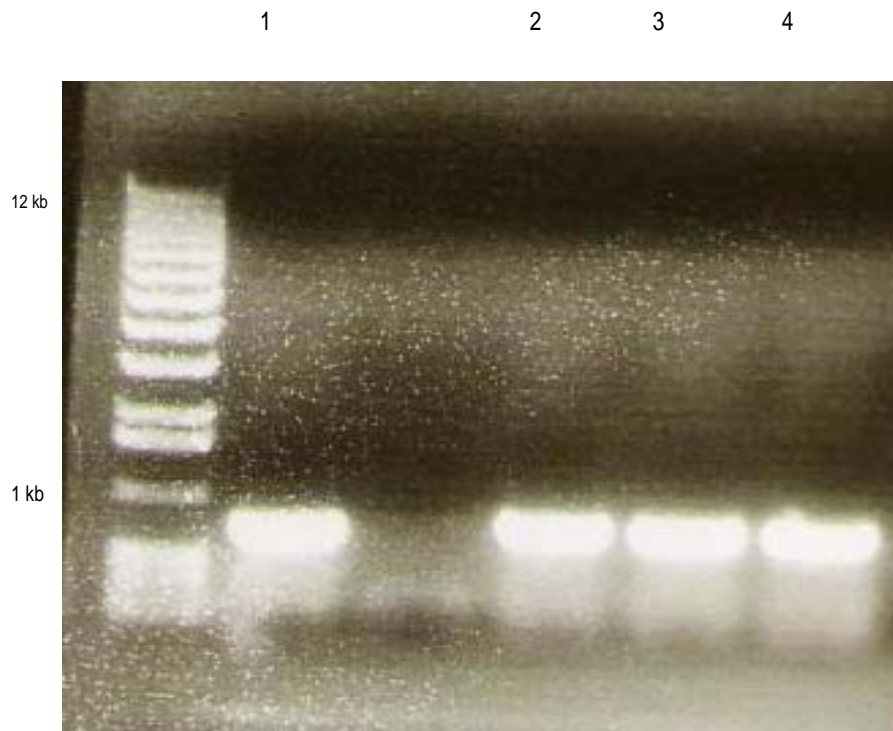


Abbildung 4: 1-4 zeigt die *emp* Promoter Sequenz nach Plasmid DNA Isolierung aus Newman + pEmp-gfp-lux und anschließender PCR. Wie erwartet sind 600 bp Banden zu sehen.

Um zu sehen, ob das vorliegende pEmp-gfp-lux Konstrukt auch tatsächlich funktionell ist, wurden zu Beginn Experimente mit Newman pEap-gfp-lux und pEmp-gfp-lux in MBB durchgeführt. Nach Auswertung der Daten entstand die Graphik in Abbildung 5. Sie zeigt die *eap* Expression in MBB im Vergleich mit der *emp* Expression in MBB über 10 Stunden. In der Expressionshöhe ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Was den Verlauf der Expression angeht, zeigt sich der gleiche Trend. Damit ist der Nachweis einer Wachstumsphasen – abhängigen *emp* Transkription gegeben.

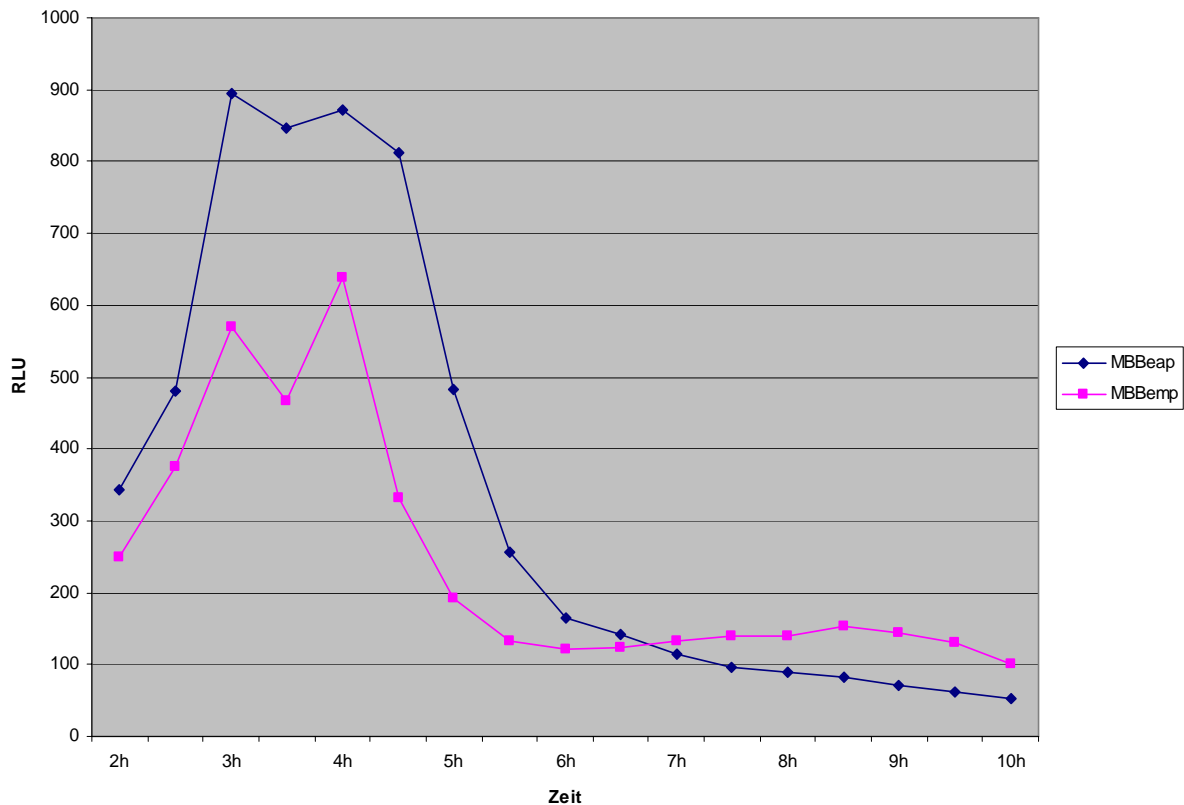


Abbildung 5 : Vergleich von *eap* und *emp* Expression in MBB

5.2 Newman Wachstumskurven

Die Wachstumskurven sollten mögliche Schwankungen im Wachstumsverhalten von *S. aureus* in den einzelnen Medien aufzeigen, um so mögliche Unterschiede im Expressionsverhalten von *eap* und *emp* zu erklären. Wie in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben, wurden die Kurven mit Newman in Basis Nährmedien (vgl. 4.1.1) ermittelt. In Abbildung 6 a-d sind die Wachstumskurven graphisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass Newman in allen Medien bereits nach 2 Stunden Wachstum in die Exponentialphase eintritt. Nach Ablauf von 2 weiteren Stunden beginnt die Post-Exponentialphase. Diese Phase liegt in etwa zwischen der 4. und 6. Stunde. Die nächste Wachstumsphase, die so genannte Stationäre Phase, wurde nicht von jeder Newman Kultur, nach Ablauf von 10 Stunden, erreicht. In MBB kultiviert, geht Newman nach Ablauf von 6 Stunden als erstes in die Stationäre Phase über.

In Abbildung 6 a wird Newman (kultiviert in MBB) mit Newman (kultiviert in TSB, BHI und THB) verglichen. Die eben genannten Medien sind Standardnährmedien für die Kultivierung von *S. aureus*. In den ersten 7 Stunden ist kein besonders großer Unterschied im Wachstum zu erkennen. Nach der 6. – 7. Stunde traten die Bakterien in MBB in die Stationäre Phase ein, in den anderen drei Medien kam es nicht zum Eintritt in die Stationäre Phase. Nach Ablauf der 10. Stunde war Newman in den drei anderen Medien noch nicht in die Stationäre Phase übergetreten.

Abbildung 6 b zeigt einen Wachsumskurvenvergleich von Newman (in MBB) mit Newman (in CY mit und ohne Glucose supplementiert). Das CY Medium wird z.B. für die Untersuchung von *sae*, einer der *eap* Regulatoren (Harraghy et al., 2005), eingesetzt. Newman wuchs in Anwesenheit von Glucose deutlich besser, verglichen mit Newman in CY ohne Glucose und mit Newman in MBB. Die Bakterien wuchsen bereits ab der 2. Stunde unterschiedlich schnell. Das stärkste Wachstum lag vor in CY mit Glucose, gefolgt von MBB und CY ohne Glucose. In beiden CY Medien wurde die Stationäre Phase nach der 9. Stunde erreicht.

In Abbildung 6 c ist Newman in MBB und Newman in NZCYM und NZYM aufgeführt. Das Wachstum war bis zur 7. Stunde ohne besonderen Unterschied. Dann trat Newman in MBB in die Stationäre Phase ein, während in den anderen zwei Kulturen die Bakterien noch wuchsen (nach 10 Stunden Wachstum war die Stationäre Phase noch nicht erreicht). In der mit Casamino Säuren supplementierten NZYM Kultur vermehrten sich die Bakterien geringfügig weniger als im NZCYM.

Abbildung 6 d vergleicht Newman in MBB mit Newman in NB, LB und MHB. Die hier erwähnten Medien werden normalerweise für die Kultivierung von *E.coli* verwendet. Manchmal werden sie aber auch bei Studien mit *S. aureus* eingesetzt. In NB war das Wachstum etwas besser als in MBB, wohingegen die Bakterien in LB und MHB langsamer wuchsen. Die Stationäre Phase wurde von Newman in diesen Medien nach der 10. Stunde nicht erreicht.

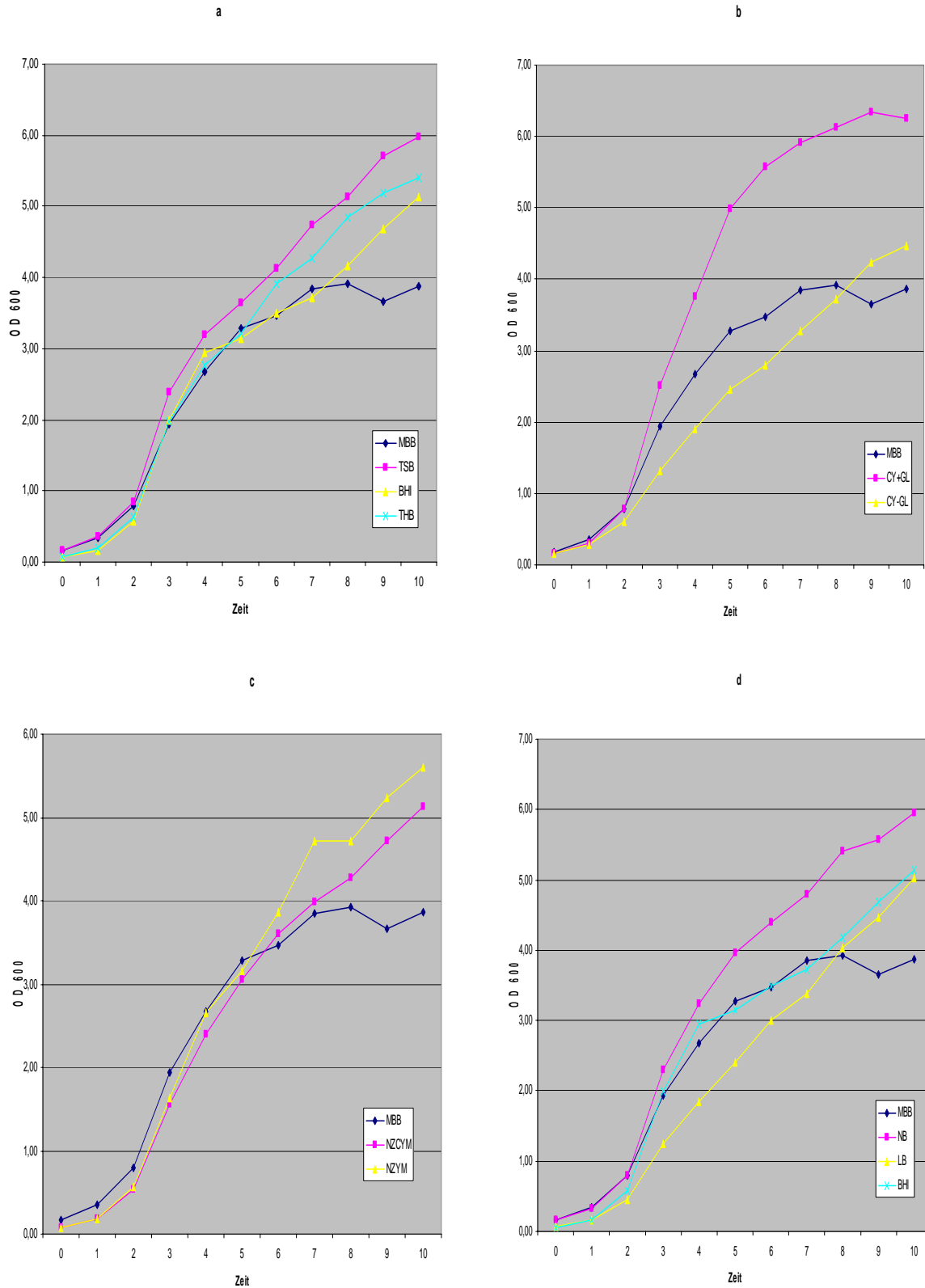


Abbildung 6: Newman Growth-Curves: Newman kultiviert in: a = MBB im Vergleich mit BHI,TSB,THB; b = MBB im Vergleich mit CY+, CY-; c = MBB im Vergleich mit NZCYM, NZYM; d = MBB im Vergleich mit NB, LB, BHI

5.3 gfp-lux Reporter Gen Analysen und pH Bestimmung in Basismedien

Parallel zu den Versuchen mit dem gfp-lux-Reporter-System wurde der pH-Wert in den Basismedien zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Dies erschien sinnvoll, da neben den verschiedenen Inhaltsstoffen auch eine Veränderung des pH-Wertes Einfluss auf die Gen Expression nehmen kann (B. Weinrick et al., Dez. 2004). Newman + pEap-gfp-lux (Harraghy) und pEmp-gfp-lux (diese Studie) wurden in dieser Studie eingesetzt (vgl. Kapitel 5.1)

Abbildung 7 zeigt die *eap* Expression in MBB im Vergleich mit der *emp* Expression in MBB über 10 Stunden. In der Expressionshöhe ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Was den Verlauf der Expression angeht, zeigt sich der gleiche Trend. Nach 3 Stunden wurde eine Expressionsspitze erreicht, die in der nächsten halben Stunde abfiel und erneut zur 4. Stunde anstieg. Nach der zweiten Spitze zur 4. Stunde fiel die Expression ab und stieg nicht mehr bis zur 10. Stunde an. Der pH-Wert in MBB fiel bis zur 3. Stunde nur von anfänglich 7.0 auf 6.8 ab, stieg bis zur 6. Stunde wieder auf 7.9 an und erreichte nach 10 Stunden Inkubation einen Wert von 8.4. Er fiel in dem Zeitraum der Datenerhebung nie unter einen Wert von 6.8 ab.

