

Aus dem Bereich  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
Fachrichtung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchungen zur Wirkung von Hämin auf die Aktivität  
der Hämolytase in *Staphylococcus aureus***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2011

vorgelegt von  
Dipl.-Chem. Julia Schmitt  
geb. am: 08.11.1982 in Lahnstein



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2007 bis November 2010 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Mathias Herrmann im Fachbereich medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität des Saarlandes, Standort Uniklinik Homburg, angefertigt.

*Für meine Eltern*

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	<i>adde</i> (hinzufügen, auffüllen bis)
Agr	<i>accessory gene regulator</i>
AIP	<i>autoinducing peptide</i> (autoinduzierendes Peptid)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Arl	<i>autolysis-related locus</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B	2,2'-Bipyridin
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BI	Bandenintensität
BSA	bovines Serumalbumin
CA	<i>community-acquired</i> (in der Bevölkerung erworben)
Cap	<i>capsular polysaccharide</i> (Polysaccharidkapsel-bildendes Protein)
CAS	<i>casamino acids</i> (Caseinhydrolysat)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
ClfA, B	<i>clumping factor A, B</i> (Verklumpungsfaktor A, B)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cna	<i>collagen-binding protein</i> (Kollagen-bindendes Protein)
Coa	<i>coagulase</i> (Koagulase)
CT-Wert	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert-Zyklus)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
Eap	<i>extracellular adherence protein</i> (extrazelluläres Adhärenzprotein)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verbesserte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Efb	<i>extracellular fibrinogen-binding protein</i> (extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
Emp	<i>extracellular matrix binding protein</i> (extrazelluläres Matrix-bindendes Protein)
Endkonz.	Endkonzentration

---

ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FnBPA, B	<i>fibronectin-binding protein A, B</i> (Fibronectin-bindendes Protein A, B)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie für Proteine)
Fur	<i>ferric uptake regulator</i>
gDNA	genomische DNA
g WF	gepoolte Wundflüssigkeit
GyrB	DNA Gyrase, B-Untereinheit
H	Hämin
HA	<i>hospital-acquired</i> (nosokomial)
Hg	Hämoglobin
Hla	$\alpha$ -Hämolysin
Hlb	$\beta$ -Hämolysin
Hld	$\delta$ -Hämolysin
HlgA	S-Klassen-Komponente des $\gamma$ -Hämolysins
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HrtA	<i>heme-regulated transporter ATPase</i>
HrtAB	<i>heme regulated transport system</i>
HssRS	<i>heme-sensor system</i>
Hts	<i>heme transport system</i>
Isd	<i>iron-regulated surface determinant system</i>
K	Kontrolle
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i> (Limulus-Amöbocyten-Lysat)
LB	Luria Bertani-Broth
LD	<i>loading dye</i> (Ladepuffer)
LPXTG	LeuProXThrGly Motiv
MCD	Magnetocirculardichroismus
MH	Müller-Hinton
MHC II-Komplex	Haupthistokompatibilitäts-Komplex der Klasse II
MHK	minimale Hemmkonzentration
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	<i>microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule</i>
n. K.	negative Kontrolle
OD	optische Dichte
P	Protoporphyrin
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PFGE	“pulsed field“ Gelelektrophorese
PIA	<i>polysaccharide intercellular adhesin</i> (interzelluläres Polysaccharid-Adhäsion)
PNAG	Poly-N-Acetylglukosamin
PPIX	Protoporphyrin IX
PVL	<i>Panton-Valentine leukocidin</i> (Panton-Valentine Leukozidin)
RAP	<i>RNAIII-activating protein</i> (RNAIII aktivierendes Protein)
(m)RNA	( <i>messenger</i> , Boten-) Ribonukleinsäure
Rot	<i>repressor of toxin</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Serum
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sae	<i>SA exoprotein expression</i>
Sar	<i>staphylococcal accessory regulator</i>
Sbi	<i>staphylococcal IgG binding protein</i>
SCV	<i>small-colony variant</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERAM	<i>secretable expanded repertoire adhesive molecule</i>
SigB, $\sigma^B$	<i>sigma factor B</i> (Sigmafaktor B)
Srr	<i>staphylococcal respiratory response</i>
SrtA	<i>transpeptidase sortase A</i> (Transpeptidase Sortase A)
T	Tween20
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
TSST-1	<i>toxic shock syndrome toxin-1</i> (Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin 1)
U	Unit
u. N.	unterhalb der Nachweisgrenze
UV	ultraviolett
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	2
1 Einleitung .....	3
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
1.2 Virulenzfaktoren von SA.....	4
1.2.1 Adhäsionsfaktoren.....	4
1.2.2 Exotoxine .....	6
1.2.3 Superantigene.....	7
1.3 Regulationsmechanismen der Virulenzfaktoren.....	7
1.3.1 Zweikomponenten-Systeme .....	8
1.3.2 Weitere Regulationsmechanismen .....	9
1.3.3 Vernetzung der Regulatoren.....	9
1.4 Eisenmetabolismus von SA.....	11
1.4.1 Regulator Fur .....	11
1.4.2 Siderophore.....	12
1.4.3 Häm-Aufnahme .....	12
2 Zielstellung.....	15
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Material .....	17
3.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....	17
3.1.2 Nährmedien der Bakterien.....	17
3.2 Methoden .....	18
3.2.1 Herstellung und Überprüfung von LS1 Mutanten.....	18
3.2.1.1 Genomische Manipulation durch Phagentransduktion.....	18
3.2.1.2 gDNA Extraktion.....	19
3.2.1.3 PCR .....	20
3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	21
3.2.1.5 "Pulsed field" Gelelektrophorese .....	22
3.2.2 Wachstumskurven.....	22
3.2.3 MHK-Bestimmung .....	23
3.2.4 Western Blot Analyse .....	23
3.2.4.1 Kultivierung und Ernte der Bakterien .....	23
3.2.4.2 SDS-PAGE.....	24

3.2.4.3	Blotten und Entwicklung .....	26
3.2.5	ELISA.....	27
3.2.5.1	Funktionsschema .....	27
3.2.5.2	Etablierung.....	28
3.2.5.3	Versuchsdurchführung .....	30
3.2.6	Proteine "spiken" .....	30
3.2.7	Eap-Isolierung aus SA Newman.....	31
3.2.8	Hämolyse-Test .....	32
3.2.9	Real-time PCR.....	32
3.2.9.1	Primer-Optimierung .....	33
3.2.9.2	Kultivierbedingungen und Probenvorbereitung.....	34
3.2.9.3	Statistische Auswertung .....	34
4	Ergebnisse .....	36
4.1	Auswirkungen der Eisenverfügbarkeit im Nährmedium auf LS1 .....	36
4.1.1	Veränderung der Hämolyserate.....	36
4.1.2	Veränderung der Expression der Hämolsine.....	37
4.1.3	Änderungen der Transkriptionsrate verschiedener Regulatoren .....	40
4.1.4	Veränderung der Expression von <i>sae</i> und den Hämolsinen in RPMI .....	44
4.2	Vergleich der Reaktion von LS1 und den Mutanten LS1 $\Delta$ <i>sae</i> und LS1 $\Delta$ <i>fur</i> auf Hämin-Zugabe .....	47
4.2.1	Herstellung der LS1 Mutanten.....	47
4.2.2	Untersuchung der Mutanten .....	48
4.2.2.1	Veränderung der Hämolyserate der Mutanten aufgrund der Eisenverfügbarkeit im Nährmedium.....	48
4.2.2.2	Veränderung der Expression von <i>sae</i> und den Hämolsinen in den Mutanten aufgrund der Eisenverfügbarkeit in LB.....	50
4.2.2.3	Veränderung der Expression von <i>sae</i> und den Hämolsinen durch Hämin- und Eisensulfat-Zugabe in RPMI und LB .....	53
4.2.2.4	Auswirkungen von Hämin auf das Wachstum.....	62
4.2.2.4.1	Wachstumskurven.....	62
4.2.2.4.2	MHK-Bestimmung .....	64
4.3	Vergleich des Hämin-Effekts auf transkriptioneller Ebene in verschiedenen SA Stämmen .....	64
4.4	Aktivitätsbestimmung des Sae-Regulators anhand eines repräsentativen Kontrollproteins .....	68
4.4.1	Auswirkungen der Eisenverfügbarkeit auf die Expression von Eap .....	68

4.4.2	Untersuchung der Eap-Expression nach Zugabe anderer Eisenquellen .....	71
4.4.3	Abhängigkeit der Eap-Expression von der Eisenverfügbarkeit in LS1 Mutanten .....	73
4.5	Vergleich der Auswirkungen von Hämin auf Newman und eine Newman Mutante .....	74
4.5.1	Eap-Expressionsdaten in Abhängigkeit von Hämin.....	74
4.5.2	Auswirkungen von Hämin auf das Wachstum.....	75
4.5.2.1	Wachstumskurven.....	75
4.5.2.2	MHK-Bestimmung .....	76
4.6	Testen von Wundisolaten auf Eap-Präsenz .....	77
4.6.1	Bestimmung des Tests mit der kleinsten Detektionsgrenze für Eap .....	77
4.6.2	Untersuchung der Wundisolate .....	79
5	Diskussion.....	81
5.1	Auswirkung der Eisenverfügbarkeit auf die Expression verschiedener Proteine.....	81
5.2	Regulationsmechanismen der Hämolyse.....	83
5.3	Abhängigkeit der Regulation vom Nährmedium und dem Zusatz verschiedener Eisenquellen .....	88
5.4	Toxischer Effekt von Hämin .....	92
5.5	Vergleich der Hämin-Wirkung auf verschiedene SA Stämme .....	94
5.6	Eap-Nachweis in Wundisolaten .....	95
5.7	Zusammenfassung und Ausblick .....	95
	Literaturverzeichnis .....	99
	Publikationen / Kongressbeiträge .....	107
	Danksagungen .....	109
	Lebenslauf.....	110

## Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* (SA) ist einer der wichtigsten nosokomialen Krankheitserreger, der durch zunehmende Antibiotikaresistenzen zu einer immer größeren Gefahr für die Bevölkerung wird. Ein kritischer und lebensnotwendiger Mechanismus für SA stellt während der Kolonisierung oder Infektion der streng regulierte Eisenmetabolismus dar. Die wichtigste Eisenquelle, Häm, eine Untereinheit von Hämoglobin, kann dabei über Hämolysin-vermittelte Lyse von Erythrozyten freigesetzt und mit speziellen membranassoziierten Transportproteinen in SA aufgenommen werden. Eine zu große intrazelluläre Konzentration an Häm hat allerdings aufgrund der hohen Reaktivität dieses Moleküls toxische Auswirkungen. Die Schutzmechanismen von SA vor einer Intoxikation durch Häm sind bis dato noch nicht vollständig aufgeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher eisenkonzentrationsabhängige Regulationsmechanismen untersucht, mit Schwerpunkt auf der von Häm-abhängigen Transkriptionskontrolle.

Es konnte von uns gezeigt werden, dass Überstände von SA Kulturen, die unter Eisenmangel angezogen wurden, die Hämolyse von Erythrozyten induzieren konnten, während eine Reduktion zu beobachten war, wenn die SA Kulturen mit Hämin (die oxidierte Form von Häm) inkubiert wurden. Anhand von Proteindaten konnten diese Unterschiede in der Hämolyse u. a. mit einer eisenabhängigen Expression des  $\alpha$ -Hämolysins begründet werden. Des Weiteren ergaben Analysen auf der Transkriptionsebene, dass die Hämolyse *hla* ( $\alpha$ -Hämolysin), *hlyB* ( $\beta$ -Hämolysin) und *hlyA* (S-Klassen-Komponente des  $\gamma$ -Hämolysins) abhängig von der verfügbaren Hämin-Konzentration in ihrer Transkription beeinflusst wurden. Dies bestätigte einen Einfluss der Eisenquelle Hämin auf der Transkriptionsebene. Daraufhin wurden verschiedene Regulationssysteme in Anwesenheit dieses Moleküls auf ihre Aktivität getestet. Das wichtigste System scheint nach den hier vorliegenden Daten der regulatorische Locus *sae* zu sein. Untersuchungen mit einer *sae* Mutante konnten diese Hypothese weiter bestärken, da in diesem Stamm im Vergleich zum WT keine Auswirkungen von Hämin auf die Transkription der Hämolyse mehr ermittelt werden konnten. Des Weiteren scheint der durch Hämin ausgelöste Effekt auf spezifische Weise zu verlaufen. Untersuchungen zur Expression des extrazellulären Adhärenzproteins Eap, das als Indikator für die Aktivität des Sae-Regulatorsystems verwendet wurde, ergaben, dass andere Eisenquellen keine vergleichbaren Effekte auslösen konnten.

Eine abschließende Studie mit verschiedenen SA Stämmen zeigte weiterhin, dass Hämin in allen untersuchten Stämmen die Regulation der Transkription der Hämolyse auf vergleichbare Weise beeinflussen konnte.

## Summary

*Staphylococcus aureus* (SA) is one of the leading nosocomial pathogens and a major risk factor for human health due to its increasing antibiotic resistance. One critical and vital mechanism for the bacterium is the acquisition of iron during colonization or infection. The most important iron source for this microorganism in human is heme, a subunit of hemoglobin, which is released by hemolysin-mediated lysis of erythrocytes and transported via special membrane-associated transport proteins into the bacterial cell. However, since large intracellular concentrations of heme are known to lead to intoxication because of the high reactivity of this molecule, SA needs to tightly control the production and activation of its hemolytic enzymes. Because this mechanism is not yet fully understood, we wanted to address the question, whether and how the transcription, production and activities of hemolytic enzymes of SA are modulated by the presence and absence of iron in form of heme.

The present work shows that SA excretes an increased amount of hemolytic enzymes under iron-limiting conditions, while the addition of hemin (the oxidized form of heme) to a culture of SA grown under iron-rich conditions resulted in a clearly reduced hemolytic activity of the supernatant. These differences in the rates of lysis were, at least in part, due to the iron-dependent expression of  $\alpha$ -hemolysin. Further investigations showed that the transcription of nearly all hemolysin genes of SA, *i.e.* *hla* ( $\alpha$ -hemolysin), *hlb* ( $\beta$ -hemolysin) and *hlgA* (S-class-component of the  $\gamma$ -hemolysin), were regulated in a hemin-dependent manner. In order to identify the regulatory molecules that were responsible for the aforementioned phenomena, the activities of different regulatory systems were assayed in the presence of this molecule. Our data suggest that the most important regulator for the hemolysin production in response to iron-limitation and heme availability seems to be the two-component regulatory system Sae. These observations were supported by a *sae* mutant strain, which did not show any changes in the transcriptional rates of hemolysins in response to hemin. The hemin-mediated effect seemed to be specific, since the expression of the extracellular adherence protein Eap, which was used as an indicator for the activity of the Sae system, did not reveal any comparable changes in expression if other iron sources were added.

A consecutive study of different SA strains demonstrated that the hemin-dependent repression of hemolysin transcription was comparable in all strains tested, suggesting that this regulatory mechanism seems to be valid for a great range of SA isolates.

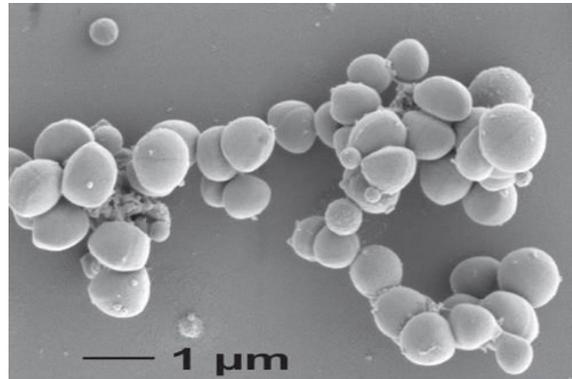
# 1 Einleitung

## 1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (SA) ist eine der Hauptursachen für nosokomiale (HA, hospital-acquired) und in der Bevölkerung erworbene (CA, community-acquired) Infektionen<sup>[19]</sup>, die sich zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie z. B. Endokarditis, Osteomyelitis, Sepsis und Lungenentzündung entwickeln können<sup>[64]</sup>. Auf der anderen Seite sind bis zu 30% der Bevölkerung ständig mit diesem Erreger kolonisiert, ohne dass es zu einer Infektion kommt<sup>[105]</sup>. In diesem Fall wird meistens die Nase, aber auch der Rachen, die Achselhöhle, die Vagina oder die Hautoberfläche von SA besiedelt<sup>[11]</sup>. Kolonisierte Menschen besitzen allerdings ein erhöhtes Infektionsrisiko, da SA in angrenzende Gewebe oder den Blutkreislauf gelangen und sich somit im Wirt ausbreiten kann. Dies wird durch Verletzungen der Haut oder ein durch andere Erkrankungen bereits geschwächtes Immunsystem zusätzlich begünstigt<sup>[52, 64]</sup>. Für Patienten in Krankenhäusern besteht ebenfalls eine größere Gefahr, da diese meist schon durch andere Erkrankungen geschwächt sind oder Katheter bzw. andere körperfremde Implantate tragen, die kontaminiert sein könnten und damit ein Infektionsrisiko darstellen<sup>[63, 64]</sup>. Krankenhausangestellte können dabei zusätzlich zur Übertragung der Keime zwischen den Patienten beitragen. Ein noch viel größeres Problem stellen zunehmende Resistenzen von SA gegenüber Antibiotika dar. Eine Gruppe dieser resistenten Stämme, die sogenannten MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*), sind heute für etwa 50% der SA Infektionen in Krankenhäusern verantwortlich und haben eine hohe Mortalitätsrate<sup>[20, 51]</sup>.

SA ist ein grampositives Bakterium mit einer Größe von etwa 1 µm. Es kann traubenförmige Cluster bilden und besitzt eine goldene Farbe, wenn es auf Agarplatten kultiviert wird<sup>[81]</sup> (Abb. 1-1). Diese zwei Eigenschaften trugen zur Namensgebung dieses Organismus bei ("staphyle" ist aus dem Griechischen übersetzt "Weintraube", "aureus" ist Latein und heißt "golden")<sup>[106]</sup>. SA sind unbewegliche, nicht sporenbildende und fakultativ anaerob wachsende Bakterien, die erst kürzlich der Familie der *Staphylococcaceae* zugeordnet wurden<sup>[60]</sup>. SA besitzt ein etwa 2800 - 2900 Kilobasenpaar umfassendes, ringförmiges Chromosom, das neben einem festen Kerngenom auch variable Bereiche wie Pathogenitätsinseln, Prophagen, Plasmide und Transposons besitzt<sup>[33, 63, 81]</sup>. Die Zellwand ist eine dynamische Struktur und besteht aus drei verschiedenen Komponenten. Peptidoglykan formt dabei ein makromolekulares, verzweigtes Netzwerk, das den größten Teil der Zellwand ausmacht. Die in die Zellwand integrierte Teichonsäure trägt zur negativen Gesamtladung der Oberfläche bei, die eine große Rolle bei der Immunabwehr und der Ionenakquisition spielt. Die Zellwand von SA wird durch kovalent gebundene Oberflächenproteine komplettiert<sup>[81]</sup>. Viele SA

produzieren zusätzlich noch eine Kapsel, die die äußere Hülle der Bakterien bildet. Sie besteht aus Polysacchariden und bietet einen gewissen Schutz vor der Phagozytose durch Zellen des Immunsystems<sup>[28]</sup>.



**Abb. 1-1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Staphylococcus aureus*<sup>[92]</sup>.**

Eine phänotypische Variante von SA stellen die sogenannten SCVs (small-colony variants) dar. Diese besitzen einen verlangsamteten Metabolismus und können über längere Zeit in wirtseigenen Zellen persistieren. Dort sind sie vor Chemotherapeutika und dem Immunsystem geschützt. Ein weiterer Vorteil besteht in einer größeren Resistenz gegenüber Antibiotika und Defensinen<sup>[13, 84, 85]</sup>.

Neben den Antibiotikaresistenzen spielen sogenannte Virulenzfaktoren bei der Kolonisierung sowie der Initiierung einer Infektion eine entscheidende Rolle<sup>[39]</sup>.

## 1.2 Virulenzfaktoren von SA

Die Virulenz von SA ist in der Expression einer ganzen Reihe verschiedener Virulenzfaktoren begründet. Diese können an verschiedenen wichtigen Eigenschaften von SA wie z. B. der Adhäsion und Invasion in Wirtszellen oder deren Abbau, dem Schutz vor der Immunantwort oder der Akquirierung bestimmter Wirtsfaktoren als Nahrungsquelle beteiligt sein<sup>[39]</sup>. Die Virulenzfaktoren lassen sich in die drei folgenden Gruppen unterteilen.

### 1.2.1 Adhäsionsfaktoren

Zu den Adhäsionsfaktoren gehört auch die Gruppe der MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). Diese Oberflächenproteine sind zumeist kovalent an Zellwandproteine gebunden, können die Verbindung zwischen SA und dem Wirt herstellen und somit die Besiedelung des Wirtes initiieren<sup>[27, 32]</sup>. Die wichtigsten

Vertreter dieser Gruppe sind die Fibronectin-bindenden Proteine FnBPA und FnBPB (fibronectin-binding protein A, B), die Verklumpungsfaktoren ClfA und ClfB (clumping factor A, B), das Kollagen-bindende Protein Cna (collagen-binding protein) und Protein A. Die MSCRAMMs haben neben ihren Bindungseigenschaften zu wirtseigenen Strukturen ebenfalls strukturelle Gemeinsamkeiten. Sie besitzen das sogenannte LeuProXThrGly (LPXTG) Motiv. Durch die Sortase katalysierte Spaltung dieser konservierten Signaldomäne können die Proteine in die Zellwand eingebaut werden<sup>[15]</sup>.

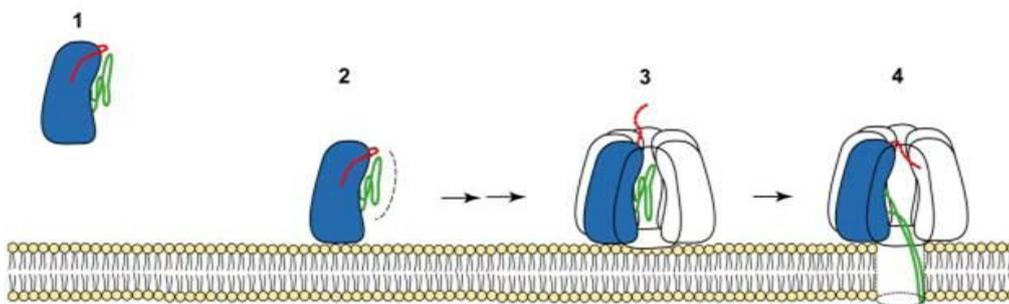
Eine weitere Gruppe von Proteinen ist ebenfalls an der Adhäsion der Bakterien an Wirtskomponenten beteiligt. Dies sind die SERAMs (secretable expanded repertoire adhesive molecules). Sie unterscheiden sich von den MSCRAMMs durch das Fehlen des LPXTG Motivs. Die wichtigsten Vertreter dieser Proteingruppe sind Eap (extracellular adherence protein), Emp (extracellular matrix binding protein) und Efb (extracellular fibrinogen-binding protein)<sup>[38]</sup>. Sie teilen keine strukturellen dafür aber funktionale Eigenschaften wie z. B. die Adhäsion und Modulation des Immunsystems während einer Infektion.

Eap ist ein sehr wichtiger und vielfältiger Virulenzfaktor, der in allen bisher getesteten SA Isolaten zu finden ist<sup>[43]</sup>. Dieses Adhärenzprotein kann neben vielen Faktoren der extrazellulären Matrix, wie z. B. Vitronectin, Fibronectin und Fibrinogen, auch an sich selbst sowie an die bakterielle Zellwand binden<sup>[77]</sup>. Des Weiteren kann Eap zur Internalisierung von SA in Endothelzellen beitragen<sup>[34]</sup> und die Angiogenese hemmen<sup>[95]</sup>. Es sind auch Wechselwirkungen mit dem Immunsystem beobachtet worden. Eap hat beispielsweise negative Auswirkungen auf die Leukozytenadhäsion, die Granulozytenrekrutierung und die T-Zellproliferation<sup>[14, 35, 58]</sup>.

Die MSCRAMMs und SERAMs können den ersten Kontakt zwischen SA und dem Wirt herstellen und somit die Kolonisierung starten. Anschließend kann SA den sogenannten Biofilm bilden. Biofilm ist eine komplexe Bakterienpopulation, die auf und in einer selbstproduzierten Matrix wachsen. Diese Matrix besteht häufig aus PNAG (Poly-N-Acetylglukosamin), dies wird in der Literatur auch als PIA (polysaccharide intercellular adhesin) bezeichnet, und beinhaltet zusätzlich Proteine und DNA<sup>[7, 8, 66]</sup>. Die Zellen, die in diesem dichten Geflecht eingebettet sind, sind dort insbesondere vor antimikrobiellen Therapeutika sowie dem Immunsystem geschützt. Dies kann dazu führen, dass es bei einer von SA ausgelösten Infektion zu einer verzögerten Heilung aufgrund der Biofilmbildung kommt<sup>[44, 81]</sup>.

### 1.2.2 Exotoxine

Eine wichtige Eigenschaft von SA ist die Produktion und Sekretion von Toxinen, die Wirtszellen schädigen können. Zu diesen zytolytischen Toxinen gehören u. a. die Hämolsine ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Hämolsin) sowie die Leukozidine [u. a. LukF, LukS (LukF bzw. S Komponente des Leukozidins) und PVL (Panton-Valentine leukocidin)]<sup>[50]</sup>. Das  $\alpha$ -Hämolsin formt in eukaryotischen Membranen zylindrische Heptamere und kann dadurch Poren bilden, die zur osmotischen Lyse der Zelle, meist Erythrozyten, führt<sup>[70, 103, 107]</sup>. Das  $\beta$ -Hämolsin, auch Sphingomyelinase C genannt, ist für Erythrozyten und Monozyten zytotoxisch. Des Weiteren inhibiert dieses Protein die Migration von Granulozyten und besitzt damit ein anti-inflammatorisches Potential<sup>[98]</sup>. Der genaue Wirkmechanismus ist bisher noch nicht eindeutig aufgeklärt, liegt aber vermutlich in der initialen Spaltung von in der Plasmamembran integriertem Sphingomyelin begründet<sup>[41]</sup>. Das  $\gamma$ -Hämolsin ist, ähnlich der Leukozidine, ein Zweikomponenten-Hämolsin, das vor allem Leukozyten lysiert. Dies verläuft ähnlich dem  $\alpha$ -Hämolsin durch Oligomerisierung an der Zelloberfläche der Zielzelle und anschließender Porenbildung<sup>[83]</sup>. PVL, das wichtigste von SA produzierte Leukozidin, ist ebenfalls ein Zweikomponenten-Zytolysin, das Leukozyten lysieren kann<sup>[81]</sup>. Der Wirkmechanismus ist denen der Hämolsine sehr ähnlich. Zunächst binden die einzelnen PVL-Untereinheiten an die Zelloberfläche und oligomerisieren zu einem Heterotetramer, wobei die beiden verschiedenen Komponenten alternierend angeordnet sind. Nach Anlagerung eines weiteren Heterotetramers zu einem Oktatetramer und einer anschließenden Konformationsänderung bildet sich eine transmembranständige Pore. Diese ermöglicht das Einströmen von Kalziumionen und führt zum Zelltod<sup>[1]</sup>. Die Porenbildung ist in Abb. 1-2 am Beispiel des  $\alpha$ -Hämolsins schematisch dargestellt.



**Abb. 1-2 Schematischer Mechanismus der Porenbildung am Beispiel des  $\alpha$ -Hämolsins.** (1) wasserlösliches H<sub>1a</sub>-Monomer, (2) Bindung an Membran einer Wirtszelle, (3) Bildung einer heptameren Vorläuferpore durch Oligomerisierung, (4) Konformationsänderung zur funktionalen Pore (verändert nach Vorlage von<sup>[45]</sup>).

### 1.2.3 Superantigene

Die dritte Gruppe der Virulenzfaktoren bilden die Superantigene. Die Sekretion dieser Toxine ins extrazelluläre Milieu führt zu einer massiven Zytokinausschüttung, die eine normale Immunantwort des Wirts auf die Superantigene bzw. SA verhindert. T-Zellen können nicht mehr proliferieren und als Konsequenz können auch keine Antikörper mehr gebildet werden. Dies führt zu einer Schwächung des Immunsystems und erleichtert SA die weitere Ausbreitung<sup>[28, 81]</sup>. Die Induktion dieser übermäßigen Immunantwort ist in der Bindung der Superantigene an die Außenseite der MHC II-Komplexe (Haupthistokompatibilitätskomplex) der antigen-präsentierenden Zellen begründet. Daraufhin folgt eine Verknüpfung zu dem T-Zellrezeptor der T-Helferzelle. Diese Bindung erfolgt, ohne dass ein für den T-Zellrezeptor spezifisches Antigen durch MHC II präsentiert wird. Dadurch wird eine sehr große Zahl an T-Zellen aktiviert und dies führt zu einer immensen Ausschüttung von Zytokinen<sup>[28]</sup>. Zu diesen Superantigenen gehören verschiedene Enterotoxine (Enterotoxin A, B, C, D, E, G, Q) sowie TSST-1 (toxic shock syndrome toxin-1)<sup>[81]</sup>. Ein großes Problem ist, dass ein Kontakt mit diesen Antigenen nicht nur bei Besiedelung mit SA vorkommen kann, sondern dass diese Toxine ebenfalls in kontaminierten Nahrungsmitteln zu finden sind<sup>[4]</sup>. Folgen einer durch Superantigene ausgelösten Immunantwort können sich von Übelkeit und Durchfall bis zu Multiorganversagen, das sogenannte toxische Schocksyndrom, erstrecken<sup>[4, 28]</sup>.

Für die gezielte Synthese der gerade beschriebenen Virulenzfaktoren besitzt SA ein sehr komplexes Regulationssystem.

## 1.3 Regulationsmechanismen der Virulenzfaktoren

Die Expression der zuvor beschriebenen Virulenzfaktoren steht unter einem sehr komplexen Regulationsmechanismus, an dem viele verschiedene Regulatoren beteiligt sind. Diese Regulation ist abhängig von der Wachstumsphase der Zellen und den äußeren Wachstumsbedingungen<sup>[10]</sup>. Eine solche Regulation ist wichtig, damit SA sich ändernden Bedingungen z. B. im Wirt anpassen und die Überlebenschancen vergrößern kann. Zu einem großen Teil werden diese Regulationen über Zweikomponenten-Systeme gesteuert. Neben diesen Systemen gibt es aber auch zusätzliche Regulatoren wie z. B. die Familie der Sar DNA-Bindeproteine (staphylococcal accessory regulator) und alternative Sigmafaktoren<sup>[10]</sup>.

### 1.3.1 Zweikomponenten-Systeme

Die Zweikomponenten-Systeme bestehen aus einem Sensor für extrazelluläre Liganden (sensor histidine kinase) und einem Regulator (response regulator). Äußere Liganden binden dabei spezifisch an eine extrazelluläre Rezeptordomäne des Sensors, dessen Kinase dadurch aktiviert wird. Diese phosphoryliert im Anschluss den Regulator des Zweikomponenten-Systems und induziert so dessen Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, in deren Folge die Transkription der entsprechenden Gene beeinflusst wird<sup>[10]</sup>. Heute sind viele verschiedene Zweikomponenten-Systeme bekannt. Zu den wichtigsten Vertretern gehören: Agr (accessory gene regulator), Sae (SA exoprotein expression), Srr (staphylococcal respiratory response) und Arl (autolysis-related locus).

#### **Agr (accessory gene regulator)**

Der *agr* Locus besteht aus fünf Genen und umfasst zwei verschiedene Transkripte, RNAII (kodiert für *agrDBCA*) und RNAIII (kodiert für *hld*)<sup>[16]</sup>. AgrC hat die Funktion des Sensors und AgrA die Funktion des Regulators. RNAIII ist auf der einen Seite der Effektor des *agr* Locus und kodiert auf der anderen Seite zusätzlich für das  $\delta$ -Hämolyisin (*hld*), das nicht in die weitere Regulation involviert ist<sup>[10]</sup>. Agr kann über zwei verschiedene Wege zur Regulation beitragen. Der erste verläuft über eine Autoaktivierung und wird zu dem sogenannten "Quorum sensing" gezählt, einem Kommunikationssystem von Einzellern. *agrDBCA* führt dabei zur Bildung von AIPs (autoinducing peptides), die aus der Zelle exportiert werden<sup>[10, 16]</sup>. Diese AIPs können den transmembranständigen Sensor AgrC der Ursprungszelle oder auch der Nachbarzelle aktivieren und somit die Aktivierung des *agr* Locus starten<sup>[10]</sup>. Dieser Mechanismus stellt einen Messfühler von SA für die Zelldichte dar, da die AIP-Konzentration im extrazellulären Bereich proportional mit der Zellzahl ansteigt. Der zweite Weg der Agr-Aktivierung verläuft über RAP (RNAIII-activating protein). Dieses Protein wird von SA sekretiert und kann vermutlich über einen Rezeptor die RNAIII-Synthese aktivieren. RNAIII als Effektor des Agr-Locus initiiert somit die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen<sup>[10]</sup>. Agr kann mehr als 100 Gene in ihrer Transkription beeinflussen. So wird beispielsweise die Expression der Exoproteine positiv und die Synthese von Oberflächenadhäsionsproteinen negativ von diesem System reguliert<sup>[16]</sup>.

#### **Sae (SA exoprotein expression)**

Der *sae* Locus besteht aus vier Genen, von denen zwei, SaeR und SaeS, den Regulator und Sensor des Zweikomponenten-Systems bilden<sup>[65]</sup>. Das *sae* System kontrolliert die Expression einer Reihe wichtiger Virulenzfaktoren wie z. B. Hla, Hlb, Coa (Koagulase), Eap und FnBPA<sup>[31, 37, 97]</sup>.

### **Srr (staphylococcal respiratory response)**

SrrA (Regulator) und SrrB (Sensor) sind die beiden Komponenten dieses Systems. Sie sind involviert in der Regulation von Proteinen, die für den Energiemetabolismus und die Energiebereitstellung auch unter anaeroben Bedingungen von Bedeutung sind<sup>[73]</sup>.

### **Arl (autolysis-related locus)**

Dieser Locus besteht aus den Genen *arlS* (Sensor) und *arlR* (Regulator) und ist vermutlich am Zellwachstum, der Zellteilung und dem selbstinduzierten Zelltod (Autolyse) beteiligt. Des Weiteren kann indirekt die Transkription von Virulenzfaktoren wie z. B. *hla*, *hly* und Protein A (*spa*) reduziert werden<sup>[10]</sup>.

## **1.3.2 Weitere Regulationsmechanismen**

### **Sar (staphylococcal accessory regulator)**

Der *sar* Locus kodiert nur für ein Protein, SarA, das allerdings von drei verschiedenen Transkripten (*sarA*, *sarB* und *sarC*), welche wachstumsphasenabhängig exprimiert werden, kodiert wird. SarA kann direkt an die DNA binden und so die Transkription von zellwandassoziierten Proteinen und Exoproteinen beeinflussen<sup>[17, 22]</sup>. Des Weiteren gilt SarA als einer der wichtigsten Aktivatoren des *agr*-Lokus. Neben SarA gibt es eine Reihe weiterer *sarA* Homologe, wie SarR, SarS, SarT, SarU und Rot (repressor of toxin), die auf ähnliche Weise in die Regulation von Virulenzfaktoren eingreifen<sup>[10]</sup>.

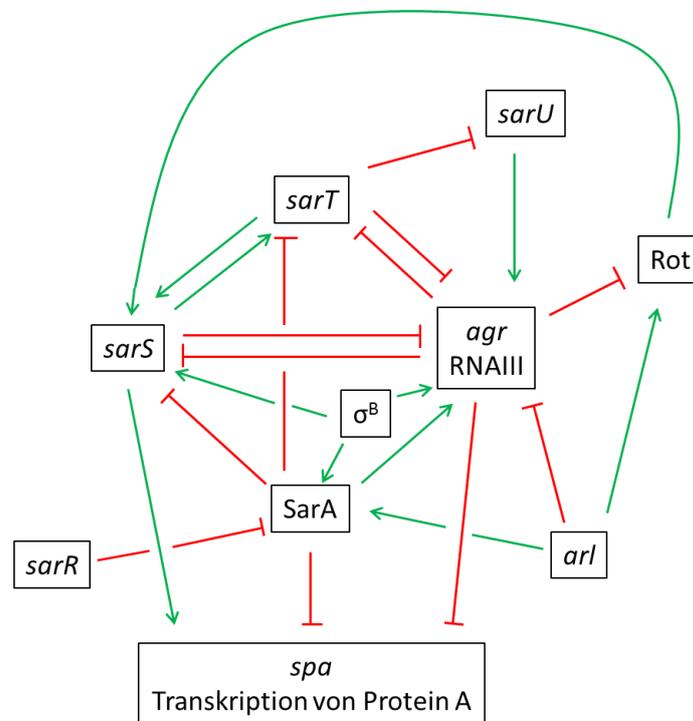
### **Alternative Sigmafaktoren**

Eine Gruppe alternativer Sigmafaktoren ( $\sigma^{B, H}$  und  $\sigma^S$ ) sind mit in die Regulation von Genen eingebunden, deren Expression sich verändernden Umweltfaktoren anpasst. Die größte Bedeutung für die Expression von Virulenzfaktoren übernimmt dabei der alternative Sigmafaktor  $\sigma^B$ , dessen Aktivität von den Genprodukten RsbU, -V und -W moduliert wird. Die Aktivierung erfolgt u. a. durch äußere Stressfaktoren wie z. B. Ethanol, Salz oder Hitzeschock und führt auf direktem Weg aber auch durch Modulation der Aktivitäten von SarA, Sae und Agr zu Expressionsänderungen bei einer Vielzahl von Virulenzfaktoren<sup>[10]</sup>.

## **1.3.3 Vernetzung der Regulatoren**

Die Aktivität der Regulatoren ist abhängig von einem initialen Stimulus. Des Weiteren sind die beschriebenen Regulationssysteme auch untereinander verzweigt und beeinflussen sich in ihrer Aktivität gegenseitig. Anhand eines Beispiels soll eine Möglichkeit dieser komplexen Vernetzung verdeutlicht werden. Dafür wurde die Transkriptionskontrolle von *spa*, das für

Protein A kodiert, ausgewählt. In Abb. 1-3 ist eine vereinfachte, schematische Darstellung des Netzwerkes der Regulatoren abgebildet. Darin ist zu erkennen, dass die Regulatoren positiv (grüner Pfeil) sowie negativ (rote Linie) auf andere Regulatoren und auch direkt auf die Transkription wirken können. Es sind sehr viele Systeme an der Transkriptionskontrolle von *spa* beteiligt, aber nur SarS, SarA und RNAIII haben einen direkten Einfluss. Im Zentrum dieses Mechanismus stehen SarS, SarT, SarA und RNAIII, die zusätzlich alle untereinander vernetzt sind. SarR, Rot, ArIRS oder  $\sigma^B$  können beispielsweise indirekt über diese Regulatoren in die Regulation eingreifen. Das Schaubild soll anhand dieses Beispiels zeigen, dass die Transkriptionskontrolle von vielen verschiedenen Systemen beeinflusst wird und diese ebenfalls untereinander vernetzt sind. Aus diesem Grund gestaltet sich die Erforschung dieser Mechanismen als sehr schwierig.



**Abb. 1-3 Schematische Darstellung der Vernetzung der Regulationssysteme am Beispiel der *spa* Transkription.** Grüne Pfeile bedeuten eine Induktion und rote Linien eine Repression des jeweils folgenden Regulationssystems bzw. der Transkription des Proteins (zusammengefasst nach Vorlage von<sup>[10, 61, 73, 91]</sup>).

Es ist für SA von zentraler Bedeutung während der Kolonisierung verschiedene Gene zeitabhängig zu exprimieren, damit eine Anpassung an die Bedingungen im Wirt gewährleistet ist. Das hier beschriebene regulatorische Netzwerk ist vermutlich für die Anpassung der Expressionsmuster an die Umweltbedingungen von großer Wichtigkeit<sup>[10]</sup>. Solche Regulationssysteme spielen aber nicht nur bei der Expression von Virulenzfaktoren eine große Rolle. Der Eisenmetabolismus von SA steht vermutlich ebenfalls unter einer

strikten Kontrolle verschiedener Genregulationssysteme, deren Interaktionen aber bisher noch nicht im Detail aufgeklärt sind.

## 1.4 Eisenmetabolismus von SA

Eisen ist ein sehr wichtiges Element für alle lebenden Organismen, da es an vielen zellulären und enzymatischen Reaktionen beteiligt ist und ebenfalls zu Transportprozessen von Elektronen beiträgt. In den meisten Fällen dient Eisen dabei als Kofaktor für andere Proteine oder Enzyme<sup>[96]</sup>. Am häufigsten kommt Eisen in der Umwelt als Fe(II) und Fe(III) vor, wobei Fe(II) nicht sehr stabil ist und meist spontan durch Sauerstoff oder Enzyme zu Fe(III) oxidiert wird. Fe(III) bildet stabile Oxide oder bindet an z. B. Ferritin, Transferrin, Lactoferrin oder Hämproteine<sup>[5]</sup>. Aus diesem Grund ist die freie Eisenkonzentration sehr gering ( $10^{-9}$  -  $10^{-18}$  M in der Umwelt und  $10^{-24}$  M in einer Säugerzelle)<sup>[87]</sup>.

An der Regulation des Eisenmetabolismus sowie der Aufnahme dieses Metalls in SA sind eine Reihe verschiedener Systeme beteiligt.

### 1.4.1 Regulator Fur

Mit Hilfe des Regulators Fur (ferric uptake regulator) können Bakterien die intrazelluläre Eisenkonzentration erkennen<sup>[36]</sup>. Dies ist sehr wichtig, da Eisen einen überlebensnotwendigen Kofaktor verschiedener Enzyme darstellt, eine zu hohe Konzentration aber eine toxische Wirkung auf die Bakterien hat. Freies  $\text{Fe}^{2+}$  kann in hohen Konzentrationen mit Wasserstoffperoxid über die Fenton-Reaktion zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale führen. Diese können verschiedene intrazelluläre Moleküle schädigen<sup>[102]</sup>. Aus diesem Grund unterliegt der Eisenhaushalt einer strikten Kontrolle. Dadurch wird gewährleistet, dass Eisen auf der einen Seite bei Bedarf vermehrt akquiriert und verwertet werden kann, dass auf der anderen Seite das Bakterium ebenfalls vor einer zu hohen Eisenkonzentration geschützt ist. Fur liegt meist inaktiv als Homodimer vor. Durch die Bindung von  $\text{Fe}^{2+}$  an jedes Monomer und einer anschließenden Konformationsänderung wird der Regulator aktiviert und kann in dieser Form an spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten Fur-Boxen, binden<sup>[57]</sup>. Eine Fur-Box ist eine 19 Basenpaar lange Sequenz, die sich in Promotorregionen der über Fur regulierten Gene befindet<sup>[57]</sup>. Durch das Binden von Fur an die DNA wird eine Anlagerung der RNA-Polymerase verhindert und damit die Transkription der entsprechenden Gene unterbunden. Sinkt die intrazelluläre Eisenkonzentration, löst sich  $\text{Fe}^{2+}$  von Fur, der Regulator wird inaktiv und löst sich von der DNA. So können die zuvor inhibierten Gene wieder abgelesen werden<sup>[18]</sup>. Gene, die auf diese Weise von Fur kontrolliert werden,

kodieren u. a. für Proteine der Eisenakquirierung, für zytoplasmatische Proteine sowie für antioxidative Stressproteine<sup>[101]</sup>. Mit dieser Regulation kann das Bakterium über Fur eine ausreichende, nicht toxische Eisenkonzentration gewährleisten. Seit kurzem ist bekannt, dass Fur nicht nur ausschließlich als Repressor der Genexpression fungiert, sondern ebenfalls positive Wirkungen besitzt. So kann Fur beispielsweise die Regulationssysteme Sae und Agr induzieren und damit indirekt die Expression von Virulenzfaktoren fördern<sup>[48]</sup>.

### 1.4.2 Siderophore

SA haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um ihren Eisenbedarf während der Besiedelung oder Infektion eines Wirtes zu decken. Eine Möglichkeit bietet die Synthese von Chelatoren, sogenannte Siderophore. Sie werden von SA sekretiert und können Fe(III) selektiv mit sehr großer Affinität binden. Sobald Eisen gebunden wurde, wird dieser Komplex in das bakterielle Zytoplasma reimportiert und das Eisen im Zytosol freigesetzt<sup>[5, 96]</sup>. Neben freiem Eisen können Siderophore auch Metallionen aus Proteinen wie z. B. aus Transferrin binden. Transferrin hat eine Größe von etwa 80 kDa und besitzt zwei Bindungsstellen für Fe(III). Zum größten Teil wird das Eisen aus Transferrin über einen Siderophoren-vermittelten Weg genutzt<sup>[78]</sup>. Dieser Mechanismus geschieht unspezifisch von dem Transferrinursprung. Ein zusätzlicher Weg besteht in der Bindung von Transferrin an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von SA. Diese sind jeweils nur für Transferrin aus einem bestimmten Wirt spezifisch<sup>[71]</sup>. Anschließend wird Eisen über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus in die Zelle aufgenommen<sup>[71]</sup>.

### 1.4.3 Häm-Aufnahme

Das wichtigste für die Eisenakquirierung von SA genutzte Molekül ist jedoch Häm, welches zu 75% als Eisenquelle genutzt wird<sup>[59]</sup>. Häm besteht aus einem Porphyrin, das über die Stickstoffatome Fe(II) bindet (Abb. 1-4). Am häufigsten kommt es als Untereinheit des Hämoglobins vor<sup>[5]</sup>, das sich innerhalb von Erythrozyten befindet<sup>[88]</sup>. In allen bisher publizierten Versuchsdurchführungen wurde allerdings immer Hämin, die oxidierte Form von Häm, verwendet.

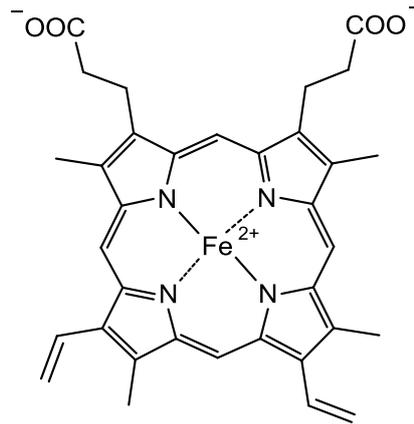
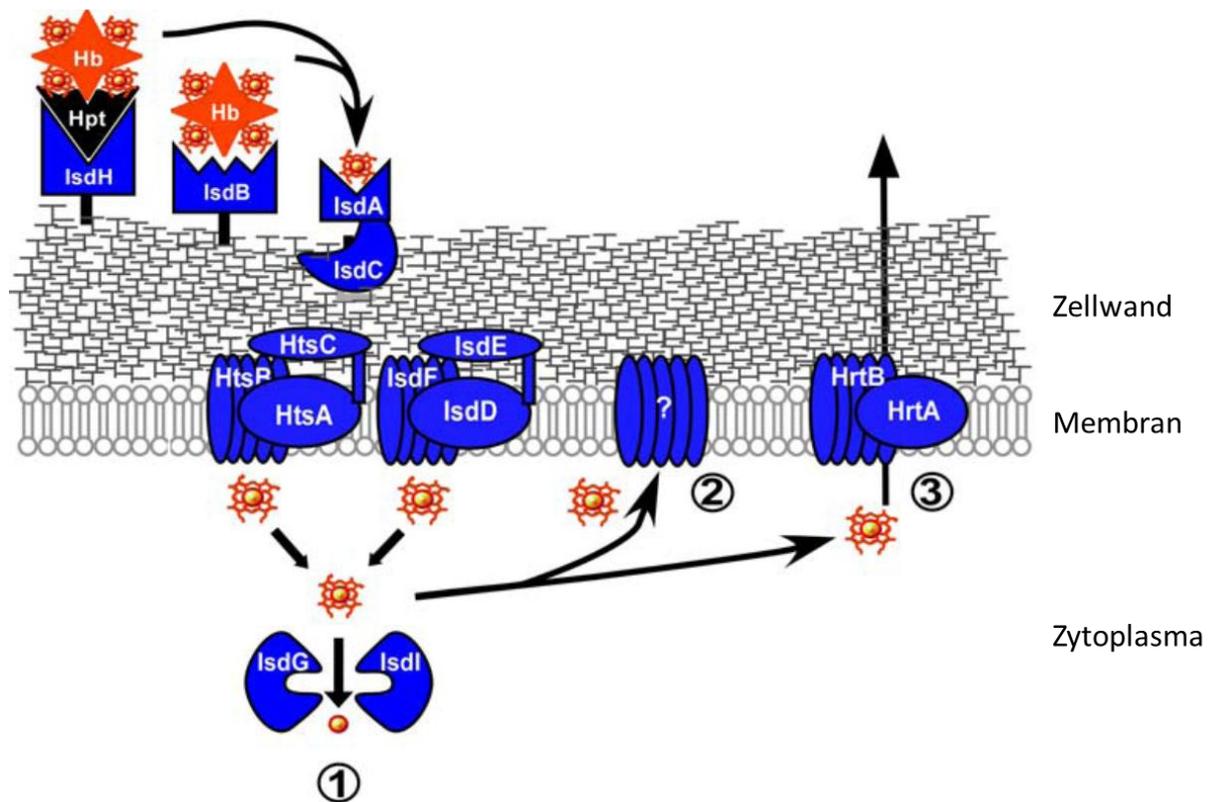


Abb. 1-4 Strukturformel von Häm<sup>[26]</sup>.

Nach Hämolyse-vermittelter Lyse von Erythrozyten liegt lokal eine bis zu 100-fach erhöhte Eisenkonzentration vor<sup>[90]</sup>. Hämoglobin kann von speziellen Rezeptoren gebunden und die Häm-Untereinheiten ins Zytoplasma transportiert werden. Für diesen Import gibt es zwei verschiedene Systeme, Isd (iron-regulated surface determinant system) und Hts (heme transport system)<sup>[88]</sup> (vgl. Abb. 1-5).

Das Isd-System besteht aus 10 Genen, die unter der Kontrolle des eisenabhängigen Regulators Fur stehen<sup>[69]</sup>. Zu diesem System zählen vier zellwandverankerte Proteine (IsdABCH), eine Transpeptidase (SrtA), drei Membrantransportproteine (IsdDEF), und zwei Monooxygenasen (IsdGI). IsdB und IsdH binden Hämoglobin an der Zelloberfläche<sup>[21]</sup>. Die Häm-Untereinheiten werden über einen noch unbekanntem Mechanismus aus dem Hämoglobin freigesetzt, über IsdC durch die Zellwand und über das Membrantransportsystem IsdDEF oder auch über das Hts-System über die Zellmembran ins Zytoplasma transportiert<sup>[69]</sup>. Das Hts-System besteht aus einem Lipoprotein (HtsA) und zwei Permeasen (HtsB und HtsC)<sup>[68]</sup>.

Innerhalb der Zelle kann Häm unterschiedlich genutzt werden. Das Eisen kann durch die Monooxygenasen IsdG oder IsdI aus dem Porphyrin freigesetzt werden oder das Häm-Molekül bindet an membranassoziierte Proteine und wirkt dort als Kofaktor bei z. B. der Elektronentransportkette<sup>[99]</sup>. Die dritte Möglichkeit besteht im Export des Moleküls. Dies ist sehr wichtig, da es bei einer zu hohen intrazellulären Häm-Konzentration aufgrund der hohen Reaktivität zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kommen kann, die DNA und Proteine schädigen<sup>[25]</sup>. Aus diesem Grund können Häm und dessen Abbauprodukte über den Transporter HrtAB (heme regulated transport system) aus dem Zytoplasma exportiert werden<sup>[88]</sup>.



**Abb. 1-5 Importmechanismus und Verwendung von Häm.** Häm wird über das Isd- oder das Hts-System in das Zytoplasma transportiert. Dort kann Häm durch die Monooxygenasen IsdG oder IsdI abgebaut und Eisen freigesetzt werden (1). Der Häm-Komplex kann von membranassoziierten Proteinen gebunden werden und bei enzymatischen Prozessen als Kofaktor dienen (2) oder überschüssiges Häm und dessen Abbauprodukte werden über den Transporter HrtAB exportiert (3) (verändert nach Vorlage von<sup>[88]</sup>).

Der detaillierte Mechanismus mit den verantwortlichen Regulationssystemen und deren Interaktionen untereinander ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt und zurzeit Bestandteil vieler Untersuchungen.

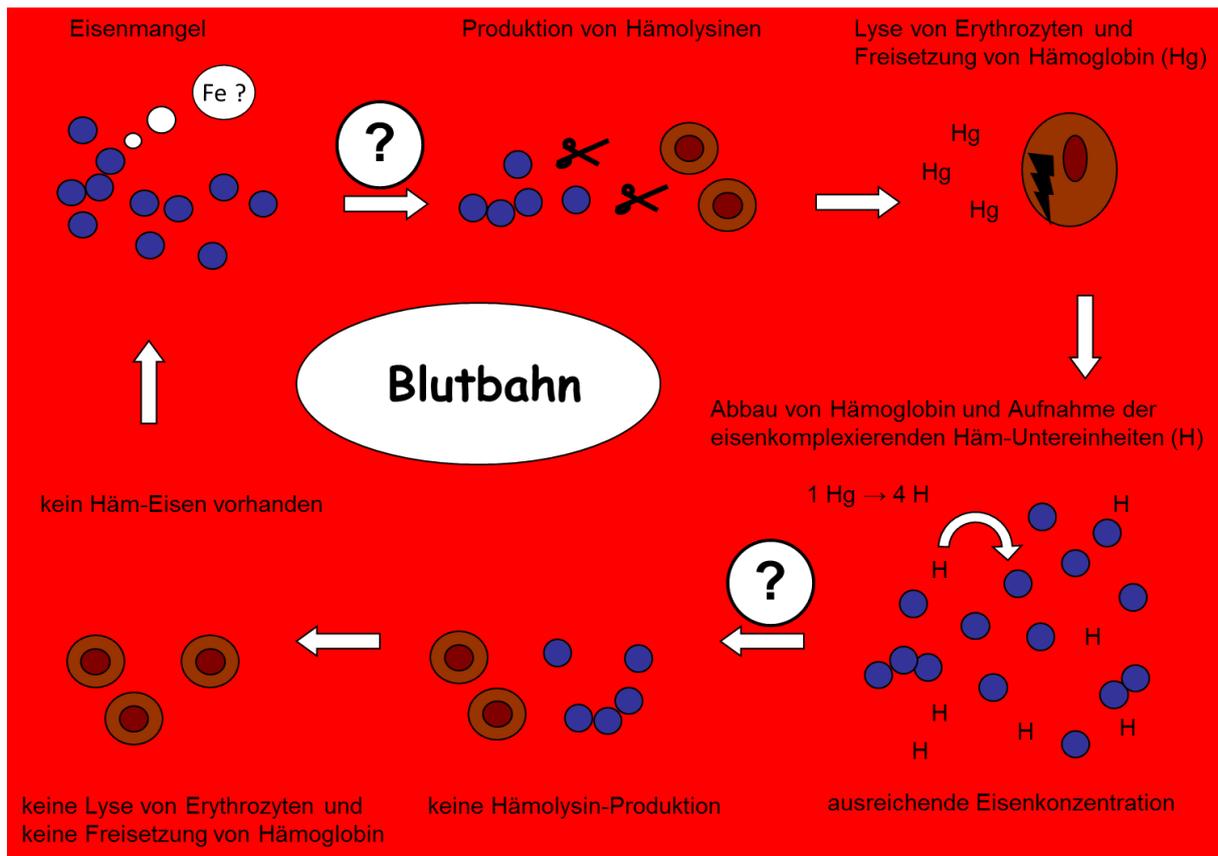
## 2 Zielstellung

Die Regulation des Eisenhaushaltes spielt in SA eine zentrale Rolle. Zum einen ist dieses Metall lebensnotwendig, da es an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist, zum anderen ist die wichtigste Eisenquelle von SA, das Häm (eine Untereinheit von Hämoglobin), bei zu hohen Konzentrationen toxisch für die Zelle. Aus diesem Grund ist es für SA notwendig, die Freisetzung und Aufnahme von Häm zu regulieren.

Die Auswirkungen von Eisenmangel auf SA sind schon von vielen Arbeitsgruppen untersucht worden. Es ist daher bereits bekannt, dass Häm bei Eisenbedarf über Hämolsin-vermittelte Lyse von Erythrozyten und anschließendem Import in die Zelle vermehrt akquiriert werden kann. Der umgekehrte Effekt, wenn ausreichend Eisen in Form von Häm verfügbar ist, steht bisher noch nicht so sehr im Fokus laufender Untersuchungen. In Abb. 2-1 ist schematisch die z. T. bekannte bzw. vermutete eisenabhängige Expression der Hämolsine dargestellt. Ziel dieser Dissertation war es, die Auswirkungen von Hämin, die oxidierte Form von Häm, auf SA aufzuzeigen und zu verstehen, wie sich dieses Bakterium vor einer Intoxikation schützen kann. Insbesondere sollte in diesem Zusammenhang ein Schwerpunkt auf die dabei beteiligten Genregulationssysteme gelegt werden.

Dazu sollten die Transkriptionsraten der Hämolsine sowie die dadurch induzierte Lyse von Erythrozyten in Abhängigkeit der verfügbaren Eisenkonzentration getestet werden. Im nächsten Schritt sollten die in diesen Prozess involvierten Regulationssysteme bestimmt werden. Durch Verwendung verschiedener Eisenquellen sollte zusätzlich untersucht werden, ob Häm über einen spezifischen Mechanismus erkannt wird oder ob der Effekt nur von der verfügbaren Eisenkonzentration abhängig ist.

Dieser hier zur Untersuchung stehende Regulationsmechanismus ist für SA überlebensnotwendig und bietet somit vielleicht in Zukunft einen neuen Angriffspunkt für die Bekämpfung von SA Infektionen. Neue Erkenntnisse über Einzelheiten dieses kritischen Schrittes können die Erforschung neuer antimikrobiellen Therapeutika unterstützen.



**Abb. 2-1 Vereinfachtes Schema zur eisenabhängigen Expression der Hämolytine.** Unter Eisenmangel werden vermehrt Hämolytine zur Lyse von Erythrozyten produziert. Das dabei freigesetzte Hämoglobin wird abgebaut und die Häm-Untereinheit in SA zur Deckung des Eisenbedarfs aufgenommen. Es wird vermutet, dass bei hoher Häm-Konzentration die Hämolytinsynthese gestoppt wird und keine weiteren Erythrozyten lysiert werden<sup>[2, 101]</sup>.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Quelle
6850	Klinisches Isolat	[6]
8325-4	NCTC8325 Derivat, ohne Prophagen, <i>rsbU</i>	[72]
COL	MRSA, homog. hohe Methicillin-Resistenz, klinisches Isolat, Tet <sup>R</sup>	[53]
Cowan		ATCC12598
HOM149	LS1 $\Delta$ <i>sae</i> , Kan <sup>R</sup>	M. Bischoff, unveröffentlicht
IK184	Newman $\Delta$ <i>rsbUVWsigB</i> , Erm <sup>R</sup>	[30]
LS1	Murines Arthritis-Isolat	[9]
LS1 $\Delta$ <i>fur</i>	LS1 $\Delta$ <i>fur</i> , Tet <sup>R</sup>	diese Arbeit
mAH12	Newman <i>eap</i> <sup>-</sup> , Erm <sup>R</sup>	[42]
MJH010	8325-4 $\Delta$ <i>fur</i> , Tet <sup>R</sup>	[40]
MSSA 1112	Klinisches Isolat, <i>bla</i> <sup>+</sup>	[24]
N315	MRSA, klinisches Isolat	[56]
NewHG	Newman <i>saeS</i> <sup>+</sup>	[65]
Newman	Klinisches Isolat, ClfA, B und Eap Überexprimierer, <i>saeS</i>	[23], ATCC25904
SA113 $\Delta$ <i>srtA</i>	SA113 $\Delta$ <i>srtA</i> , Erm <sup>R</sup>	[104]

Tab. 3-1 Verwendete Bakterienstämme dieser Arbeit.

##### 3.1.2 Nährmedien der Bakterien

Die hier verwendeten Bakterienstämme (Tab. 3-1) wurden nach allgemein gültigen Arbeitsprotokollen ausgestrichen und kultiviert. Dafür wurden folgende Medien und Agar-Suspensionen verwendet.

MBB-Medium	
Pepton	45 g
Hefeextrakt	22.5 g
NaCl	22.5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.5 g
ad 4.5 l H <sub>2</sub> O	pH 7.0

LB-Medium	
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O	pH 7.3

LB-Agar	
Bacto-Agar	7.5 g
ad 500 ml LB	

LB-softy		BHI-Medium		Müller-Hinton-Medium (MH)	
Bacto-Agar	0.6 g	BHI-Medium	37 g	MH-Medium	22 g
ad 100 ml LB		ad 1 l H <sub>2</sub> O		ad 1 l H <sub>2</sub> O	

RPMI 1640 (Gibco)
Diesem Medium wurde für die Kultivierung der Bakterien 1% CAS zugesetzt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herstellung und Überprüfung von LS1 Mutanten

#### 3.2.1.1 Genomische Manipulation durch Phagentransduktion

Zur Übertragung eines bereits vorhandenen Gen-Knockouts, bei dem das Gen durch eine Resistenzkassette ausgetauscht worden ist, in ein anderes SA Isolat, wird meist die Methode der Phagentransduktion verwendet. Dabei werden nach Infektion des Ausgangsstammes mit den Phagen alle viralen Komponenten in den Bakterien synthetisiert und in einer "Self-assembly" zu neuen Phagen zusammengesetzt. Hierbei kommt es ebenfalls vor, dass anstelle der Phagen-DNA bakterielle DNA-Bruchstücke mit in die Phagen integriert werden. Die Bakterien lysieren, nachdem sich die Phagen selbst zusammengesetzt haben. Die Phagen werden anschließend aufgereinigt und mit dem Empfängerstamm inkubiert. Durch homologe Rekombination erfolgt der Einbau des zu übertragene bakteriellen DNA-Fragments in das neue bakterielle Genom. Auf erfolgreiche Insertion wird mithilfe der Resistenzkassette selektioniert.