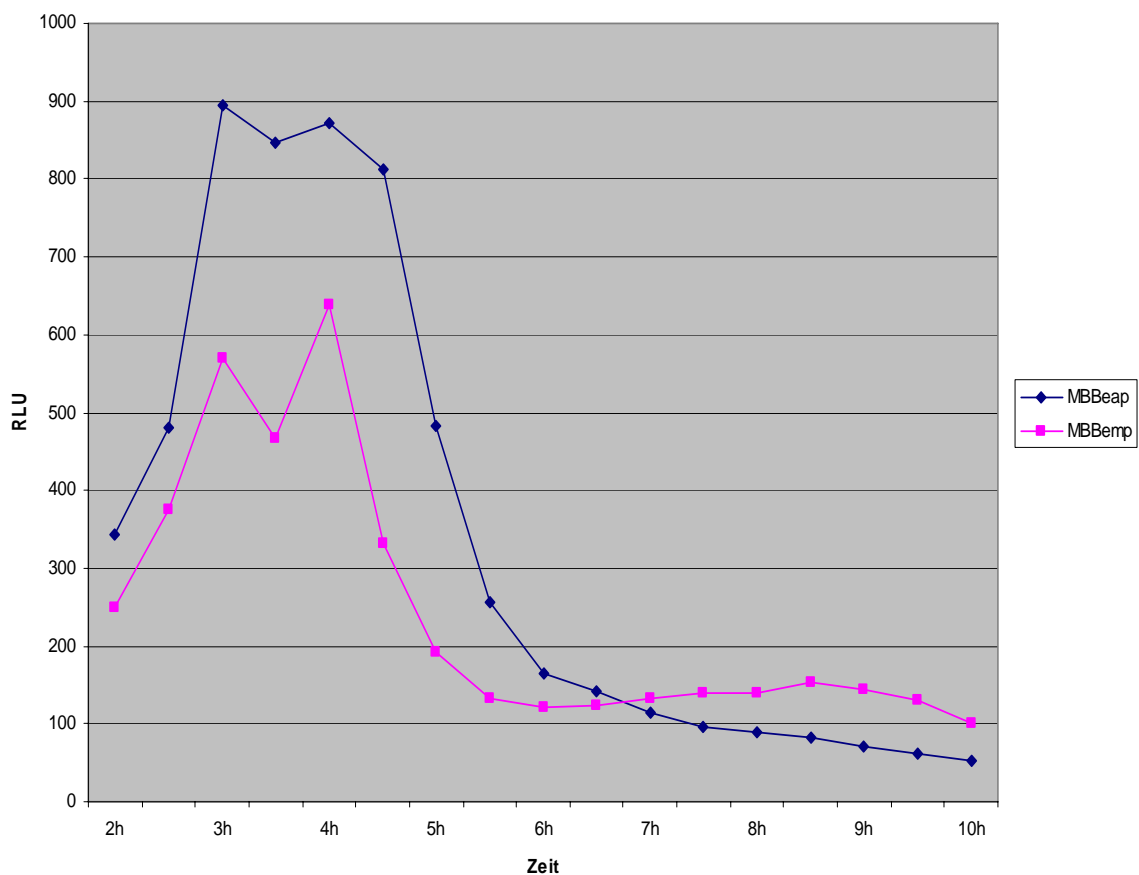


Abbildung 7: *eap* und *emp* Expression in MBB

Abbildung 8a zeigt die Expression von *eap* in MBB im Vergleich mit der Expression in BHI und TSB. In beiden Medien lag die *eap* Expression deutlich unter der in MBB. In BHI wurde das Maximum nach 2,5 Stunden, in TSB nach 3 Stunden erreicht. Zu dem Zeitpunkt der maximalen *eap* Expression in MBB ist diese ungefähr dreimal so hoch wie die in den Vergleichsmedien.

Für die *emp* Expression in BHI und TSB im Vergleich zu der in MBB, gezeigt in Abbildung 8b, gilt ähnliches wie für die *eap* Expression. In beiden Medien lag die Expression unter der in MBB. Anders als bei der *eap* Expression ist die Expression für *emp* in TSB geringfügig höher als in BHI. Das Maximum der Genexpression wird in beiden Medien nach 2,5 Stunden erreicht.

Lag in MBB die *emp* Expression unter der *eap* Expression, so ist der Unterschied in BHI und TSB für beide Gene nicht so eindrucklich.

Der pH-Wert fiel sowohl in TSB als auch in BHI innerhalb der ersten 3 Stunden unter einen Wert von 7.0. In TSB wurde ein pH-Wert von 5.9 erreicht. Innerhalb der nächsten 3 Stunden fiel er durchgehend auf 5.4 und stieg bis zur 10. Stunde auf 6.4 an. In BHI lag der Wert zur 3. Stunde bei 6.1 und stieg in den nächsten 7 Stunden auf einen Wert von 7.6 an. In beiden Medien lag ein Wert kleiner 6.5 zur 3. Stunde vor.

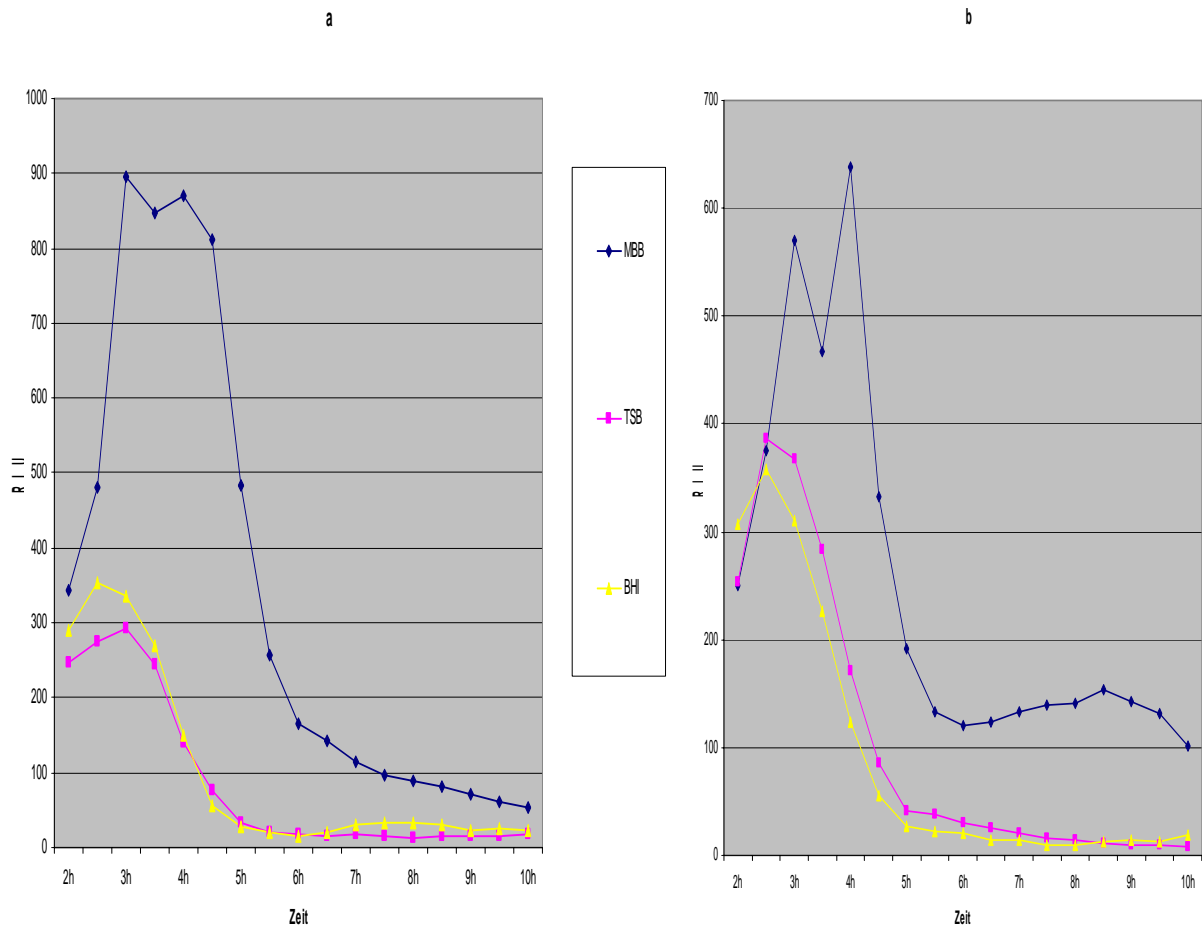


Abbildung 8: Vergleich der *eap* bzw. der *emp* Expression in verschiedenen Nährmedien, welche für gewöhnlich zum Kultivieren von *S. aureus* eingesetzt werden; a = *eap* in MBB, TSB, BHI; b = *emp* in MBB, TSB, BHI

In vorausgehenden Studien wurde bereits der repressive Effekt von Glukose in MBB auf die *eap* Expression gezeigt (Harraghy et al., 2005). Die unterdrückende Wirkung von Glukose im CY Medium auf die Expression von *eap* und *emp* ist anhand der Abbildung 9a und b zu erkennen. Im CY Medium mit Glukose supplementiert kam es zu einer deutlichen Unterdrückung der *eap* und *emp* Expression im Vergleich zum CY Medium. *Eap* und *emp* wurden durch die Supplementierung von Glukose in CY nur halb so stark expremiert wie in CY ohne Glukose. Durch den Glukosezusatz in CY folgte das Maximum der *eap* und *emp* Expression 0,5 Stunde später als im CY ohne Glukosezusatz. Das CY Medium hatte einen positiven Einfluss auf die *eap* Expression im Vergleich zum MBB. Auf die *emp* Expression wirkte es, indem der Spitzenwert etwas früher erreicht wurde im Vergleich mit MBB.

Im mit Glukose supplementiertem Medium fällt der pH-Wert zur 3. Stunde unter 7.0 auf 6.6, zur 6. Stunde auf 5.8 und blieb dann bis zum nächsten Messpunkt unverändert. Im CY Medium

ohne Glukosezusatz wurde kein pH-Wert unter 7.0 erreicht. Zur 3. Stunde lag ein pH-Wert von 7.1 vor, der dann weiter anstieg und zur 10. Stunde einen Wert von 7.5 erreichte.

Abbildung 9c und d vergleicht die Expression beider Gene in MBB mit NZYM und NZCYM. Beide Medien führen nicht zu einer Steigerung der Expression im Vergleich mit MBB. Im Gegenteil, die Expression fiel geringer aus als in MBB. Die *emp* Expression in MBB war doppelt so hoch wie die in NZYM. Die zugeführten Casamino Säuren in NZYM führten zu einer weiteren Reduktion der *eap* und *emp* Expression. Der negative Effekt der Casamino Säuren wirkte sich auf *eap* stärker aus als auf *emp*. Bei *emp* kam es nur minimal zu einer Reduktion der Expression. *Eap* wurde in dem mit Casamino Säuren supplementiertem NZYM Medium nur halb so stark expremiert wie in NZYM. Das Maximum von *eap* lag in beiden Vergleichsmedien bei 4 Stunden. Bei *eap* kam es nur zu einer Expressionsspitze in NZYM und NZCYM. Bei *emp* lief der Verlauf der Expression wie im MBB mit zwei Spitzen, nämlich einer zur 3. und einer zur 4. Stunde.

Der pH-Wert fiel durch die Supplementation von Casamino Säuren in NZYM innerhalb der ersten 3 Stunden auf 6.9, dann stieg er auf 8.4 an und blieb konstant. Im NZYM stieg der pH-Wert zunächst auf 7.3 und im weiteren Verlauf bis auf 8.6 an.

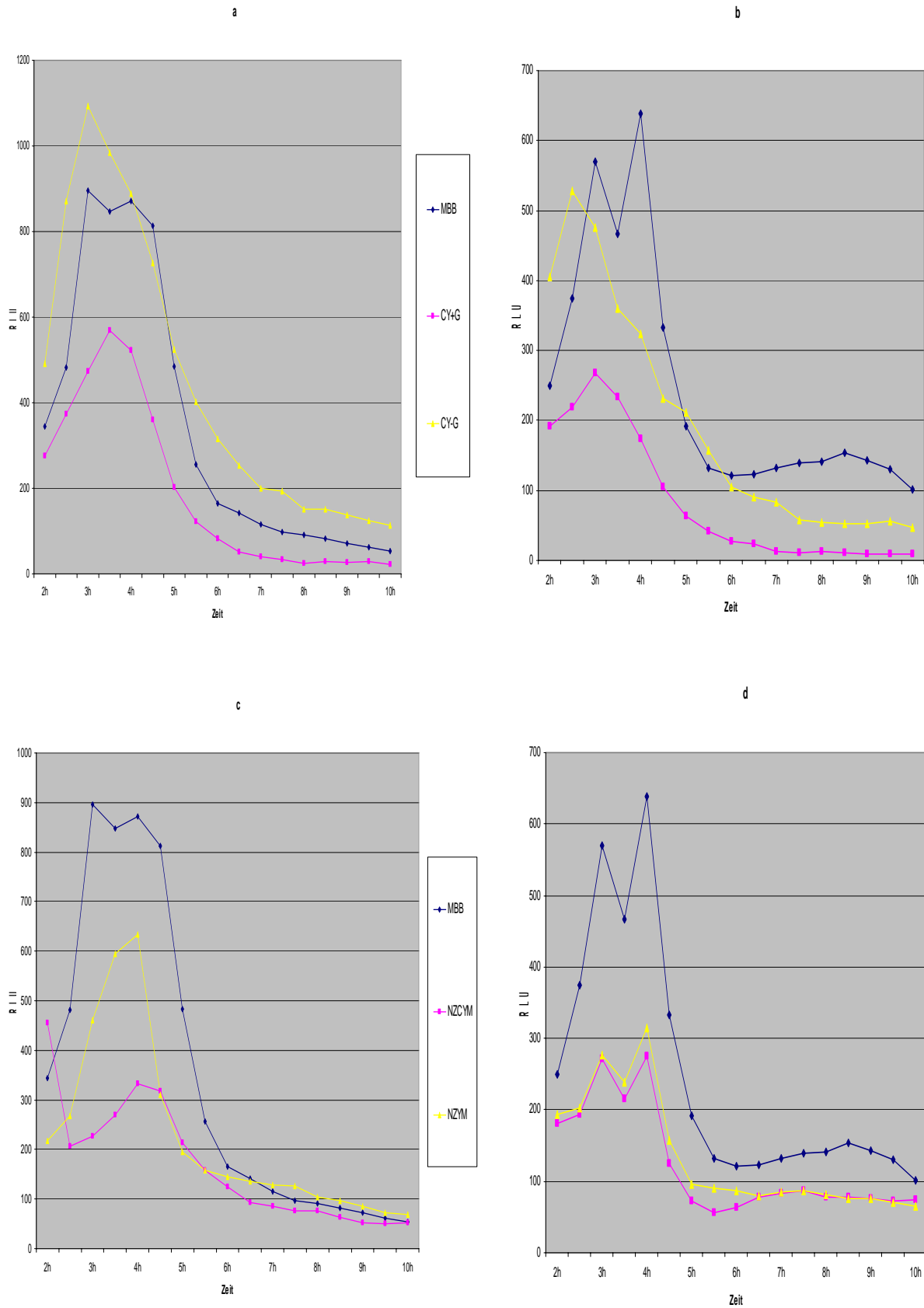


Abbildung 9: Vergleich der *eap* und der *emp* Expression in verschiedenen Wachstumsmedien, die für Studien der Genexpression in *S. aureus* eingesetzt wurden; a = *eap* in MBB, CY+, CY-; b = *emp* in MBB, CY+, CY-; c = *eap* in MBB, NZCYM, NZYM; d = *emp* in MBB, NZCYM, NZYM

Abbildung 10 vergleicht die *eap* und *emp* Expression in den Medien MHB, LB und NB mit MBB. Beide Gene wurden in NB nur geringfügig exprimiert. Das Maximum von *eap* wurde nach 2,5 Stunden und von *emp* nach 3 Stunden erreicht. Die *eap* Expression lag in MHB und LB etwa 11 % über der in MBB. In LB wurde das Maximum 0,5 Stunde vor dem in MHB und MBB erreicht. MHB hatte einen positiven Effekt auf die *emp* Expression im Vergleich zu der in MBB, wohingegen die Kultivierung in LB nicht verstärkend wirkt. In beiden Medien wurde das Maximum 0,5 Stunde zuvor erreicht.

Der pH-Wert in NB fiel innerhalb der ersten 3 Stunden auf 6.1 ab. Innerhalb der nächsten 3 Stunden kam es erneut zu einem Abfall auf 5.1. Bis zur 10. Stunde stieg er dann wieder auf 6.4. In den beiden anderen Medien fiel der Wert nie unter 7.0.

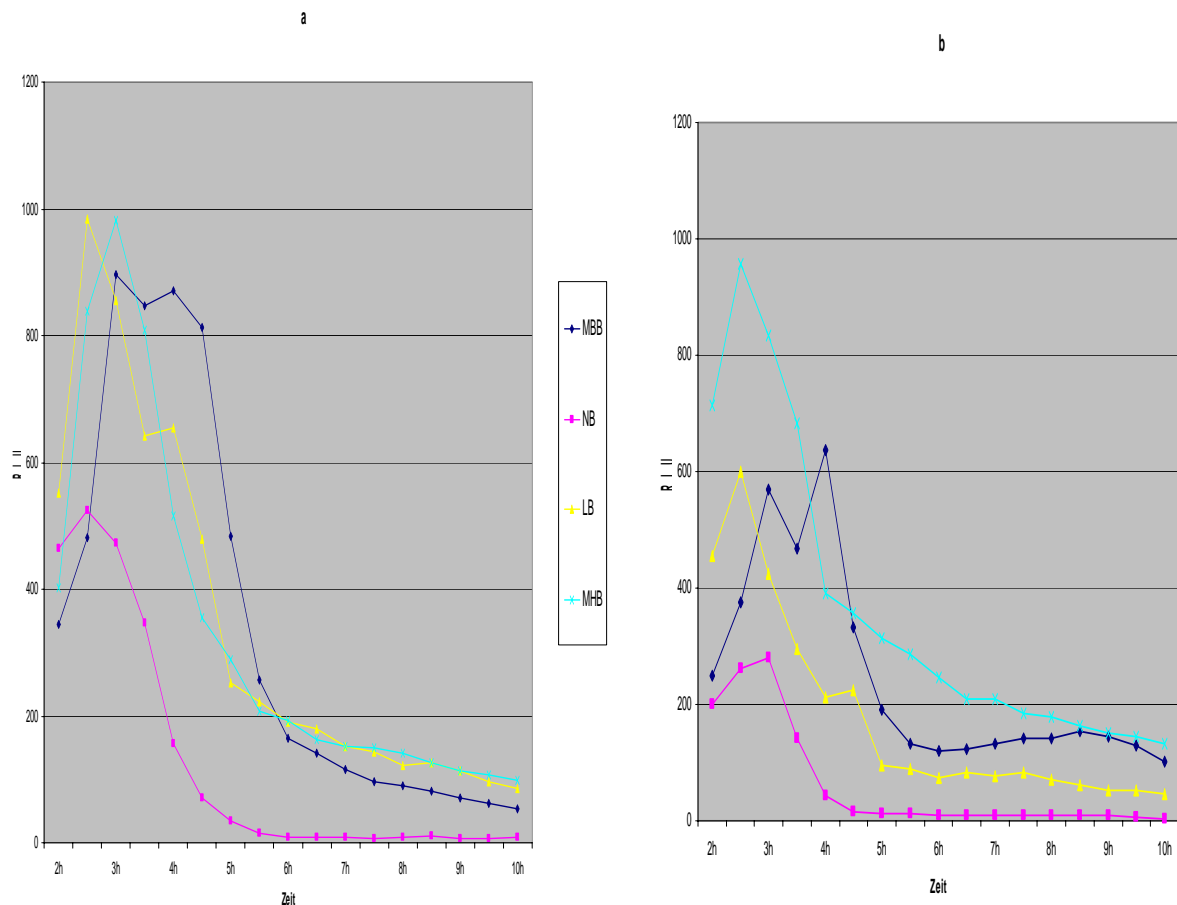


Abbildung 10: Vergleich von *eap* und *emp* Expression in Medien, die für gewöhnlich für die Kultivierung von *E.coli* benutzt werden, aber welche auch in Studien der Genexpression in *S. aureus* zum Einsatz kommen; a = *eap* in MBB, NB, LB, MHB; b = *emp* in MBB, NB, LB, MHB

In Abbildung 11 wurden die *eap* und die *emp* Expression in LB und NZYM miteinander verglichen. Beide Medien unterscheiden sich nur durch die Anwesenheit von Magnesiumsulfat in NZYM. Diese Tatsache erklärt möglicherweise die geringere Expression in NZYM. Es liegen allerdings Daten vor (Myriam Groß, noch nicht publiziert), die belegen, dass die Supplementation von Magnesium-Chlorid die Expression positiv beeinflusst.

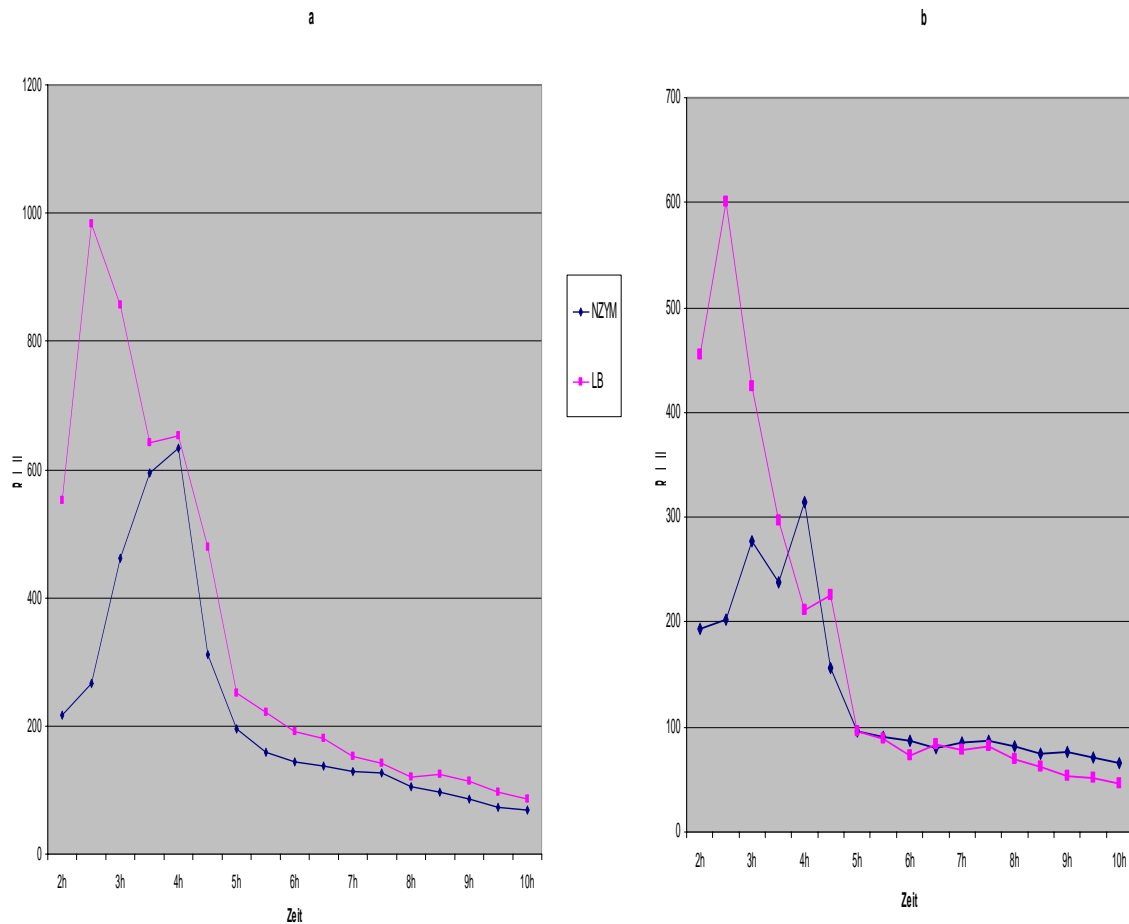


Abbildung 11: Der einzige Unterschied der beiden, zum Vergleich der *eap* und *emp* Expression, eingesetzten Medien, besteht in der Anwesenheit von Mg Sulfat in NZYM; a = *eap* in NZYM, LB; b = *emp* in NZYM, LB

Die außerordentlich hohe *eap* und *emp* Expression im Vergleich zu MBB wurde durch THB erzielt und wird durch Abbildung 12 veranschaulicht. Die erste Spitze der *eap* Expression wurde in THB wie in MBB nach 3 Stunden erreicht und liegt nur gering über dieser. Das Maximum in THB tritt nach 4,5 Stunden auf und ist im Vergleich zu MBB in etwa 3,5 Mal so hoch. Auf *emp* hatte es einen geringeren Effekt. In THB ist die *emp* Expression ca. um das 1,5 fache stärker als

im Vergleich zu der in MBB. Der pH-Wert fiel nie unter einen Wert von 7.0 und stieg bis zum letzten Messpunkt auf 7.9 an.

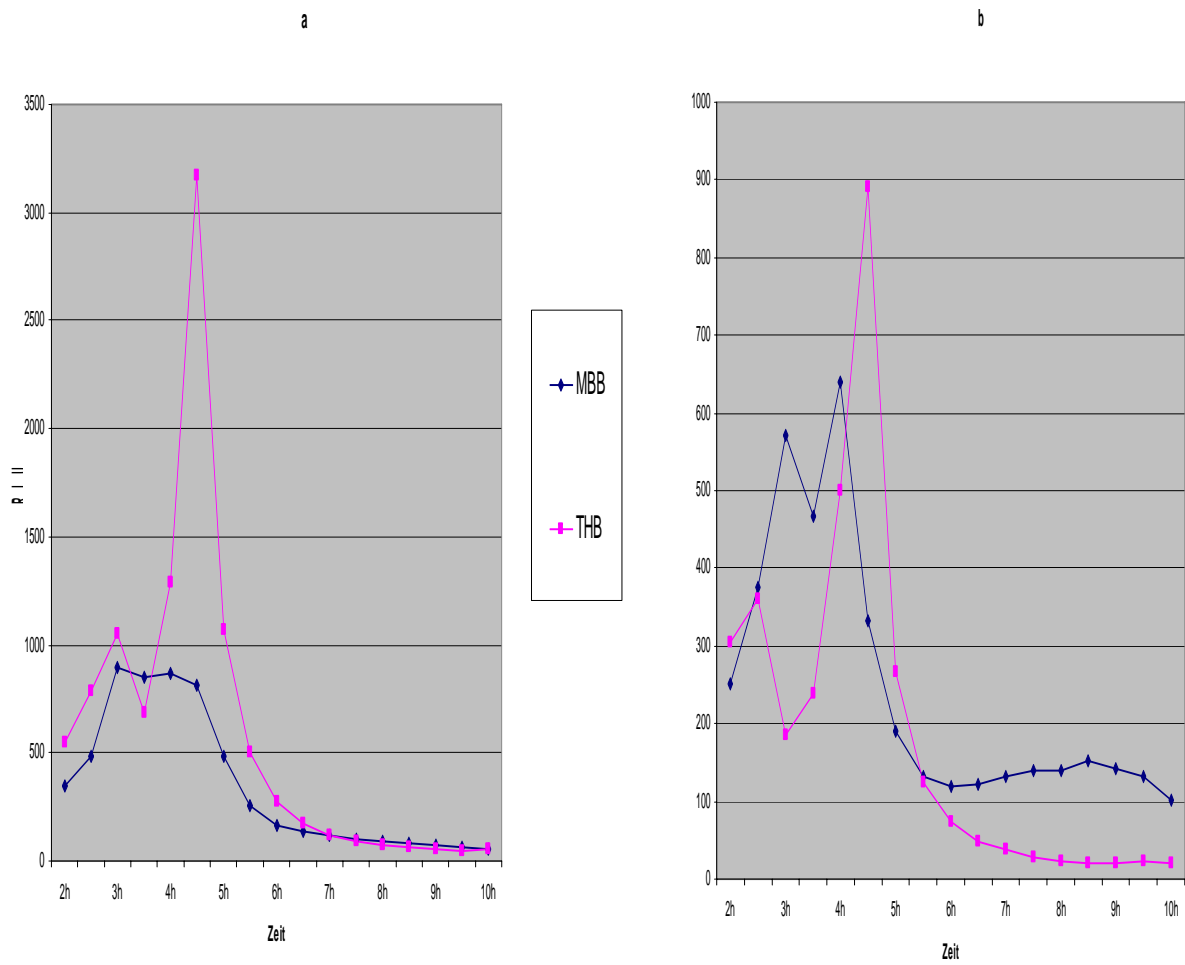


Abbildung 12: Vergleich der *eap* und *emp* Expression in MBB und THB; a = *eap* in MBB, THB; b = *emp* in MBB, THB

5.4 Untersuchung der Zellwandprotein- und der sezernierten Proteinmenge

Die bisher vorliegenden Ergebnisse der Genexpression von *eap* und *emp* in den unterschiedlichen Medien legen nahe, die Quantität der Proteinsynthese mittels SDS Gelelektrophorese von Eap in einer eingeschränkten Auswahl von Medien (MBB, TSB, THB) zu untersuchen. Die Untersuchung der Zellwandproteine und der sezernierten Proteine ermöglichte eine schnelle Anschauung der Quantität von Eap in unterschiedlichen Medien zu unterschiedlichen Zeiten. Bei der Isolation von Zellwandproteinen lag kein Eap vor. Das Ergebnis der Isolation der sezernierten Proteine von Newman, kultiviert in unterschiedlichen Medien (MBB, THB, TSB), ist zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung (nach 3 Stunden und 6 Stunden), in Abbildung 13 wiedergegeben.

Anscheinend gibt es bis zur 3. Stunde keinen quantitativen Unterschied in der Proteinexpression. Nach weiteren 3 Stunden ist in MBB mehr Eap vorhanden als in den anderen beiden Medien. Zwischen THB und TSB scheint es keinen quantitativen Unterschied zu geben.

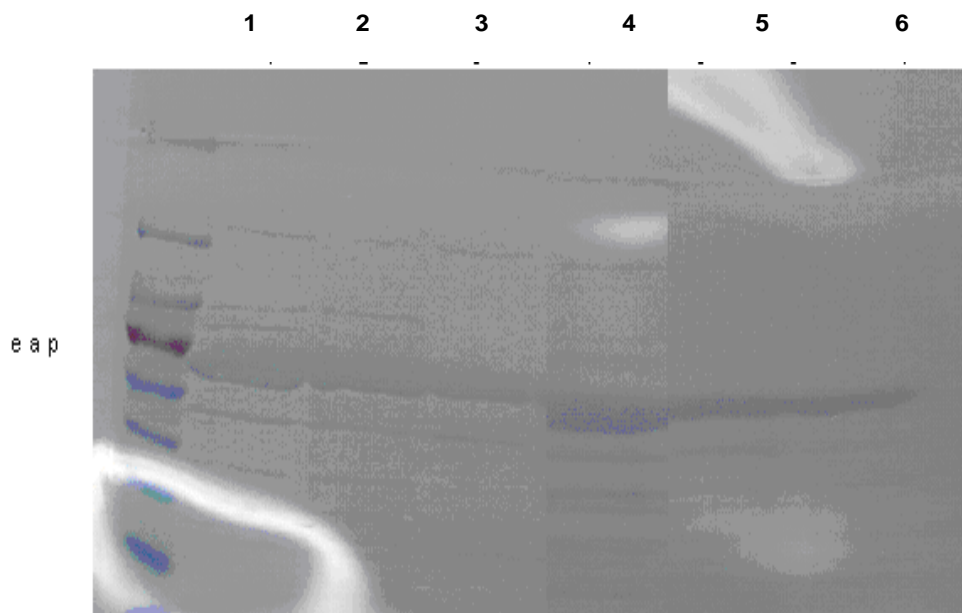


Abbildung 13: *Newman* sezernierte Proteine; 1-3 = 3 h; 4-6 = 6 h; 1 u 4 = MBB, 2 u 5 = THB, 3 u 6 = TSB

5.5 gfp-lux Reporter Gen Analysen in modifizierten Basismedien

Wegen der besseren Expression von *eap* im Vergleich zu *emp* und der Erkenntnis, dass beide Gene ähnlich auf die Veränderungen reagieren, wurden die nächsten Experimente nur noch mit Newman + pEap-gfp-lux benutzt.

Die erstaunliche Wirkung des THB auf die *eap* Expression wurde untersucht, indem das THB mehrfach modifiziert wurde. Da die Rinderherzinfusion ein Bestandteil von THB darstellt, der in den anderen eingesetzten Medien fehlt, wurde THB ohne Rinderherzinfusion eingesetzt, um zu sehen, was mit der *eap* Expression passiert. Das Pepton ist in THB am stärksten vertreten (vgl. Kapitel 4.1.1); um seine Auswirkung auf die *eap* Expression zu untersuchen, wurde THB mit verringertem Gehalt an Pepton eingesetzt.

Ohne den Zusatz der Rinderherzinfusion verringerte sich die *eap* Expression um etwa 0,167 und das eine Maximum lag bei 4 Stunden. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, lag die Expression noch deutlich höher als in MBB. Durch die Reduzierung von Pepton konnte eine deutliche Reduktion der *eap* Expression erzielt werden. Bereits die Senkung des Peptons von 2 % auf 1.5 % ließ die *eap* Expression unter die *eap* Expression von Newman in MBB fallen (welche schon über 3 Mal geringer ausfällt). Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass Pepton einen positiven Einfluss auf die *eap* Expression hat. Auf Grund dieser Vermutung wurde MBB mit Pepton schrittweise modifiziert (vgl. Kapitel 4.1.1), von den normal vorhandenen 1 % auf 1.5 % und auf 2 %. Die Modifikation von MBB mit Pepton führte jedoch nicht zu dem erwarteten Ergebnis. Die Modifikation hatte sogar einen negativen Effekt und die Maxima wurden später erreicht.