Dazu wurde zunächst eine Übernachtskultur des Ausgangsstammes mit dem zu übertragene Knockout in 20 ml LB (37°C, 150 rpm) angesetzt. Am nächsten Tag wurde ein geeigneter Phage in Phagenpuffer (4 ml LB mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>) in verschiedenen Verdünnungen angesetzt. Dazu wurden zunächst 135 µl Phagenpuffer mit 15 µl des Phagenlysates gemischt und ausgehend von dieser Mischung weitere 5 Verdünnungen im Verhältnis 1:10 vorgelegt. Zu der Übernachtskultur wurden 100 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> gegeben und jeweils 300 µl davon in sechs sterile Glasröhrchen überführt. Von jeder Verdünnung des Phagens wurden 100 µl jeweils in ein Glasröhrchen gegeben, so dass die Bakterien in jedem Röhrchen mit einer anderen Phagenverdünnung angeimpft wurden. Diese Mischung wurde anschließend 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 4 ml verflüssigter, 50°C warmer LB-softy mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> gegeben, kurz gemischt und auf je eine Blutagarplatte gegossen. Nach dem Abkühlen wurden diese Platten über Nacht im Brutschrank bei 37°C

inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte ausgewählt, die eine ausreichende Lyse des Bakterienrasens aufwies. Auf diese Platte wurden 2 ml LB mit 5 mM  $\text{CaCl}_2$  gegeben und die oberste Schicht mit einem Glasstab vorsichtig abgeschabt. Dies wurde anschließend gevortext, zum Pelletieren des Agars zentrifugiert (9000 rpm, 10 min) und der Überstand sterilfiltriert (0.2  $\mu\text{m}$  Filter). Dieses Phagenlysat wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

Für den zweiten Teil der Phagentransduktion wurden 20 ml LB mit dem Empfängerstamm des Knockouts angeimpft und über Nacht inkubiert (37°C, 150 rpm). Es wurde wieder eine Verdünnung des gerade hergestellten Phagenlysates vorbereitet. Als Ausgangspunkt diente das pure Phagenlysat und dies wurde jeweils 1:10 mit Phagenpuffer verdünnt, 4 bis 5 Verdünnungen reichen dazu aus. Als Kontrolle wurde auch eine Probe nur mit Puffer verwendet, um eventuelle Kontaminationen zu erkennen. Von der Übernachtskultur wurden nach Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  (5 mM Endkonz.) 300  $\mu\text{l}$  in Glasröhrchen vorgelegt und je 100  $\mu\text{l}$  der Verdünnungen des Phagenlysates zugegeben. Dies wurde 15 min bei RT inkubiert und anschließend wurden 4 ml LB-softy ohne  $\text{CaCl}_2$ -Zusatz zugegeben. Diese Mischung wurde kurz geschüttelt und anschließend auf LB-Agarplatten mit dem benötigten Antibiotikum gegossen. Dabei muss das Antibiotikum zur Selektion verwendet werden, gegen das der Ausgangsstamm eine Resistenzkassette an der Stelle der Deletion beinhaltet. Diese Platten wurden 1 - 2 Nächte im Brutschrank bebrütet (37°C) und die gewachsenen Kolonien wurden auf erfolgreichen Knockout überprüft. Da bekannt ist, dass die Übertragung von DNA-Fragmenten mittels Phagentransduktion auch genetische Rearrangements des Empfänger-genoms auszulösen vermag, ist es wichtig, die Transduktanden neben der phänotypischen Charakterisierung auch mittels "pulsed-field" Gelelektrophorese (PFGE, vgl. 3.2.1.5) zu untersuchen.

### 3.2.1.2 gDNA Extraktion

Zur Extraktion von genomischer DNA aus SA wurden 500  $\mu\text{l}$  einer Übernachtskultur in 10 ml frischem Medium bei 37°C und 150 rpm bis zu einer OD von 0.6 angezüchtet. Die Bakterien wurden pelletiert (4°C, 7500 rpm, 15 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2 ml 0.9% NaCl auf Eis resuspendiert, 1 ml in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (4°C, 14000 rpm, 1 min). Dieses Pellet wurde in 180  $\mu\text{l}$  TE (10  $\mu\text{M}$  Tris, 1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Zum Lysieren der Bakterien wurden 2  $\mu\text{l}$  Lysozym (1 mg/ml), 5  $\mu\text{l}$  Lysostaphin (2 mg/ml) und 2  $\mu\text{l}$  RNase (100 mg/ml) zugegeben und das Gemisch bis zur vollständigen Lyse im Wasserbad bei 37°C belassen. Im Anschluss wurden 200  $\mu\text{l}$  warme, frisch angesetzte 2%ige SDS-Lösung hinzugefügt, die Proben invertiert und etwa 10 min weiter bei 37°C im Wasserbad gewärmt. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  warme Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) zugegeben, gemischt und nochmals weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde ein Volumen (hier: 500  $\mu\text{l}$ ) eines Phenol-Chloroform-Gemisches (Roti-

Phenol / Chloroform [Roth], Verhältnis: Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol: 25:24:1) dazu pipettiert und 20 min bei 37°C im Thermomixer geschüttelt. Diese Mischung wurde zentrifugiert (14000 rpm, 5 min) und die Oberphase in ein neues Gefäß überführt. Im Anschluss wurde erneut ein Volumen Phenol-Chloroform zugegeben und verfahren wie gerade beschrieben. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis der Überstand klar war. Dieser wurde in ein neues Gefäß überführt und 2.5 Volumen 100%iges Ethanol zum Fällern der DNA zugeführt und mehrfach invertiert. Zur Optimierung der Fällung wurden die Proben 10 min bei -20°C gekühlt und zwischendurch mehrfach invertiert. Anschließend wurde die ausgefallene DNA abzentrifugiert (RT, 14000 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden zweimal mit je 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, die Flüssigkeit anschließend abgossen und das Sediment getrocknet. Zum Schluss wurde die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, kurz gevortext und zum vollständigen Lösen für 1 h bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

### 3.2.1.3 PCR

Zur Überprüfung der positiven Klone aus der Phagentransduktion wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurden spezielle Primer (Eurofins MWG Operon) designt (siehe Tab. 3-2). In diesem Fall sollte ein Primer, wie in Abb. 3-1 gezeigt, in der eingefügten Resistenzkassette binden (MBH229) und der zweite außerhalb dieser Insertion (MBH227). Mit dieser Strategie sollte nur dann ein PCR-Produkt erhalten werden, wenn die Insertion erfolgreich war und an der richtigen Stelle eingesetzt wurde.

MBH227	<i>srtA</i> up +	5'-GTGAAATGTATAAAAAGGAGCC-3'
MBH229	<i>ermB</i> int -	5'-CTTGCTCATAAGTAACGGTAC-3'

Tab. 3-2 Primersequenzen für eine PCR zur Überprüfung der potentiellen Mutanten.

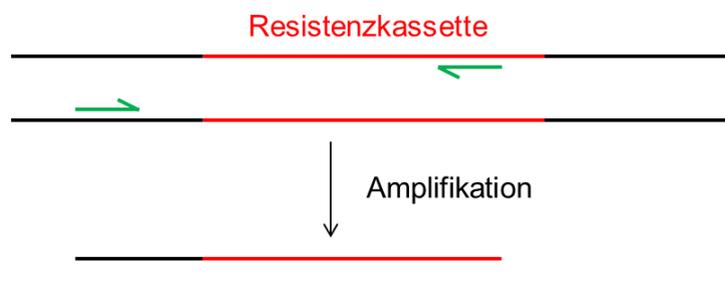


Abb. 3-1 Schema der PCR zur Überprüfung einer erfolgreichen Phagentransduktion.

Für die PCR wurde zunächst folgender Master Mix angesetzt, der anschließend für jede Probe in einem PCR-Ansatz eingesetzt wurde.

Master Mix für 10 Ansätze		Endkonz./PCR-Ansatz	PCR-Ansatz	
H <sub>2</sub> O	197 µl	333 µM 1.5 U/µl	gDNA	1 µl
10 mM dNTPs (Roche)	10 µl		Master Mix	24 µl
5 U/µl Taq (Sigma)	3 µl		MBH227 (10 pmol/µl)	2.5 µl
10x Puffer (Roche)	30 µl		MBH229 (10 pmol/µl)	2.5 µl
Endvolumen	240 µl		Endvolumen	30 µl

Diese Proben wurden in ein PCR-Gerät überführt und mit folgendem Programm wurde die DNA amplifiziert:

95°C	95°C	53°C	72°C	72°C	20°C
5 min	30 s	30 s	1 min	10 min	∞
30 Zyklen					

### 3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von DNA-Proben z. B. aus einer PCR können diese auf ein Agarosegel geladen werden. Dazu wurden die Proben zusätzlich folgendermaßen mit einem Ladebuffer gemischt:

DNA-Probe	2 µl
6x LD (Fermentas)	1 µl
ad 6 µl H <sub>2</sub> O	

Diese Proben konnten in die Taschen eines Agarosegels geladen werden, das zuvor in eine Apparatur mit dem Laufpuffer TAE gelegt wurde. Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde eine äußere Spannung von 100 V angelegt. Die Banden der DNA konnten mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Laufpuffer TAE	
Tris/HCl	4.84 g
EDTA	0.4 g
Essigsäure	1.14 ml
ad 1 l H <sub>2</sub> O	

1%iges Agarosegel:

1 g Agarose wurde in 100 ml TAE gelöst, anschließend 0,0015% Ethidiumbromid (Roth) zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer zum Polymerisieren gegossen.

### 3.2.1.5 “Pulsed field“ Gelelektrophorese

Der Transfer einer Deletion von einem SA Isolat in ein anderes per Phagentransduktion bringt den Nachteil mit sich, dass bei der Infektion des Empfängerstammes mit den Phagen größere genetische Durchmischungen im Chromosom des Empfängerstammes auftreten können. Um diesen unerwünschten Nebeneffekt in den erhaltenen Transduktanden auszuschließen und um sicherzustellen, dass bei dem Phagentransduktionsprozess keine Kontaminanten selektioniert wurden, wurde eine “pulsed field“ Gelelektrophorese (PFGE) durchgeführt. Hierbei wird der “genetische Fingerabdruck“ der mutierten Stämme mit dem des Ausgangsstammes auf Basis eines SmaI-Verdau, ein Restriktionsenzym, das nur selten innerhalb des Genoms von SA zu schneiden vermag, verglichen. Die dabei auftretenden Genomfragmente, die mehrere 100 kb lang sein können, werden dann durch das PFGE-Verfahren (eine Sonderform einer gelbasierenden elektrophoretischen Auftrennung, bei der die Trennung der – großen – DNA-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit in einem seine Richtung regelmäßig wechselnden Feld erreicht wird) elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Überprüfung wurde im Routinelabor unseres Instituts durchgeführt.

### 3.2.2 Wachstumskurven

Zur Bestimmung einer Wachstumskurve wurde zunächst eine Übernachtskultur in dem jeweils benötigten Nährmedium angesetzt und mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 150 rpm geschüttelt und am nächsten Tag auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0.1 in frischem Medium verdünnt. Anschließend wurde die Kultur auf die benötigten Kolben verteilt und ggf. mit den zu untersuchenden Substanzen versetzt. Diese Kulturen wurden im Schüttler bei 37°C und

150 rpm kultiviert, in regelmäßigen Zeitabständen die  $OD_{600}$  aller Proben gemessen und die Ergebnisse anschließend graphisch aufgetragen.

### 3.2.3 MHK-Bestimmung

Die Aktivität antibakterieller Substanzen kann mit einer MHK-Bestimmung (minimale Hemmkonzentration) bestimmt werden. Die MHK ist dabei diejenige Konzentration einer Substanz, bei der nach einer definierten Inkubationszeit makroskopisch kein Bakterienwachstum beobachtet werden kann. Für diese Bestimmung wurde nach den Vorgaben des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-Standard) die zu testende Substanz mit Müller-Hinton-Medium (MH) auf eine Konzentration von 256  $\mu$ M verdünnt und in die Vertiefungen der ersten Spalte einer Mikrotiterplatte vorgelegt. In alle anderen Vertiefungen der Platte wurden 50  $\mu$ l MH vorgelegt und ausgehend von der ersten Spalte eine Verdünnungsreihe pipettiert (Verdünnung pro Spalte 1:2). In die letzte Spalte wurden als negative Kontrolle nur 100  $\mu$ l MH eingefüllt. Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden am Vortag auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bebrütet. Diese wurden in MH auf McFarland 0.5 eingestellt und anschließend in 10 ml MH 1:100 verdünnt. In jede Vertiefung der vorbereiteten Platte wurden 50  $\mu$ l der Bakterienkultur gegeben und die Platte anschließend 16 – 20 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die niedrigste Konzentration des zu testenden Stoffes bestimmt, bei der das Wachstum der Bakterien komplett inhibiert war und als MHK angegeben.

### 3.2.4 Western Blot Analyse

#### 3.2.4.1 Kultivierung und Ernte der Bakterien

Die Übernachtskultur des zu untersuchenden Stammes wurde mit frischem Nährmedium auf eine  $OD_{600}$  von 0.1 verdünnt. Diese Kultur wurde anschließend auf verschiedene Kolben verteilt und je nach Versuch mit unterschiedlichen Zusatzstoffen beimpft. Anschließend wurden die Bakterien bei 37°C und 150 rpm im Schüttler für die angegebene Zeit kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die  $OD_{600}$  von allen Proben gemessen und daraus die zu erntende Menge Bakterien pro Probe bestimmt (siehe Tab. 3-3). Damit wurde sichergestellt, dass von jeder Probe die benötigte Bakterienzahl geerntet werden konnte.

Die geernteten Proben wurden zentrifugiert (4°C, 5000 g, 10 min) und die Pellets vom Überstand getrennt. Zur Detektion des  $\alpha$ -Hämolytins wurden die Überstände verwendet und für die Eap-Detektion die Pellets. Die Überstände aller Proben wurden mit frischem Medium auf gleiches Volumen aufgefüllt, damit eine Vergleichbarkeit der Exoproteine gewährleistet

werden konnte. Um die Proben nicht unnötig hoch zu verdünnen, wurden diese immer auf das Volumen aufgefüllt, das der Probe mit dem größten Volumen entsprach. Anschließend wurden die Proben gevortext und sterilfiltriert. Es wurden jeweils 30 µl entnommen, mit 10 µl 4x LD gemischt und die Proteine anschließend bei 80°C denaturiert (10 min). Die Bakterienpellets wurden mit 1 M LiCl wie in Tab. 3-3 angegeben resuspendiert und zur Extraktion der Zelloberflächenproteine für 2 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation (4°C, 5000 g, 10 min) und die Überstände mit den Exoproteinen wurden abgenommen. Jeweils 15 µl jedes Überstandes wurden mit 5 µl 4x LD gemischt und erhitzt (10 min, 80°C). Die so vorbereiteten Proben konnten auf eine SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) aufgetragen und somit die Proteine der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Stamm	OD <sub>600</sub> in 5 ml	Zellzahl/ml	resusp. in LiCl	finale Konzentration
LS1 (LB)	3.0	3*10 <sup>9</sup>	300 µl	5*10 <sup>7</sup> Zellen/µl
LS1 (RPMI)	0.5	5*10 <sup>8</sup>	50 µl	5*10 <sup>7</sup> Zellen/µl
LS1 Δ <i>sae</i> (LB)	3.0	3*10 <sup>9</sup>	300 µl	5*10 <sup>7</sup> Zellen/µl
LS1 Δ <i>fur</i> (LB)	3.0	3*10 <sup>9</sup>	300 µl	5*10 <sup>7</sup> Zellen/µl
Newman (LB)	1.0	1*10 <sup>9</sup>	600 µl	8.3*10 <sup>6</sup> Zellen/µl
NewHG (LB)	3.0	3*10 <sup>9</sup>	300 µl	5*10 <sup>7</sup> Zellen/µl

**Tab. 3-3 Übersicht der jeweils zu erntenden Bakterienzahl und der zu verwendenden LiCl-Menge zur Resuspension der Bakterienpellets.**

4x LD	
1 M Tris/HCl pH 6.8	5 ml
87% Glyzin	4 ml
Bromphenol-Blau Na-Salz	10 mg
SDS	0.5 g
0.5 M DTT	800 µl
ad 10 ml H <sub>2</sub> O	

### 3.2.4.2 SDS-PAGE

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen kann eine SDS-PAGE genutzt werden. Hier werden Proteine der Größe nach aufgetrennt und können anschließend zur Analyse angefärbt oder mit Antikörpern in einem Western Blot spezifisch detektiert werden.

Dazu wurde zunächst ein Polyacrylamidgel in der benötigten Konzentration vorbereitet. Das Gel besteht aus einem "weitmaschigem" Sammelgel (oberer Teil), das der Konzentrierung

der Proben dient, und einem "engmaschigem" Trenngel (unterer Teil), das für die Größenauffrennung verantwortlich ist. Das fertige Gel wurde in einen Behälter mit SDS-Laufpuffer eingespannt, die denaturierten Proteinproben wurden in die Taschen des Sammelgels aufgetragen und es wurde von außen eine Spannung von 110 mV angelegt. Wenn die Proben weit genug aufgetrennt waren, wurde das Gel aus der Apparatur entfernt und zunächst kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Sollten die Proben direkt im Gel sichtbar gemacht werden, wurde dieses anschließend mit einer Coomassie-Lösung angefärbt (ca. 1 h). Unspezifische Färbung wurde im Anschluss durch eine Coomassie-Entfärbelösung wieder entfernt. Zum Schluss wurde die Entfärbelösung mit Wasser abgewaschen und die Gele konnten zur Dokumentation fotografiert und getrocknet werden. Sollten die Proben durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht werden, wurde anstatt der Färbung ein Western Blot angeschlossen (s. 3.2.4.3).

	Trenngel		
	8%	10%	12.5%
Lösung A	1.35 ml	1.65 ml	2.1 ml
Lösung B	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
H <sub>2</sub> O	2.4 ml	2.1 ml	1.6 ml
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	4.15 µl	4.15 µl	4.15 µl
Endvolumen	5.1 ml	5.5 ml	5.0 ml

	Sammelgel
	5%
Lösung A	0.6 ml
Lösung C	0.8 ml
H <sub>2</sub> O	1.9 ml
10% APS	33.3 µl
TEMED	2.7 µl
Endvolumen	3.34 ml

Lösung A:	Acrylamid	40 %
	Bis-Acrylamid	1.04 %
Lösung B:	Tris/HCl	118.2 g pH 8.8
	SDS	2 g
	ad 500 ml H <sub>2</sub> O	
Lösung C:	Tris/HCl	39.40 g pH 6.8
	SDS	2 g
	ad 500 ml H <sub>2</sub> O	

SDS-Laufpuffer	
Glyzin	14.4 g
SDS	1 g
Tris/Base	3 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O	

Coomassie-Färbelösung	
5% Coomassie Brilliant Blue G250 in Methanol	200 ml
5% Coomassie Brilliant Blue R250 in H <sub>2</sub> O	200 ml
konzentrierte Essigsäure	40 ml
im Anschluss filtrieren	

Coomassie-Entfärbelösung	
Methanol	500 ml
Eisessig	100 ml
ad 1 l H <sub>2</sub> O	

### 3.2.4.3 Blotten und Entwicklung

Ein Western Blot ist ein spezifischer Nachweis für ein bestimmtes Protein, der auf der Detektion von speziellen Antikörpern beruht. Hierzu mussten die zu untersuchenden Proben zunächst mit einer SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Mittels einer Blot-Apparatur (Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad) wurden die so aufgetrennten Proteine auf eine Protan Nitrocellulose Transfer Membran (Whatman) übertragen, die zuvor in Blot-Puffer für 10 min inkubiert wurde. Zum Blotten wurde für 1 h von außen eine von der Anzahl bzw. Größe der Blots abhängige Stromstärke angelegt, eine Membran: 48 mA, zwei Membrane: 96 mA. Im Anschluss an das Blotten wurden die noch freien Bindungsstellen der Membran mit 3%iger Magermilch in TBS-T für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wurde die Membran mit dem für das zu detektierende Protein spezifischen primären Antikörper (verdünnt in 3%iger Magermilch) bei 4°C über Nacht inkubiert. Folgende primäre Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

	Verdünnung	
monoklonaler anti-Eap-Antikörper (Maus):	1:1000	J. Patti, Baltimore
polyklonaler anti-Eap-Antikörper (Kaninchen):	1:50000	U. Schubert, Gießen
polyklonaler anti-Hla-Antikörper (Schaf):	1:1000	Abcam

Im Anschluss wurde die Membran 3x für 15 min bei RT mit TBS-T gewaschen und der sekundäre Antikörper (verdünnt in TBS-T) für 1 h bei RT im Dunklen dazugegeben. Folgende sekundäre Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

	Verdünnung	
anti-Maus:	1:6000	Bio-Rad
anti-Kaninchen:	1:1000	Bio-Rad
anti-Schaf:	1:6000	Santa Cruz Biotechnology

Der sekundäre Antikörper bindet den primären Antikörper spezifisch und ist mit dem Enzym HRP (horseradish peroxidase) konjugiert. Dieses Enzym katalysiert durch Substrat-Zugabe eine Chemilumineszenz-Reaktion, die im Anschluss zur Detektion der Proteinbanden genutzt wird. Nach der Zugabe des zweiten Antikörpers wurde die Membran wieder wie zuvor gewaschen und im Anschluss die Proteine mittels Substrat sichtbar gemacht. Dazu wurden 1 ml ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) auf die Membran pipettiert. Dabei wird das in der ECL-Lösung enthaltene Substrat durch HRP unter Abstrahlung detektierbarer Lumineszenz umgesetzt. Diese Lumineszenz konnte mit Hilfe eines Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm™ ECL High Performance Chemiluminescence film; GE Healthcare) oder mit dem Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad) sichtbar gemacht bzw. die Bandenintensität quantitativ bestimmt werden.

Blot-Puffer	
Trizma	4.85 g
Glyzin	22.5 g
Methanol	400 ml
ad 2 l H <sub>2</sub> O	

TBS	
Tris	3 g
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
ad 1 l H <sub>2</sub> O	

TBS-T
0.1% Tween20 in TBS

### 3.2.5 ELISA

#### 3.2.5.1 Funktionsschema

Der ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein immunologisches Nachweisverfahren mit dessen Hilfe zum Beispiel Proteine nachgewiesen werden können. Hierbei nutzt man die Eigenschaft von Antikörpern, die spezifisch an das zu untersuchende Protein binden. Diese Antikörper sind mit einem Enzym markiert und können anschließend durch Zugabe eines Substrates eine Fluoreszenzreaktion katalysieren. Die Intensität dieser Reaktion wird gemessen und dient damit der quantitativen Bestimmung des Antigens. Es gibt verschiedene ELISA-Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode ist der Sandwich-ELISA. Dazu werden zunächst die Bindungsstellen des Bodens einer Mikrotiterplatte mit einem geeigneten spezifischen Antikörper abgesättigt. Anschließend wird die zu testende Probe dazugegeben, die an den Antikörper bindet. Danach wird mit einem weiteren spezifischen Antikörper (primärer Antikörper) inkubiert, der wiederum an das Protein binden kann. Im Anschluss folgt die Zugabe des letzten Antikörpers (sekundärer Antikörper), der an den zuvor zugegebenen primären Antikörper bindet und selbst mit einem Enzym beladen ist. Dieser Schritt dient der Verstärkung des Signals, da mehrere sekundäre Antikörper an den primären Antikörper binden können. Anschließend wird das Substrat

zugegeben, dass durch das Enzym, das am sekundären Antikörper gebunden ist, umgesetzt wird. Das Reaktionsprodukt kann im Anschluss gemessen werden (vgl. Abb. 3-2).

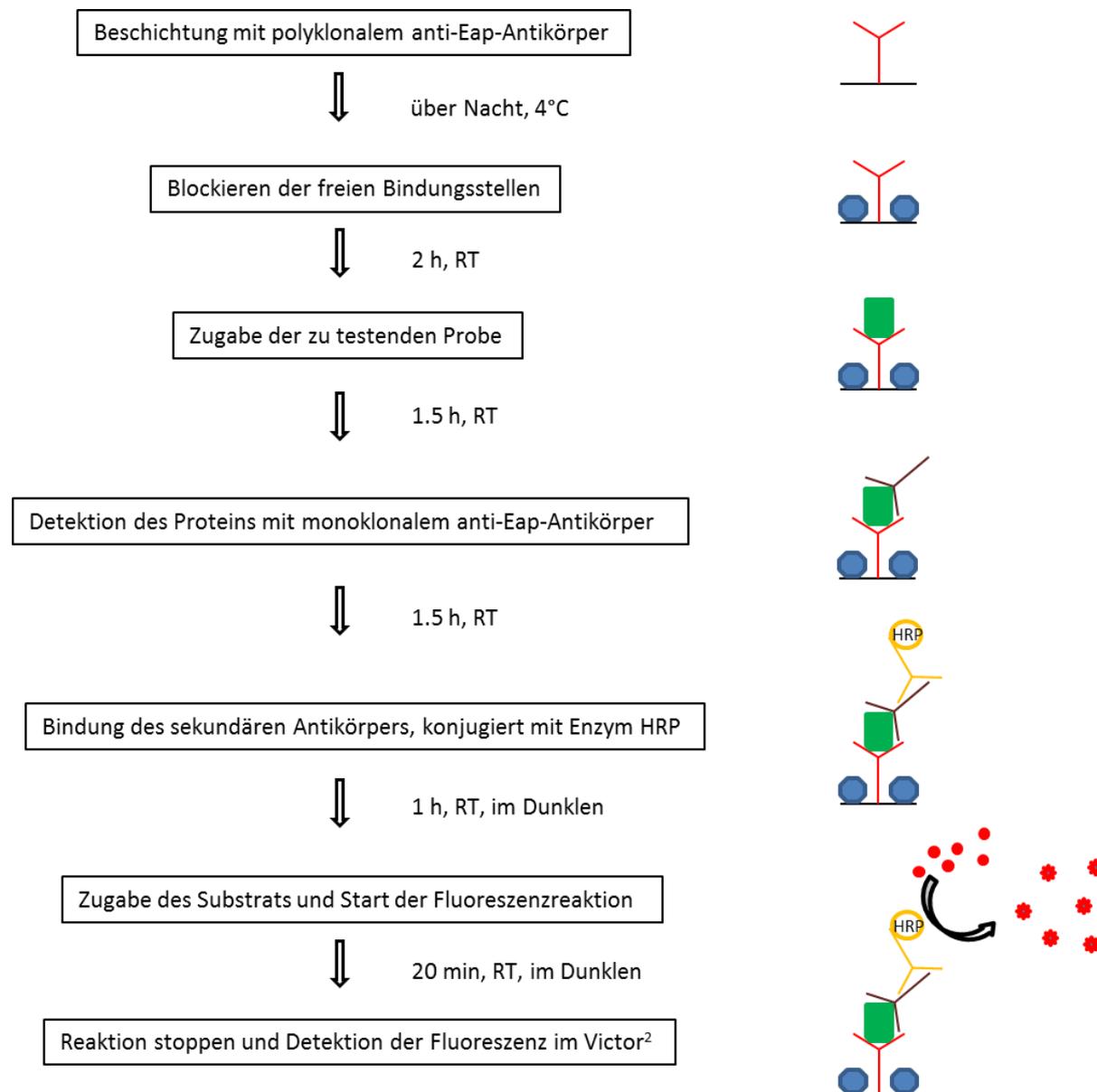


Abb. 3-2 Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs<sup>[3]</sup>.

### 3.2.5.2 Etablierung

Für die Etablierung des ELISAs wurde eine Anleitung aus "Current Protocols in Molecular Biology"<sup>[3]</sup> zur Orientierung verwendet. Es sollte zur Absättigung des Bodens der Mikrotiterplatte ein polyklonaler anti-Eap-Antikörper, zur Eap-Detektion ein monoklonaler anti-Eap-Antikörper (primärer Antikörper) und als sekundärer Antikörper ein anti-Maus-Antikörper verwendet werden. Die ELISA-Etablierung diente dazu, die richtigen Konzentrationen der hier benötigten Antikörper zu bestimmen.

Dazu wurden verschiedene Konzentrationen nach einem Schachbrettmuster (Abb. 3-3) auf die Mikrotiterplatten aufgetragen. Zuerst wurde jeweils die Hälfte des Bodens einer Mikrotiterplatte mit 1 µg/ml, 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml polyklonalem anti-Eap-Antikörper beschichtet und über Nacht abgedeckt bei 4°C im Kühlschrank belassen. Am nächsten Tag wurden die Platten ausgeklopft und alle Vertiefungen mit 100 µl PBS-BSA für 2 h bei RT blockiert. Anschließend wurden die Platten ausgeklopft und dreimal mit 200 µl PBS-T gewaschen. Es wurde eine Verdünnungsreihe des Proteins Eap vorgelegt mit folgenden Konzentrationen: 200 ng/ml, 50 ng/ml, 12.5 ng/ml, 3.125 ng/ml, 0.78 ng/ml und nur Puffer als negative Kontrolle. 50 µl dieser Verdünnungen wurden spaltenweise wie im Schema (Abb. 3-3) angegeben in die Vertiefungen pipettiert und 1.5 h bei RT belassen. Anschließend wurde die Platte ausgeklopft und fünfmal mit PBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde eine Verdünnungsreihe des monoklonalen anti-Eap-Antikörpers pipettiert mit folgenden Konzentrationen: 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62.5 ng/ml, 31.25 ng/ml und nur Puffer als negative Kontrolle. Es wurden 50 µl jeder Verdünnung reihenweise wie im Schema (Abb. 3-3) angegeben in die Vertiefungen pipettiert und 1.5 h bei RT belassen. Anschließend wurde die Platte ausgeklopft und fünfmal mit PBS-T gewaschen. Für 1 h bei RT im Dunklen wurde der anti-Maus-Antikörper inkubiert, von dem 50 µl einer 1:3000 Verdünnung in jede Vertiefung gegeben wurden. Die Platte wurde im Anschluss wieder ausgeklopft und wie zuvor fünfmal gewaschen. 100 µl Substrat (Substrate Reagent Pack, R&D Systems) wurden in jede Vertiefung überführt und im Dunklen inkubiert. 20 min später wurden pro Vertiefung 100 µl Stopplösung (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) zugegeben und die Fluoreszenz im Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer) vermessen. Anhand dieser Ergebnisse konnten die günstigsten Antikörperkonzentrationen bestimmt werden. Als zusätzliche Kontrollen wurden ebenfalls unbeschichtete Platten und Platten, bei denen eine Verdünnungsreihe von BSA statt Eap verwendet wurde, vermessen. Die Ergebnisse dieser Kontrollplatten dienten der Bestimmung der Hintergrundlumineszenz und es konnten zusätzlich unspezifische Antikörperbindungen erkannt werden.

Konzentration des monoklonalen AK [ng/ml]	Konzentration von Eap [ng/ml]						Konzentration von Eap [ng/ml]					
	200	50	12.5	3.125	0.78	n. K.	200	50	12.5	3.125	0.78	n. K.
500												
250												
125												
62.5												
31.25												
n. K.												
	polyklonaler AK 1. Konzentration						polyklonaler AK 2. Konzentration					

Abb. 3-3 Pipettierschema für die ELISA-Etablierung nach dem Schachbrett-Muster<sup>[3]</sup>.

PBS-BSA	5% BSA in PBS
PBS-T	0.05% Tween20 in PBS

### 3.2.5.3 Versuchsdurchführung

In dieser Arbeit sollte das Protein Eap mit Hilfe eines ELISAs nachgewiesen werden. Hierbei wurde nach dem gleichen Protokoll wie zur ELISA-Etablierung verfahren (vgl. 3.2.5.2). Lediglich die verwendeten Antikörperkonzentrationen hatten diesmal einen festen, aus der Etablierung stammenden Wert. So wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit je 50 µl polyklonalem anti-Eap-Antikörper (1 µg/ml in PBS) beschichtet. Nach dem Blockieren der freien Bindungsstellen wurden die zu testenden Proben in die Vertiefungen pipettiert. Die Proben sollten am besten in verschiedenen Verdünnungen vermessen werden. Dies dient einer genaueren Bestimmung und reduziert das Risiko, dass der lineare Messbereich eventuell verfehlt werden könnte. Zur Detektion wurden 50 µl monoklonaler anti-Eap-Antikörper (250 ng/ml in PBS-BSA) und anschließend 50 µl anti-Maus-Antikörper (1:3000 in PBS-BSA) zugegeben.

### 3.2.6 Proteine "spiken"

Proteine werden "gespikt", um deren Stabilität im Wirt und die Spezifität der Analyseverfahren zu überprüfen. Dazu wurden die zu untersuchenden Proteine in gepooltem Serum verdünnt und 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde 1 µl der Probe mit 9 µl PBS versetzt und mit 4x LD erhitzt (10 min, 80°C). Die Proben konnten anschließend im Western Blot auf ihre Stabilität geprüft werden.

### 3.2.7 Eap-Isolierung aus SA Newman

Jeweils 5 ml einer Übernachtskultur von dem Newman  $\Delta$ rsbUVWsigB Derivat IK184 wurden in 4x 500 ml MBB überführt und bei 37°C und 150 rpm über Nacht kultiviert. Anschließend wurde jede der vier Kulturen bei 4°C und 5000 g für 15 min pelletiert. Jedes Pellet wurde mit 150 ml PBS gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurden diese mit je 60 ml 1 M LiCl (pH 5.4 – 5.6) resuspendiert und für 2 h bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Durch Zentrifugation (4°C, 5000 g, 15 min) wurden die zellulären Bestandteile vom Überstand abgetrennt und dieser in 6x 20 cm lange Dialyseschläuche (Größe 10, Inf Dia 1/4", 31.7 mm: 15M Approx., Mediatech International Ltd) überführt. Die Dialyseschläuche mussten vor der Nutzung zunächst 10 min in 800 ml 2% NaHCO<sub>3</sub> und 1 mM EDTA (pH 8.0) gekocht und anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen werden. Danach wurden sie nochmals 10 min in 800 ml 1 mM EDTA (pH 8.0) gekocht, abgekühlt und nochmals mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die in die Dialyseschläuche gefüllten Proben wurden zweimal etwa 45 min in 3 l PBS bei 4°C unter Rühren dialysiert. Zum Konzentrieren der Proteinprobe wurden die Schläuche mit PEG (Polyethylenglykol) bestreut und bei 4°C für 1 – 2 h gekühlt. Anschließend wurde PEG mit H<sub>2</sub>O abgespült, alle Proben vereinigt und sterilfiltriert (0.22 µm Filter). Das Protein in der Lösung wurde mit Hilfe einer FPLC (BioLogic DuoFlow, Bio-Rad) über eine Mono S 5/50 GL Säule (GE Healthcare) weiter aufgereinigt. Dabei wurde die Methode des Ionenaustauschers genutzt. Die Matrix der Mono S Säule besitzt negativ geladene Sulfonat-Gruppen, die positiv geladene Proteine wie auch Eap binden können. Ungeladene oder negativ geladene Proteine werden einfach wieder von der Säule herunter gewaschen. Die gebundenen Proteine können mit einem Elutionspuffer wieder von der Säule gelöst werden. Dieser Puffer besitzt eine hohe Salzkonzentration und wird in einem linearen Gradienten zugegeben, so dass sich die Salzkonzentration langsam und gleichmäßig erhöht. Jedes Protein wird aufgrund seiner Bindungseigenschaften bei einer bestimmten Salzkonzentration von den Bindungsstellen der Matrix durch positive Ionen des Elutionspuffers verdrängt und von der Säule eluiert. Zum Waschen der Säule wurde in diesem Fall Puffer A (50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8.2) und zum Eluieren des Proteins ein linearer Gradient aus Puffer A und Puffer B (50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.2) verwendet. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 2 ml aufgefangen und mittels SDS-PAGE wurden die positiven Fraktionen bestimmt und vereinigt. Mit Hilfe von Centricons (Centriplus, Millipore) wurden die Proben weiter aufkonzentriert und in TBS umgepuffert. Das aufgereinigte Protein wurde sterilfiltriert und bei -70°C eingefroren. Zur Konzentrationsbestimmung von Eap wurde das BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Thermo Scientific) verwendet. Endotoxin-Freiheit wurde mit Hilfe des Limulus Amebocyte Lysate-Kits (LAL, Lonza) getestet. Beide Kits wurden nach den Protokollen der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

### 3.2.8 Hämolyse-Test

Der Hämolyse-Test gibt Aufschluss über die durch zytolytische Exoproteine hervorgerufene Hämolyse von Erythrozyten. Da die Hämolyse von SA in das Nährmedium sekretiert werden, wurden nur bakterielle Überstände für diesen Versuch verwendet. Dazu wurde eine Überstandkultur des benötigten Bakterienstamms abzentrifugiert (4°C, 5000 g, 10 min) und das Pellet in gleichem Volumen frischen Mediums resuspendiert. Anschließend wurde die Kultur auf verschiedene Kolben verteilt und je nach Versuch mit verschiedenen Zusätzen versehen. Alle Proben wurden 1 h bei 37°C und 150 rpm im Schüttler inkubiert und anschließend die Bakterien pelletiert (4°C, 5000 g, 5 min). Der bakterielle Überstand wurde sterilfiltriert und mit PBS folgendermaßen verdünnt: 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 und 1:8. 10 ml frisches humanes Vollblut wurde mit Li-Heparin-Röhrchen einem Spender entnommen und mit 4 ml steriler 0.9%iger NaCl-Lösung gemischt. Zum Abtrennen des Serums wurde diese Mischung zentrifugiert (1200 g, 5 min) und die Erythrozyten so lange mit 5 ml 0.9%iger NaCl-Lösung gewaschen bis der Überstand nicht mehr gelblich gefärbt war. Dann wurden die gewaschenen Erythrozyten mit 0.9%iger NaCl-Lösung bis zu einem Volumen von 5 ml aufgefüllt. 500 µl jeder Verdünnungsstufe der bakteriellen Überstände wurden in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 500 µl der Erythrozyten-Suspension gemischt. Dies wurde zunächst 30 min bei 37°C im Brutschrank und anschließend 30 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss wurden alle Proben abzentrifugiert (7000 g, 1 min), der Überstand 1:2 mit PBS verdünnt und die Absorption bei 540 nm gemessen (Unicam Helios-γ). Bei dieser Wellenlänge kann das aus lysierten Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin detektiert und anhand der Absorptionsintensität die Hämolyse in Relation zu positiver und negativer Kontrolle berechnet werden. Als negative Kontrolle diente eine Probe aus 500 µl Erythrozyten und 500 µl PBS (entspricht 0% Lyse), als positive Kontrolle wurden 500 µl Erythrozyten mit 500 µl PBS gemischt und per Ultraschall die Zellen lysiert (entspricht 100% Lyse). Als Nullwert (Blank) für die Messung im Photometer dienten 500 µl bakterieller Überstand mit 500 µl PBS.

### 3.2.9 Real-time PCR

Die Methode der real-time PCR dient der Messung der Expressionsrate bestimmter Gene. Da die produzierte mRNA per PCR nicht direkt detektiert werden kann, muss diese nach der Isolierung in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA kann anschließend mit spezifischen Primern in einer PCR quantitativ analysiert werden.

### 3.2.9.1 Primer-Optimierung

Die benötigte Konzentration der Primer, die bei einer real-time PCR eingesetzt werden, müssen zunächst durch eine Primer-Optimierung bestimmt werden. Dazu wurde ein Master Mix der PCR für jedes zu testende Primerpaar mit verschiedenen Primer-Konzentrationen angesetzt: 50 nM/50 nM, 50 nM/100 nM, 100 nM/50 nM, 100 nM/100 nM, 300 nM/300 nM, 900 nM/900 nM. In einem real-time Lauf wurden anschließend diese Konzentrationen getestet. Die optimale Konzentration ist diejenige, die mit einer exponentiellen Verdopplung der cDNA zu möglichst niedrigen CT-Werten (cycle threshold) führt und zusätzlich keine Amplifikationen in den negativen Kontrollen aufweist. Liegt dies bei mehreren Primer-Kombinationen vor, so wird die niedrigste der möglichen Primer-Konzentrationen ausgewählt. Zusätzlich wurde die dadurch bestimmte optimale Konzentration anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen an cDNA in einem real-time Lauf getestet und eine Standardkurve erstellt. Folgende cDNA-Konzentrationen wurden verwendet: 20 ng/μl, 4 ng/μl, 0.8 ng/μl, 0.16 ng/μl, 0.032 ng/μl, 0.0064 ng/μl und 0.00128 ng/μl. Liegt die Steigung der dadurch erhaltenen Standardkurven zwischen einem Wert von -3.3 und -3.4 können die Primer in der vorher bestimmten Konzentration zur Analyse verwendet werden. In Tab. 3-4 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer (Eurofins MWG Operon) zusammen mit den jeweils optimalen Konzentrationen aufgelistet.

Primer		Sequenz	Konzentration
<i>arlR</i>	forward	5'-CAGACGATTATATAGTTAAGCCGTTTGA-3'	300 nM
<i>arlR</i>	reverse	5'-CGTTGACATCGATAATATCCTTTTGT-3'	300 nM
<i>eap</i>	forward	5'-AAGCGTCTGCCGCAGCTA-3'	300 nM
<i>eap</i>	reverse	5'-TGCATATGGAACATGGACTTTAGAA-3'	300 nM
<i>gyrB</i>	forward	5'-GACTGATGCCGATGTGGA-3'	300 nM
<i>gyrB</i>	reverse	5'-AACGGTGGCTGTGCAATA-3'	300 nM
<i>hla</i>	forward	5'-GAACCCGGTATATGGCAATCAA-3'	900 nM
<i>hla</i>	reverse	5'-GGAAGTTCTCTGCTGCTTTCATAG-3'	900 nM
<i>hlb</i>	forward	5'-AGATGGTGGCGTAGCGATTG-3'	300 nM
<i>hlb</i>	reverse	5'-TCGAATCCACAACCGCTTTT-3'	300 nM
<i>hlgA</i>	forward	5'-GCAGTTGGTTTAATAGCCCCTTT-3'	300 nM
<i>hlgA</i>	reverse	5'-TCTTTTGATGATTTCTGCACCTTG-3'	300 nM
<i>RNAIII</i>	forward	5'-AGGAGTGATTTCAATGGCACAAG-3'	300 nM
<i>RNAIII</i>	reverse	5'-TGTGTCGATAATCCATTTTACTAAGTCA-3'	300 nM
<i>saeS</i>	forward	5'-AAACTTGCTTGATAATGCGCTAAA-3'	50 nM
<i>saeS</i>	reverse	5'-GTTCTGGTATAATGCCAATACCTTCA-3'	100 nM

<i>sarA</i>	forward	5'-TCAATGGTCACTTATGCTGACAAA-3'	300 nM
<i>sarA</i>	reverse	5'-TCAATACAGCGAATTCTTCAAAGC-3'	300 nM
<i>sigB</i>	forward	5'-CGAACGAGAAATCATACAATGTACGT-3'	100 nM
<i>sigB</i>	reverse	5'-AAACCGATACGCTCACCTGTCT-3'	100 nM

Tab. 3-4 Sequenzen der verwendeten Primer für real-time PCR.

### 3.2.9.2 Kultivierbedingungen und Probenvorbereitung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten real-time PCR-Versuche wurden nach folgendem Protokoll angefertigt. Das benötigte Nährmedium wurde mit Hilfe einer Übernachtskultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0.1 angeimpft und 6 h bei 37°C und 150 rpm im Schüttler kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf verschiedene vorgewärmte Kolben verteilt und je nach Versuch mit verschiedenen Zusätzen versetzt. Diese Mischung wurde erneut bei 37°C und 150 rpm im Schüttler inkubiert und nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben (LB-Kulturen: 1 ml, RPMI-Kulturen: 2 ml) entnommen. Diese wurden zentrifugiert (4°C, 5000 g, 5 min) und die Bakterienpellets in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren. Die aufgetauten Bakterien wurden mechanisch mit einer Lysing Matrix B (MP Biomedicals) aufgeschlossen, die RNA mit dem NucleoSpin RNA II-Kit von Macherey-Nagel isoliert und die Konzentration photometrisch bestimmt. 5 µg RNA von jeder Probe wurden zum DNase Verdau nach Protokoll des Turbo-DNA-free™ Kits (Ambion) eingesetzt. Anschließend folgte die Umschreibung der RNA in cDNA mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) mit dem folgenden Temperatur-Programm im PCR-Gerät:

25°C	37°C	85°C
10 min	120 min	5 s

50 ng der so erhaltenen cDNA wurden mittels Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) per real-time PCR (ABI Prism 7000 SDS) analysiert. Die Expression der mRNA der verschiedenen Gene wurde mit Hilfe des Housekeeping-Gens *gyrB* nach der  $\Delta$ CT-Methode normiert. Als Kontrolle für die Abwesenheit von genomischer DNA wurde die aufgereinigte RNA ebenfalls für das Housekeeping-Gen *gyrB* getestet.

### 3.2.9.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der real-time PCR-Daten wurde der Mann-Whitney Rangsummen Test verwendet. Hierfür wurden die Rohdaten vor der Normierung der Werte auf die Kontrollen benutzt. Es wurde stets auf signifikante Unterschiede der Messwerte im

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle geprüft. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Werte anschließend auf die Kontrollen normiert und in einem Schaubild graphisch dargestellt. Die p-Werte wurden folgendermaßen festgelegt: \*  $p \leq 0.03$ , \*\*  $p \leq 0.003$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

## 4 Ergebnisse

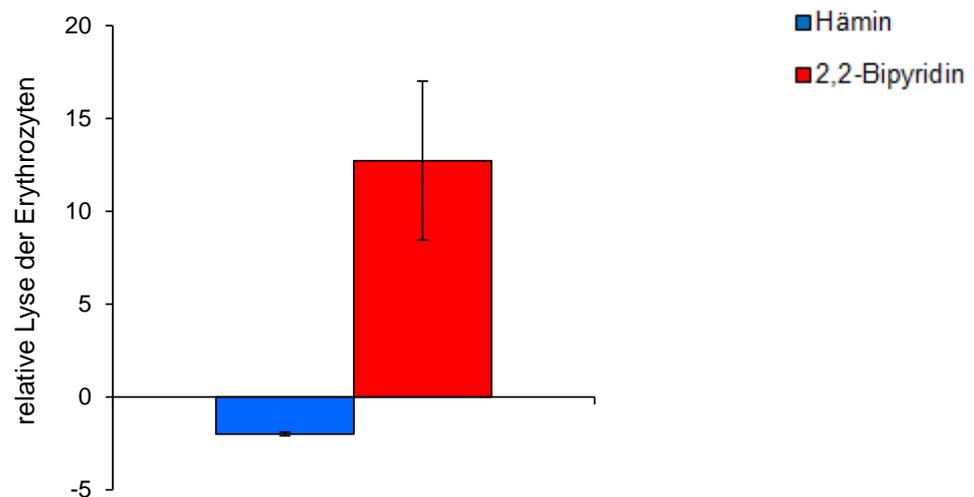
### 4.1 Auswirkungen der Eisenverfügbarkeit im Nährmedium auf LS1

#### 4.1.1 Veränderung der Hämolyserate

SA benötigt Eisen in einer Reihe zellulärer Prozesse wie z. B. dem Elektronentransport oder der Nukleotidsynthese<sup>[67]</sup>. Mit Hilfe von Hämolytinen kann die eisenkomplexierende Häm-Untereinheit aus Erythrozyten akquiriert werden. Es ist bereits bekannt, dass Eisenmangel zu einer erhöhten Expression der Hämolytine in SA und damit zu einer größeren Hämoglobinfreisetzung führt<sup>[101]</sup>. Ob und wie sich aber auf der anderen Seite die vorhandene Eisenkonzentration auf die Hämolyse auswirkt, ist bisher noch nicht im Detail untersucht worden.

Um Änderungen in der Hämolyserate feststellen zu können, wurde ein Hämolyse-Test unter Eisenmangel-Bedingungen sowie unter Eisenzugabe in Form von Hämin untersucht. Dazu wurden Kulturen des stark hämolytischen SA Isolates LS1 für 1 h mit Hämin oder 2,2'-Bipyridin zur Eisenkomplexierung inkubiert und anschließend die bakteriellen Überstände, in denen sich die Hämolytine befinden, sterilfiltriert. Diese Überstände wurden mit humanen Erythrozyten gemischt und die Lyserate der Blutzellen wurde durch die photometrische Detektion von freigesetztem Hämoglobin bestimmt.

Die Hämolyserate, die aus Überständen von Kulturen mit zugesetztem Hämin bestimmt wurde, war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um den Faktor 2 reduziert (Abb. 4-1). Im Gegensatz dazu wurden mehr Erythrozyten lysiert, wenn in der Bakterienkultur ein Eisenmangel durch 2,2'-Bipyridin induziert wurde. Die Hämolyserate wurde dabei um den Faktor 12 erhöht. Diese Experimente weisen damit darauf hin, dass die Verfügbarkeit von Eisen die Hämolyserate von LS1 stark zu beeinflussen vermag.



**Abb. 4-1 Hämolyse-Test mit LS1.** LS1 wurde für 1 h bei 37°C mit 4  $\mu$ M Hämmin bzw. 250  $\mu$ M 2,2'-Bipyridin in LB kultiviert. Die Überstände wurden mit gewaschenen humanen Erythrozyten inkubiert und die Lyserate der Blutzellen durch Messung des dabei freigesetzten Hämoglobins bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Aufgetragen ist die relative Änderung der Lyserate durch Addition der Zusätze im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In der Abbildung sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

#### 4.1.2 Veränderung der Expression der Hämolytine

Aus den Ergebnissen des Hämolyse-Tests (vgl. Abb. 4-1) resultierte die Frage, ob die verschiedenen Eisenkonzentrationen einen Einfluss auf die Aktivität der Hämolytine haben oder ob eine Regulation auf der Expressionsebene dieser Proteine vorliegt.

Um diese Frage zu beantworten, wurden LS1 Kulturen mit Hämmin bzw. 2,2'-Bipyridin angeimpft und die bakteriellen Überstände nach 6 h sterilfiltriert. Diese wurden anschließend auf das wichtigste und in den größten Konzentrationen vorkommende Hämolytin, das  $\alpha$ -Hämolytin (Hla), im Western Blot untersucht.

Die Messungen ergaben, dass in der Probe, der 2  $\mu$ M Hämmin zugegeben wurde, weniger Hla vorhanden ist als in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4-2). Mit 4  $\mu$ M Hämmin nahm die Hla-Menge weiter ab, so dass eine antiproportionale Konzentrationsabhängigkeit der Hla-Menge zur Hämmin-Konzentration zu erkennen war. Durch Quantifizierung der Bandenintensitäten und Normierung auf die unbehandelte Kontrolle konnten diese Unterschiede berechnet werden. Die Hla-Menge nach 2  $\mu$ M Hämmin-Zugabe betrug demnach noch 30% und nach 4  $\mu$ M Hämmin-Zugabe nur noch 17% der Hla-Menge der Kontrollprobe. Im Gegensatz dazu vergrößerte sich die Hla-Proteinmenge unter eisenreduzierten Bedingungen. Auch hier konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Hla-Menge und der Konzentration von 2,2'-Bipyridin erkannt werden. Hier ist die Hla-Menge mit 125  $\mu$ M bzw. 250  $\mu$ M 2,2'-Bipyridin um den Faktor 1.21 bzw. 3.19 erhöht. Das bedeutet, dass mit steigender Hämmin-Konzentration

weniger Hla produziert wurde, während eine Abnahme der Eisenkonzentration eine Erhöhung der Hla-Menge zur Folge hatte.

	K	µM Hämin		µM 2,2'-Bipyridin	
		2	4	125	250
rel. Bandenintensität	1	0.30	0.17	1.21	3.19

**Abb. 4-2 Abhängigkeit der Hla-Menge von der verfügbaren Eisenkonzentration im Medium.** LS1 wurde 6 h mit 2 und 4 µM Hämin bzw. 125 und 250 µM 2,2'-Bipyridin in LB kultiviert. Die bakteriellen Überstände wurden mittels Western Blot analysiert und die gemessenen Bandenintensitäten auf die Kontrolle (K) normiert. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für drei unabhängige Wiederholungen.

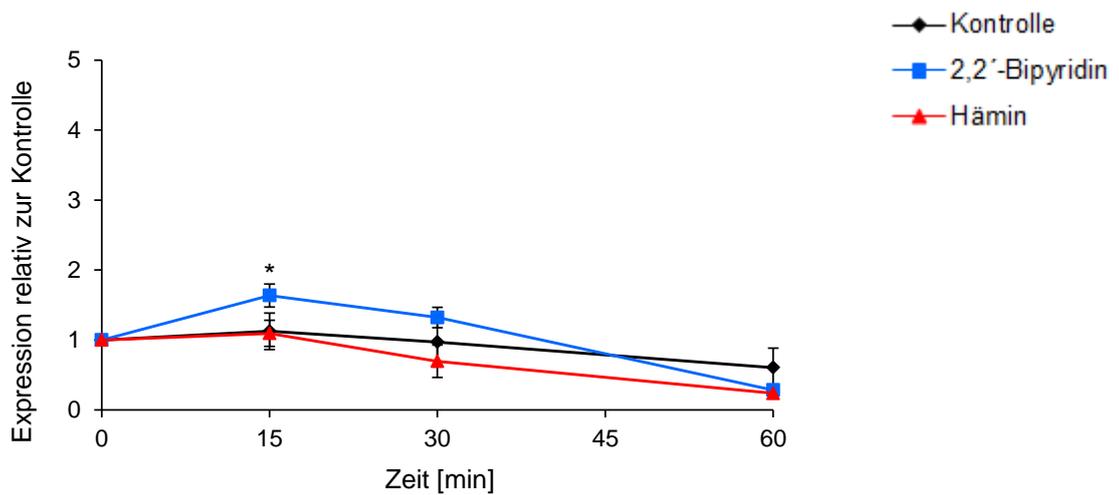
Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor dargestellten Resultate aus dem Hämolyse-Test und weisen darauf hin, dass diese eisenabhängigen Veränderungen der Hämolyserate auf eine Zu- bzw. Abnahme der Hla-Proteinmenge zurückzuführen sind. Um zu testen, ob diese Effekte auch auf transkriptioneller Ebene sichtbar sind, wurden die Expressionsraten der wichtigsten Hämolsine in Abhängigkeit der äußeren Eisenkonzentration untersucht.

Um dies zu testen wurde zu 6-stündigen LS1 Kulturen Hämin bzw. 2,2'-Bipyridin gegeben, über einen Zeitraum von 1 h zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und anschließend davon die RNA isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und diese mit Hilfe von spezifischen Primern für die drei wichtigsten Hämolsin-Gene [ $\alpha$ -Hämolsin (*hla*),  $\beta$ -Hämolsin (*hlb*) und die S-Klassen-Komponente des  $\gamma$ -Hämolsins (*hlgA*)] in einer real-time PCR analysiert.

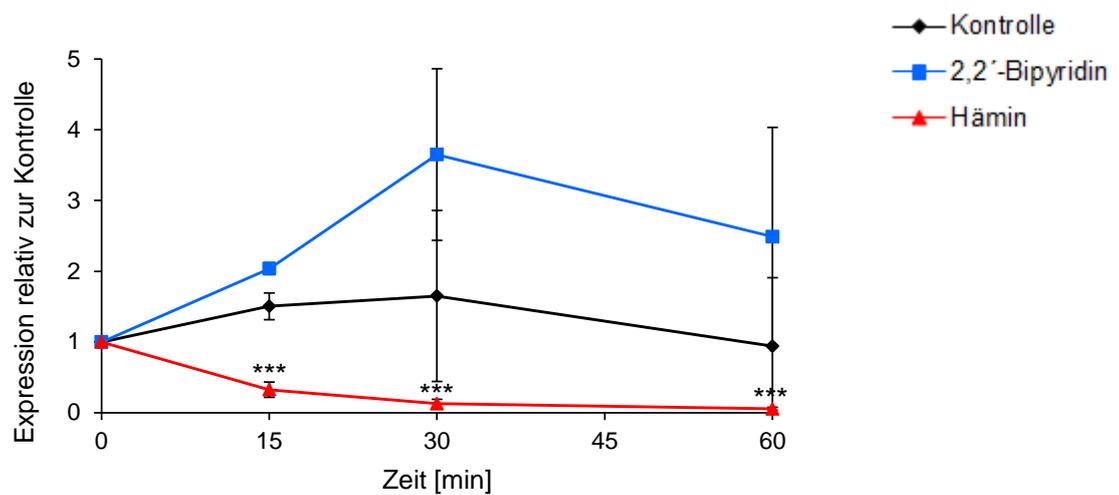
Auch hier zeigte sich, dass die Transkription der Hämolsin-Gene im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch Hämin-Zugabe deutlich reduziert wurde (Abb. 4-3). Die Zugabe von 2,2'-Bipyridin hingegen bewirkte eine klare Zunahme der Expression dieser Gene, während relativ konstante Werte in den Kontrollen ohne Zusätze im Wachstumsmedium beobachtet werden konnten. Bei fast allen untersuchten Genen konnten deutliche Unterschiede bereits 15 min nach Zugabe der beiden Moleküle festgestellt werden, die bei etwa 30 min ein Maximum erreichten und sich 1 h nach Zugabe wieder dem Kontrollwert annäherten. Dabei wurde die *hla* Expression 30 min nach Hämin-Zugabe um einen Faktor von 1.4 reduziert, während es 30 min nach 2,2'-Bipyridin-Zugabe zu einer 1.4-fachen Induktion der Expression kam. Die beobachteten Unterschiede sind jedoch sehr gering und ergeben nur 15 min nach 2,2'-Bipyridin-Zugabe einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Für die Expression der weiteren Hämolsin-Gene zeigten sich jedoch deutlich klarere Effekte. Die Expression von *hlb* wurde 30 min nach Hämin-Zugabe 12.9-fach reduziert und durch Eisenmangel 2.2-fach induziert. Hier konnte eine hoch-signifikante

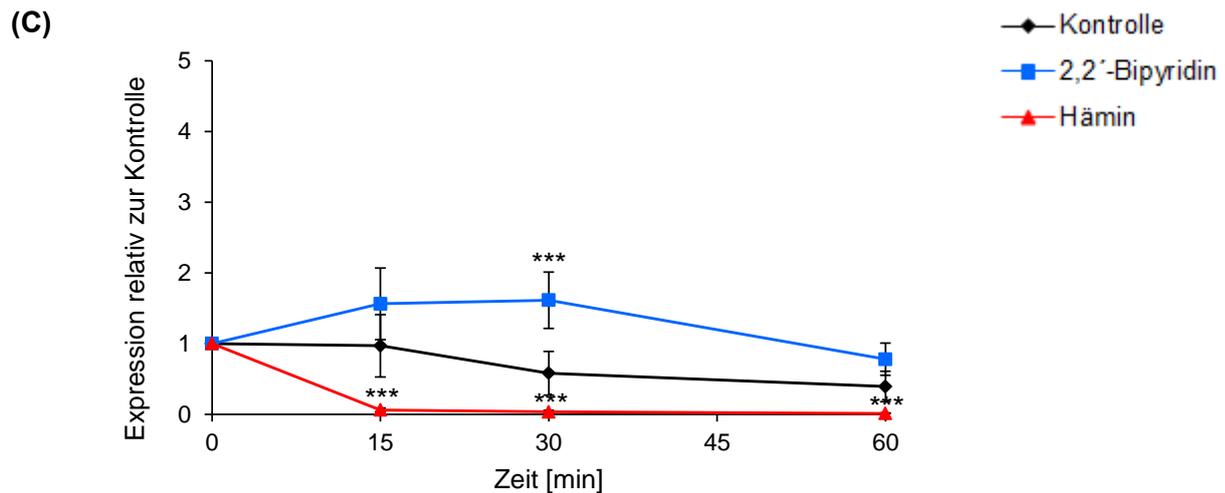
Reduktion der Expression durch Hämin zu allen analysierten Zeitpunkten beobachtet werden, während die Induktion durch Eisenmangel keine Signifikanz ergab. Die *hlgA* Expression verhielt sich ähnlich in ihrer Veränderung nach Zugabe der Supplemente wie die *hfb* Expression. Mit Hämin wurde diese 16.7-fach reduziert und unter Eisenmangel lag eine Induktion um den Faktor 2.8 vor. Hier konnte aber für beide Zusätze eine signifikante Veränderung bestimmt werden.

(A)



(B)





**Abb. 4-3 Bestimmung der Transkriptionsveränderungen der Hämolytase durch Eisenmangel und Hämin-Zugabe.** Eine 6-stündige LS1 Kultur in LB wurde mit 250  $\mu\text{M}$  2,2'-Bipyridin oder 4  $\mu\text{M}$  Hämin versetzt und es wurden über einen Zeitraum von 1 h Proben für die RNA-Isolation entnommen. mRNA-Levels von *hla* (A), *hlyB* (B) und *hlgA* (C) wurden mittels real-time PCR bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen (\*  $p \leq 0.03$ , \*\*  $p \leq 0.003$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

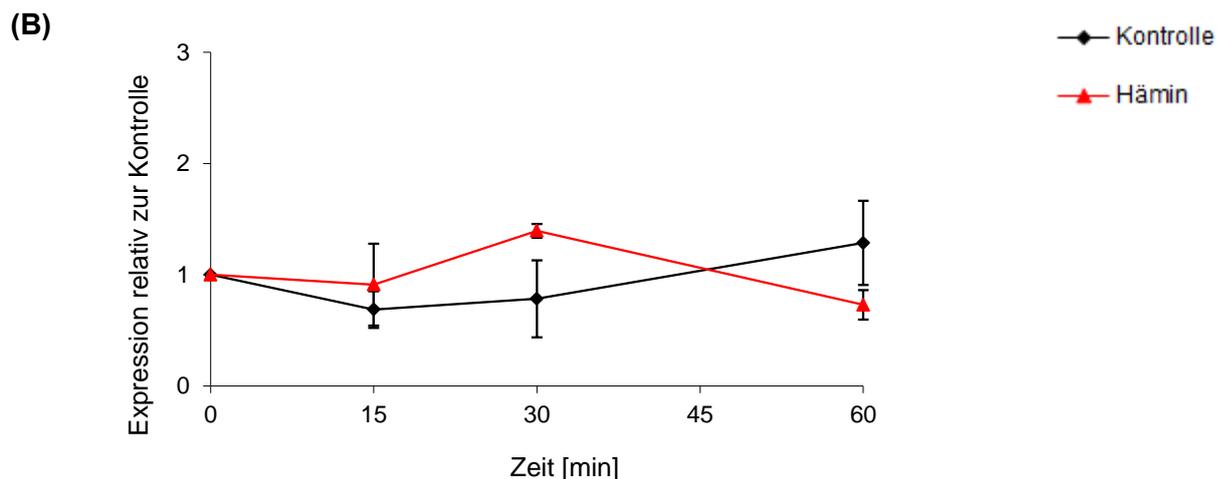
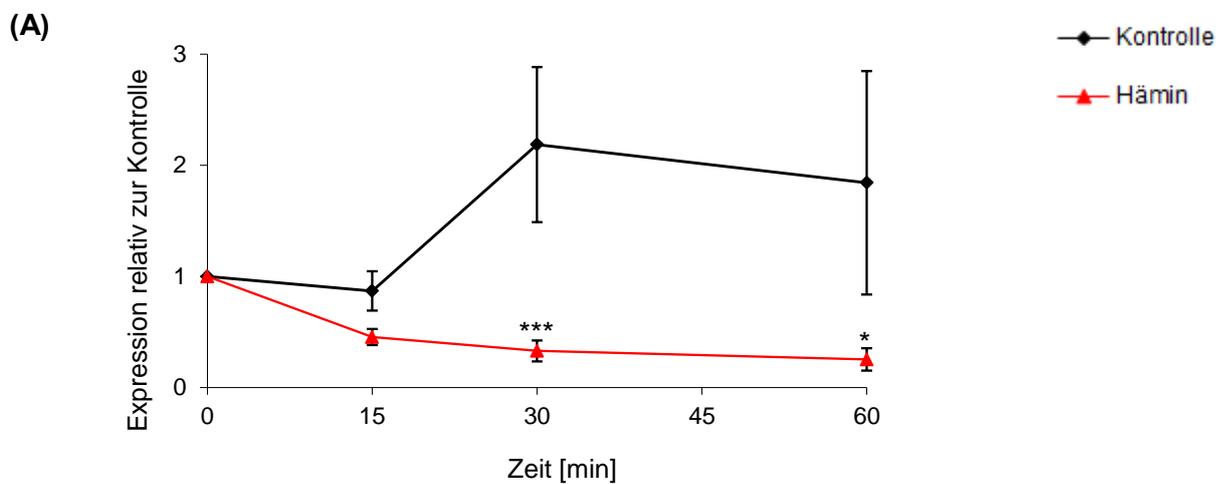
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei allen untersuchten Hämolytase-Genen unter Eisenmangel eine Induktion der Expression und mit Hämin eine Reduktion der Expression beobachtet werden konnte. Dabei wurden bei dem  $\alpha$ -Hämolytase die kleinsten Effekte und bei dem  $\gamma$ -Hämolytase die größten Effekte beobachtet. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Hämin, konträr zu den Hämolytasedaten, in allen Fällen eine größere Änderung in der Expression zur Folge hatte als der induzierte Eisenmangel durch 2,2'-Bipyridin. Des Weiteren zeigte sich, dass diese Regulierung bereits auf der Transkriptionsebene stattfindet.