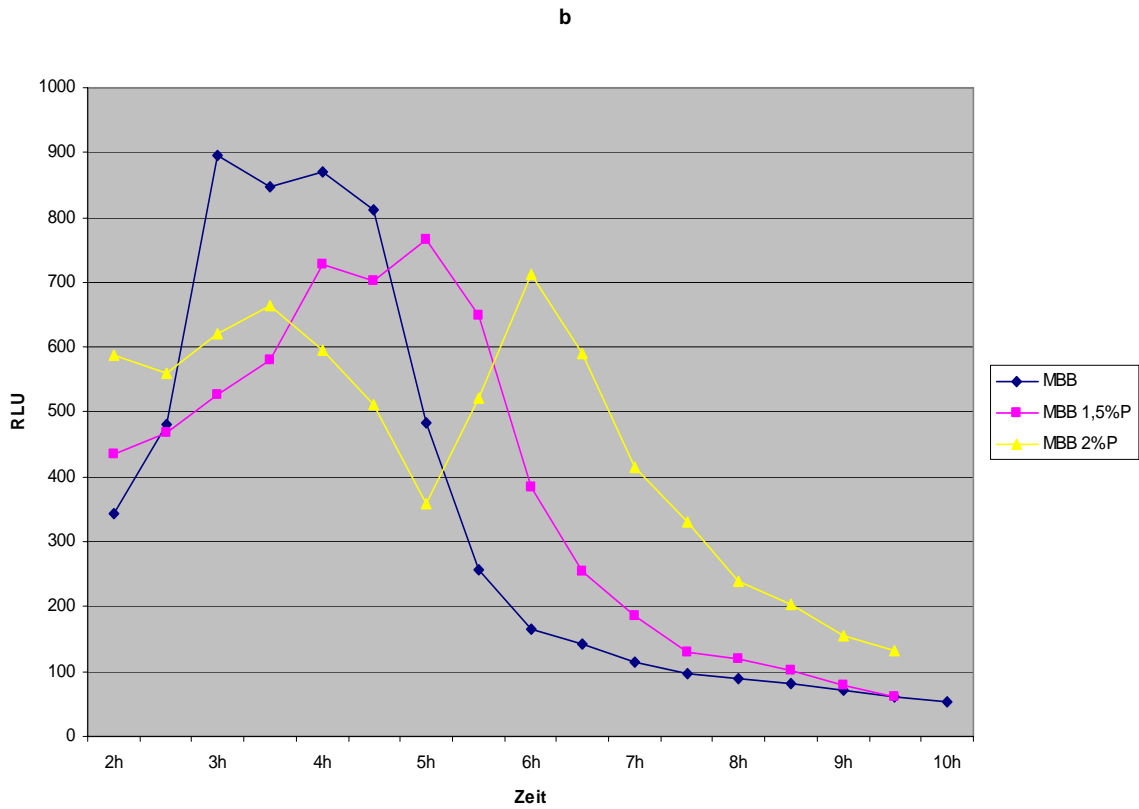
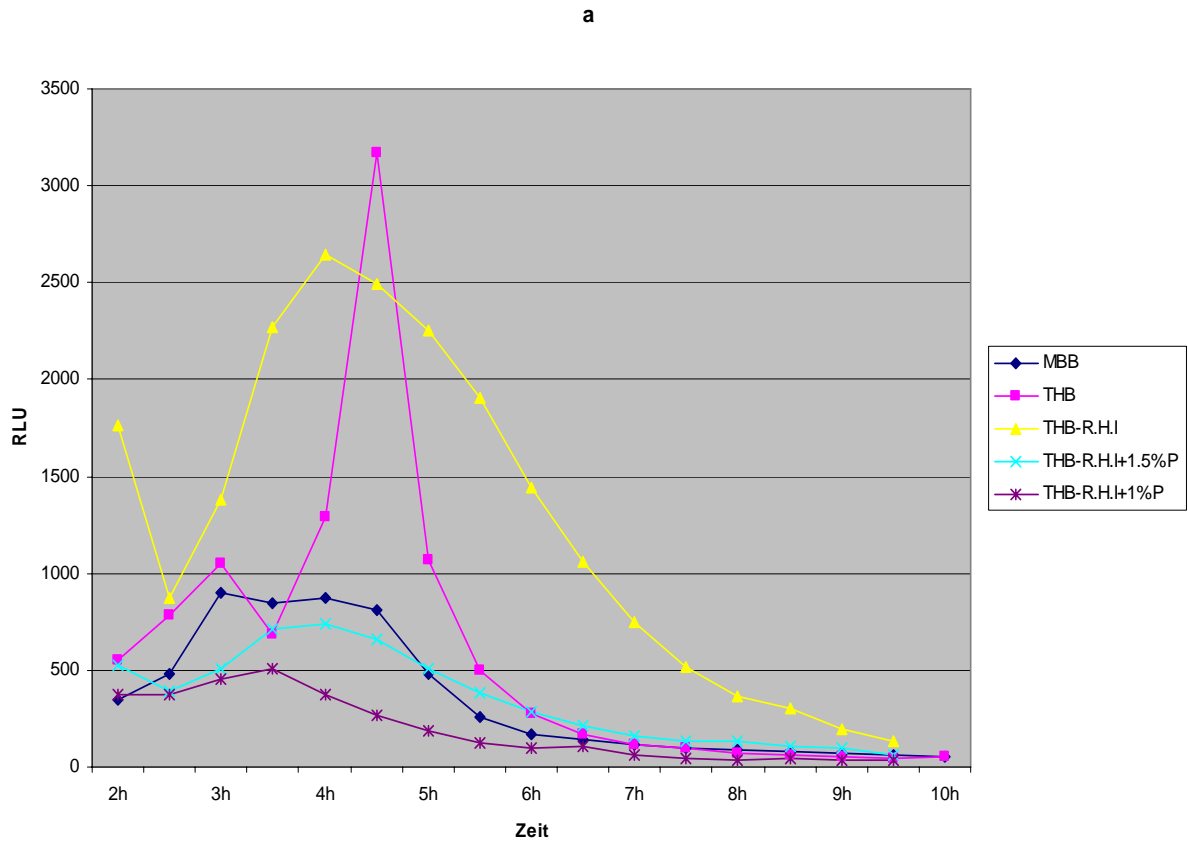


Abbildung 14: Untersuchung der Wirkung des Peptons auf die *eap* Expression; a + b = *eap*

Die hohe Expression von *eap* durch Newman in THB war demnach nicht nur durch die alleinige Supplementation von Pepton auslösbar. Es muss noch einen anderen Grund dafür geben. Deshalb wurde im nächsten Schritt der Gehalt von Glukose und Acetat (Abbildung 15) bestimmt, da es bei der aeroben Metabolisierung von Glukose zur Anreicherung von Acetat kommt und der pH-Wert fällt. Das Acetat führt möglicherweise zu einer Veränderung der Genexpression. Es wurden nicht mehr alle Medien untersucht, sondern nur noch MBB, TSB, BHI und THB. Diese sind, wie bereits erwähnt, Standardnährmedien für die *S. aureus* Kultivierung.

Der Gehalt an Glukose wurde wie in Kapitel 4.2.5.2.1 beschrieben bestimmt. Für den Gehalt an Glukose konnte gezeigt werden, dass die Glukose nach 3 Stunden vollständig aufgebraucht war.

In MBB kam es innerhalb der ersten 3 Stunden zu einer Acetat Anreicherung, welche bis zum nächsten Messpunkt deutlich abfiel und zum letzten Messpunkt, nach 10 Stunden, unter der Anfangsmenge lag. Das Acetat wurde demnach von *S. aureus* wieder metabolisiert. Bei TSB und BHI kam es bis zur 6. Stunde zu einem Acetate Anstieg. Für TSB lag der Acetat Anstieg etwas unterhalb von dem in BHI.

Im THB stieg die Acetatkonzentration ebenfalls innerhalb der ersten 6 Stunden an und blieb dann jedoch konstant. Sogar nach 24 Stunden Kultivierung war die gleiche Menge an Acetat vorhanden.

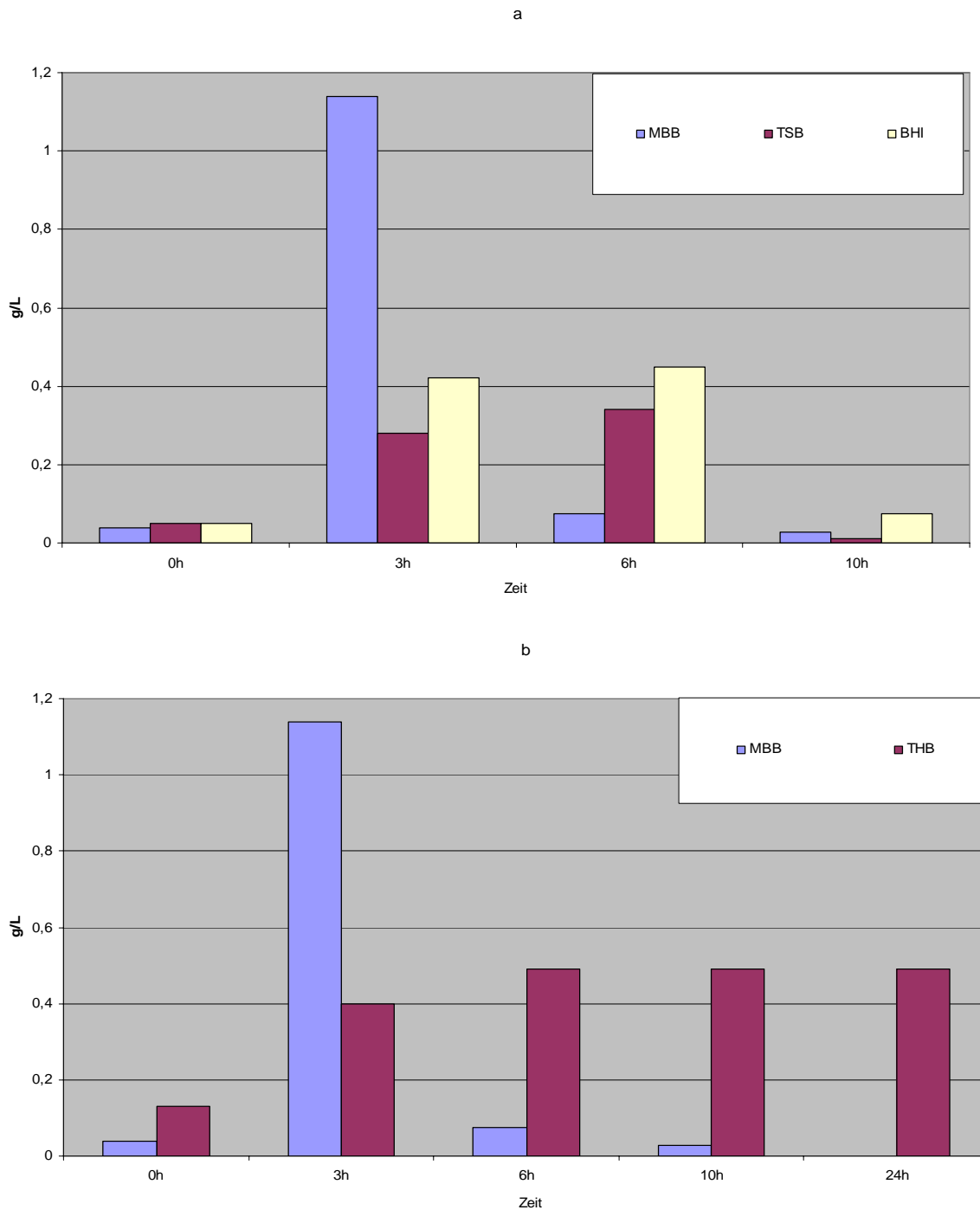


Abbildung 15: Vergleich des Acetat-Stoffwechsels von Newman in unterschiedlichen Medien; a = MBB, TSB, BHI; b = MBB, THB

Möglicherweise ist auch die Anreicherung von Acetat für die deutliche *eap* Expression in THB verantwortlich. Rice et al (2005) konnten eine Beeinflussung der Genexpression durch Acetat zeigen. Deswegen wurde im nächsten Schritt MBB mit Acetat modifiziert (vgl. Kapitel 4.1.1), mit Newman (pEap-gfp-lux) inokuliert und die Lumineszenz analysiert. Die Menge an Acetat beläuft sich auf unter 30 mM.

In beiden mit Na-Acetat modifizierten Medien kam es zu einer Veränderung der *eap* Expression (Abbildung 16a). Die Expressionsspitzen wurden zur selben Zeit erreicht wie vor der Modifikation. Das Na-Acetat wirkte im Vergleich mit MBB hinsichtlich der ersten *eap* Expressionsspitze abschwächend, hinsichtlich der zweiten *eap* Expressionsspitze aber verstärkend. Das NaCl wirkte sich auf beide *eap* Expressionsspitzen verstärkend im Vergleich zu MBB aus. Das Maximum lag bei beiden über 1,6 Mal so hoch wie in MBB. Das Acetat scheint demnach zu Beginn einen hemmenden Effekt auf die *eap* Expression auszuüben. Die *emp* Expression wurde durch das Na-Acetat deutlich verstärkt. Der Verlauf war der gleiche wie in MBB, allerdings wurden deutlich höhere Werte erzielt, wie Abbildung 16b zeigt.

Des Weiteren wurde das Natrium durch Kalium ersetzt, dadurch sollte festgestellt werden, ob das Natrium oder das Acetat bzw. das Chlorid den Effekt auslöst. Die *eap* Expression der ersten Spitze fällt beim K-Acetat Zusatz geringer als beim KCl Zusatz aus. Die Expression bei der Zugabe von KCl war nach der 3. Stunde ähnlich der in MBB, fiel dann deutlich unter der von MBB bis zur 4,5 Stunden ab und stieg in der 5. Stunde leicht an. Die zweite Spitze war im Vergleich mit der Spitze in MBB reduziert und um 1 Stunde nach rechts verschoben. Die Spitzen bei MBB supplementiert mit 30 mM K Acetat lagen bei 3,5 und 5 Stunden. Der erste Spitzenwert war im Vergleich zu MBB um 0,5 Stunden und der zweite Spitzenwert um 1 Stunde verschoben.

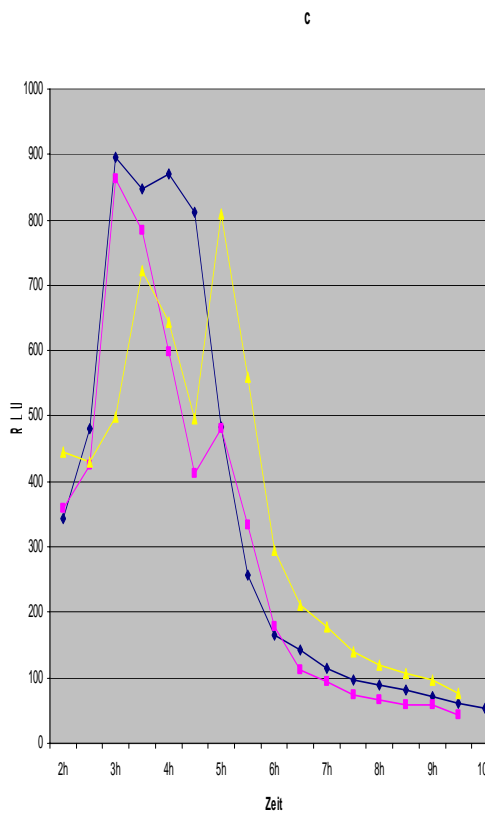
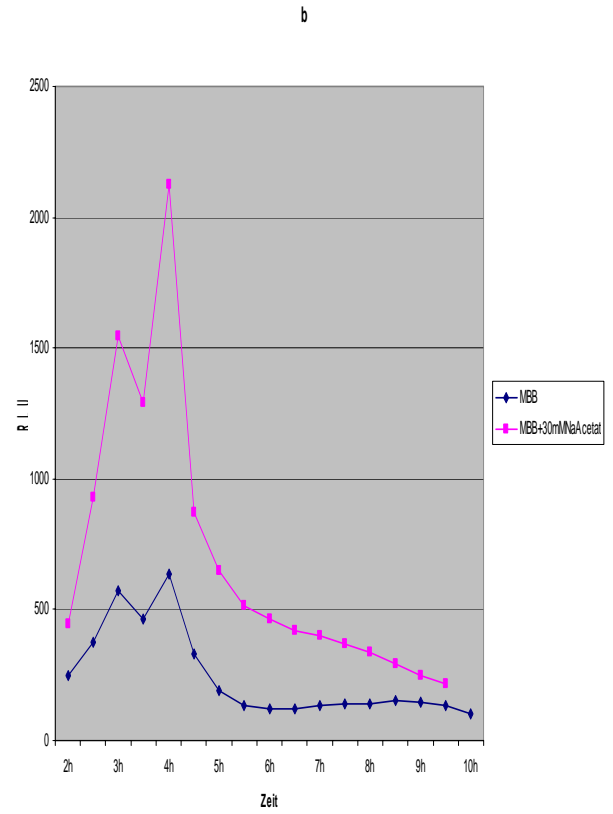
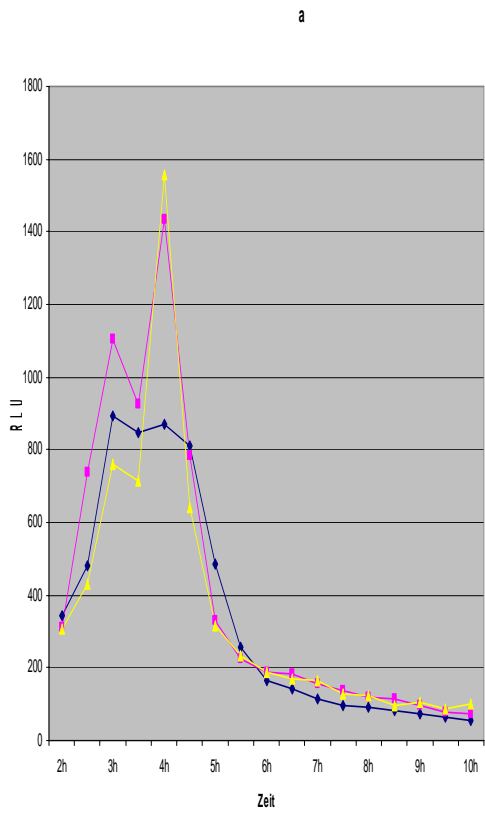


Abbildung 16: Acetat Experimente; a + c = *eap*, b = *emp*

5.6 Newman Aconitase Mutant

Obwohl eine Acetat Supplementation nicht direkt eine Wirkung auf die Expression von *eap* und *emp* zu haben scheint, steht eine aufgehobene Metabolisierung von Acetat, wie es in THB vorkam, möglicherweise mit einem unterbrochenem Zitratzyklus oder dem Verlust der Fähigkeit Acetat zu verstoffwechseln, in Verbindung. Es wurde der Versuch unternommen eine *acnA* Mutante zu erzeugen. Dieser Mutante fehlt das Enzym Aconitase, welches für den Acetatstoffwechsel benötigt wird. Die *acnA* Mutante sollte zeigen, welche Auswirkungen es auf die *eap/emp* Expression hat, wenn der Zitratzyklus, der energiereiche Verbindungen in der Post-Exponential-Phase bereitstellt, unterbrochen wird. Die Substrate des Zitratzyklus entstehen durch den oxidativen Abbau von Acetyl-CoA, welches wiederum aus dem aeroben Stoffwechsel von Glukose und anderen Aminosäuren entsteht. Das Enzym Aconitase wird für die Umwandlung von Citrat zu Isocitrat, eine Zwischenstufe des Zitratzyklus, benötigt.