#### 4.1.3 Änderungen der Transkriptionsrate verschiedener Regulatoren

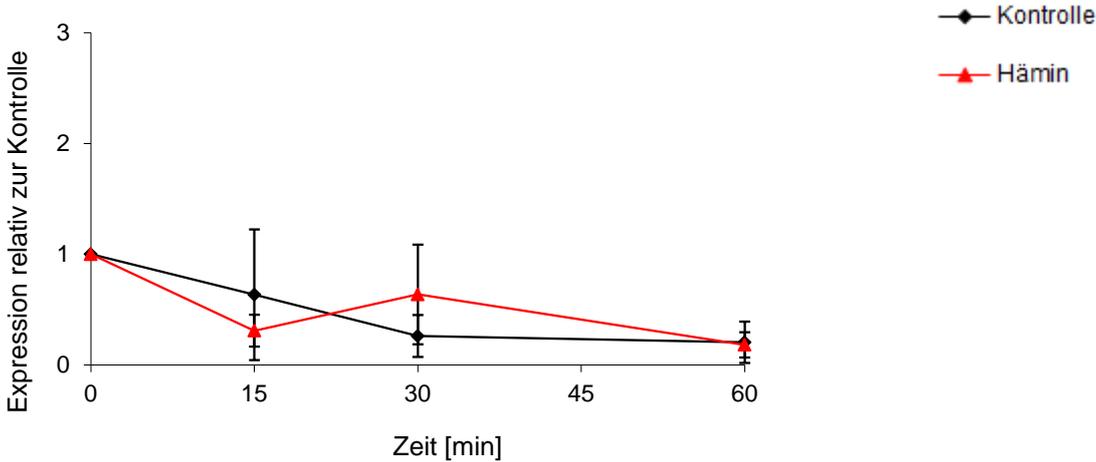
Um den Effekt, der durch die Eisenverfügbarkeit auf die Expression der Hämolytase in den vorherigen Experimenten beobachtet wurde, weiter verstehen zu können, sollten verschiedene Regulatoren auf ihre Reaktionen unter diesen Konditionen untersucht werden. Da die Wirkung von Hämin im Rahmen dieser Arbeit im Vordergrund stand und im Gegensatz zu den Eisenmangel-Bedingungen ein größerer Effekt auf der Transkriptionsebene zu erkennen war, wurden die zu untersuchenden Regulatoren zunächst nur mit Hämin-Zugabe getestet. Folgende Regulatoren, die alle eine zentrale Rolle in der Steuerung der Genexpression der Hämolytase spielen, wurden in diesem Experiment untersucht: Sae (SA exoprotein expression), Arl (autolysis-related locus), RNAIII (der Effektor des Agr Systems, accessory gene regulator), SarA (staphylococcal accessory regulator) und SigB (Sigmafaktor).

Um deren Reaktion auf Hämin zu testen wurde wie zuvor zu 6-stündigen LS1 Kulturen Hämin gegeben, über einen Zeitraum von 1 h zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und mit einer real-time PCR analysiert.

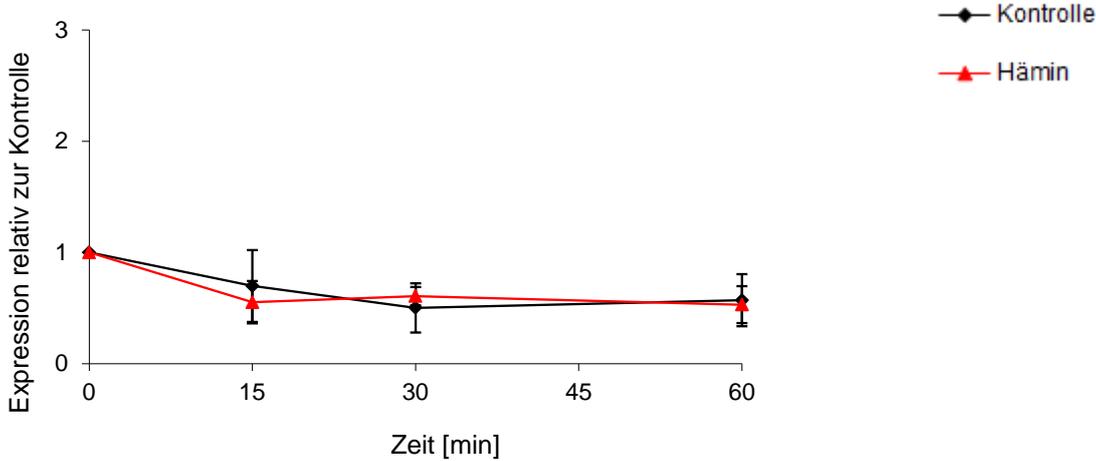
Die Ergebnisse in Abb. 4-4 zeigen deutlich, dass außer bei der Transkription von *sae* keine klaren Auswirkungen durch Hämin-Zugabe in diesem Zeitraum beobachtet werden konnten. Weder *arl*, *RNAIII*, *sarA* oder *sigB* zeigten eine signifikante Veränderung in ihrer Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die *sae* Expression hingegen wurde durch Hämin um einen Faktor von maximal 6.6 reduziert. Dieser Effekt trat wie bei den Hämolytinen ebenfalls 30 min nach Zugabe auf und weist darauf hin, dass die *sae* Transkription in ähnlicher Weise wie die Hämolytine durch Hämin beeinflusst wird.

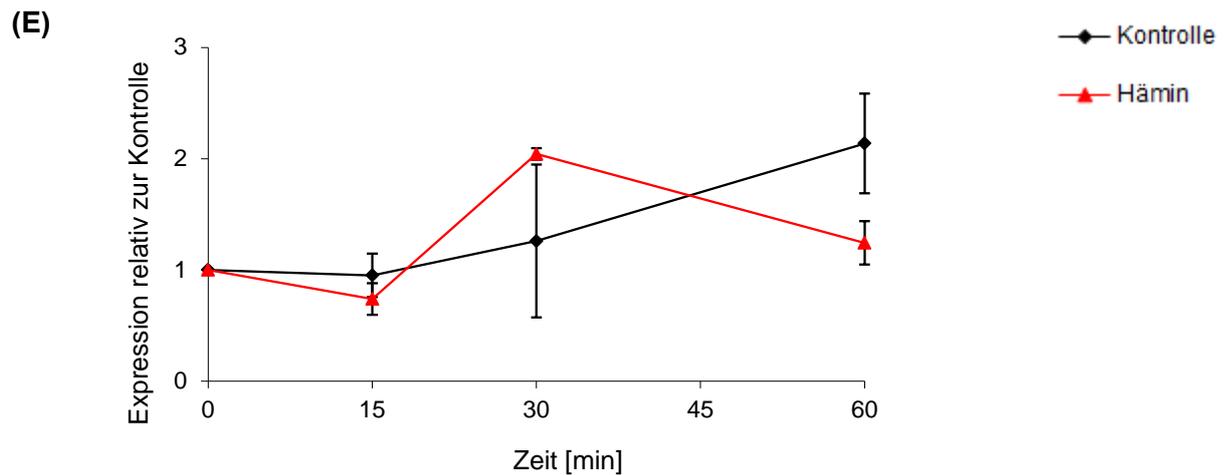


(C)



(D)

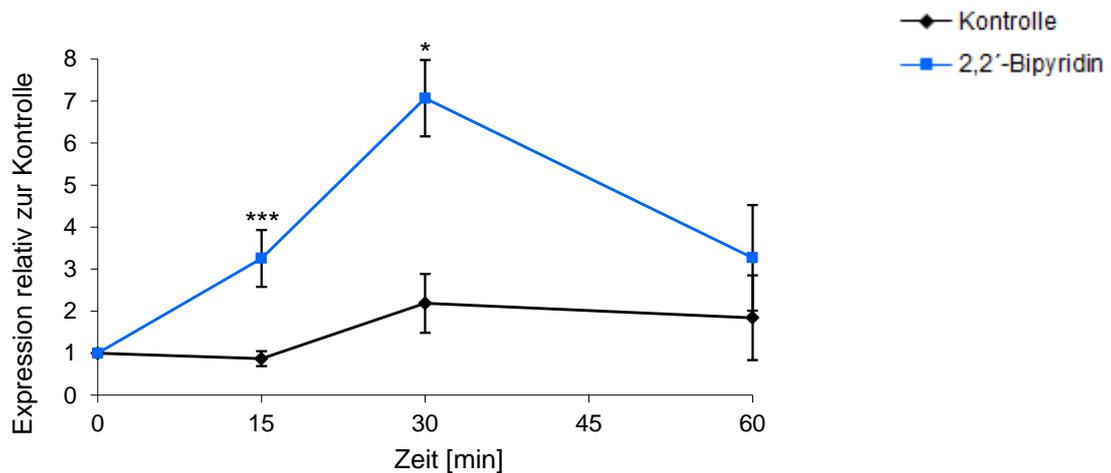




**Abb. 4-4 Bestimmung der Transkriptionsveränderungen verschiedener Regulatoren durch Hämin-Zugabe.** Eine 6-stündige LS1 Kultur in LB wurde mit 4  $\mu$ M Hämin versetzt und es wurden über einen Zeitraum von 1 h Proben für die RNA-Isolation entnommen. mRNA-Levels von *sae* (A), *arl* (B), *RNAIII* (C), *sarA* (D) und *sigB* (E) wurden mittels real-time PCR bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen (\*  $p \leq 0.03$ , \*\*  $p \leq 0.003$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

Zur Vervollständigung wurde die Auswirkung von Eisenmangel auf die Expression von *sae* ebenfalls untersucht.

Auch in diesem Experiment ist zu erkennen, dass die Expression von *sae* nach 2,2'-Bipyridin-Zugabe signifikant um einen Faktor von maximal 3.2 induziert wurde (Abb. 4-5). Der Unterschied der Expressionen von *sae* in dieser Messung erreichte ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle nach 30 min sein Maximum.



**Abb. 4-5 Bestimmung der Transkriptionsveränderungen des Regulators Sae durch Eisenmangel.** Eine 6-stündige LS1 Kultur in LB wurde mit 250  $\mu$ M 2,2'-Bipyridin versetzt und es wurden über einen Zeitraum von 1 h Proben für die RNA-Isolation entnommen. mRNA-Levels von *sae* wurden mittels real-time PCR bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen (\*  $p \leq 0.03$ , \*\*  $p \leq 0.003$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

Diese Resultate weisen darauf hin, dass der Regulator Sae eine zentrale Rolle in der Reaktion des Bakteriums auf Eisenanwesenheit spielen könnte.

#### 4.1.4 Veränderung der Expression von *sae* und den Hämolytinen in RPMI

Um die Kulturbedingungen der Bakterien den Gegebenheiten im menschlichen Körper etwas anzunähern und mediumspezifische Auswirkungen ausschließen zu können, wurden die Expressionsanalysen in RPMI wiederholt. RPMI ist ein chemisch definiertes Medium, dem kein Eisen von außen zugesetzt worden ist. Damit ähnelt es in dieser Hinsicht den Bedingungen z. B. in der Blutbahn, da hier ebenfalls nahezu kein freies Eisen vorliegt.

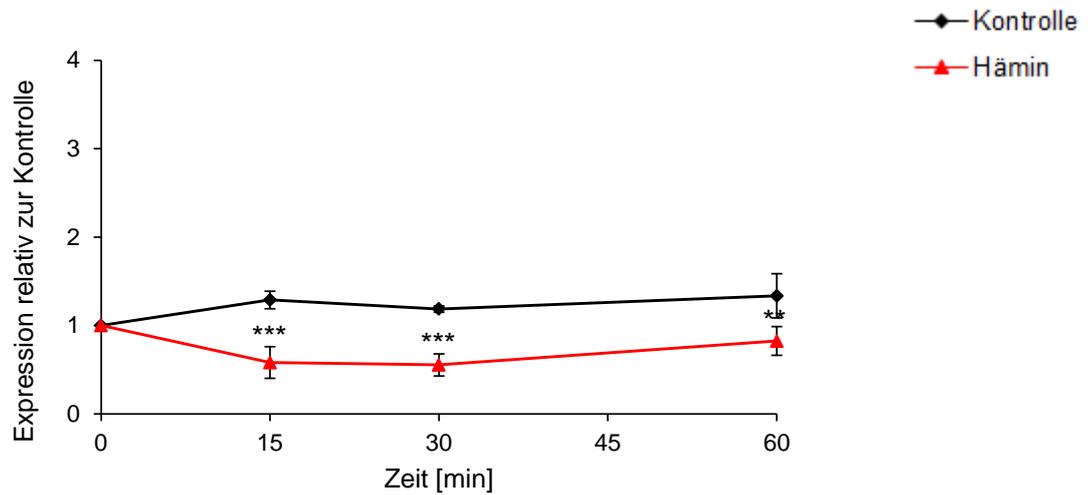
Aufgrund der im Vergleich zum Vollmedium LB deutlich geringeren Nährstoffkonzentration in RPMI kommt es in letzterem Medium zu einer klaren Wachstumsverzögerung, die bei der Interpretation der Expressionsdaten zu berücksichtigen ist.

Für diese Untersuchung wurde zu 6-stündigen LS1 Kulturen Häm in gegeben, über einen Zeitraum von 1 h zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und anschließend davon die RNA isoliert. Die RNA wurde in einer real-time PCR analysiert.

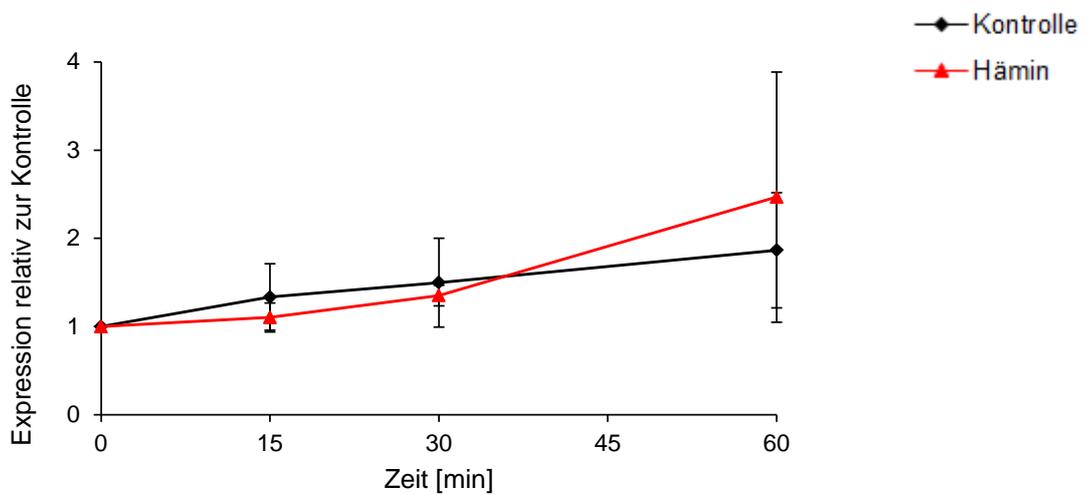
Die Ergebnisse in Abb. 4-6 zeigen deutlich, dass Häm in RPMI wie zuvor in LB die Expression fast aller untersuchten Gene beeinflusst. Die größten Unterschiede konnten 15 bis 30 min nach Häm-Zugabe beobachtet werden. Nach 60 min näherten sich die Expressionsraten wieder den Kontrollwerten an. Die Reduktion der *sae* Expression zeigte zwar hoch-signifikante Unterschiede zur Kontrolle, erreichte aber nur relativ kleine Veränderungen (15 min: -2.2, 30 min: -2.1). Die *hla* Expression hingegen wurde durch Häm in

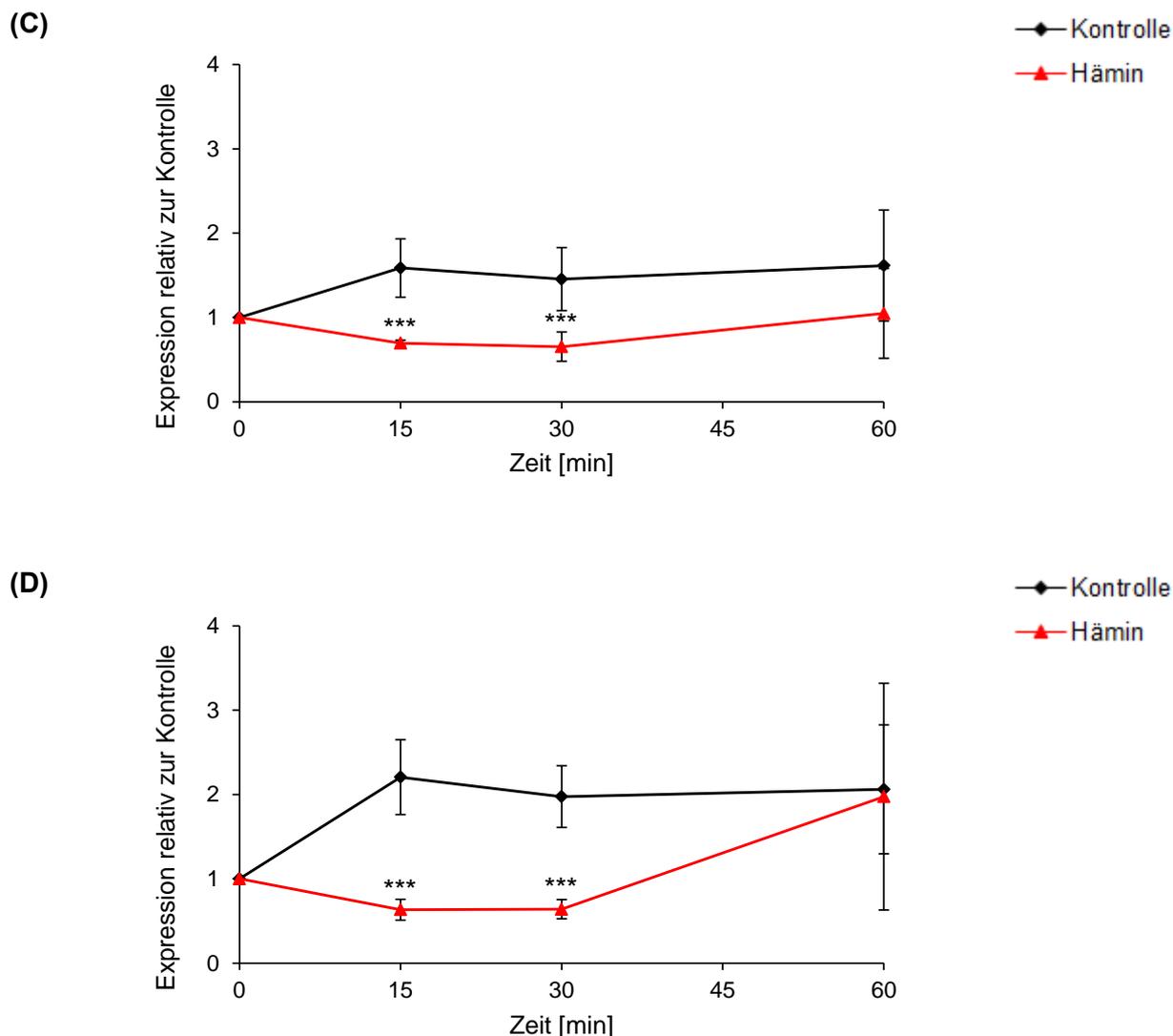
in RPMI gar nicht beeinflusst und verhielt sich wie die unbehandelte Kontrolle. *hIb* wurde in einer vergleichbaren Größenordnung wie die *sae* Expression reduziert (15 min: -2.3, 30 min: -2.2). Der größte Effekt konnte bei *hIgA* beobachtet werden. Die Expression wurde hier nach 15 min signifikant um den Faktor 3.5 reduziert.

(A)



(B)





**Abb. 4-6 Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sae* und den Hämolytinen durch Hämin-Zugabe in RPMI.** Eine 6-stündige LS1 Kultur in RPMI wurde mit 4  $\mu\text{M}$  Hämin versetzt und es wurden über einen Zeitraum von 1 h Proben für die RNA-Isolation entnommen. mRNA-Levels von *sae* (A), *hla* (B), *hlyB* (C) und *hlyA* (D) wurden mittels real-time PCR bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen (\*  $p \leq 0.03$ , \*\*  $p \leq 0.003$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

Dieser Versuch verdeutlichte, dass die Expression der untersuchten Gene mit Ausnahme von *hla* in RPMI ebenfalls vergleichbar wie in LB durch Hämin reduziert wurde. Zur weiteren Untersuchung dieses Effekts sollten LS1 Mutanten hergestellt und ebenfalls unter den gleichen Bedingungen getestet werden.

## 4.2 Vergleich der Reaktion von LS1 und den Mutanten LS1 $\Delta$ sae und LS1 $\Delta$ fur auf Hämin-Zugabe

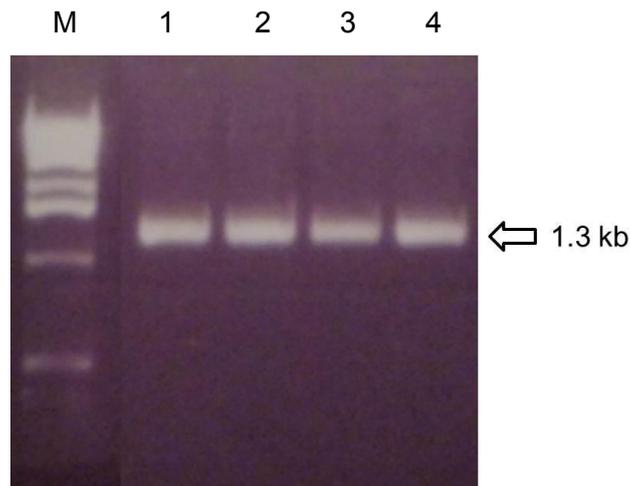
### 4.2.1 Herstellung der LS1 Mutanten

Da der "ferric uptake regulator" Fur, ein Repressor, der durch Eisenanwesenheit aktiviert wird bzw. Eisen als Kofaktor bindet und dadurch in seine aktive Form überführt wird, einen der wichtigsten Eisen-Regulatoren von SA darstellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit neben der bereits bestehenden sae Mutante eine LS1  $\Delta$ fur Mutante hergestellt. Die dritte Mutante, die analysiert werden sollte, war eine LS1  $\Delta$ srtA Mutante, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden sollte. Die Sortase ist ein Protein, das indirekt durch die Verankerung von Häm-Transportproteinen in die Zellwand an der Aufnahme von Hämin ins Zytoplasma der Bakterien beteiligt ist<sup>[67]</sup>. Durch den Knockout dieses Proteins sollte die Internalisierung von Hämin reduziert und somit festgestellt werden, ob Hämin seine Wirkung bereits außerhalb des Bakteriums oder erst nach Erreichen des Zytoplasmas entfaltet.

Zur Herstellung von LS1  $\Delta$ fur und LS1  $\Delta$ srtA wurde die Methode der Phagentransduktion verwendet. Dies war möglich, da diese Mutanten bereits in anderen SA Stämmen vorlagen und mittels Phagen in LS1 transduziert werden konnten.

Als Ausgangsstamm für die fur Mutante diente der Stamm MJH010<sup>[40]</sup> und für die srtA Mutante das Derivat SA113  $\Delta$ srtA<sup>[104]</sup>. Beide Ausgangsstämme wurden mit Phage  $\phi$  85 lysiert und ein Phagenlysat hergestellt. Anschließend wurde der Empfängerstamm des Knockouts mit diesem Lysat infiziert und positive Mutanten auf Agarplatten mit Antibiotika selektioniert. Zur weiteren Bestätigung wurden mögliche positive Klone von LS1  $\Delta$ srtA mit Hilfe von spezifischen Primern in einer PCR getestet. Das PCR-Produkt wurde zur Größenbestimmung auf ein Agarosegel aufgetragen.

In der Abbildung des Gels (Abb. 4-7) ist zu erkennen, dass die erhaltenen Banden der zu testenden Klone die zu erwartende Größe von etwa 1.3 kb aufwiesen. Mit Hilfe einer "pulsed-field" Gelelektrophorese (PFGE) sollte bestätigt werden, dass es sich bei dem Empfängerstamm des Knockouts zum einen um LS1 handelt und dass zum anderen keine größeren genetischen Reorganisationen in der Mutante entstanden sind. Leider konnte dies im Falle des getesteten LS1  $\Delta$ srtA Kandidaten nicht zweifelsfrei gezeigt werden, so dass die erhaltene Mutante nicht für weitere Versuche genutzt werden konnte.



**Abb. 4-7 Agarosegel zur Kontrolle der durch Phagentransduktion hergestellten Mutante LS1  $\Delta srtA$ .** Vier verschiedene, durch die Phagentransduktion erhaltene Klone wurden mittels PCR auf die Insertion der Resistenzkassette an der Stelle des Sortase A-Gens getestet.

Mögliche Klone von LS1  $\Delta fur$  wurden durch einen schon bekannten Phänotyp der Mutante, der durch deutlich reduziertes Wachstum zu erkennen ist, überprüft<sup>[40]</sup>. Dazu wurden drei zu untersuchende Klone LS1  $\Delta fur$  1 - 3 über Nacht in BHI angezogen und am nächsten Tag deren  $OD_{600}$  gemessen. Es wurde bei allen Klonen ein deutlich reduziertes Wachstum im Vergleich zum WT (Wildtyp) festgestellt.

$OD_{600}$	(LS1):	5.81
$OD_{600}$	(LS1 $\Delta fur$ 1):	3.32
$OD_{600}$	(LS1 $\Delta fur$ 2):	3.78
$OD_{600}$	(LS1 $\Delta fur$ 3):	4.11

Auch diese Klone wurden im Anschluss mit Hilfe einer PFGE überprüft. In diesem Fall konnte bestätigt werden, dass es sich bei den getesteten Proben um LS1 Derivate handelte, bei denen keine größeren genetischen Rearrangements aufgetreten sind.

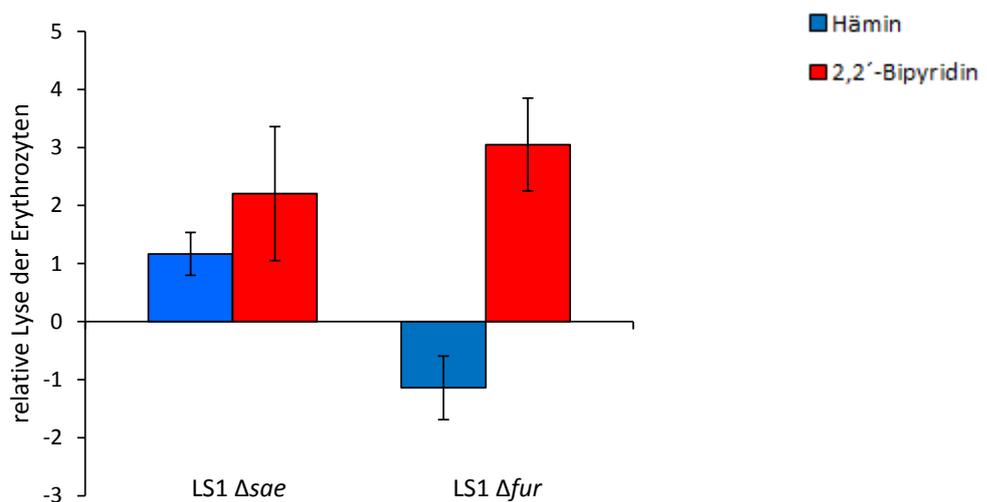
## 4.2.2 Untersuchung der Mutanten

### 4.2.2.1 Veränderung der Hämolyserate der Mutanten aufgrund der Eisenverfügbarkeit im Nährmedium

Zunächst sollte die Abhängigkeit der Hämolyserate der LS1 Mutanten von der Eisenverfügbarkeit im Medium wie zuvor im WT bestimmt werden, um festzustellen, ob diese Mutationen für die Hämolyse relevant sind.

Dazu wurden Kulturen von LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  für 1 h mit Hämin oder 2,2'-Bipyridin inkubiert und anschließend die bakteriellen Überstände sterilfiltriert. Diese Überstände wurden mit humanen Erythrozyten gemischt und die Lyserate der Blutzellen wurde durch die photometrische Detektion von freigesetztem Hämoglobin bestimmt.

In Abb. 4-8 ist die Änderung der Lyserate mit Zusätzen normiert auf die unbehandelte Kontrolle aufgetragen. Es ist auffallend, dass durch Hämin-Zusatz bei beiden Mutanten keine deutlichen Änderungen der Lyserate zu beobachten waren. Nur durch 2,2'-Bipyridin-Zugabe konnte die Lyserate bei beiden Stämmen erhöht werden. Allerdings ist die Standardabweichung bei LS1  $\Delta sae$  sehr groß. Hinzu kommt, dass die basale Hämolyserate dieses Stammes in der Kontrolle nur einen sehr kleinen Wert angenommen hat. Dies ist in dieser Darstellung allerdings nicht zu erkennen. Es zeigt aber, dass durch die Mutation von *sae* die Lyse von Erythrozyten fast vollständig inhibiert ist. Die Lyserate von LS1  $\Delta fur$  ist dagegen auf einem ähnlichen Level wie der WT.



**Abb. 4-8 Hämolyse-Test mit LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$ .** LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  wurden für 1 h bei 37°C mit 4  $\mu$ M Hämin bzw. 250  $\mu$ M 2,2'-Bipyridin in LB kultiviert. Die Überstände wurden mit gewaschenen humanen Erythrozyten inkubiert und die Lyserate der Blutzellen durch Messung des dabei freigesetzten Hämoglobins bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmt. Aufgetragen ist die relative Änderung der Lyserate durch Addition der Zusätze ins Nährmedium im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In der Abbildung sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Um die hier erhaltenen Daten besser interpretieren zu können, sollten zusätzlich die Proteinlevels von Hla der beiden Mutanten auf deren Eisenabhängigkeit untersucht werden.

#### 4.2.2.2 Veränderung der Expression von *sae* und den Hämolytinen in den Mutanten aufgrund der Eisenverfügbarkeit in LB

Zur Bestimmung der vorhandenen Hla-Menge wurden Kulturen der beiden Mutanten mit Hämin bzw. 2,2'-Bipyridin angeimpft, für 6 h kultiviert und die Überstände im Anschluss im Western Blot mit polyklonalem Anti-Hla-Antikörper analysiert.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden entsprechende Proben des WT ebenfalls auf das Gel aufgetragen (vgl. Abb. 4-2). Die verwendete 2,2'-Bipyridin-Konzentration wurde bei LS1  $\Delta fur$  auf 125  $\mu\text{M}$  reduziert, da bei höheren Konzentrationen eine klare Wachstumsinhibierung beobachtet wurde.

Anders als im WT konnten bei der LS1  $\Delta sae$  Mutante nur sehr schwache Hla-Banden detektiert werden (Abb. 4-9). Durch Hämin-Zugabe konnte des Weiteren nur eine sehr geringe Reduktion der Expression auf einen Wert von 65% der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Im WT wurden im Gegensatz dazu nach Hämin-Zugabe nur noch 6% der vorherigen Menge erhalten. Durch Induktion von Eisenmangel im Medium durch 2,2'-Bipyridin-Zugabe wurde allerdings eine fast doppelte Proteinmenge (1.80) auf dem Blot im Vergleich zur Kontrolle erhalten. Im WT war diese Zunahme der Hla-Menge mit einem Faktor von 4.63 aber sehr viel deutlicher.

In LS1  $\Delta fur$  wurden ähnliche Ergebnisse wie in LS1  $\Delta sae$  erzielt. Hier wurde auch in der Kontrolle eine sehr geringe Menge an Hla detektiert, die durch Hämin-Zugabe kaum in ihrer Intensität abgeschwächt wurde (0.72). Allerdings konnte auch hier eine Induktion um den Faktor 3.35 mit 2,2'-Bipyridin beobachtet werden. Diese Zunahme liegt knapp unter dem Bereich, der für den WT erhalten wurde.

	LS1			LS1 $\Delta sae$			LS1 $\Delta fur$		
	K	H	B	K	H	B	K	H	B
									
rel. Bandenintensität	1	0.06	4.63	1	0.65	1.80	1	0.72	3.35

**Abb. 4-9 Veränderung der Hla-Menge von LS1, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  in Abhängigkeit von der verfügbaren Eisenkonzentration im Medium.** LS1 und LS1  $\Delta sae$  wurden 6 h mit 4  $\mu\text{M}$  Hämin (H) bzw. 250  $\mu\text{M}$  2,2'-Bipyridin (B) in LB kultiviert. LS1  $\Delta fur$  wurde 6 h mit 4  $\mu\text{M}$  Hämin bzw. 125  $\mu\text{M}$  2,2'-Bipyridin in LB kultiviert. Die bakteriellen Überstände wurden mittels Western Blot analysiert und die gemessene Bandenintensität auf die jeweilige Kontrolle (K) normiert. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für drei unabhängige Wiederholungen.

Um die Wirkung von Hämin auf die Genexpression der Mutanten LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  zu testen, wurden zunächst die basalen Expressionslevel der zu untersuchenden Gene *sae*, *hla*, *hlyB* und *hlyA* im Vergleich zu LS1 untersucht. Damit sollten Unterschiede in der Expression dieser Gene aufgrund der bestehenden Mutation gezeigt werden.

Dazu wurde die RNA von 6.5-stündigen Kulturen isoliert und per real-time PCR analysiert.

In Tab. 4-1 ist zu erkennen, dass eine sehr große Expression von *sae* und *hla* in LS1 vorlag, die jedoch je nach Experiment stark schwankte. Die beiden anderen Hämolyseine hingegen wurden deutlich schwächer exprimiert. In LS1  $\Delta sae$  konnte, die Deletion bestätigend, keine *sae* Expression detektiert werden. Des Weiteren sind alle drei Hämolyseine in dieser Mutante sehr deutlich in ihrer Expression im Vergleich zum WT reduziert (*hla*:  $-5.4 \cdot 10^5$ , *hlyB*: -17, *hlyA*: -131). Dies wurde aufgrund der starken Abhängigkeit der Hämolyseine-Expression von Sae erwartet. Der mit Abstand größte Effekt in dieser Mutante wurde bei der Expression von *hla* beobachtet. In LS1  $\Delta fur$  konnte ebenfalls eine deutliche Reduktion der Expression von *sae* (-216) und *hla* (-145) ermittelt werden. Die beiden anderen Hämolyseine, *hlyB* und *hlyA*, zeigten zwar eine etwas erhöhte Expression im Vergleich zu LS1, wiesen aber auch eine sehr hohe Standardabweichung auf. Die erhaltenen Werte für LS1  $\Delta fur$  deuten damit ebenfalls auf einen markanten Einfluss von *fur* auf die Expression von *sae* und *hla* hin.

	<i>sae</i>	<i>hla</i>	<i>hlyB</i>	<i>hlyA</i>
LS1	697 ± 371	1632 ± 964	0.34 ± 0.11	1.31 ± 0.54
LS1 $\Delta sae$	u. N.	$3.0 \cdot 10^{-3} \pm 6.4 \cdot 10^{-4}$	0.02 ± 0.005	0.01 ± 0.002
LS1 $\Delta fur$	3.22 ± 0.65	11.25 ± 5.14	0.63 ± 0.23	4.73 ± 3.11

**Tab. 4-1 Transkription von *sae* und den Hämolyseinen normiert auf das Housekeeping-Gen *gyrB*.** Die RNA von 6.5-stündigen Kulturen von LS1, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  in LB wurde isoliert und die mRNA-Levels von *sae*, *hla*, *hlyB* und *hlyA* mittels real-time PCR bestimmt. Angegeben ist die Transkriptionsrate normiert auf das Housekeeping-Gen *gyrB*. Werte, die auffallend hohe bzw. niedrige Transkriptionsraten ergeben, sind rot markiert. Werte, deren Standardabweichung > 50% des Messwertes betragen, sind gelb markiert (u. N.: unterhalb der Nachweisgrenze).

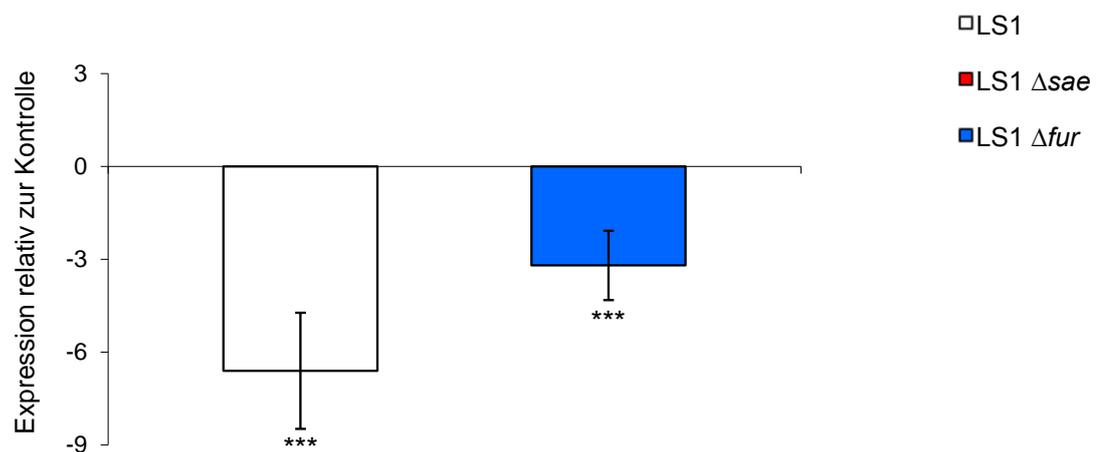
Im Anschluss an diese Erkenntnisse sollten die Auswirkungen auf die Expression durch Hämin-Zugabe in den Mutanten bestimmt werden. Dazu wurde zu 6-stündigen Kulturen von LS1, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  Hämin gegeben und nach 30 min Proben entnommen. Aus diesen Proben wurde die RNA isoliert und in einer real-time PCR analysiert.

Die Änderung der Expression durch Hämin-Zugabe wurde durch das Verhältnis der Expression der Kontrolle (ohne Hämin) zu der Expression der Proben mit Hämin berechnet. Diese Veränderung der Expression ist in den Diagrammen aufgetragen. Damit bedeutet ein Wert >1 eine Zunahme der Expression und ein Wert <-1 eine Reduktion der Expression um den angegebenen Betrag.

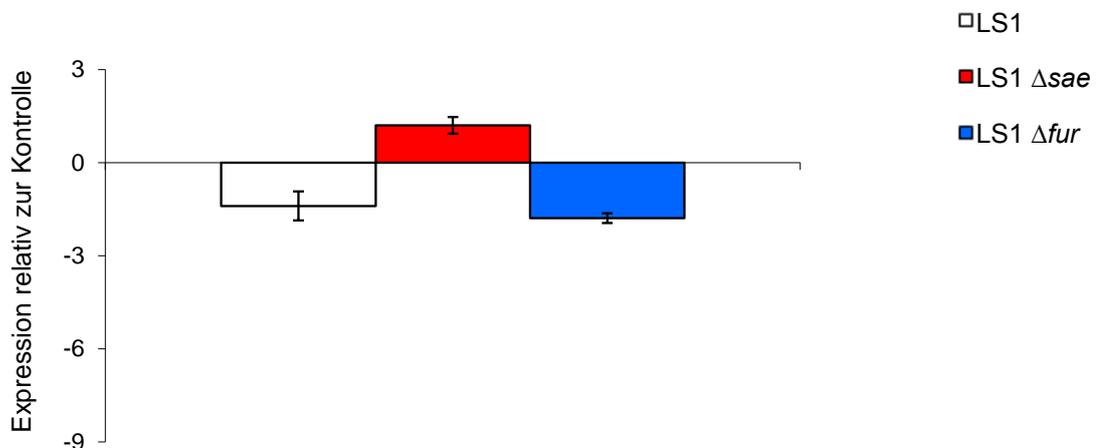
Bei der Analyse der *sae* Expression wurden nur LS1 und LS1  $\Delta fur$  untersucht, da LS1  $\Delta sae$  durch den Knockout keine *sae* Expression aufweist (vgl. Tab. 4-1). Wie in Abb. 4-10 dargestellt, zeigte der WT bei Hämin-Zugabe eine 6.6-fache Reduktion der *sae* Expression. Die Expression bei LS1  $\Delta fur$  wurde um einen Faktor von 3.2 reduziert. Dies zeigt, dass beide Bakterienstämme nach Hämin-Zugabe mit einer vergleichbaren, signifikanten Reduktion der *sae* Expression reagierten. Die *hla* Expression wurde ebenfalls durch Hämin im WT

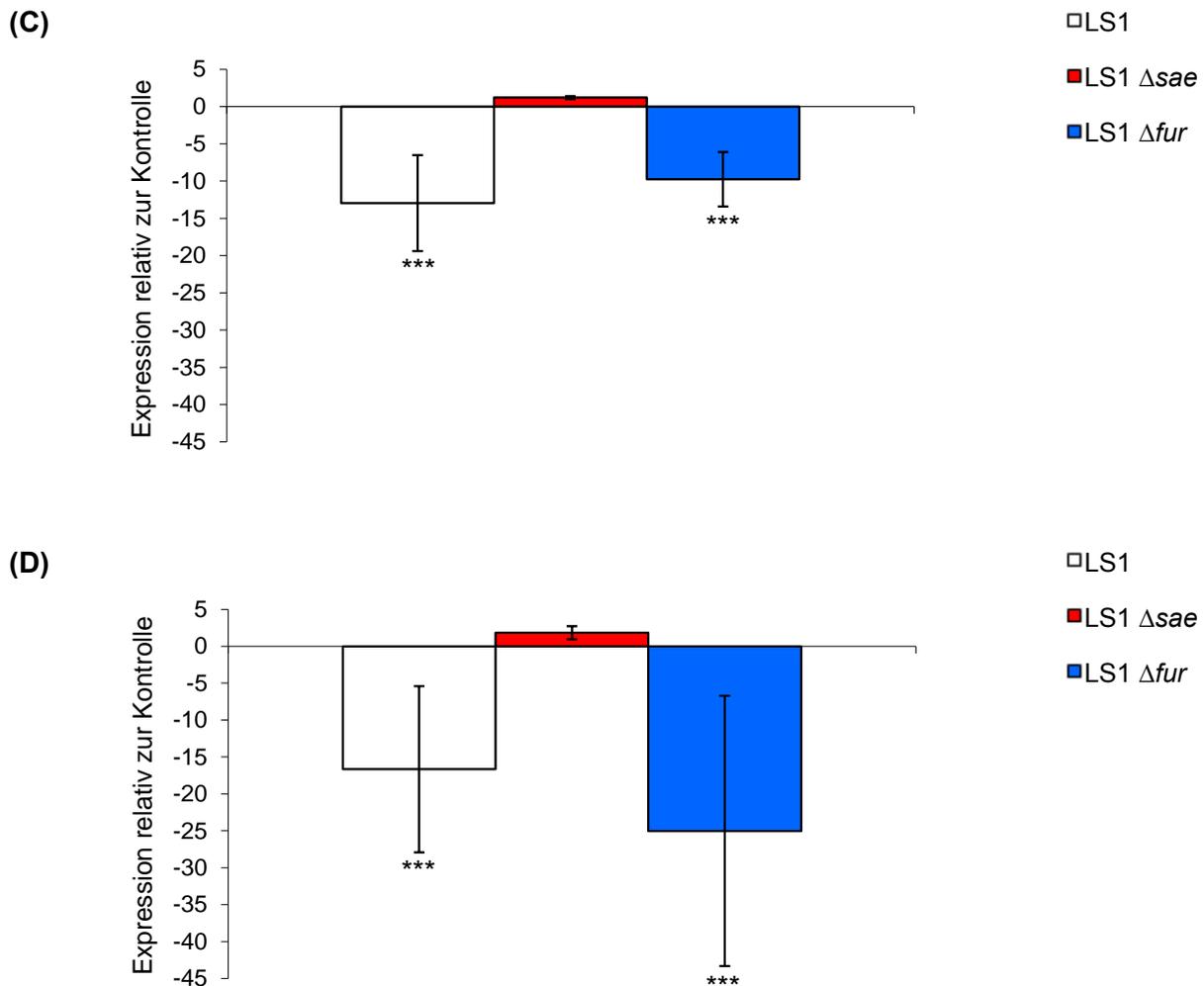
vermindert (-1.4) und auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Reaktion von Hämin auf LS1  $\Delta fur$  (-1.8) im Vergleich zum WT. Die *sae* Mutante erreichte nach Hämin-Zugabe nur eine Veränderung der *hla* Expression von 1.2 und wies damit die geringste Veränderung auf. Dieser Unterschied war auch nicht signifikant zur Kontrolle. Für *hIb* und *hIgA* hingegen wurden hoch-signifikante Unterschiede in der Expression nach Hämin-Zugabe zwischen *sae* Mutante und WT ermittelt, während die  $\Delta fur$  Mutante ein ähnliches Expressionsverhalten wie der WT zeigte. So konnte für *hIb* in LS1 eine Reduktion um -12.9 und in LS1  $\Delta fur$  um -9.7 beobachtet werden, während LS1  $\Delta sae$  wieder keine Änderungen in der Expression im Vergleich zur Kontrolle aufwies (+1.2). Die *hIgA* Expression im WT wurde durch Hämin um einen Faktor von -16.7 reduziert. Bei der  $\Delta fur$  Mutante konnte ebenfalls eine Reduktion beobachtet werden (-25.0), die im Mittel sogar leicht größer als beim WT ausfiel. Für LS1  $\Delta sae$  ergab sich wie zuvor keine Veränderung in der Expression nach Hämin-Zugabe.

(A)



(B)





**Abb. 4-10 Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sae* und den Hämolytinen in LS1 und den LS1 Mutanten durch Hämin-Zugabe.** 6-stündige Kulturen von LS1, LS1  $\Delta$ sae und LS1  $\Delta$ fur in LB wurden für 30 min mit 4  $\mu$ M Hämin versetzt und anschließend die RNA isoliert. mRNA-Level von *sae* (A), *hla* (B), *hlyB* (C) und *hlyA* (D) wurden mittels real-time PCR bestimmt. Aufgetragen sind die Veränderungen der Expression normiert auf die jeweils unbehandelte Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (\*  $p \leq 0.03$ , \*\*  $p \leq 0.003$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die Expression der vier untersuchten Gene bei LS1  $\Delta$ fur nach Hämin-Zugabe vergleichbar dem WT reduzierte. Bei LS1  $\Delta$ sae hingegen wurden keine Auswirkungen durch Hämin sichtbar.

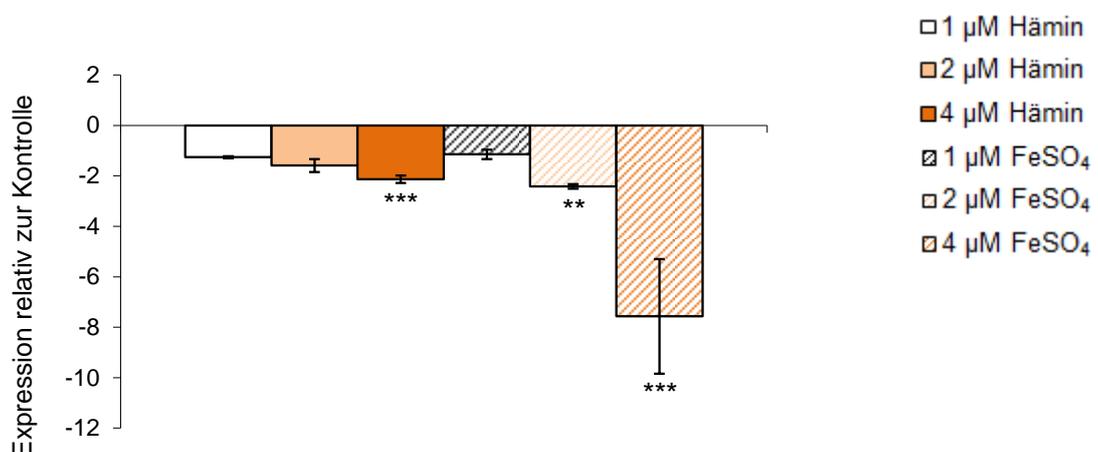
#### 4.2.2.3 Veränderung der Expression von *sae* und den Hämolytinen durch Hämin- und Eisensulfat-Zugabe in RPMI und LB

Zusätzlich zum Hämin-Effekt sollten Änderungen in der Expression durch Zugabe von ionisiertem Eisen untersucht werden, das in gleicher Molarität wie das Hämin-Eisen verwendet wurde. Dieser Versuch sollte klären, ob Eisen alleine für die Reduktion der Expression von *sae* und den Hämolytinen verantwortlich ist oder ob dies ein spezifischer

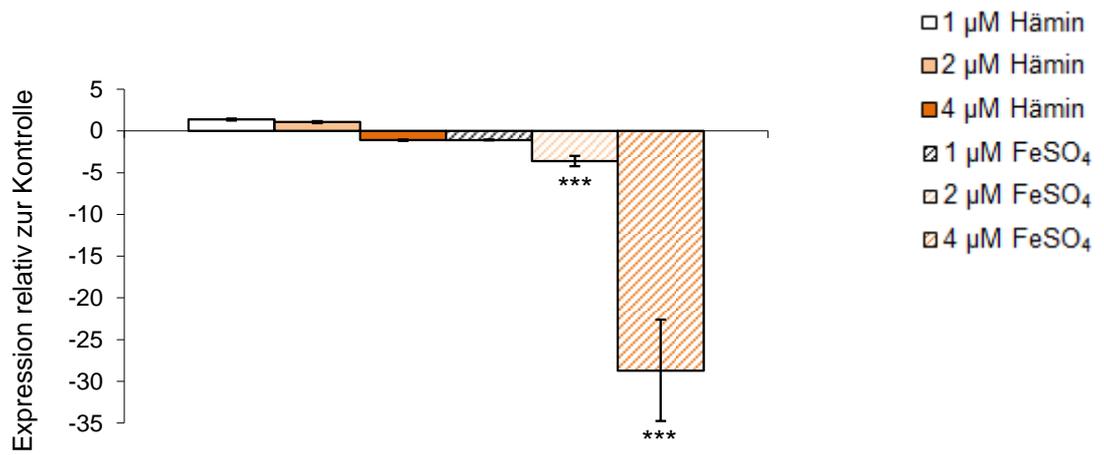
Effekt von Hämin sein könnte. Um Auswirkungen der Medien auf die Expressionsunterschiede auch in diesem Versuch ausschließen zu können, wurden diese Tests in RPMI und LB durchgeführt.

Abb. 4-11 (A) zeigt die Ergebnisse für RPMI. Vergleichbar den zeitabhängigen Experimenten in RPMI (vgl. Abb. 4-6) konnte auch in den konzentrationsabhängigen Versuchen eine Verminderung der *sae* Expression nach Hämin-Zugabe festgestellt werden. Die Reduktion war zudem proportional zur zugegebenen Hämin-Konzentration, erreichte allerdings erst ab einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  Hämin (-2.1) eine statistische Signifikanz. Eisensulfat bewirkte ebenfalls eine Reduktion der Expression dieses Gens, die mit steigender  $\text{FeSO}_4$ -Konzentration einen immer größeren Wert annahm. Auffallend ist, dass die Verminderung der Transkription, die durch 4  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  ausgelöst wurde (-7.6), 3.6-fach größer war als die Reduktion durch Hämin-Zugabe trotz gleicher Eisenmolarität. Die Expression von *hla* wurde in RPMI durch Hämin hingegen gar nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu konnte diese Expression durch Zugabe von Eisensulfat mit einer um bis zu 28-fach schwächeren Expression als bei der Kontrolle drastisch vermindert werden. Auch in diesem Fall verringerte sich die Expression mit zunehmender  $\text{FeSO}_4$ -Konzentration. Das für das  $\beta$ -Hämolysin kodierende Gen *hlb* wurde ebenfalls in diesem Experiment durch Hämin-Zugabe in seiner Transkriptionsrate reduziert. Hier war eine Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  Hämin nötig, um einen signifikanten Effekt (-2.2) zu erzielen. Nach Eisensulfat-Supplementierung hingegen wurde eine signifikante Verminderung der Expression bereits bei 2  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  sichtbar (-2.3), die bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  fast eine 10-fache Reduktion aufwies. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für das dritte Hämolysin-Gen, *hlgA*, erzielt. Schon ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Hämin konnten hier signifikante Reduktionen der Expression beobachtet werden (1  $\mu\text{M}$ : -1.6, 2  $\mu\text{M}$ : -2.3, 4  $\mu\text{M}$ : -3.1). Der Effekt durch Eisensulfat hingegen war erneut deutlich stärker und erreichte bei einer Konzentration von 4  $\mu\text{M}$  eine 7-fache Expressionsverminderung im Vergleich zur Kontrolle.

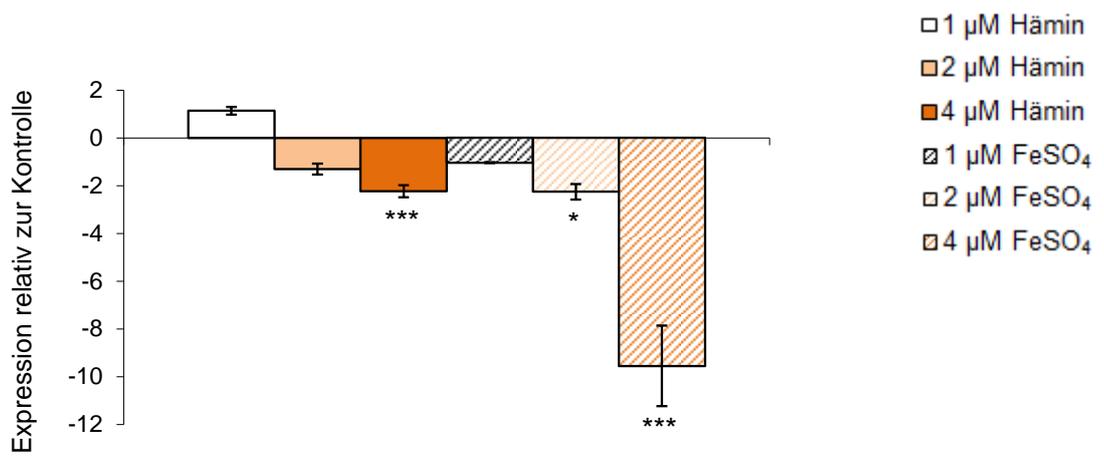
(A.1)



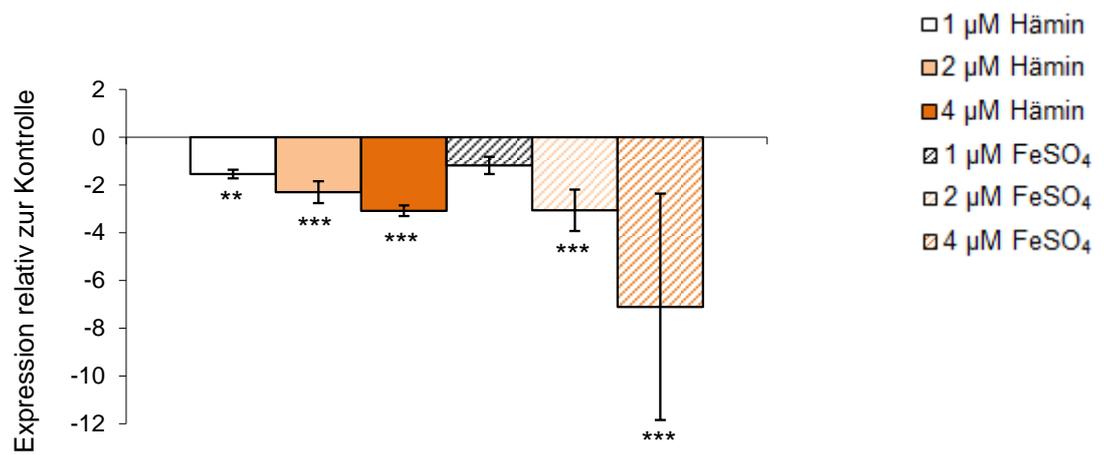
(A.2)



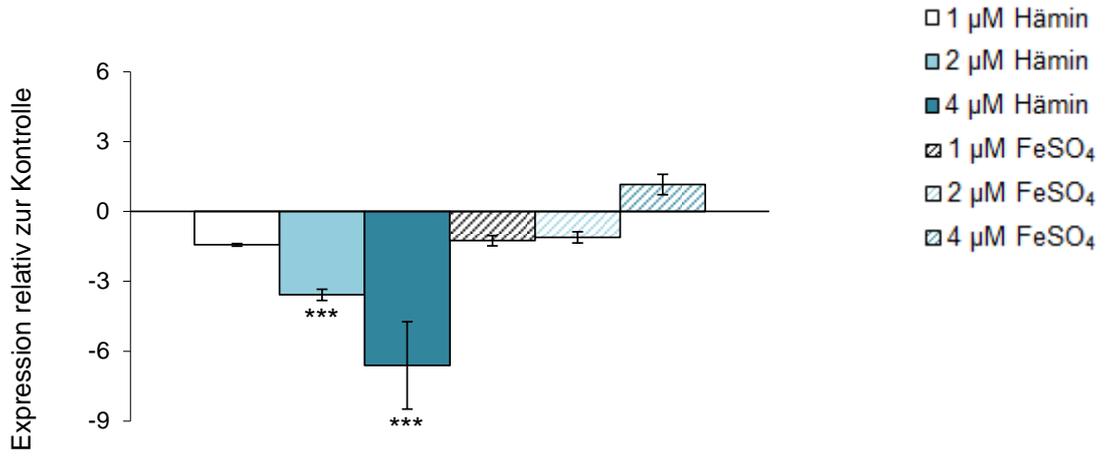
(A.3)



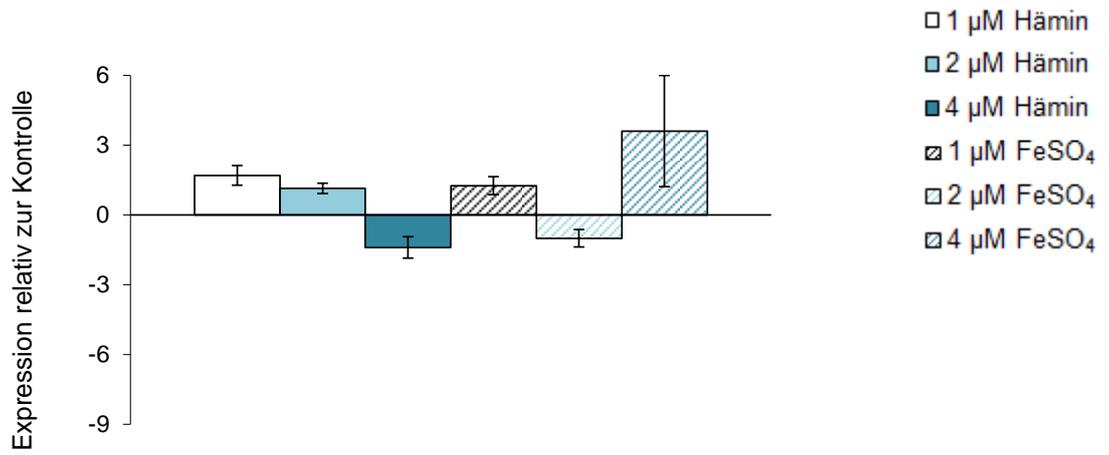
(A.4)



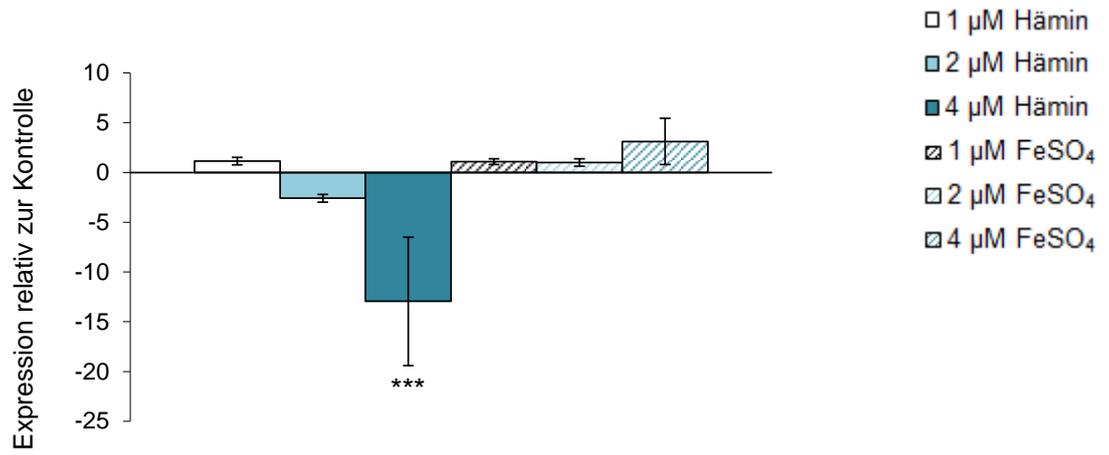
(B.1)



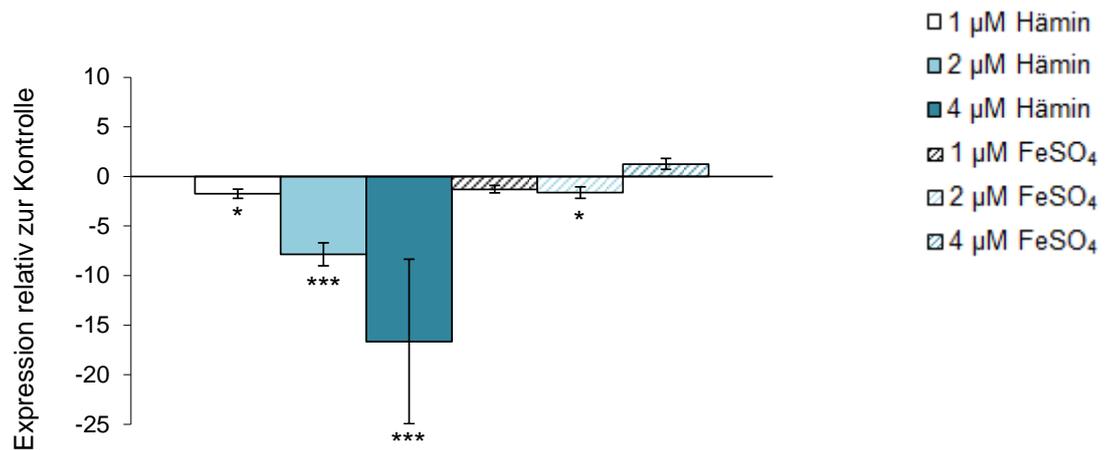
(B.2)



(B.3)



(B.4)



**Abb. 4-11 Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sae* und den Hämolytinen in LS1 kultiviert in RPMI und LB durch Zugabe unterschiedlicher Eisenquellen.** 6-stündige LS1 Kulturen in RPMI (A) und LB (B) wurden für 30 min mit 1, 2 und 4 µM Häm in bzw. 1, 2 und 4 µM FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O versetzt und anschließend die RNA isoliert. mRNA-Level von *sae* (1), *hla* (2), *hlyB* (3) und *hlyA* (4) wurden mittels real-time PCR bestimmt. Aufgetragen sind die Veränderungen der Expression normiert auf die jeweils unbehandelte Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (\* p ≤ 0.03, \*\* p ≤ 0.003, \*\*\* p ≤ 0.001).