Für die Klonierungen wurde das Plasmid pGAS-6 (Somerville et al., 2002) eingesetzt. Dieses enthält neben dem *acnA* Gen auch noch ein Erythromycin- und Chloramphenicol-Resistenzmarker. Die Erythromycin-Resistenz-Kassette ist in das *acnA* Gen integriert. Als erstes wurde pGAS-6 in RN4220 durch Elektroporation (vgl. Kapitel 4.2.2.8.2) transformiert. Die Inkubationstemperatur lag wegen der Hitzelabilität des Plasmids bei 30° C.

Die anschließende Kontrolle zeigte zwei Banden (Abbildung 17): Eine Bande (~2000bp) auf Höhe der pGAS 6 positiv Kontrolle und eine kleinere Bande (~500bp).

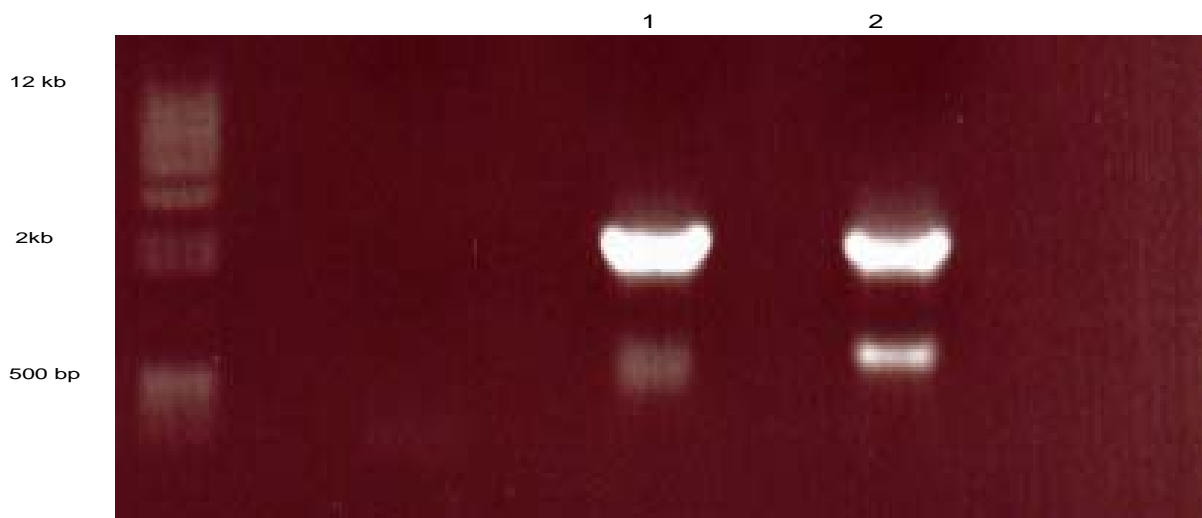


Bild 17: *acnA* Mutant ; 1= pGAS-6 pos. Kontrolle, 2= pGAS-6 nach Plasmid Isolation, gewonnen aus RN4220 nach Transformation des pGAS-6 durch Elektroporation und PCR

Im nächsten Schritt wurde pGAS-6 aus RN4220 isoliert und mit Elektroporation in Newman transformiert. Die Bakterien wurden bei 30° C inkubiert. Eine Kultivierung der transformierten Bakterien auf BHI Agar gelang weder bei einer Inkubationstemperatur von 30° C noch bei 43° C.

Da eine Transformation mit Elektroporation nicht gelang wurde aus RN4220 (pGAS-6) ein Phagenlysat gewonnen. Newman, inokuliert mit dem Phagenlysat, wurde bei 30° C, 37° C und bei 43° C inkubiert. Bei 30° C und 37° C kam es zur Bildung von Kolonien. Die Kolonien wurden erneut ausgestrichen und bei 30° C und 37° C inkubiert. Dieser Schritt war erfolgreich. Dieses Vorgehen wurde danach noch zwei Mal wiederholt. Die Inkubationstemperatur wurde bei der letzten Inkubation auf 43° C festgelegt. Diese Temperatur sollte hinsichtlich Insertion des *acnA* Gens und des ErmB-Resistenzmarkers in das Genom von Newman selektionieren.

5.6.1 Selektion einer Insertionsmutante

Um die *acnA* Mutanten zu isolieren, wurde eine Übernachtskultur von Newman nach Phagen-Transduktion in TSB angesetzt. Es wurde kein Antibiotikum supplementiert, um Bedingungen zu schaffen, die dadurch plasmidfreie Organismen selektionieren. Die Kulturen wurden bei 30° C und 150 RPM 16 Stunden inkubiert. Die Übernachtskultur wurde mit TSB 1: 20 verdünnt und erneut unter gleichen Bedingungen, diesmal für 24 Stunden, inkubiert. Dieser Schritt wurde an vier aufeinander folgenden Tagen wiederholt. Die Bakterien wurden dann auf BHI Agar (10 µg/ml Erythromycin) bei 37° C für 24 Stunden kultiviert. Von den entstandenen Kolonien wurde dann eine Kolonie halbiert. Eine Hälfte wurde auf BHI Agar + 10 µg/ml Erythromycin, aufgetragen und die andere Hälfte auf BHI Agar + 10 µg/ml Chloramphenicol. Die Insertionsmutanten haben bei Verlust des Plasmids nur noch ihren Resistenzmarker für Erythromycin und reagieren sensitiv auf Chloramphenicol. Es waren beide Platten bewachsen und es war davon auszugehen, dass das Plasmid noch vorhanden war.

In einem anderen Versuch wurde eine Übernachtskultur mit Newman nach Phagen-Transduktion in TSB + 10µg/ml Erythromycin bei 30° C, 150 RPM und über Nacht inokuliert, angesetzt. Dann wurde die Übernachtskultur mit TSB 1: 20 verdünnt und in Gegenwart von 10 µg/ml Erythromycin bei 43° C über Nacht kultiviert. Verschiedene Verdünnungen dieser Kultur wurden auf mit 10 µg/ml Erythromycin angereichertem TSB Agar bei 43° C über Nacht rekultiviert. Im nächsten Schritt sollten die Klone gefunden werden, die keine Chloramphenicolresistenz aufwiesen. Allerdings gelang auch dieser Versuch, eine Insertionsmutante zu isolieren, nicht.

Durch die Phagen-Transduktion konnte pGAS-6 in Newman eingeschleust werden, was durch Plasmid DNA Präparation und nachfolgender PCR und Agarosegelelektrophorese gezeigt

werden konnte (Abbildung 18). Es gelang aber nicht, die *acnA* Mutante in Newman zu generieren.

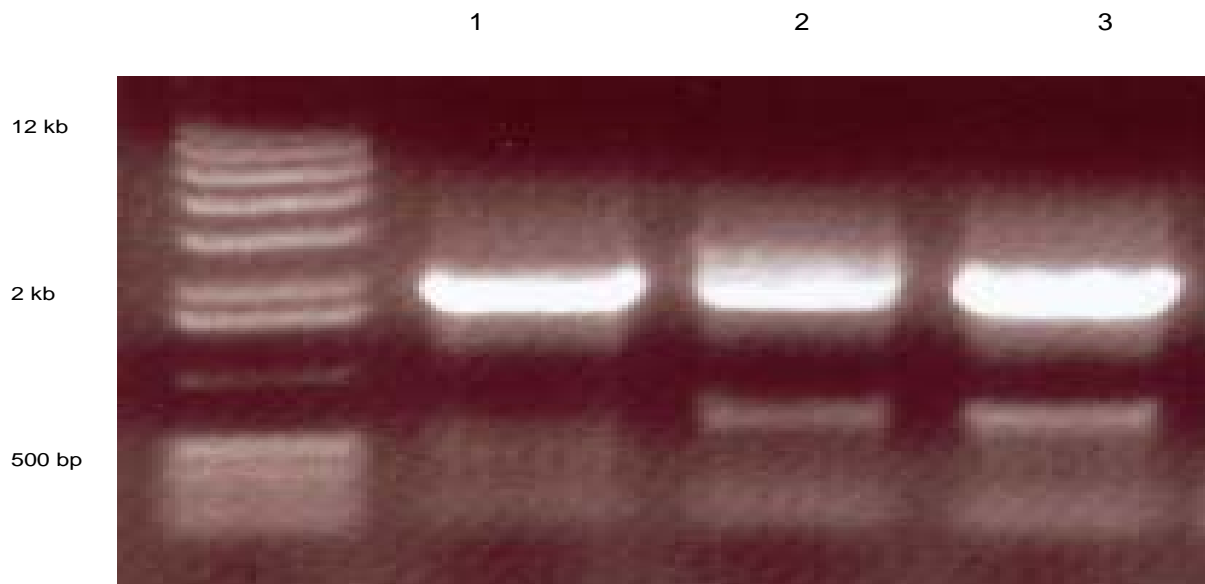


Bild 18: *acnA* Mutante; 1= pGAS-6 pos. Kontrolle, 2 u. 3= pGAS-6 nach Plasmid Isolation aus Newman nach Transformation von pGAS-6 mittels Elektroporation und PCR

6 Diskussion

In verschiedenen Studien wurde bislang gezeigt, dass *S. aureus*, in Abhängigkeit des extrazellulären Milieus, dazu neigt, bestimmte Virulenzfaktoren in unterschiedlicher Menge in den einzelnen Wachstumsphasen zu produzieren (Chan and Foster, 1998; Clark et al., 2004). Es wurde festgestellt, dass diese Anpassung an das umgebende Milieu mit einer veränderten Transkription verschiedener Regulationsmechanismen in Zusammenhang steht (Chan et al., 1998; Yarwood et al., 2001). *eap* ist als wichtiger Virulenzfaktor bekannt, allerdings ist über seine Expression noch vieles unklar. Unterschiedliche Medien und auch verschiedene Stämme werden bei der Arbeit mit *S. aureus* von den unterschiedlichen Gruppen für die Experimente eingesetzt. Die Novick und Wolz Gruppe benutzen CYPG, wohingegen andere Gruppen BHI bevorzugen (Chan and Foster, 1998; Chatterjee et al., 2005). In anderen Studien wird aber auch TSB, THB oder LB verwendet. In situ (Kolonisation, invasive Infektion, wechselnder Wirt oder Umgebungsbedingungen) ist *S. aureus* unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt, die durch Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien modellhaft nachgestellt werden. An Veränderungen seiner Umwelt kann sich *S. aureus* anpassen, indem der Erreger seine Genexpression verändert. Bisher ist bekannt, dass *eap* in Abhängigkeit vom Wachstumsmedium, unterschiedlich exprimiert wird (Harraghy et al., 2005). Sararia-Otten et al (1997) zeigte, dass die Produktion von RNA III ebenso vom Nährmedium abhängt. Chan und Foster (1998) konnten nachweisen, dass ein Variieren der einzelnen Nährstoffe Einfluss auf die Genexpression nimmt. In Anbetracht der Vielfalt der eingesetzten Medien, ist es von großer Bedeutung in Erfahrung zu bringen, wie sich das Anpassungsverhalten in den einzelnen Medien auf die Expression von *eap* und *emp* auswirkt. Diese Untersuchung fördert auch den Vergleich verschiedener Studien hinsichtlich der Genexpression. Des Weiteren sollte geklärt werden, welche Kulturfaktoren für die unterschiedliche Expression in den einzelnen Medien verantwortlich sind.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das Verhalten von *S. aureus*, in Bezug auf die Expression von *eap* und *emp* in neun häufig eingesetzten Basisnährmedien, welche zum Teil modifiziert wurden, untersucht.

6.1 Wahl des Reporter-Gen-Assay

Obwohl ein Newman *emp* β -Galaktosidase Reporter Konstrukt vorliegt (Harraghy et al., 2005) wurden Newman (pEmp-gfp-lux) konstruiert und die Experimente mit dem *gfp-lux* Reporter denen mit dem β -Galaktosidase Reporter vorgezogen. Newman (pEap-gfp-lux) lag bereits einsatzfähig vor (N. Harraghy). Die Experimente mit dem *eap*- und *emp-gfp-lux* Reporter

ermöglichen es die Expression der zwei Gene in mehrere Medien in Echtzeit zu erfassen. Neben der Erfassung der Expression in Echtzeit ist es möglich, 96 Felder mit Proben, auf Dichte und Luminescence gleichzeitig zu untersuchen. Die Datenerhebung erfolgt halbstündlich ohne äußeren Eingriff. Es ist nicht notwendig, während der Datenerhebung das Experiment zu überwachen. Dadurch ist die Durchführung des Experiments ohne großen Zeitaufwand zu bewältigen, gleiches trifft auf die Vorbereitung zu. Untersuchungen mit dem β -Galaktosidase Reporter sind zeitaufwändiger und die Untersuchungen laufen nicht in Echtzeit ab.

Zum Vergleich mit der Expression von *eap* wurde ein weiteres, für ein SERAM Protein kodierendes Gen *emp*, unter Einsatz der für die Herstellung des pEap-gfp-lux Konstrukts bereits erfolgreichen Klonierungsstrategie in pGfp-lux kloniert. Das erzielte Konstrukt pEmp-gfp-lux wies, ebenso wie pEap-gfp-lux, eine deutlich wachstumsphasenabhängige Expression auf und wir konnten daher davon ausgehen, dass das Konstrukt einsatzfähig war. Der Unterschied lag in der deutlich geringeren Expression von *emp* zu *eap*, wobei der Trend gleich war.

6.2 Resultate

6.2.1 Wachstum von *S. aureus* Newman in verschiedenen Nährmedien

In den verschiedenen Basismedien wurde anfänglich das Wachstumsverhalten von Newman untersucht, um später die *eap* und *emp* Expression in den einzelnen Medien, den einzelnen Wachstumsphasen zuordnen zu können. Diese Untersuchung sollte auch aufzeigen, ob in den einzelnen Medien Newman unterschiedlich schnell wächst (Abbildung 6). In den einzelnen Nährmedien gab es keine nennenswerten Unterschiede im Wachstum. In MBB trat Newman etwas früher in die Post-Stationäre Phase ein als in den restlich getesteten Basismedien.

6.2.2 *Eap* und *emp* Expression in verschiedenen Nährmedien

Um herauszufinden, welchen Effekt verschiedene Nährmedien auf die Expression von *eap* und *emp* in Newman haben, wurde das auf Bioluminescens basierende System (Qazi et al., 2001), welches auch von der Harraghy Gruppe zur *eap* Untersuchung eingesetzt wurde, verwendet. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass die Expression von *eap* und *emp* in den verschiedenen Medien unterschiedlich zu sein scheint. Interessant ist die Beobachtung, dass *emp* verglichen mit *eap*, in allen untersuchten Medien den gleichen Trend der Expression aufweist, lediglich in geringerer Menge (Abbildung 7, 8, 9, 10, 12). Die Expression beider Gene lag in TSB, BHI und NB deutlich reduziert im Vergleich zu MBB vor (Abbildung 8 und 10). Eine deutliche Erhöhung der Expression beider Gene wurde in THB entdeckt (Abbildung 12). Zwischen LB und NZYM liegt der einzige Unterschied in der Abwesenheit von $MgSO_4$ in LB.