Anders als in RPMI lieferte der gleiche Versuchsansatz in LB zum Teil abweichende Ergebnisse [Abb. 4-11 (B)]. Wie zuvor in RPMI wurde die *sae* Expression auch in LB durch Häm-Zugabe reduziert. Ab einer Konzentration von 2 µM Häm lag eine signifikante Reduktion um -3.6 bzw. bei 4 µM Häm um -6.6 vor. Allerdings konnte, anders als in RPMI, nach Eisensulfat-Zugabe in keiner der verwendeten Konzentrationen ein deutlicher Effekt auf die Transkription dieses Gens beobachtet werden. Die *hla* Expression wurde weder von Häm noch von FeSO<sub>4</sub> in ihrer Transkriptionsrate signifikant beeinflusst. Das β-Hämolytogen *hlyB* wurde vergleichbar wie die *sae* Expression durch Häm reduziert. Hier lag eine Signifikanz ab einer Konzentration von 4 µM Häm (-12.9) vor. Auch in diesem Fall konnte keine der verwendeten Eisensulfat-Konzentrationen einen Effekt hervorrufen. Die *hlyA* Expression zeigte vergleichbare Ergebnisse. Eine signifikante Reduktion der Expressionsrate von -1.8 zeigte sich bereits ab einer Konzentration von 1 µM Häm, die sich bei 4 µM Häm auf -16.7 vergrößerte. Eisensulfat hatte auch in diesem Fall keinen großen Einfluss auf die Expression. Allerdings lag bei 2 µM FeSO<sub>4</sub> eine signifikante Veränderung der Expression im Vergleich zur Kontrolle vor (-1.6), obwohl die Änderung nur einen sehr kleinen Betrag aufweist.

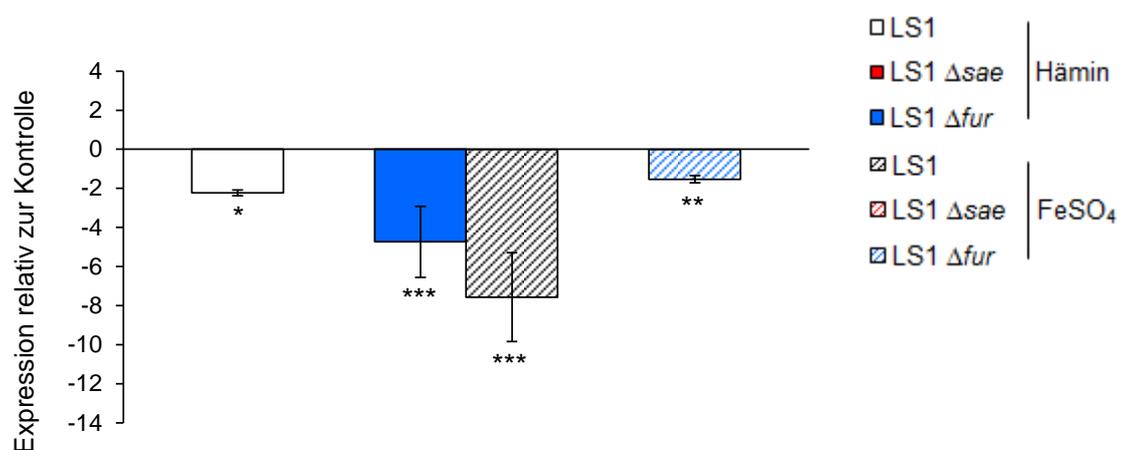
Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Häm in RPMI sowie in LB zu Reduktionen der Expressionsraten der untersuchten Gene führte, mit Ausnahme des α-Hämolytins. Dort waren in beiden Medien keine signifikanten Veränderungen zu beobachten. Eisensulfat hatte in RPMI einen starken, reduzierenden Effekt auf die Transkriptionsrate aller Gene, der in LB nicht beobachtet werden konnte.

Um die Auswirkungen von Eisen auf die Genexpression weiter analysieren zu können, wurden in RPMI auch die beiden LS1 Mutanten, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$ , untersucht.

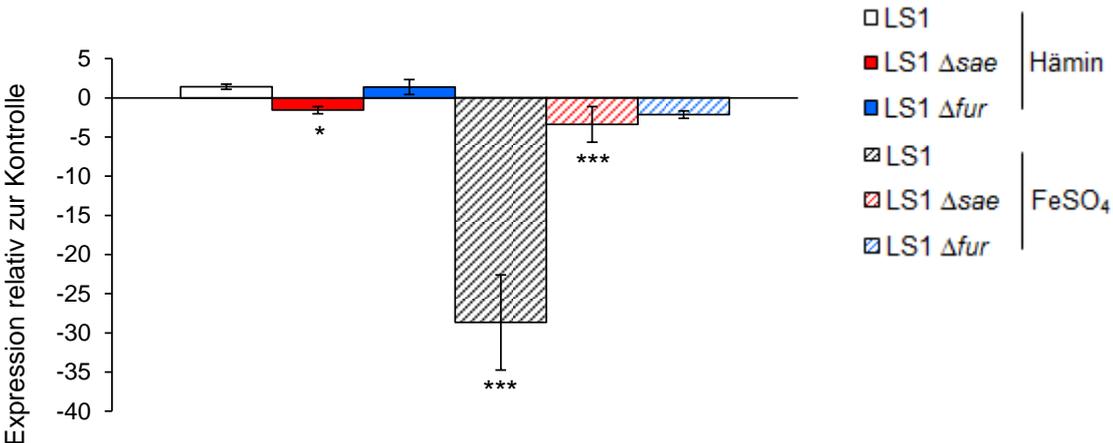
Dazu wurde zu 6-stündigen Kulturen von LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  in RPMI Hämin bzw. FeSO<sub>4</sub> gegeben und nach 30 min Proben entnommen. In diesem Fall wurde nur eine Konzentration von jeweils 4  $\mu$ M verwendet, da im vorhergehenden Experiment mit diesen Konzentrationen die größten Effekte erzielt werden konnten. Zum besseren Vergleich wurden in diesen Diagrammen erneut die schon zuvor in Abb. 4-11 gezeigten Ergebnisse für LS1 integriert.

Wie in Abb. 4-12 zu erkennen ist, wurde die *sae* Expression auch in diesem Experiment bei LS1  $\Delta fur$  durch Hämin stark reduziert. Es lag eine Verminderung der Transkriptionsrate um den Faktor 4.7 vor. Interessanterweise konnte aber nur ein sehr kleiner Effekt (-1.5) auf die Transkription nach Eisensulfat-Zugabe beobachtet werden. Die *hla* Expression konnte in keinem der drei Stämme durch Hämin sehr stark beeinflusst werden. Lediglich bei LS1  $\Delta sae$  lag eine signifikante Änderung vor, obwohl die Reduktion einen sehr kleinen Wert ergab (-1.6). Eisensulfat hingegen konnte die Expression bei LS1  $\Delta sae$  um einen Faktor von 3.7 reduzieren. Dieser Effekt war aber deutlich geringer als beim WT (-28.7) und bei LS1  $\Delta fur$  war nur ein sehr kleiner, nicht signifikanter Effekt sichtbar (-2.1). Die Expression des  $\beta$ -Hämolyysin-Gens wurde neben dem WT (-2.1) nur noch bei LS1  $\Delta fur$  durch Hämin reduziert (-3.7). LS1  $\Delta sae$  zeigte erneut keine Reaktion auf Hämin-Zugabe (-1.0). Durch Eisensulfat hingegen wurde in diesem Stamm eine 3.4-fache Verminderung der Expression erreicht. Im Gegensatz dazu konnte erneut keine Veränderung durch Eisensulfat bei LS1  $\Delta fur$  (-1.4) beobachtet werden. Das dritte Hämolyysin-Gen, *hlgA*, zeigte bei LS1  $\Delta sae$  weder einen Effekt auf Hämin- (+1.0) noch auf Eisensulfat-Zugabe (-1.6). Eine 7.2-fache Reduktion der Transkription konnte allerdings durch Hämin in LS1  $\Delta fur$  beobachtet werden, während mit Eisensulfat erneut kein Effekt (-1.7) sichtbar war.

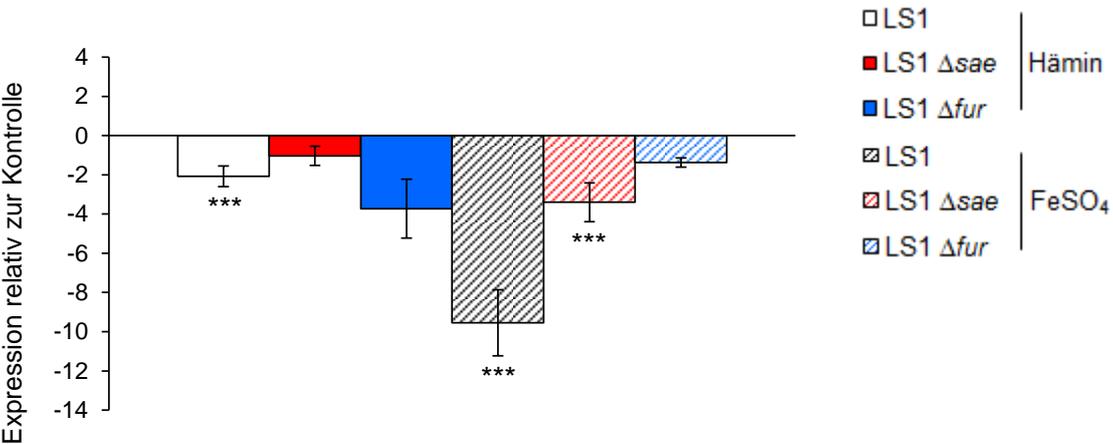
(A)

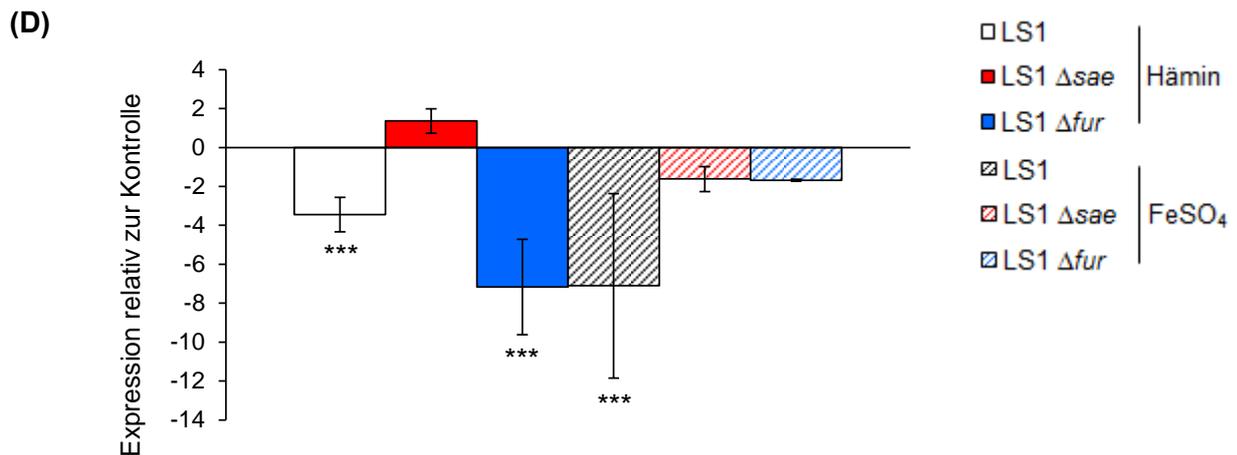


(B)



(C)





**Abb. 4-12 Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sae* und den Hämolyseinen in LS1, LS1  $\Delta$ sae und LS1  $\Delta$ fur kultiviert in RPMI durch Zugabe von unterschiedlichen Eisenquellen.** 6-stündige Kulturen von LS1, LS1  $\Delta$ sae und LS1  $\Delta$ fur in RPMI wurden für 30 min mit 4  $\mu$ M Hämmin bzw. 4  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O versetzt und anschließend die RNA isoliert. mRNA-Level von *sae* (A), *hla* (B), *hly* (C) und *hlgA* (D) wurden mittels real-time PCR bestimmt. Aufgetragen sind die Veränderungen der Expression normiert auf die jeweils unbehandelte Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (\*  $p \leq 0.03$ , \*\*  $p \leq 0.003$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass erneut, wie auch in den Experimenten in LB (vgl. Abb. 4-10), die kleinsten Effekte durch Hämmin in LS1  $\Delta$ sae beobachtet wurden. Des Weiteren waren die Änderungen in LS1  $\Delta$ fur immer etwas deutlicher als in LS1. Im Gegensatz dazu führte FeSO<sub>4</sub> in LS1  $\Delta$ fur nur zu sehr kleinen Reduktionen der Expression. Es wurde aber immer eine kleine Reduktion der Gene in LS1  $\Delta$ sae beobachtet, aber der größte Effekt durch FeSO<sub>4</sub> konnte in LS1 detektiert werden.

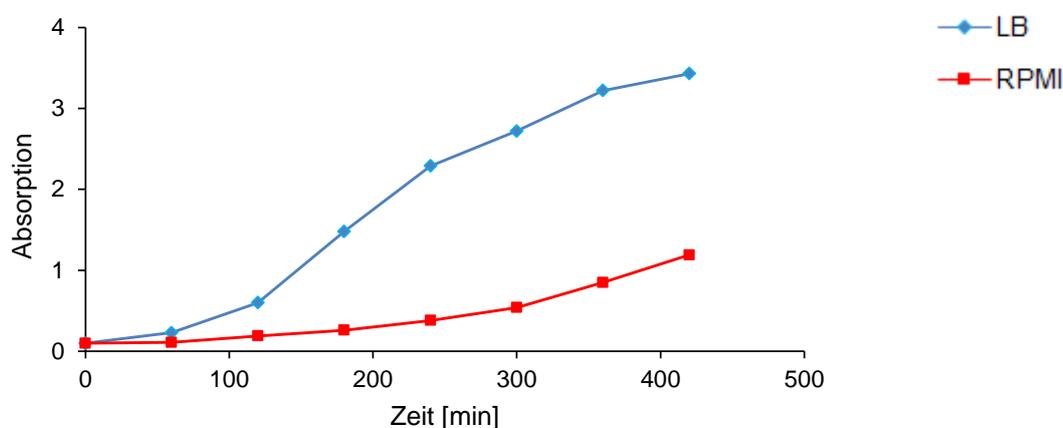
Da in den Expressionsanalysen mit LB und RPMI zwei verschiedene Medien verwendet wurden, sollte zusätzlich die Abhängigkeit der basalen Expression der untersuchten Gene auf das Nährmedium untersucht werden. Dazu wurde die RNA von 6.5-stündigen Kulturen aus LB sowie RPMI isoliert und per real-time PCR analysiert. Da die Proben zu einem bestimmten Zeitpunkt entnommen wurden, wurde von jeder Probe die OD<sub>600</sub> zum Zeitpunkt der Probenentnahme gemessen. Angegeben ist der Mittelwert der gemessenen ODs einer Probe aus drei unabhängigen Wiederholungen.

Wie zuvor erwähnt ist RPMI ein sehr nährstoffarmes Medium. Deshalb war die gemessene OD<sub>600</sub> nach 6.5 h trotz gleicher Start-OD in RPMI um ein Vielfaches geringer als in LB (vgl. Tab. 4-2). Dieser Umstand ist bei der Bewertung der Daten zu berücksichtigen, da die Bakterien bei der Ernte in LB in einer anderen Wachstumsphase waren und damit ein anderes Expressionsgrundmuster aufwiesen als die in RPMI kultivierten Stämme.

	OD <sub>600</sub> in LB	OD <sub>600</sub> in RPMI
LS1	2.01	0.84
LS1 $\Delta sae$	3.15	0.73
LS1 $\Delta fur$	1.17	0.64

**Tab. 4-2 Vergleich der OD<sub>600</sub> in verschiedenen Medien.** LS1, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  wurden 6.5 h in LB bzw. in RPMI kultiviert und anschließend die OD<sub>600</sub> gemessen. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

Zur besseren Verdeutlichung sind in Abb. 4-13 exemplarisch die Wachstumskurven von LS1 in LB und in RPMI aufgetragen. Anhand dieser Kurven wird deutlich, dass LS1 in LB recht früh (nach ca. 2 - 3 h) in die exponentielle Wachstumsphase eintritt, während die Kultur in RPMI erst sehr spät (nach ca. 6 - 7 h) exponentielles Wachstum zeigt. Die Unterschiede in der OD<sub>600</sub> nach 6.5 h in LB zwischen dem in Tab. 4-2 angegebenen Wert und der Wachstumskurve sind mit unterschiedlichen Volumina der Kulturen erklärbar. Dieses Beispiel zeigt exemplarisch, dass in RPMI ein stark verlangsamtes Wachstum vorliegt und dass somit vermutlich wachstumsphasenabhängige Transkriptionsmechanismen zu einem späteren Zeitpunkt eintreten werden.



**Abb. 4-13 Vergleich der Wachstumskurven von LS1 in LB und RPMI.** LS1 wurde in LB und RPMI kultiviert. Wachstumsraten wurden durch regelmäßige Messungen der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) bestimmt. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für 2 unabhängige Wiederholungen.

In Tab. 4-3 ist die Expression der Gene von LS1, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  in RPMI auf das Housekeeping-Gen *gyrB* normiert dargestellt. Die rot markierten Werte heben deutliche Unterschiede der Expression der Gene im Vergleich zu den bereits zuvor bestimmten Transkriptionsraten in LB hervor (vgl. Tab. 4-1). Hierbei fällt auf, dass LS1 in LB eine erheblich größere Expression von *sae* sowie von *hla* aufwies als in RPMI. Dagegen konnte in RPMI eine über 100-fach größere *hly* Expression beobachtet werden als in LB. Bei LS1  $\Delta sae$  wurden nur sehr kleine Expressionsraten für die Hämolyse bestimmt. Hier lag kaum ein

Unterschied zwischen den beiden Medien vor. Bei LS1  $\Delta fur$  hingegen konnten große Unterschiede bei *hla* und *hlb* gemessen werden. In dem Fall war die Expression in RPMI jeweils um ein Vielfaches größer als in LB. Dabei muss aber beachtet werden, dass die Standardabweichung dieser beiden Werte den jeweiligen Mittelwerten entsprach.

	<i>sae</i>	<i>hla</i>	<i>hlb</i>	<i>hlgA</i>
LS1	10.84 ± 2.85	26.27 ± 10.42	43.85 ± 20.18	0.44 ± 0.05
LS1 $\Delta sae$	-- --	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.01 ± 0.004
LS1 $\Delta fur$	4.86 ± 0.94	99.75 ± 115.63	66.31 ± 61.92	0.24 ± 0.12

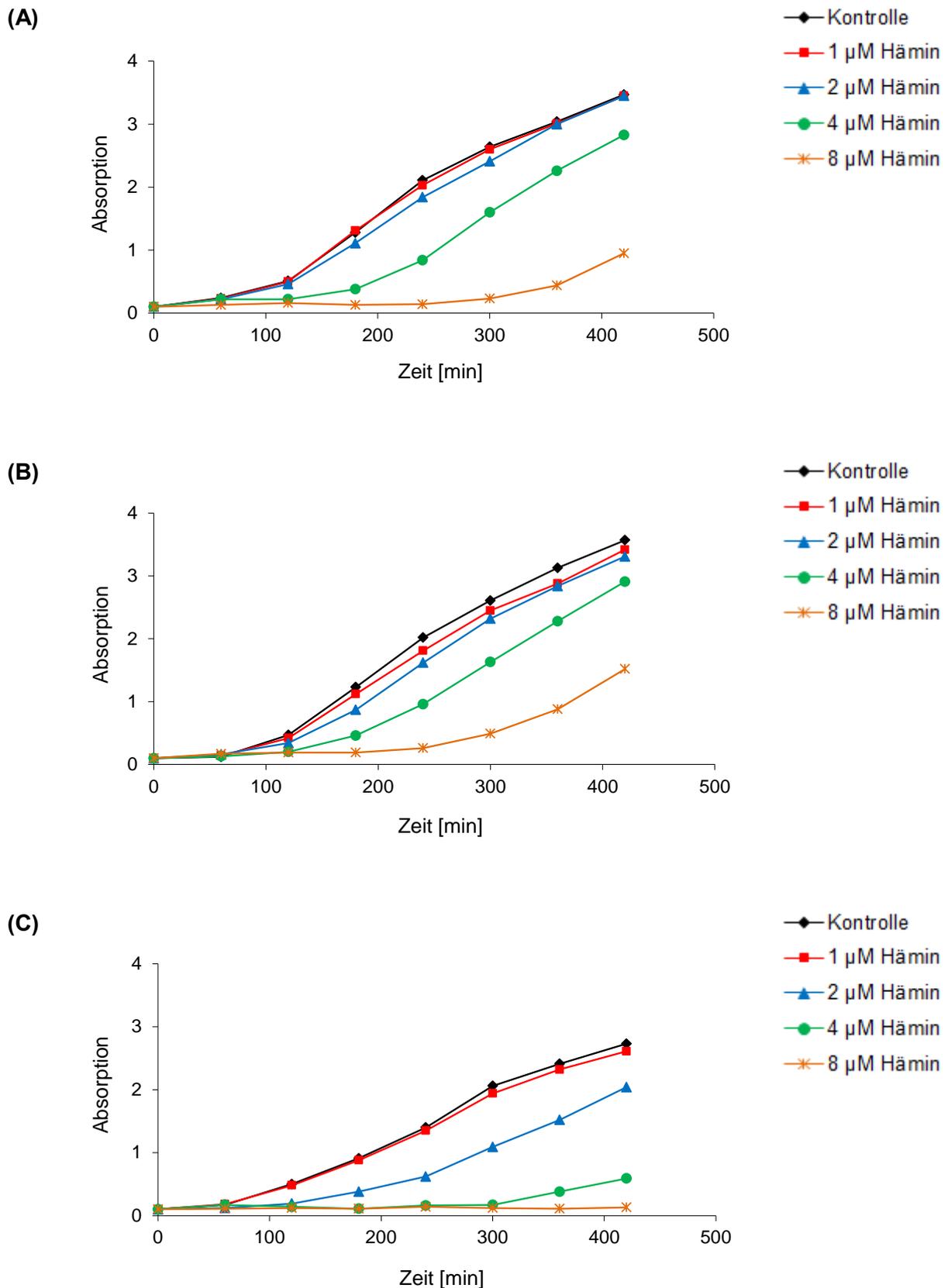
**Tab. 4-3 Unterschiede der Transkription von LS1 und den Mutanten in RPMI.** Die RNA von 6.5-stündigen Kulturen von LS1, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  in RPMI wurde isoliert und die mRNA-Levels von *sae*, *hla*, *hlb* und *hlgA* mittels real-time PCR bestimmt. Angegeben ist die Transkriptionsrate normiert auf das Housekeeping-Gen *gyrB*. Werte, die auffallend hohe bzw. niedrige Transkriptionsraten ergeben, sind rot markiert. Werte, deren Standardabweichung > 50% des Messwertes betragen, sind gelb markiert.

#### 4.2.2.4 Auswirkungen von Hämin auf das Wachstum

##### 4.2.2.4.1 Wachstumskurven

Da bekannt ist, dass Hämin für SA in Schüttelkultur schon in mikromolaren Konzentrationen zytotoxisch ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit für die verwendeten Stämme und Mutanten auch der Einfluss der unterschiedlichen Hämin-Konzentrationen auf das Wachstum untersucht werden.

In Übereinstimmung mit der Literatur ist in allen drei Diagrammen in Abb. 4-14 zu erkennen, dass die Wachstumsrate mit steigender Hämin-Konzentration zunehmend inhibiert wurde. Das Wachstum von LS1 wurde dabei ab einer Konzentration von 4  $\mu$ M Hämin deutlich reduziert und bei 8  $\mu$ M, insbesondere in den ersten 6 h, weitgehend gehemmt. LS1  $\Delta sae$  reagierte vergleichbar auf Hämin. Allerdings wurde hier das Wachstum nach 4 und 8  $\mu$ M Hämin-Zugabe etwas weniger reduziert als beim Wildtyp. Im Gegensatz dazu reichten bei LS1  $\Delta fur$  bereits 2  $\mu$ M Hämin um das Wachstum markant zu reduzieren und bei 4 und 8  $\mu$ M Hämin konnte kaum noch Wachstum der Zellen beobachtet werden.



**Abb. 4-14 Auswirkungen unterschiedlicher Hämin-Konzentrationen auf das Wachstum von LS1, LS1  $\Delta\text{sae}$  und LS1  $\Delta\text{fur}$ .** LS1 (A), LS1  $\Delta\text{sae}$  (B) und LS1  $\Delta\text{fur}$  (C) wurden in LB mit 0, 1, 2, 4 und 8  $\mu\text{M}$  Hämin kultiviert. Wachstumsraten wurden durch regelmäßige Messungen der optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) bestimmt. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für 2 unabhängige Wiederholungen.

#### 4.2.2.4.2 MHK-Bestimmung

Um die Toxizität von Hämin für LS1 und die Mutanten LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  zusätzlich auf einer anderen Art bestimmen zu können, wurden MHKs (minimale Hemmkonzentration) nach CLSI-Standard ermittelt. Dazu wurde Hämin in Konzentrationen zwischen 0.125  $\mu\text{M}$  und 128  $\mu\text{M}$  verwendet. In Tab. 4-4 sind die Ergebnisse der MHK-Bestimmung für die drei untersuchten Stämme aufgelistet.

Auch dieser Test bestätigt, dass LS1  $\Delta fur$  deutlich sensitiver auf Hämin reagierte als die anderen beiden Stämme, da bereits bei 16  $\mu\text{M}$  Hämin kein Wachstum dieses Stammes mehr beobachtet werden konnte. LS1 und LS1  $\Delta sae$  hingegen zeigten in diesem Versuch keine Unterschiede und wurden erst ab einer Konzentration von 64  $\mu\text{M}$  Hämin in ihrem Wachstum vollständig inhibiert.

LS1:	64 $\mu\text{M}$
LS1 $\Delta sae$ :	64 $\mu\text{M}$
LS1 $\Delta fur$ :	16 $\mu\text{M}$

**Tab. 4-4 Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Hämin bei LS1, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$ .** Hämin wurde in Konzentrationen von 0.125 bis 128  $\mu\text{M}$  in Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorgelegt. LS1, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  wurden in MH auf McFarland 0.5 eingestellt und anschließend 1:100 verdünnt. Diese wurden ebenfalls in die Vertiefungen überführt und im Brutschrank inkubiert. Die MHK für Hämin ist die niedrigste Konzentration, bei der das Wachstum der Bakterien komplett inhibiert wurde.

### 4.3 Vergleich des Hämin-Effekts auf transkriptioneller Ebene in verschiedenen SA Stämmen

Zum besseren Verständnis und zum Ausschluss, dass LS1 eine Ausnahme in der Reaktion auf Hämin innerhalb der SA Gruppe darstellt, wurden ebenfalls andere SA Stämme auf Veränderungen in der Genexpression durch dieses Molekül untersucht. Dabei wurde ein besonderer Schwerpunkt auf den SA Stamm Newman gelegt. Es ist bereits bekannt, dass Newman eine Punktmutation in *saeS* beinhaltet<sup>[97]</sup> und dass aus dem Grund dieser Stamm in manchen Sae-abhängigen Mechanismen eine Ausnahme darstellt. Deshalb wurde ebenfalls der Stamm NewHG<sup>[65]</sup> verwendet, der ein "normales" *saeS*-Gen beinhaltet. Damit sollte untersucht werden, ob diese Mutation ebenfalls eine Rolle bei der Hämin-Regulation spielt. Dafür sollten zunächst die basalen Transkriptionsraten der vier Gene aller untersuchten Stämme bestimmt und verglichen werden. Für diesen Versuch wurde die RNA von 6.5-stündigen Kulturen isoliert und per real-time PCR analysiert.

In Tab. 4-5 ist deutlich zu erkennen, dass sich die basalen Transkriptionsraten der verschiedenen Stämme stark voneinander unterscheiden. Zur besseren Übersicht wurden daher die Werte rot markiert, die sich markant vom Durchschnitt aller Werte abgehoben

hatten. Zusätzlich sind alle Standardabweichungen, die mehr als 50% des Messwertes ergaben, gelb markiert. Anhand der Werte ist deutlich zu erkennen, dass die *sae* und *hla* Expression bei 8325-4, Newman und LS1 deutlich höhere Expressionswerte ergab als bei den anderen SA Stämmen. Dabei ist aber auch anzumerken, dass die Standardabweichungen bei diesen Daten sehr große Werte erzielten. Damit ist eine weitere Bewertung dieser Messdaten sehr schwierig. Allerdings variierten die erzielten Expressionswerte sehr stark bei sehr hohen Werten. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Expression dieser Gene trotz großer Standardabweichung sehr viel höher ist als bei den anderen Stämmen. Allerdings kann aufgrund der Fehlerdifferenz kein definitiver Expressionsunterschied errechnet werden. Des Weiteren fällt auf, dass die Expressionsraten von 8325-4 außer bei *hlgA* deutlich über dem Durchschnitt aller untersuchten SA Stämme lagen. 6850 ergab bei *sae* und *hla* eine überdurchschnittliche Expression. Des Weiteren ist auffallend, dass Newman im Vergleich zu NewHG in allen vier Genen eine sehr viel höhere Expressionsrate aufwies. Diese Unterschiede gehen vermutlich auf die Punktmutation in *saeS* von Newman zurück. Die Expressionsdaten von NewHG dagegen reihen sich in den Durchschnitt der erzielten Messwerte der anderen Stämme ein. Des Weiteren ist auffallend, dass die Standardabweichungen fast aller *hla* Expressionswerte mehr als 50% der Messwerte ergaben. Das zeigt, dass die Expression dieses Gens vermutlich sehr sensibel auf kleine Veränderungen reagiert. Zusätzlich ist anzumerken, dass die Expression aller Gene von 8325-4 sehr große Standardabweichungen aufzeigten. Dies konnte für keinen anderen Stamm gezeigt werden.