Möglicherweise ist das die Erklärung für die gesteigerte *eap* und *emp* Expression in diesem Medium verglichen mit NZYM (Abbildung 11). M. Groß (Promotionsarbeit in Vorbereitung) konnte in ihrer Studie zeigen, dass eine Supplementation von $MgCl_2$ in MBB zu einer Erhöhung der *emp* Expression führt. Betrachtet man alle Daten, so scheint es möglich, dass es nährmediumabhängige Veränderungen der Expression von *eap* und *emp* gibt. Um genau sagen zu können, welche Faktoren der einzelnen Medien verantwortlich für diese unterschiedliche Expression sind, könnten Medien eingesetzt werden, deren chemische Zusammensetzung genau definiert sind. Durch Variieren jeweils eines definierten Bestandteiles, unter gleichzeitiger Beobachtung des Verhaltens der Expression, könnte man mehr darüber erfahren, welcher Bestandteil genau die Veränderung in der Expression vermittelt.

In dieser Studie ist ein solch genauer Vergleich nicht möglich, da wir komplexe Medien untersucht haben, deren genaue chemische Zusammensetzung nicht festgelegt ist. Einigen Medien gleich ist jedoch die Supplementation von Glukose.

Glukose

In unserer Studie ist in einigen der Basismedien Glukose ein gemeinsamer Inhaltsstoff (TSB, NB, BHI, THB, CY+). Verschiedene Forschungsgruppen konnten bereits zeigen, dass Glukose einen Effekt auf die Genexpression haben kann. Die Gruppe N. Harraghy et al. (2005) zeigte einen negativen Effekt von Glukose auf die *eap* und *emp* Expression in MBB. Es wurden zwei Reporter-Gen-Assays, der β -Galaktosidase Reporter und der *gfp-lux* Reporter, eingesetzt. Mit den beiden Reporter Assays wurde die Expression von *eap* und *emp* in Bezug auf die Beeinflussbarkeit von äußeren Faktoren bei verschiedenen *S. aureus* Stämmen analysiert. Harraghy et al. konnten mit den Reporter Assays zeigen, dass die Expression beider Gene in der Exponential Phase von Newman steigt und danach wieder abfällt. Die Ergebnisse aus den real-time PCR Experimenten zeigten ebenfalls, dass es zu einer Abnahme der Expression von *eap* und *emp* während der Stationären Phase kam. Die Untersuchungen in MBB, supplementiert mit 0.5 % Glukose, zeigte eine vier- bis fünffache Verringerung der Expression von *eap* und *emp* zum 4 Stunden Zeitpunkt. Mit der real-time PCR konnte die Reduktion der Expression von *eap* und *emp* in Glukose supplementierten MBB im Vergleich zu einfachen MBB auf Genebene demonstriert werden. Weitere Untersuchungen mit der real-time PCR und verschiedenen Deletionsmutanten führten zu der Erkenntnis, dass *agr*, *sarA* und *sae* im Zusammenhang mit der Expression von *eap* und *emp* steht. Bei *agr*, *sarA* und *sae* Minusmutanten wurde *eap* und *emp* verringert exprimiert. Newman exprimierte *sae* in MBB mit 0.5 % Glukose ebenfalls geringer als in MBB.

L. B. Regassa et al. (1991; 1992) hatten ebenfalls den repressiven Effekt von Glukose auf bestimmte *agr* regulierte Gene und deren Proteine aufzeigen können. In ihrem Fall ging es unter anderem um die Expression von *agr* regulierten Genen *sec+* und *hla*.

Um die Experimente dieser Studie mit den Ergebnissen von N. Harraghy et al. (2005) vergleichen zu können, wurde CY Medium genau 0.5 % Glukose beigesetzt. Anstelle des CY Mediums wurde in deren Studie MBB mit 0.5 % Glukose supplementiert. Es konnte gezeigt werden, dass in dem mit Glukose supplementiertem CY Medium die Expression von *eap* und *emp* deutlich unter der im CY Medium lag (Abbildung 9 a und b). Auch in den anderen glukosehaltigen Medien kam es im Vergleich zu MBB zu einer deutlich reduzierten Expression beider Gene (Abbildung 8 und 10), jedoch mit einer Ausnahme: THB enthält ebenfalls Glukose, aber es kam zu einer erhöhten Expression von sowohl *eap* als auch *emp* im Vergleich zu der Expression in MBB (Abbildung 12). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Expression nicht nur allein durch eine Supplementierung von Glukose verändert wird. Da der einzige Unterschied zwischen MBB und CY+ in der Supplementierung von Glukose liegt, muss der repressive Effekt auf die *eap* und *emp* Expression in Zusammenhang mit der Glukose stehen. Neben der Anwesenheit der Glukose können möglicherweise der Glukosestoffwechsel oder die damit verbundenen Stoffwechselprodukte bzw Milieuveränderungen an diesem differentiellen Effekt auf die Genexpression beteiligt sein.

pH-Werte

Die Weinrick Gruppe (Weinrick et al., 2004) hat festgestellt, dass es bei der Fermentation von Glukose zu einer Ansäuerung der Umgebung kommt. In der Studie von Weinrick ging es neben den Beobachtungen, dass die Metabolisierung von Glukose zu einer Ansäuerung des Mediums führt, auch um die Auswirkung des leicht sauren Milieus auf die Expression verschiedener Gene von *S. aureus*. Eine große Anzahl *sae* abhängiger und *sae* unabhängiger Gene, deren Expression sich mindestens zweifach durch die Ansäuerung der Umgebung von vorher 7.5 auf 5.5 ändert, wurden entdeckt und als MAS (mild acid stimulon) definiert. Auf Grund dieser Informationen wurden in den Basismedien dieser Studie die pH-Werte zu mehreren Zeitpunkten des Wachstums erfasst.

Im CY+ Medium fiel der pH-Wert von anfänglich 7,0 auf unter 6,0 nach 6 Stunden, während der pH-Wert im CY Medium ohne Glukose von ebenfalls anfänglich 7,0 immer über 7,0 blieb. Da wir davon ausgehen, dass *sae* an der Expression von *eap* und *emp* beteiligt ist (Harraghy et al.), kann vermutet werden, dass es auch in unserem Fall durch die Ansäuerung des CY+ Mediums, durch die Metabolisierung der Glukose (Weinrick et al., 2004), zu einer Beeinträchtigung von *sae* und somit auch von *eap* und *emp* gekommen ist.

Auch in den anderen glukosehaltigen Medien (TSB, NB, BHI, THB) kam es zu einer Veränderung des pH-Wertes. In TSB und NB fiel der pH-Wert unter 6,0 ab. Im BHI kam es zu einem Abfall, jedoch nicht unter einen Wert von 6,0. Erstaunlich hierbei ist die Expression von *eap* und *emp* in den Medien. Im Vergleich mit MBB hat *S. aureus* keine nennenswerte *eap* und *emp* Expression in den drei genannten Medien gezeigt. Obwohl THB mit 0.2 % Glukose supplementiert wurde, konnte *S. aureus* die beiden Gene deutlich transkribieren. Der pH-Wert, der in THB nicht unter einen Wert von 6,5 abfiel, steht wohlmöglich damit in Zusammenhang.

Auch L. B. Regassa et al. (August 1992) untersuchten den Effekt von Glukose auf die Expression von *agr* in verschiedenen *S. aureus* Stämmen. Die Konzentration der Glukose belief sich immer zwischen 0.08 M und 0.11 M. Zunächst wurde FRI1230 unter anderem in einem Medium mit Glukose und der dazugehörige Kontrolle ohne Glukose angezogen und nach 6 Stunden die Proben für die Analyse mit Northern blot entnommen. In dem mit Glukose supplementiertem Medium kam es zu einer Reduktion der RNAII und RNAIII im Vergleich zur Kontrolle. Der pH-Wert stieg in der Kontrolle von anfänglich 6.5 auf 7.0, wohingegen er in der mit Glukose supplementierten Probe von anfänglich 6.5 auf 5.0 abfiel. Die weiteren Experimente erfolgten unter Beibehalten eines konstanten pH-Wertes mit Hilfe eines Fermentor Systems. Regassa et al. kamen in ihren Studien zu dem Ergebnis, dass die alleinige Supplementierung von Glukose bei Konstanthaltung des pH-Wertes auf 6,5 nicht zu einer Veränderung der Expression

von *agr* im Vergleich zur Kontrolle, ausreichte. Nur ein Absinken im pH-Wert auf 6,5 führte nach ihren Beobachtungen auch nicht zu einer Veränderung. Lediglich die Kombination aus Glukose und pH-Wert Minderung unter 6,5 führte zu einer nennenswerten Repression der Expression.

Dieser Sachverhalt stärkt somit die Vermutung, dass auch in unserem Fall die Repression der *eap* und *emp* Expression nicht allein von der Supplementierung von Glukose abhängt, sondern der fallende pH-Wert mit dazu beiträgt, während in THB eine Repression der *eap* und *emp* Expression trotz Anwesenheit von Glukose ausbleibt, da der pH-Wert nicht sinkt. In Anbetracht der Veränderbarkeit der Blutglukose, jedoch des konstanten pH-Wertes bei 7,4 im menschlichen Blut, ist diese Feststellung sehr interessant. So könnten beispielsweise Überlegungen sich mit dem Thema einer glukosehaltigen Therapie im Wundbereich befassen, sofern sicher ist, dass bestimmte Glukosekonzentrationen zu einer Reduktion der Expression von zum Beispiel *eap* und *emp* führen, welche die Pathogenität eines Erregers mitbestimmen. Andererseits ist beispielsweise das pH Milieu in einem Abszess typischerweise ein saures Milieu und die Expressions-Suppression von *Eap* und *Emp* in diesen sauren Umgebungsbedingungen könnten Hinweis darauf sein, dass diese Genprodukte *Eap* und *Emp* pathogenetisch im reifen Abszess von nur noch untergeordneter Bedeutung sind, während die Stoffwechselbedingungen des Erregers im Abszess in Richtung Überleben und Vermehrung gelenkt werden.

Auch kann *S. aureus* nach der Invasion innerhalb eines Endosoms seine *eap* und *emp* Expression wegen des niedrigen pH-Wertes einstellen und umgekehrt wieder anfangen *eap* zu exprimieren, wenn er in das Zytoplasma gelangt, indem ein pH-Wert von 7 vorliegt.

In der bereits weiter oben erwähnten Studie von B. Weinrick (Weinrick et al., 2004) konnte die Unabhängigkeit der Repression von *sae* durch Glukose gezeigt werden. Durch verschiedene Experimente konnte die Gruppe feststellen, dass *sae* auch ohne Anwesenheit von Glukose, allein durch die Verringerung des pH-Wertes auf 5,5 negativ beeinflusst wird. Allerdings kann man die Supplementation von Glukose und den pH-Wert nicht getrennt betrachten, da eine Metabolisierung von Glukose eben zu einem fallenden pH-Wert führen kann.

Da die Arbeitsgruppe von N. Harraghy et al. (2005) zu dem Ergebnis kam, dass die *eap* und *emp* Expression an die von *sae* gebunden ist, ist es auf Grund der geschilderten Beobachtungen für unseren Fall wahrscheinlich, dass eine Senkung des pH-Wertes, in Folge der Glukosefermentation, zu einer Unterdrückung der *sae* Expression und somit gleichzeitig zu einer verringerten *eap* und *emp* Expression führt. Allerdings kann an dieser Stelle nur eine solche Vermutung ausgesprochen werden und es ist nicht sicher, ob *sae* vermindert exprimiert wurde. Für genauere Angaben sind weitere Untersuchungen notwendig. Die pH-Wert Betrachtungen und

vor allem die Beobachtungen, dass der pH-Wert in THB nie unter einen Wert von 7 fiel, führen zu der Vermutung, dass ein pH-Wertebereich existiert, der für die Expression von *eap* und *emp* optimal ist.

Die Gruppe von Xudong Liang (Liang et al., 2006) kam in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass die Expression von *eap* und *emp* unabhängig von dem Sae System ist. Allerdings benutzte die Gruppe TSB zur Kultivierung ihrer Bakterien und es besteht somit nicht die Möglichkeit zum direkten Vergleich mit unseren Daten oder den Daten von Harraghy et al. Das unterstreicht abermals, wie wichtig zukünftige Forschung auf dem Gebiet der unterschiedlichen Genexpression in unterschiedlichen Medien ist. Diese Ergebnisse sind Anzeichen dafür, dass nicht alle Studien miteinander zu vergleichen sind, da die verschiedenen Gruppen ihre unterschiedlichen Stämme von Bakterien in den unterschiedlichsten Medien kultivieren und in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Nährmedien, auf die Genexpression gezeigt wurde. Damit ein Vergleich irgendwann möglich wird, muss noch einiges über das Expressionsverhalten von *S. aureus* in den Basismedien herausgefunden werden.

Möglicherweise sind die oben erwähnten Beobachtungen über den Zusammenhang mit glukosehaltigen Medien und dem daraus resultierenden fallenden pH-Wert, der sich seinerseits wieder auf die Expression einzelner Gene auswirkt, eine tatsächliche Erklärung dafür, dass in THB die *eap* und *emp* Expression trotz der Anwesenheit von Glukose im Vergleich mit dem Verhalten der Expression in MBB nicht reduziert vorliegt. Der pH-Wert wurde in THB bei der Metabolisierung von Glukose nicht reduziert. Möglicherweise liegt das an dem Natriumbikarbonat, welches als Puffer hilft, den pH-Wert konstant zu halten. Eventuell kam es wegen des nicht fallenden pH-Wertes möglicherweise auch nicht zu einer Repression von *eap* und *emp* regulierenden Genen und somit auch nicht von *eap* und *emp*. Allerdings erklärt es im Vergleich zu MBB nicht den stark positiven Effekt des Mediums auf die Expression der zwei Gene. Um zu erörtern, welche Stoffe in THB für das unerwartete Ergebnis verantwortlich waren, wurden dem Medium nacheinander verschiedene Stoffe entzogen und *S. aureus* ebenfalls mit dem *eap*-gfp-lux-System in den modifizierten Medien untersucht.

Modifiziertes THB

Als eher unwesentlicher Bestandteil von THB auf die Expression von *eap* stellte sich die Rinderherzinfusion dar, deren genauer Inhalt sich nicht bestimmen lässt. Ohne die Rinderherzinfusion veränderte sich die Expression nur geringfügig in ihrem Maximum (Abbildung 14a). Das Verringern des Peptongehaltes wirkte sich jedoch stark negativ auf die *eap* Expression aus (Abbildung 14a). Es kam nach diesen Experimenten die Vermutung auf, dass allein das Pepton für die *eap* Expression in THB verantwortlich war und MBB wurde

stufenweise auf den Peptongehalt des THB angepasst. Die Erwartung, dass der höhere Gehalt an Pepton die *eap* Expression in MBB positiv beeinflussen würde, wurde nicht erfüllt. Es kam sogar zu einem minimal repressiven Effekt im Vergleich zu MBB mit normalem Peptongehalt (Abbildung 14b). Es ist daher also nicht möglich, dem Pepton einen stimulierenden Effekt auf die *eap* Expression zuzuordnen. Aber allein die Erkenntnis, dass Pepton in THB einen positiven Effekt auf die *eap* Expression ausübt und in MBB nicht den gleichen Effekt hat, sondern vielmehr eine senkende Wirkung aufweist, ist durchaus erstaunlich.

Peptone sind Aminosäuren und kurzkettige Peptidgemische, die durch enzymatische Hydrolysen mit Pepsin aus tierischen oder pflanzlichen Proteinen gewonnen werden. Pepton ist möglicher Lieferant essentieller bzw nicht essentieller Aminosäuren, welche eine sekundäre Kohlenstoffquelle, die insbesondere nach Metabolisierung der primären Kohlenstoffquelle mittelbar gemacht werden kann, darstellt.

Pepton hat einen steigernden Effekt auf die *eap* Expression von Newman in THB kultiviert. Da das Pepton in MBB nicht zur gleichen Wirkung geführt hat, stellt sich die Frage, welche Energiequellen möglicherweise in MBB von Newman genutzt werden.

Energiequellen für *S. aureus*

Eine Energiequelle, die die Bakterien für ihr Überleben, Wachstum und ihre Produktion von Virulenzfaktoren benutzen, ist die Glukose, aber auch verschiedene Aminosäuren und Glutamat werden zur Gewinnung von Energie metabolisiert. Diese Metabolisierung geschieht durch den Zitratzyklus. Durch ihn wird ATP in der Post-Exponential-Phase bereitgestellt. Die aerobe Metabolisierung von Glukose führt zur Bildung von Pyruvat, welches in Acetyl-Co-Enzym A und dieses wiederum zu Acetat umgewandelt wird. Das Acetat wird von den Bakterien nach außen abgegeben und sammelt sich im Medium an. Gehen die Energiequellen wie Glukose zu Ende, wird das Acetat von *S. aureus* wieder internalisiert und über den Citratzyklus in Energie umgewandelt (Somerville et al., 2002).

G. A. Somerville (2003) konnte einen Zusammenhang zwischen dem Acetatstoffwechsel und dem Wachstumsvermögen von *S. aureus* zeigen. Da die in dieser Studie eingesetzten Basismedien über Glukose verfügen und nicht genau bekannt ist, ob und welche Wirkung der Acetatspiegel auf die Expression von *eap* und *emp* hat, wurde in MBB mit Hilfe des *gfp-lux* Systems die Wirkung von Acetat auf die Expression beider Gene untersucht. Allem Anschein nach scheint eine Supplementierung von Acetat sich nicht auf die *eap* und *emp* Expression auszuwirken (Abbildung 16 a und c), aber wir haben bereits erörtert, dass eine bestimmte Komponente eines Mediums in einem anderen Medium eine ganz andere Wirkung erzielen kann. Ein weiterer potentiell bedeutsamer Aspekt ist die Veränderung der Acetatkonzentration während

des Wachstums. Dazu wurde der Gehalt an Acetat in ausgewählten Basismedien zu unterschiedlichen Zeiten des Wachstums bestimmt und festgehalten.

6.2.3 Acetat Messung

Die Acetatmessungen wurden in MBB, BHI, TSB und THB durchgeführt. Alle Medien, außer MBB, enthalten in unterschiedlicher Menge Glukose. Allen *S. aureus* Kulturen war gleich, dass sie nach drei Stunden Inkubation Acetat produziert hatten. Dies geschah wie erwartet, da Somerville (Somerville et al., 2002) berichtet, dass die Metabolisierung von Glukose zur Entstehung von zunächst Pyruvat führt und dieses unter aeroben Bedingungen weiter zu Acetat oxidiert wird. In MBB ist zwar keine Glukose enthalten, aber andere Aminosäuren, die auch zur Acetat Entstehung, über die Umwandlung in Pyruvat, beitragen (G. A. Somerville et al., 2003). Unter anaeroben Bedingungen entsteht aus Pyruvat Laktat. In MBB war das Acetat nach 6 Stunden vollständig verbraucht. Bei den anderen genannten Medien produzierten die Bakterien auch in den folgenden 3 Stunden Acetat. Dass in MBB das Acetat bereits nach dem 3 Stunden Zeitpunkt wieder aufgebraucht wird, liegt möglicherweise daran, dass Newman in MBB keine Glukose zur Energiegewinnung zu Verfügung hat und das Acetat zur Energiegewinnung früher verstoffwechseln muss. Diese Beobachtung ist auch vereinbar mit dem früheren Eintritt von Newman in MBB in die Post-Exponential-Phase, als in den anderen genannten Medien. Interessant ist die Beobachtung des Acetatverlaufs in THB. Anders als bei TSB und BHI, bei denen Acetat ab dem 6 Stunden Zeitpunkt verbraucht wurde, blieb es in THB konstant. Das Acetat war auch noch nach 24 Stunden Inkubation in THB vorhanden (Abbildung 15). Eine mögliche Erklärung hierfür besteht darin, dass der Zitratzyklus, in THB angezogenen Stamm Newman, blockiert ist und es als Folge dessen den Bakterien nicht möglich war, Acetat zu verstoffwechseln (Somerville et al., 2002). Gegen diese Annahme spricht allerdings das Wachstum von *S. aureus* in THB, wenn man es mit dem Wachstum in den anderen Medien vergleicht und davon ausgeht, dass ein unterbrochener Zitratzyklus zu einem verfrühten Eintritt in die Stationäre Phase führt, wie von Somerville et al. (2002) beschrieben. Möglich ist auch, dass beim Wachstum in THB die Wiederaufnahme von Acetat gestört ist. Somerville (Somerville et al., 2003) zeigte unter anderem für *S. aureus* 8325, dass ein Verlust der Fähigkeit zur Acetatmetabolisierung nicht mit einem veränderten Wachstum einhergeht, aber zu einer Verkleinerung der Kolonien beiträgt. Es scheint demnach einen Unterschied in der Wirkung zwischen Blockieren des Zitratzyklus und fehlender Verstoffwechselung von Acetat zu geben. Es könnte auch möglich sein, dass ausreichend andere Ressourcen zur Energiegewinnung vorhanden waren und Acetat keinen essentiellen Energielieferanten darstellt. THB enthält eine große Menge an Pepton, das möglicherweise als Energielieferant ausreicht. Des Weiteren muss auch daran gedacht werden, dass eine Akkumulation von Acetat eine mögliche Wirkung auf die *eap* und

emp Expression ausüben kann, wie von Kelly C. Rice (2005) für andere Gene beschrieben wurde.

Schließlich muss noch erwähnt werden, dass Acetat nur unter aeroben Konditionen entsteht. Anaerobe Konditionen würden zur Laktatproduktion führen. Alle Kultivierungen dieser Studie wurden im Schüttelbrutschrank bei 150 RPM durchgeführt und es kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass aerobe Bedingungen vorlagen. N. Harraghy konnte aber zeigen, dass es bei 230 RPM, eine Rotationsfrequenz, die zu tatsächlich aeroben Konditionen führt, zu vergleichbaren Ergebnissen kommt (unpublizierte Daten). Die bei 230 RPM ermittelten Resultate wiesen unterschiedliche Quantitäten der Acetatkonzentration auf, jedoch war der Trend vergleichbar mit der Acetatkonzentration in Kultur-Ansätzen die bei 150 RPM inkubiert wurden. In THB war ebenso nach 10 Stunden das Acetat noch vorhanden.

6.2.4 Newman *acnA* Mutant

Somerville et al. (2002; 2003) kamen zu dem Ergebnis, dass der Zitratzyklus eine wichtige Rolle für das Überleben und für die Virulenz von *S. aureus* spielt. Die Studie von Somerville et al. (2002), beschäftigt sich mit der Frage, ob die Bereitstellung von Energie für das bakterielle Wachstum in der Postexponentialphase und für die Herstellung von Virulenzfaktoren wie verschiedenste Sekretionsproteine durch die Metabolisierung via Acetat durch den Zitratzyklus erfolgt und notwendig ist. Um diese Fragen zu beantworten wurde von der Somerville Gruppe das Aconitase Gen in *S. aureus* inaktiviert, wodurch der Zitratzyklus unterbrochen wird. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die mutierten Bakterien früher in die Stationäre Phase eintreten als der Wildtyp. Der frühere Eintritt in die Stationäre Phase führte aber nicht zu einem früheren Eintritt in die Sterbephase, wie von Somerville zunächst vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass die Bakterien ohne Aconitaseaktivität ein stark verlängertes Überleben in der Stationären Phase aufwiesen. Anscheinend wird für den Eintritt in die Sterbephase die durch den Zitratzyklus bereitgestellte Energie benötigt. Des Weiteren wurden verschiedene Virulenzfaktoren, wie z.B. *hly* (= beta-Toxin), bei den *acnA* Minusmutanten, vermindert im Vergleich zum Wildtyp, exprimiert. Da der *hly* Strang zu dem von *eap* komplementär ist, besteht die Annahme, dass es auch zu einer Beeinflussung der *eap* Expression kommt. Es gibt Daten über die gleichzeitige Veränderung von *eap* Expression bei Veränderung der *hly* Expression, mit denen diese Vermutung unterstützt wird.

Dass eine Inaktivierung des *acnA* Gens zu einer Beeinflussung von *agr* und *sar* führt, wurde von Somerville 2003 gezeigt. Diese zwei Regulatoren sind bekannte Einflussgrößen auf die *eap*

und *emp* Expression. Entsprechend haben wir postuliert, dass eine Aktivierung des *acnA* Abschnittes ebenfalls einen Effekt auf die Expression von *eap* und *emp* haben könnte.

Um nähere Informationen zu erhalten was mit der *eap* und *emp* Expression geschieht, wenn der Zitratzyklus in *S. aureus* verändert wird, wurden mehrere Versuche unternommen, eine *acnA* Mutante zu erzeugen. Leider gelang es im Rahmen dieser Studie nicht mit Newman eine *acnA* Mutante herzustellen und so muss diese Hypothese derzeit unbetrachtet bleiben.

6.2.5 Untersuchungen der Zellwandproteine von Newman

Nach der Isolierung der Zellwandproteine und anschließender SDS Gelelektrophorese waren die Banden zum 3 Stunden Zeitpunkt bei allen Proben quantitativ etwa gleich groß. Die Banden zum 6 Stunden Zeitpunkt zeigten eine quantitativ geringere Bande für Eap aus Newman in THB kultiviert im Vergleich zu der Eap Bande von Newman in MBB (Abbildung 13). Die Eap Bande von der Probe aus MBB war zum 6 Stunden Zeitpunkt sogar etwa doppelt so intensiv wie die von Eap aus der THB Probe. Anhand der Transkriptions-Experimente mit dem *gfp-lux* hätte man genau das Gegenteil erwartet, da in THB eine scheinbar höhere *eap* Expression als in MBB vorlag. Da keine weiteren Versuche mehr unternommen wurden, lässt sich nur darüber spekulieren weshalb das Ergebnis aus der SDS Gelelektrophorese nicht mit den Ergebnissen aus den *gfp-lux* Experimenten zusammenpasst. Von Palma et al. (1999) wissen wir, dass eine *eap* Expression nicht zwangsläufig mit einer Eap Produktion korreliert. Es wäre aber auch möglich, dass die Proteine in den Proben durch unterschiedlichen Gehalt an Proteasen unterschiedlich schnell verdaut wurden, und es aus diesem Grund zu einem quantitativen Unterschied in den Bandendicken kam. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Methode mit dem *gfp-lux* Reporter nicht geeignet ist und eine, hier nicht durchgeführte Berechnung der Fläche unter der Expressionskurve wär eher als die maximale Expression mit dem quantitativen Proteinnachweis zu korrelieren. Möglicherweise ist die Expression in THB zum 4.5 Stunden Zeitpunkt höher als in MBB, aber insgesamt doch weniger. Oder mit dem *gfp-lux* werden nur realistische Werte innerhalb einer bestimmten Zeit erfasst, also von der 2 bis zur 5 Stunde nach Start des Experimentes. In allen Proben kam es nach einem Abfall der Expression um die 5. und 6. Stunde nicht wieder zu einem Anstieg innerhalb der in dieser Studie gemachten Messungen, die mindestens über 10 Stunden durchgeführt wurden. Harraghy et al. (2005) zeigt in ihrer Arbeit, dass die *emp* Expression nach einem initialen Abfall in der 8. Stunde auch wieder ansteigt, was die Überlegung unterstützt, dass die *gfp-lux* Experimente nicht geeignet für die Untersuchung von *eap* und *emp* in der Stationären Phase von *S. aureus* sind. Die Werte innerhalb der ersten ein bis zwei Stunden fallen auch erstaunlich hoch aus. Da die Bisluminescens von

Reportergenkonstrukten nicht nur von der Promoter-Aktivität, sondern auch von der Stoffwechsellistung bzw einer ausreichenden ATP-Konzentration abhängt, kann es letztlich auch sein, dass die Steigerungen in den *eap* bzw *emp* Expressionen in stationären / spätstationären Phasen durch die Verfügung von Energie viel eher als durch Genexpression bedingt wird.

Um die Expression von *eap* und *emp* in den einzelnen Medien tatsächlich zu bestimmen, könnte man entsprechend real-time PCR Untersuchungen durchführen.

Zusammenfassung

Zusammenfassend lassen sich die Aussagen treffen, dass die Versuche mit Newman und pEap-gfp-lux bzw. pEmp-gfp-lux auf jeden Fall geeignet sind, schnell und ohne größeren Aufwand, die entsprechenden Gene auf Unterschiede in der Expression in unterschiedlichen Medien zu untersuchen.

Bisher ist auch mit Sicherheit festzustellen, dass es zu einem adaptierten Wachstumsverhalten des Erregers, je nach Angebot an Energielieferanten in seiner Umgebung, getestet durch den Einsatz definierter Medien, kommt.

Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass der *S. aureus* neben einem adaptierten Wachstum ebenfalls seine *eap* und *emp* Expression an kulturmediumabhängige Bedingungen adaptiert, da der Mikroorganismus in unterschiedlichen Medien eine unterschiedliche Genexpression aufweist. Die maximale Expression von *eap* und *emp* scheint meist in der frühen Exponentialphase zu erfolgen, außer bei Newman kultiviert in THB, hier tritt die maximale Expression in der späten Exponentialphase auf.

Weitere Untersuchungen sind geplant, um noch genauere Informationen über die komplexe Regulation der Virulenz-Genexpression und die Fähigkeit des Erregers, sich optimal an seine Umwelt anzupassen, zu erhalten. Eine zur Reportergenanalyse komplementäre und geeignete Methode ist dabei die bereits erwähnte quantitative real-time-PCR zu sein. Beiden Verfahren – Reportergenassay und qRT-PCR inhärent sind dabei bestimmte methodenspezifische Limitationen (bei Reportergen-Assays u.a. Stabilität des Reportergen-Produktes, bei der qRT-PCR hauptsächlich Amplifikations-Effizienz und Wahl des geeigneten Vergleich-Gens).

In jedem Fall bleiben die Bestimmungen der Genexpression mittels dieser Techniken, Verfahren im Sinne einer Surrogat-Bestimmung, die jedoch – und das belegen auch die Untersuchungen in dieser Arbeit – ein hinreichend reproduzierbares und differenziertes Abbild der ausgeprägten Adaptationsfähigkeit von *S. aureus* an unterschiedliche Umgebungsbedingungen darstellt.

7 Literaturverzeichnis

- Arvidson, S. and Tegmark, K. (2001). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 159-170.
- Athanasopoulos, A.N., Economopoulou, M., Orlova, V.V., Sobke, A., Schneider, D., Weber, H., Augustin, H.G., Eming, S.A., Schubert, U., Linn, T., Nawroth, P.P., Hussain, M., Hammes, H.P., Herrmann, M., Preissner, K.T., and Chavakis, T. (2006). The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 107, 2720-2727.
- Bayer, M.G., Heinrichs, J.H., and Cheung, A.L. (1996). The molecular architecture of the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178, 4563-4570.
- Benton, B.M., Zhang, J.P., Bond, S., Pope, C., Christian, T., Lee, L., Winterberg, K.M., Schmid, M.B., and Buysse, J.M. (2004). Large-scale identification of genes required for full virulence of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, 8478-8489.
- Bhakdi, S. and Tranum-Jensen, J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55, 733-751.
- Blevins, J.S., Beenken, K.E., Elasri, M.O., Hurlburt, B.K., and Smeltzer, M.S. (2002). Strain-dependent differences in the regulatory roles of sarA and agr in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 70, 470-480.
- Blevins, J.S., Gillaspay, A.F., Rehtin, T.M., Hurlburt, B.K., and Smeltzer, M.S. (1999). The Staphylococcal accessory regulator (sar) represses transcription of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin gene (cna) in an agr-independent manner. *Mol. Microbiol.* 33, 317-326.
- Boden, M.K. and Flock, J.I. (1992). Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Microb. Pathog.* 12, 289-298.
- Boden, M.K. and Flock, J.I. (1989). Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 57, 2358-2363.
- Bone, R.C. (1994). Gram-positive organisms and sepsis. *Arch. Intern. Med.* 154, 26-34.
- Bratu, S., Landman, D., Gupta, J., Trehan, M., Panwar, M., and Quale, J. (2006). A population-based study examining the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in New York City. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5, 29.
- Casewell, M.W. and Hill, R.L. (1986). The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 18 Suppl A, 1-12.
- Chan, P.F. and Foster, S.J. (1998). The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Microbiology* 144 (Pt 9), 2469-2479.
- Chan, P.F., Foster, S.J., Ingham, E., and Clements, M.O. (1998). The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J. Bacteriol.* 180, 6082-6089.

- Chatterjee, I., Becker, P., Grundmeier, M., Bischoff, M., Somerville, G.A., Peters, G., Sinha, B., Harraghy, N., Proctor, R.A., and Herrmann, M. (2005). *Staphylococcus aureus* ClpC is required for stress resistance, aconitase activity, growth recovery, and death. *J. Bacteriol.* *187*, 4488-4496.
- Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., and Herrmann, M. (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.* *94*, 278-285.
- Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J.I., Herrmann, M., and Preissner, K.T. (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med* *8*, 687-693.
- Cheung, A.L., Bayer, A.S., Zhang, G., Gresham, H., and Xiong, Y.Q. (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *40*, 1-9.
- Cheung, A.L., Projan, S.J., and Gresham, H. (2002). The Genomic Aspect of Virulence, Sepsis, and Resistance to Killing Mechanisms in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Infect Dis Rep.* *4*, 400-410.
- Cheung, A.L. and Zhang, G. (2002). Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. *Front Biosci.* *7*, d1825-d1842.
- Cheung, A.L., Eberhardt, K., and Heinrichs, J.H. (1997). Regulation of protein A synthesis by the sar and agr loci of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *65*, 2243-2249.
- Cheung, A.L., Koomey, J.M., Butler, C.A., Projan, S.J., and Fischetti, V.A. (1992). Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 6462-6466.
- Chien, Y. and Cheung, A.L. (1998). Molecular interactions between two global regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* *273*, 2645-2652.
- Chien, Y., Manna, A.C., and Cheung, A.L. (1998). SarA level is a determinant of *agr* activation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *30*, 991-1001.
- Clarke, S.R., Wiltshire, M.D., and Foster, S.J. (2004). IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. *Mol. Microbiol.* *51*, 1509-1519.
- Cook, H.A., Furuya, E.Y., Larson, E., Vasquez, G., and Lowy, F.D. (2007). Heterosexual transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* *44*, 410-413.
- Daum, R.S., Ito, T., Hiramatsu, K., Hussain, F., Mongkolrattanothai, K., Jamklang, M., and Boyle-Vavra, S. (2002). A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis* *186*, 1344-1347.
- De Kimpe, S.J., Kengatharan, M., Thiemermann, C., and Vane, J.R. (1995). The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 10359-10363.

- Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D., and Projan, S.J. (2001). Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J. Bacteriol.* *183*, 7341-7353.
- Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R., and Bohach, G.A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.* *67*, 4673-4678.
- Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993; *6*:428-42.
- Flock, M. and Flock, J.I. (2001). Rebinding of Extracellular Adherence Protein Eap to *Staphylococcus aureus* Can Occur through a Surface-Bound Neutral Phosphatase. *J. Bacteriol.* *183*, 3999-4003.
- Foster, T.J. and Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* *6*, 484-488.
- Geisinger, E., Adhikari, R.P., Jin, R., Ross, H.F., and Novick, R.P. (2006). Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol. Microbiol.* *61*, 1038-1048.
- Gentilhomme, E., Faure, M., Piemont, Y., Binder, P., and Thivolet, J. (1990). Action of staphylococcal exfoliative toxins on epidermal cell cultures and organotypic skin. *J. Dermatol.* *17*, 526-532.
- Giraud, A.T., Mansilla, C., Chan, A., Raspanti, C., and Nagel, R. (2003). Studies on the expression of regulatory locus sae in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* *46*, 246-250.
- Giraud, A.T., Calzolari, A., Cataldi, A.A., Bogni, C., and Nagel, R. (1999). The sae locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol. Lett.* *177*, 15-22.
- Giraud, A.T., Raspanti, C.G., Calzolari, A., and Nagel, R. (1994). Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can. J. Microbiol.* *40*, 677-681.
- Goerke, C., Fluckiger, U., Steinhuber, A., Zimmerli, W., and Wolz, C. (2001). Impact of the regulatory loci agr, sarA and sae of *Staphylococcus aureus* on the induction of alpha-toxin during device-related infection resolved by direct quantitative transcript analysis. *Mol. Microbiol.* *40*, 1439-1447.
- Haggar, A., Hussain, M., Lonnie, H., Herrmann, M., Norrby-Teglund, A., and Flock, J.I. (2003). Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect. Immun.* *71*, 2310-2317.
- Halle, E., Berlin, JolantaMajcher-Petzynska und Bernd Dreslow (2002). Linezolid: das erste Antibiotikum aus der Klasse der Oxazolidinone. *Chemotherapie Journal* 2002, Heft *1*; 11:1-11
- Harraghy, N., Kormanec, J., Wolz, C., Homerova, D., Goerke, C., Ohlsen, K., Qazi, S., Hill, P., and Herrmann, M. (2005). sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology* *151*, 1789-1800.

- Harraghy, N., Hussain, M., Hagggar, A., Chavakis, T., Sinha, B., Herrmann, M., and Flock, J.I. (2003). The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* *149*, 2701-2707.
- Harris, T.O., Grossman, D., Kappler, J.W., Marrack, P., Rich, R.R., and Betley, M.J. (1993). Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect. Immun.* *61*, 3175-3183.
- Heinrichs, J.H., Bayer, M.G., and Cheung, A.L. (1996). Characterization of the sar locus and its interaction with agr in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *178*, 418-423.
- Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., and Parkhill, J. (2004). Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 9786-9791.
- Horsburgh, M.J., Aish, J.L., White, I.J., Shaw, L., Lithgow, J.K., and Foster, S.J. (2002). sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J. Bacteriol.* *184*, 5457-5467.
- Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C., Benito, Y., Geissmann, T., Namane, A., Lina, G., Etienne, J., Ehresmann, B., Ehresmann, C., Jacquier, A., Vandenesch, F., and Romby, P. (2005). *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *EMBO J.* *24*, 824-835.
- Hussain, M., Hagggar, A., Heilmann, C., Peters, G., Flock, J.I., and Herrmann, M. (2002). Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun.* *70*, 2933-2940.
- Hussain, M., Becker, K., von Eiff, C., Peters, G., and Herrmann, M. (2001). Analogs of the extracellular adherence protein (Eap) are conserved and prevalent in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* *8*, 1271-1276.
- Johnston, C.P., Cooper, L., Ruby, W., Carroll, K.C., Cosgrove, S.E., and Perl, T.M. (2006). Epidemiology of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections among healthcare workers in an outpatient clinic. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* *27*, 1133-1136.
- Jonsson, K., McDevitt, D., McGavin, M.H., Patti, J.M., and Hook, M. (1995). *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. *J. Biol. Chem.* *270*, 21457-21460.
- Kermanshahi, R.K. and Sailani, M.R. (2005). Effect of static electric field treatment on multiple antibiotic-resistant pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* *38*, 394-398.

- Kessler, C.M., Nussbaum, E., and Tuazon, C.J. (1991). Disseminated intravascular coagulation associated with *Staphylococcus aureus* septicemia is mediated by peptidoglycan- induced platelet aggregation. *J. Infect. Dis.* *164*, 101-107.
- Kreikemeyer, B., McDevitt, D., and Podbielski, A. (2002). The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. *Int. J. Med. Microbiol.* *292*, 283-295.
- Kreiswirth, B.N., Lofdahl, S., Betley, M.J., O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., and Novick, R.P. (1983). The toxic shock exotoxin structural gene is not detachably transmitted by a prophage. *Nature* *305*, 709-712.
- Ladhani, S., Poston, S.M., Joannou, C.L., and Evans, R.W. (1999). Staphylococcal scalded skin syndrome: exfoliative toxin A (ETA) induces serine protease activity when combined with A431 cells. *Acta Paediatr.* *88*, 776-779.
- Lee, L.Y., Miyamoto, Y.J., McIntyre, B.W., Hook, M., McCrea, K.W., McDevitt, D., and Brown, E.L. (2002). The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J. Clin. Invest* *110*, 1461-1471.
- Lee, J.C. (1996). The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* *4*, 162-166.
- Liang, X., Yu, C., Sun, J., Liu, H., Landwehr, C., Holmes, D., and Ji, Y. (2006). Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *74*, 4655-4665.
- Manna, A.C., Bayer, M.G., and Cheung, A.L. (1998). Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *180*, 3828-3836.
- Marrack P., Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990; 248:705-11 [Erratum, *Science* 1990; 248 : 705-11]
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H., and Schneewind, O. (1999). *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* *285*, 760-763.
- McGavin, M.H., Krajewska Pietrasik, D., Rydén, C., and Höök, M. (1993). Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix- binding protein with broad specificity. *Infect. Immun.* *61*, 2479-2485.
- Miller, M., Cespedes, C., Bhat, M., Vavagiakis, P., Klein, R.S., and Lowy, F.D. (2007). Incidence and persistence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in a community sample of HIV-infected and -uninfected drug users. *Clin. Infect. Dis.* *45*, 343-346.
- Moreno, F., Crisp, C., Jorgensen, J.H., and Patterson, J.E. (1995). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. *Clin. Infect. Dis.* *21*, 1308-1312.
- Navarre, W.W. and Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *63*, 174-229.
- Noble, W.C., Valkenburg, H.A., and Wolters, C.H. (1967). Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J. Hyg. (Lond)* *65*, 567-573.

- Novick, R.P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* *48*, 1429-1449.
- Novick, R.P. and Jiang, D. (2003). The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology* *149*, 2709-2717.
- Ogawa, S.K., Yurberg, E.R., Hatcher, V.B., Levitt, M.A., and Lowy, F.D. (1985). Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* *50*, 218-224.
- Ohlsen, K., Koller, K.P., and Hacker, J. (1997). Analysis of expression of the alpha-toxin gene (hla) of *Staphylococcus aureus* by using a chromosomally encoded hla::lacZ gene fusion. *Infect. Immun.* *65*, 3606-3614.
- Panlilio A, Culver DH, Gaynes RP, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; *13*:582-6
- Palma, M., Shannon, O., Quezada, H.C., Berg, A., and Flock, J.I. (2001). Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain. *J. Biol. Chem.* *276*, 31691-31697.
- Palma, M., Hagggar, A., and Flock, J.I. (1999). Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J. Bacteriol.* *181*, 2840-2845.
- Patti, J.M. and Höök, M. (1994). Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* *6*, 752-758.
- Proctor, R.A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J.N., and Arbeit, R.D. (1995). Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* *20*, 95-102.
- Projan, S.J. and Novick, R.P. (1997). The molecular basis of pathogenicity. In *The Staphylococci in Human Disease*, K.Crossley and G.L.Archer, eds. (New York: Churchill Livingstone), pp. 55-82.
- Qazi, S.N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C.E., Cockayne, A., Winzer, K., Chan, W.C., Williams, P., and Hill, P.J. (2001). agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect. Immun.* *69*, 7074-7082.
- Rampone, H., Martinez, G.L., Giraudo, A.T., Calzolari, A., and Nagel, R. (1996). In vivo expression of exoprotein synthesis with a Sae mutant of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Vet. Res.* *60*, 237-240.
- Regassa, L.B., Novick, R.P., and Betley, M.J. (1992). Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* *60*, 3381-3388.
- Regassa, L.B., Couch, J.L., and Betley, M.J. (1991). Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (agr) and by glucose. *Infect. Immun.* *59*, 955-962.
- Rice, K.C., Nelson, J.B., Patton, T.G., Yang, S.J., and Bayles, K.W. (2005). Acetic acid induces expression of the *Staphylococcus aureus* cidABC and IrgAB murein hydrolase regulator operons. *J. Bacteriol.* *187*, 813-821.

- Sanford, M.D., Widmer, A.F., Bale, M.J., Jones, R.N., and Wenzel, R.P. (1994). Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* *19*, 1123-1128.
- Saravia-Otten, P., Muller, H.P., and Arvidson, S. (1997). Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism. *J. Bacteriol.* *179*, 5259-5263.
- Sinha, B., Francois, P.P., Nusse, O., Foti, M., Hartford, O.M., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P., Herrmann, M., and Krause, K.H. (1999). Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. *Cell Microbiol.* *1*, 101-117.
- Somerville, G.A., Said-Salim, B., Wickman, J.M., Raffel, S.J., Kreiswirth, B.N., and Musser, J.M. (2003). Correlation of acetate catabolism and growth yield in *Staphylococcus aureus*: implications for host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* *71*, 4724-4732.
- Somerville, G.A., Chaussee, M.S., Morgan, C.I., Fitzgerald, J.R., Dorward, D.W., Reitzer, L.J., and Musser, J.M. (2002). *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival. *Infect. Immun.* *70*, 6373-6382.
- Spika, J.S., Peterson, P.K., Wilkinson, B.J., Hammerschmidt, D.E., Verbrugh, H.A., Verhoef, J., and Quie, P.G. (1982). Role of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* in leukopenia, thrombocytopenia, and complement activation associated with bacteremia. *J. Infect. Dis.* *146*, 227-234.
- Steinhuber, A., Goerke, C., Bayer, M.G., Doring, G., and Wolz, C. (2003). Molecular architecture of the regulatory Locus sae of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* *185*, 6278-6286.
- Stemper, M.E., Brady, J.M., Qutaishat, S.S., Borlaug, G., Reed, J., Reed, K.D., and Shukla, S.K. (2006). Shift in *Staphylococcus aureus* clone linked to an infected tattoo. *Emerg. Infect. Dis.* *12*, 1444-1446.
- Venugopalan, V. and Martin, C.A. (2007). Selecting anti-infective agents for the treatment of bone infections: new anti-infective agents and chronic suppressive therapy. *Orthopedics* *30*, 832-834.
- Vesga, O., Groeschel, M.C., Otten, M.F., Brar, D.W., Vann, J.M., and Proctor, R.A. (1996). *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J. Infect. Dis.* *173*, 739-742.
- Walev, I., Palmer, M., Valeva, A., Weller, U., and Bhakdi, S. (1995). Binding, oligomerization, and pore formation by streptolysin O in erythrocytes and fibroblast membranes: detection of nonlytic polymers. *Infect. Immun.* *63*, 1188-1194.
- Weinrick, B., Dunman, P.M., McAleese, F., Murphy, E., Projan, S.J., Fang, Y., and Novick, R.P. (2004). Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *186*, 8407-8423.

Wolz, C., Pohlmann-Dietze, P., Steinhuber, A., Chien, Y.T., Manna, A., Van Wamel, W., and Cheung, A. (2000). Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus *sar* in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *36*, 230-243.

Yarwood, J.M., Bartels, D.J., Volper, E.M., and Greenberg, E.P. (2004). Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* *186*, 1838-1850.

Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Paustian, M.L., Kapur, V., and Schlievert, P.M. (2002). Repression of the *Staphylococcus aureus* Accessory Gene Regulator in Serum and In Vivo. *The Journal of Bacteriology* *184*, 1095-1101.

Yarwood, J.M., McCormick, J.K., and Schlievert, P.M. (2001). Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *183*, 1113-1123.

8 Publikationen

- I. Teile dieser Arbeit wurden auf einem gemeinsamen Vortrag des Instituts der Mikrobiologie Homburg / Uni Saarbrücken und dem Institut der Mikrobiologie der Uni Genf vorgestellt: „Einfluss verschiedener Nährmedien auf die Expression der Adhäsionsproteine Eap und Emp“ Genf, 17.01. – 18.01.2008

- II. Harraghy, N., Gross, M., Kawasaki, N., Fournier, B., Herrmann, M. (2008). Identification of the *arlRS* regulatory system as a new regulator of the *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein (Eap). Manuskript in Vorbereitung.

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Mathias Herrmann, danke ich besonders für die freundliche Überlassung des Themas und für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien. Mein besonderer Dank gilt Professor Herrmann aber auch für viel Zeit und Aufmerksamkeit, die ich – auch über die eigentliche Dissertation hinaus - im Rahmen der mikrobiologischen und infektiologischen Anteile meiner Ausbildung während der letzten Jahre von ihm erhalten habe.

Niamh Harraghy, PhD, war über die gesamte Zeitdauer der Erstellung die unmittelbare Betreuerin dieser Arbeit; von ihr habe ich unendlich viele Anregungen, Hinweise und Ratschläge erhalten, und ihr bin ich dafür ganz besonders dankbar. Sie hatte es mit mir und meiner Co-Doktorandin Myriam Gross (der ich an dieser Stelle auch ‚danke‘ sage) nicht immer leicht. Trotz meiner manchmal auch impulsiven Art hat sie nie die Geduld verloren und unbeirrt weitergemacht. Ohne ihre so ausgeprägte Geduld wäre diese Arbeit möglicherweise nicht zum Abschluss gekommen.

Mit ganz besonderem Dank erwähnen möchte ich Karin Hilgert, MTA. Ich fürchte, dass ohne Karins kontinuierliche und wohlwollende Unterstützung (nicht nur auf Laborebene) vieles sehr viel schwieriger geworden wäre. Aber auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen aus dem Forschungsteam der Medizinischen Mikrobiologie, die immer wieder bereit waren zu Hilfestellungen, möchte ich ein ganz herzliches ‚danke‘ sagen. Ich habe mich im Labor und in dem gesamten dazugehörigen Team mehr als nur wohl und gut aufgehoben gefühlt, und es fällt mir daher auch nicht leicht meine Arbeit dort zu beenden, im Wissen, die mir lieb gewonnenen Menschen jetzt nur noch selten zu sehen.

Schließlich möchte ich mich auch bei Frau Ebel und dem restlichen Team des Sekretariats bedanken. Auch dort hatte man immer ein offenes Ohr für mich, was immer gut für die – hin und wieder auch einmal demotivierte - Seele war.

Vielen Dank an Mathias Hattermann für das Korrekturlesen.
DANKE an einfach alle Menschen, die mich während der letzten Jahre begleitet und unterstützt haben.

Curriculum vitae



First name Nina

Name Kawasaki

Since October 2002 Medical Student at the University of the Saarland

2001-2002 Humanities Studies (Major: Pedagogies; Minor: Law, Psychiatry)

1998-2001 Final school Examination in Pirmasens high school

1996-1998 High school in Rodalben

1995-1996 Practise at the International Bund (IB) in Pirmasens

1989-1995 High school in Pirmasens

1988-1989 Primary school in Pirmasens

1985-1988 Primary school in Kaarst

Pirmasens, September 2008 Nina Kawasaki