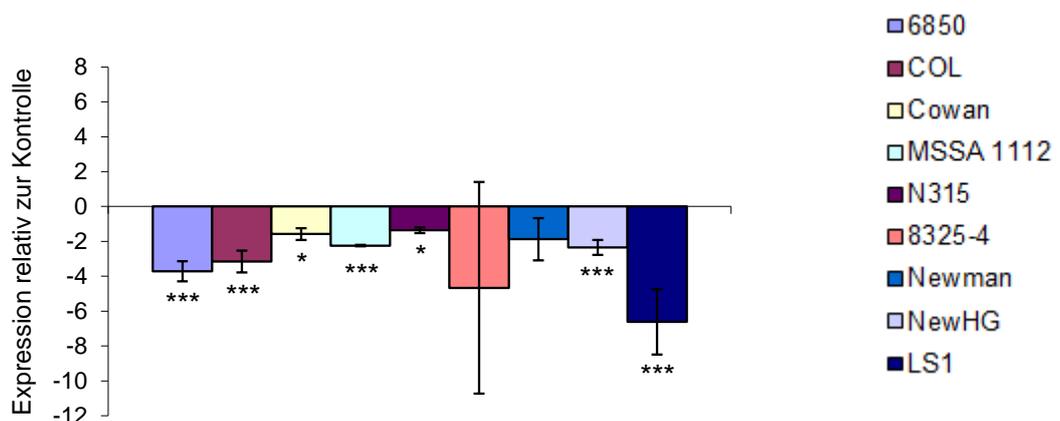
	<i>sae</i>	<i>hla</i>	<i>hla</i>	<i>hlgA</i>
6850	3.28 ± 0.23	1.29 ± 1.27	5.22 ± 1.71	0.18 ± 0.05
COL	0.97 ± 0.17	0.14 ± 0.02	0.11 ± 0.04	0.08 ± 0.05
Cowan	0.27 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.002	0.17 ± 0.07
MSSA 1112	0.61 ± 0.10	0.13 ± 0.08	0.02 ± 0.003	0.04 ± 0.01
N315	0.20 ± 0.01	0.29 ± 0.19	0.02 ± 0.003	0.04 ± 0.005
8325-4	1459 ± 1676	22299 ± 14838	16.97 ± 17.40	0.57 ± 0.31
Newman	4455 ± 4682	536 ± 590	0.04 ± 0.02	5.02 ± 1.38
NewHG	0.39 ± 0.05	0.05 ± 0.01	0.01 ± 0.001	0.11 ± 0.03
LS1	697 ± 371	1632 ± 964	0.34 ± 0.11	1.31 ± 0.54

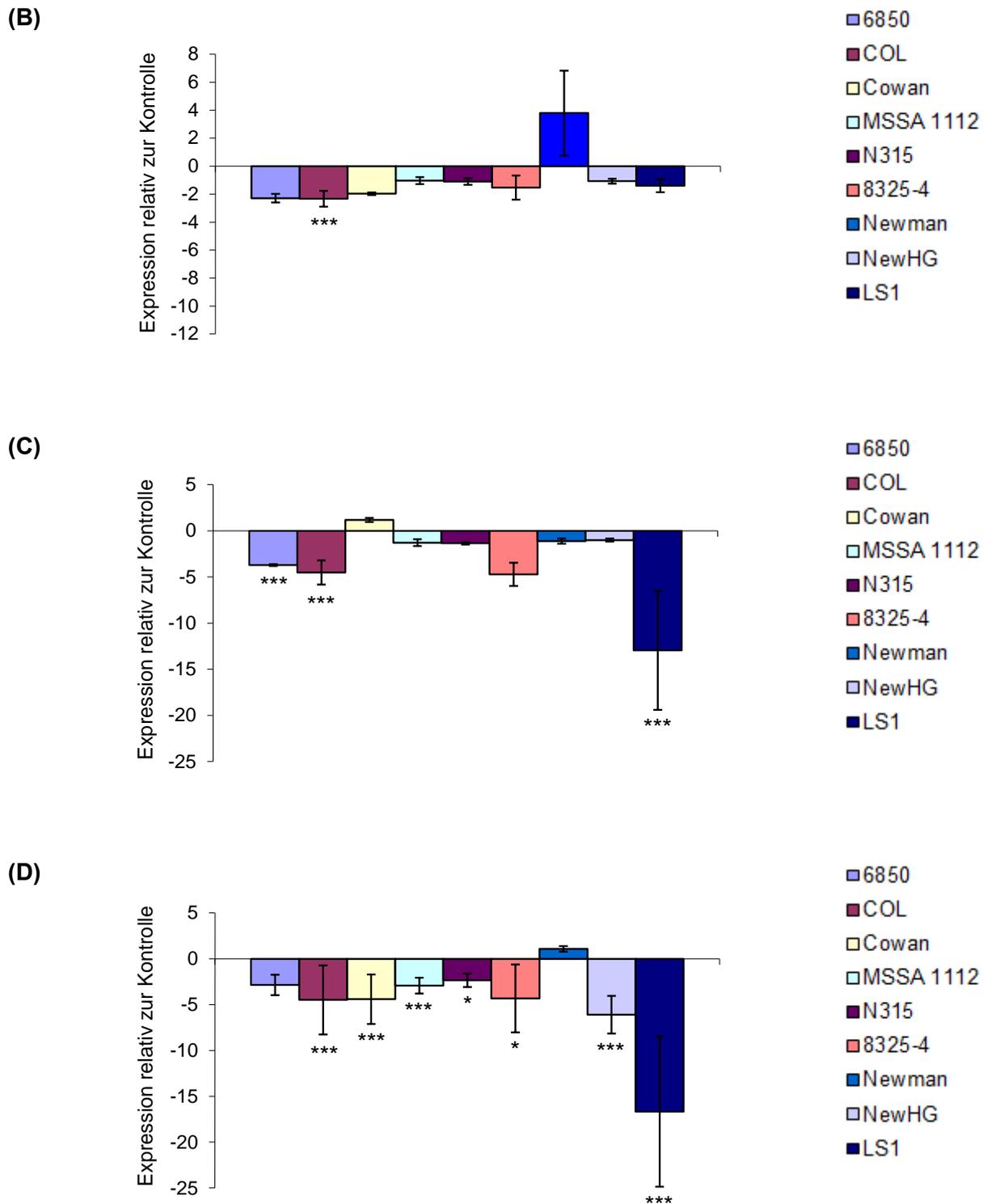
**Tab. 4-5 Vergleich der Transkriptionsraten von *sae* und den Hämolytinen in verschiedenen Stämmen.** Die RNA von 6.5-stündigen Kulturen der angegebenen SA Stämme in LB wurde isoliert und die mRNA-Level von *sae*, *hla*, *hla* und *hlgA* mittels real-time PCR bestimmt. Angegeben ist die Transkriptionsrate normiert auf das Housekeeping-Gen *gyrB*. Werte, die auffallend hohe bzw. niedrige Transkriptionsraten ergeben, sind rot markiert. Werte, deren Standardabweichung > 50% des Messwertes betragen, sind gelb markiert.

Anschließend sollten die Auswirkungen von Hämin auf die Expression dieser Gene bestimmt werden. Dazu wurde zu 6-stündigen Kulturen von 6850, COL, Cowan, MSSA 1112, N315, 8325-4, Newman und NewHG Hämin gegeben und nach 30 min Proben entnommen. Aus diesen Proben wurde die RNA isoliert und in einer real-time PCR analysiert.

In Abb. 4-15 wurden zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit die Messwerte von LS1 ebenfalls nochmals aufgetragen (vgl. Abb. 4-10). Gezeigt sind die Änderungen in der Expression nach Hämin-Zugabe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Expression von *sae* resultierte in diesem Experiment in allen Stämmen nach Hämin-Zugabe in einer Reduktion der Expression. Diese Expressionsverminderung betrug bei Cowan (-1.6), N315 (-1.4) und Newman (-1.9). Bei den meisten Stämmen (6850, COL, MSSA 1112 und NewHG) hingegen wurden Reduktionen in Bereich von -2.2 bis -3.7 gemessen. Nur bei 8325-4 und LS1 konnten größere Änderungen von -4.7 bzw. -6.6 beobachtet werden. Die *hla* Expression wurde deutlich weniger durch Hämin beeinflusst als die *sae* Expression. Hier konnten keine Effekte bei MSSA 1112 (-1.0), N315 (-1.0), 8325-4 (-1.5), NewHG (-1.0), und LS1 (-1.4) gemessen werden. Bei 6850 (-2.3), COL (-2.3) und Cowan (-2.0) wurden nur sehr kleine Expressionsreduktionen beobachtet. Interessanterweise wurde aber bei Newman eine Induktion der *hla* Expression durch Hämin um den Faktor 3.8 beobachtet. Im Vergleich zu NewHG, bei dem keine Änderungen in der Expression nach Hämin-Zugabe beobachtet werden konnte, ist diese Änderung ein Indiz dafür, dass die Mutation im WT für diesen Unterschied verantwortlich sein könnte. Die Expression von *hfb* wurde in den folgenden Stämmen durch Hämin nicht beeinflusst: Cowan (1.2), MSSA 1112 (-1.3), N315 (-1.3), Newman (-1.1) und NewHG (-1.0). Im Gegensatz dazu wurde eine signifikant verminderte Expression dieses Gens durch Hämin bei 6850 (-3.7), COL (-4.5) und LS1 (-12.9) beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die *hlgA* Expression erreicht. Hier war Newman der einzige Stamm, bei dem keine Änderung durch Hämin (+1.1) in der Expression resultierte. Alle anderen Stämme zeigten eine deutliche, meist signifikante Reduktion nach Hämin-Zugabe. Bei LS1 wurde in diesem Fall der größte Effekt (-16.7) gemessen.

(A)





**Abb. 4-15 Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sae* und den Hämolytinen in verschiedenen SA Stämmen durch Hämin-Zugabe.** 6-stündige Kulturen der angegebenen Bakterienstämme wurden für 30 min mit 4  $\mu$ M Hämin versetzt und anschließend die RNA isoliert. mRNA-Level von *sae* (A), *hla* (B), *hlyB* (C) und *hlyA* (D) wurden mittels real-time PCR bestimmt. Aufgetragen sind die Veränderungen der Expression normiert auf die jeweils unbehandelte Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (\*  $p \leq 0.03$ , \*\*  $p \leq 0.003$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass LS1 meist am sensitivsten auf Hämin-Zugabe reagierte. Allerdings stellte die Reduktion der Expression keine Ausnahme innerhalb der untersuchten SA Stämme dar, in denen meistens ähnliche Reaktionen festgestellt werden konnten.

## 4.4 Aktivitätsbestimmung des Sae-Regulators anhand eines repräsentativen Kontrollproteins

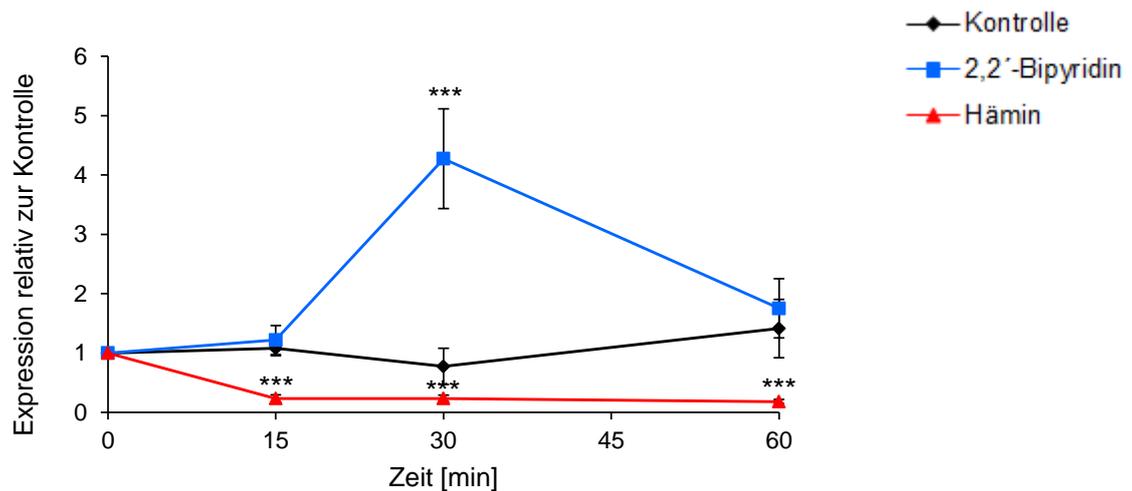
### 4.4.1 Auswirkungen der Eisenverfügbarkeit auf die Expression von Eap

Das Sae Regulon ist im Stamm Newman durch die Punktmutation ständig aktiviert. Da dieser Regulator für die Exoproteine verantwortlich ist, sind dort auch Proteine, wie z.B. Coa (Koagulase), FnbA (fibronectin-binding protein A), Sbi (staphylococcal IgG binding protein) und Efb (extracellular fibrinogen-binding protein)<sup>[65]</sup>, im Vergleich zu anderen Stämmen höher exprimiert. Eines dieser Exoproteine ist das extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap). Aufgrund der hohen Expression in Newman wird dieser Stamm auch für die native Isolierung von Eap genutzt (vgl. 3.2.7).

Da in den vorherigen Kapiteln schon eine Auswirkung von Hämin auf die Hämolyse gezeigt werden konnte, die sehr wahrscheinlich über den Regulator Sae vermittelt wurde, sollte nun der Effekt auf das Exoprotein Eap untersucht werden, da die Expression dieses Proteins maßgeblich über Sae reguliert wird<sup>[37]</sup>.

Zunächst wurden die Veränderungen der Expression von *eap* in LS1 Kulturen durch verschiedene Eisenkonzentrationen untersucht. Hierbei wurde zu 6-stündigen LS1 Kulturen Hämin bzw. 2,2'-Bipyridin gegeben, über einen Zeitraum von 1 h zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und die daraus isolierte RNA in einer real-time PCR analysiert.

In Abb. 4-16 ist deutlich zu erkennen, dass nach Hämin-Zugabe die Expression von *eap* im Vergleich zur Kontrolle signifikant vermindert wurde. Der Unterschied betrug nach 30 min einen Faktor von 3.3. Im Gegensatz dazu wurde die *eap* Expression durch 2,2'-Bipyridin-Zusatz stark erhöht. Die größte Induktion konnte nach 30 min gemessen werden (+5.5). Diese Ergebnisse sind damit mit den Expressionsdaten von *sae* und den Hämolyseindizes vergleichbar, die auch durch Hämin in ihrer Expression reduziert und durch Eisenmangel induziert wurden.

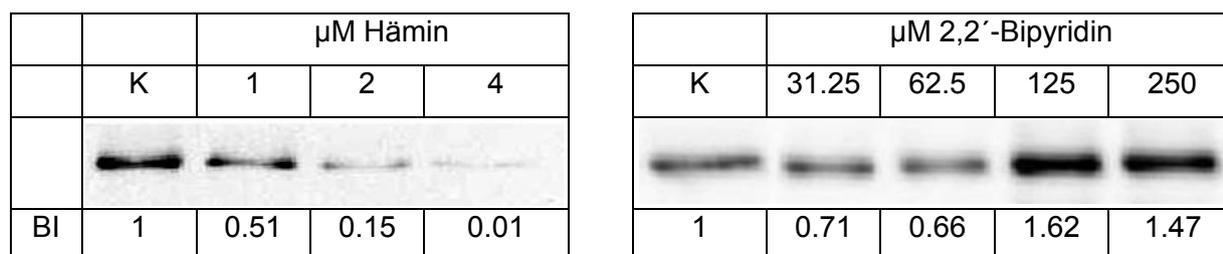


**Abb. 4-16 Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *eap* in LS1 in Abhängigkeit von der verfügbaren Eisenkonzentration im Medium.** 6-stündige Kulturen von LS1 in LB wurden mit 250  $\mu\text{M}$  2,2'-Bipyridin bzw. 4  $\mu\text{M}$  Hämin versetzt und es wurden über einen Zeitraum von 1 h Proben für die RNA-Isolation entnommen. mRNA-Levels von *eap* wurden mittels real-time PCR bestimmt. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen aus drei unabhängigen Messungen (\*  $p \leq 0.03$ , \*\*  $p \leq 0.003$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

Zusätzlich zu den Transkriptionsanalysen sollte auch der Proteinlevel überprüft werden um zu untersuchen, ob diese Genregulation sich bis auf diesen Level auswirken kann.

Kulturen von LS1 wurden dazu mit verschiedenen Hämin- bzw. 2,2'-Bipyridin-Konzentrationen angeimpft und nach 6 h die gleiche Bakterienzahl geerntet. Durch Resuspension mit 1 M LiCl wurden die Oberflächenproteine und damit auch Eap von der Bakterienmembran extrahiert. Anschließend wurden die Proben mit einem Western Blot analysiert und die Bandenintensität quantifiziert.

Aus den Blots in Abb. 4-17 wird ersichtlich, dass die Eap-Menge mit zunehmender Hämin-Konzentration reduziert und mit zunehmender 2,2'-Bipyridin-Konzentration erhöht wurde. Durch Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Hämin verringerte sich die Eap-Menge schon um die Hälfte und bei 2 bzw. 4  $\mu\text{M}$  Hämin waren nur noch 15 bzw. 1% der vorherigen Proteinmenge detektierbar. Durch 2,2'-Bipyridin-Zugabe wurden zunächst nur kleine Unterschiede festgestellt. Erst ab einer Konzentration von 125  $\mu\text{M}$  konnte eine klare Zunahme um den Faktor 1.62 gemessen werden, die aber nicht weiter vergrößert werden konnte durch eine weitere Konzentrationserhöhung von 2,2'-Bipyridin.



**Abb. 4-17 Abhängigkeit der Eap-Menge von der verfügbaren Eisenkonzentration im Medium.** LS1 wurde 6 h mit 0, 1, 2 und 4  $\mu\text{M}$  Hämmin bzw. 0, 31.25, 62.5, 125 und 250  $\mu\text{M}$  2,2'-Bipyridin in LB kultiviert. Die Oberflächenproteine wurden mit LiCl extrahiert und mittels Western Blot analysiert. Die gemessene Bandenintensität (BI) wurde auf die Kontrolle (K) normiert. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für drei unabhängige Wiederholungen.

2,2'-Bipyridin ist ein toxisches Molekül, das durch Komplexierung von freiem Eisen im Nährmedium von Bakterien zu einem Mangel an nutzbarem Eisen führt und dadurch die fast eisenfreien Bedingungen im Wirt nachahmt. Es sollte deshalb zusätzlich gezeigt werden, dass der durch 2,2'-Bipyridin-Zugabe ausgelöste Effekt auf die Eap-Expression nicht auf der Toxizität dieses Moleküls beruht, sondern der induzierte Eisenmangel für die gemessenen Unterschiede verantwortlich ist.

Um dies zu untersuchen wurden Kulturen von LS1 mit verschiedenen Hämmin- bzw. 2,2'-Bipyridin-Konzentrationen in RPMI angeimpft. Da in RPMI 2,2'-Bipyridin kein Eisen mehr komplexieren kann, sollte durch verschiedene Konzentrationen dieses Moleküls keine Änderungen in der Eap-Expression mehr erkennbar sein. 6 h nach Induktion wurde die gleiche Bakterienzahl pelletiert und durch Resuspension mit 1 M LiCl wurden die Oberflächenproteine extrahiert. Die Proben wurden wie zuvor mit Hilfe eines Western Blots analysiert.

Die Banden des Blots in Abb. 4-18 verdeutlichen, dass die Reduktion der Eap-Menge durch Hämmin-Zugabe auch in RPMI gezeigt werden konnte. Auch die quantifizierten Werte (1  $\mu\text{M}$ : 0.40, 2  $\mu\text{M}$ : 0.23 und 4  $\mu\text{M}$ : 0.02) sind in einem vergleichbaren Bereich wie zuvor in LB (vgl. Abb. 4-17). Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede in den Bandenintensitäten detektiert werden, wenn unterschiedliche 2,2'-Bipyridin-Konzentrationen zugesetzt wurden. Die quantifizierten Werte zeigten zwar eine kleine Zunahme der Eap-Menge, diese unterschied sich aber kaum zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen an 2,2'-Bipyridin und erreichte nicht so deutliche Unterschiede wie zuvor in LB.

		µM Hämmin			µM 2,2'-Bipyridin			
	K	1	2	4	31.25	62.5	125	250
relative BI	1	0.40	0.23	0.02	1.20	1.30	1.42	1.45

**Abb. 4-18 Abhängigkeit der Eap-Menge von der verfügbaren Eisenkonzentration in RPMI.** LS1 wurde 6 h mit 0, 1, 2 und 4 µM Hämmin bzw. 31.25, 62.5, 125 und 250 µM 2,2'-Bipyridin in RPMI kultiviert. Die Oberflächenproteine wurden mit LiCl extrahiert und mittels Western Blot analysiert. Die gemessene Bandenintensität (BI) wurde auf die Kontrolle (K) normiert. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für drei unabhängige Wiederholungen.

#### 4.4.2 Untersuchung der Eap-Expression nach Zugabe anderer Eisenquellen

Der nächste Schritt sollte zeigen, ob der Effekt auf die Eap-Expression ein Hämmin-spezifischer Effekt ist oder ob dies auch durch andere Eisenquellen erreicht werden kann. Dies sollte mit Transferrin und FeSO<sub>4</sub> als Eisenquelle analysiert werden. Dazu wurde eine LS1 Kultur zunächst 6 h mit unterschiedlichen Transferrin-Konzentrationen (0.5 - 4 µM) in LB inkubiert und aus den Bakterienpellets wie zuvor mit LiCl die Oberflächenproteine isoliert. Transferrin hat im Gegensatz zu Hämmin zwei Bindungsstellen für Eisen<sup>[86]</sup> und wurde, um eine äquimolare Eisenkonzentration zu den Hämmin-Versuchen erreichen zu können, auch in einer Konzentration von 0.5 µM verwendet. Mit einem Western Blot wurden die Eap-Proteine sichtbar gemacht und die Bandenintensitäten gemessen.

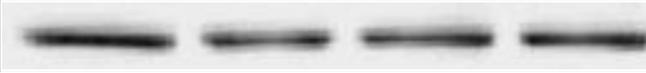
In Abb. 4-19 konnten starke Eap-Banden auf dem Blot sichtbar gemacht werden, die sich jedoch in ihren Intensitäten kaum voneinander unterschieden. Die normierten Werte für alle Konzentrationen sind in einem Bereich zwischen 0.94 und 1.17. Das bedeutet, dass Transferrin nicht den gleichen Effekt wie Hämmin hervorrufen konnte.

		µM Transferrin			
	K	0.5	1	2	4
rel. Bandenintensität	1	0.98	1.02	1.17	0.94

**Abb. 4-19 Abhängigkeit der Eap-Menge von der verfügbaren Transferrin-Konzentration als Eisenquelle.** LS1 wurde 6 h mit 0, 0.5, 1, 2 und 4 µM Transferrin in LB kultiviert. Die Oberflächenproteine wurden mit LiCl extrahiert und mittels Western Blot analysiert. Die gemessene Bandenintensität wurde auf die Kontrolle (K) normiert. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für drei unabhängige Wiederholungen.

Anschließend wurde der Effekt von Eisensulfat auf die Eap-Expression getestet. In diesem Fall wurde LS1 in dem eisenfreien Medium RPMI kultiviert, da in dem zuvor benutzten Nährmedium LB bereits eine signifikante, jedoch nicht klar definierte Eisenkonzentration vorliegt. Auch in diesem Fall wurden die Bakterien 6 h mit äquimolaren Konzentrationen (1 - 4  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ ) wie zuvor Hämin kultiviert und die Proteine nach gleichem Protokoll aufgearbeitet und analysiert.

Auch in diesem Blot (Abb. 4-20) konnten nur sehr kleine Unterschiede in der Proteinmenge von Eap nach Zugabe von Eisensulfat gemessen werden. Die Bandenintensitäten wurden durch die Eisenzugabe zwar etwas erniedrigt, dieser Unterschied war aber nicht sehr deutlich. Die unterschiedlichen Konzentrationen an Eisensulfat resultierten in sehr ähnlichen Intensitäten zwischen 0.71 und 0.79. Dies bedeutet, dass auch Eisen in ionischer Form den zuvor beschriebenen Hämin-Effekt nicht erreichen konnte.

		$\mu\text{M FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$		
	K	1	2	4
				
rel. Bandenintensität	1	0.71	0.79	0.79

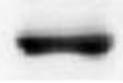
**Abb. 4-20 Abhängigkeit der Eap-Menge von der verfügbaren Eisensulfat-Konzentration als Eisenquelle.** LS1 wurde 6 h mit 0, 1, 2 und 4  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$  in RPMI kultiviert. Die Oberflächenproteine wurden mit LiCl extrahiert und mittels Western Blot analysiert. Die gemessene Bandenintensität wurde auf die Kontrolle (K) normiert. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für drei unabhängige Wiederholungen.

Da aufgrund der gerade erhaltenen Ergebnisse Eisen alleine vermutlich nicht für die Effekte auf der Protein- und der Transkriptionsebene verantwortlich zu sein scheint, sollte der Porphyrinring des Hämins daraufhin untersucht werden, ob dieser auch ohne komplexiertes Metall die Hämin-Wirkung hervorrufen kann.

In diesem Fall wurde LS1 in RPMI kultiviert und für 6 h im Schüttler mit den angegebenen Zusätzen kultiviert. Die Oberflächenproteine wurden durch LiCl-Extraktion abgelöst und mittels Western Blot analysiert.

In dem in Abb. 4-21 gezeigten Blot konnte wieder eine drastische Reduktion der Proteinmenge nach Hämin-Zugabe erkannt werden. Nur noch 1% der Eap-Menge war im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Die anderen Banden hingegen unterscheiden sich in ihrer Intensität kaum. Allerdings ist deren Eap-Menge um die Hälfte reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Aber weder durch den Protoporphyrinring alleine noch zusammen mit Eisen konnte ein vergleichbarer Effekt wie der durch Hämin detektiert werden. Eisensulfat alleine hatte wie zuvor in Abb. 4-20 nur einen sehr geringen Einfluss auf Eap. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Protoporphyrinring nur mit komplexiertem Eisen, also nur als

Hämin, seine Wirkung auf die Genregulation entfalten kann. Protoporphyrin und Eisensulfat scheinen sich unter diesen Bedingungen nicht zu Hämin zusammensetzen zu können, da auch in diesem Fall kein Effekt auf der Proteinebene erkennbar war.

	K	H	P	P + Fe	Fe
					
rel. Bandenintensität	1	0.01	0.45	0.42	0.52

**Abb. 4-21 Veränderung der Eap-Menge durch Zugabe von eisenfreiem Protoporphyrin.** LS1 wurde 6 h mit Hämin (H), Protoporphyrin (P), Protoporphyrin +  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (Fe) und  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  in RPMI kultiviert (alle Zusätze wurden in einer Konzentration von  $4 \mu\text{M}$  zugegeben). Die Oberflächenproteine wurden mit LiCl extrahiert und mittels Western Blot analysiert. Die gemessene Bandenintensität wurde auf die Kontrolle (K) normiert. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für drei unabhängige Wiederholungen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass weder mit Transferrin, Eisensulfat oder dem Porphyrinring ohne Eisen ähnliche Ergebnisse wie zuvor mit Hämin auf die Proteinmenge von Eap erzielt werden konnten.

#### 4.4.3 Abhängigkeit der Eap-Expression von der Eisenverfügbarkeit in LS1 Mutanten

Zur Vervollständigung der Versuche sollten die Auswirkungen von Hämin auf die Eap-Expression ebenfalls in den LS1 Mutanten analysiert werden. Dazu wurden LS1  $\Delta\text{sae}$  und LS1  $\Delta\text{fur}$  6 h in LB mit Hämin und 2,2'-Bipyridin kultiviert und die Proteine wie zuvor extrahiert und mit Western Blot detektiert.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden entsprechende Proben von LS1 nochmals auf das Gel aufgetragen (Abb. 4-17). In Abb. 4-22 konnte für LS1 wie schon zuvor gezeigt werden, dass eine deutlich kleinere Eap-Menge nach Hämin-Zugabe (0.24) detektiert werden konnte, während 2,2'-Bipyridin eine Zunahme der Protein-Expression (2.19) zur Folge hatte. Bei LS1  $\Delta\text{sae}$  konnten nur sehr schwache Banden erhalten werden. Auch die Kontrolle ohne Zusätze ist deutlich in ihrer Bandenintensität reduziert im Vergleich zum WT. Dies kann als Beleg dafür gewertet werden, dass Sae für die Expression von Eap von zentraler Bedeutung ist. LS1  $\Delta\text{fur}$  ergab ebenfalls sehr viel schwächere Banden als der WT. Nach Hämin-Zugabe konnte aber in dieser Mutante eine Reduktion der Expression (0.47) beobachtet werden, während durch 2,2'-Bipyridin-Zugabe eine deutliche Zunahme (5.27) zu erkennen war.

	LS1			LS1 $\Delta sae$			LS1 $\Delta fur$		
	K	H	B	K	H	B	K	H	B
rel. BI	1	0.24	2.19	1	0.66	1.10	1	0.47	5.27

**Abb. 4-22 Veränderung der Eap-Menge von LS1, LS1  $\Delta sae$  und LS1  $\Delta fur$  in Abhängigkeit von der verfügbaren Eisenkonzentration im Medium.** LS1 und LS1  $\Delta sae$  wurden 6 h mit 4  $\mu$ M Häm in bzw. 250  $\mu$ M 2,2'-Bipyridin in LB kultiviert. LS1  $\Delta fur$  wurde 6 h mit 4  $\mu$ M Häm in bzw. 125  $\mu$ M 2,2'-Bipyridin in LB kultiviert. Die Oberflächenproteine wurden mit LiCl extrahiert und mittels Western Blot analysiert. Die gemessene Bandenintensität (BI) wurde auf die Kontrolle (K) normiert. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für drei unabhängige Wiederholungen.

## 4.5 Vergleich der Auswirkungen von Häm in auf Newman und eine Newman Mutante

### 4.5.1 Eap-Expressionsdaten in Abhängigkeit von Häm in

Da der SA Stamm Newman in vorherigen Versuchen bereits eine Sonderstellung in der Regulation durch Häm in darstellte, die vermutlich mit dem Polymorphismus des Sae Regulons begründet werden kann, sollte auch dieser Stamm sowie der *saeS*-komplementierte Stamm NewHG auf Änderungen der Eap-Expression durch Häm in untersucht werden. Da Newman sehr viel mehr Eap produziert als alle anderen SA Stämme, wurden die Proben dieses Stammes 90-fach verdünnt auf die Western Blot Gele aufgetragen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bandenintensität der Eap-Bande bei Newman mit Häm in größer wurde (Abb. 4-23). Die Intensität war etwa um den Faktor 5 größer als die Kontrolle. Im Gegensatz dazu konnte bei NewHG mit Häm in eine Verringerung der Bandenintensität auf etwa 60% des Kontrollwertes gemessen werden.

	Newman		NewHG	
	K	H	K	H
rel. Bandenintensität	1	4.94	1	0.59

**Abb. 4-23 Veränderung der Eap-Menge von Newman und NewHG durch Häm in-Zugabe.** Newman und NewHG wurden 6 h mit 4  $\mu$ M Häm in (H) in LB kultiviert. Die Oberflächenproteine wurden mit LiCl extrahiert und mittels Western Blot analysiert. Die gemessene Bandenintensität wurde auf die Kontrolle (K) normiert. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für drei unabhängige Wiederholungen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass neben den stark voneinander abweichenden basalen Expressionsraten von Eap in diesen beiden Stämmen, zusätzlich eine unterschiedliche Reaktion durch Hämin-Zugabe auf dem Level der Eap-Expression gemessen werden konnte.

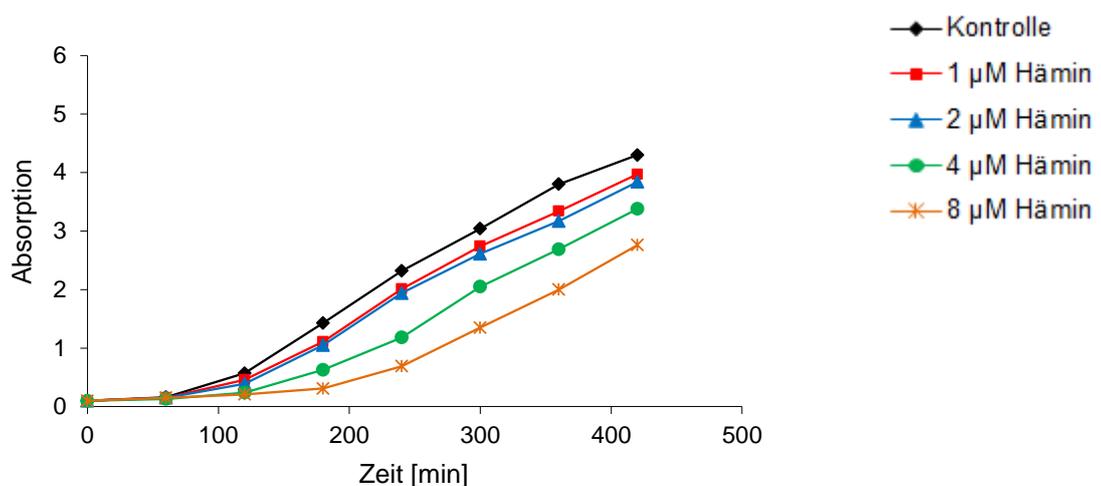
## 4.5.2 Auswirkungen von Hämin auf das Wachstum

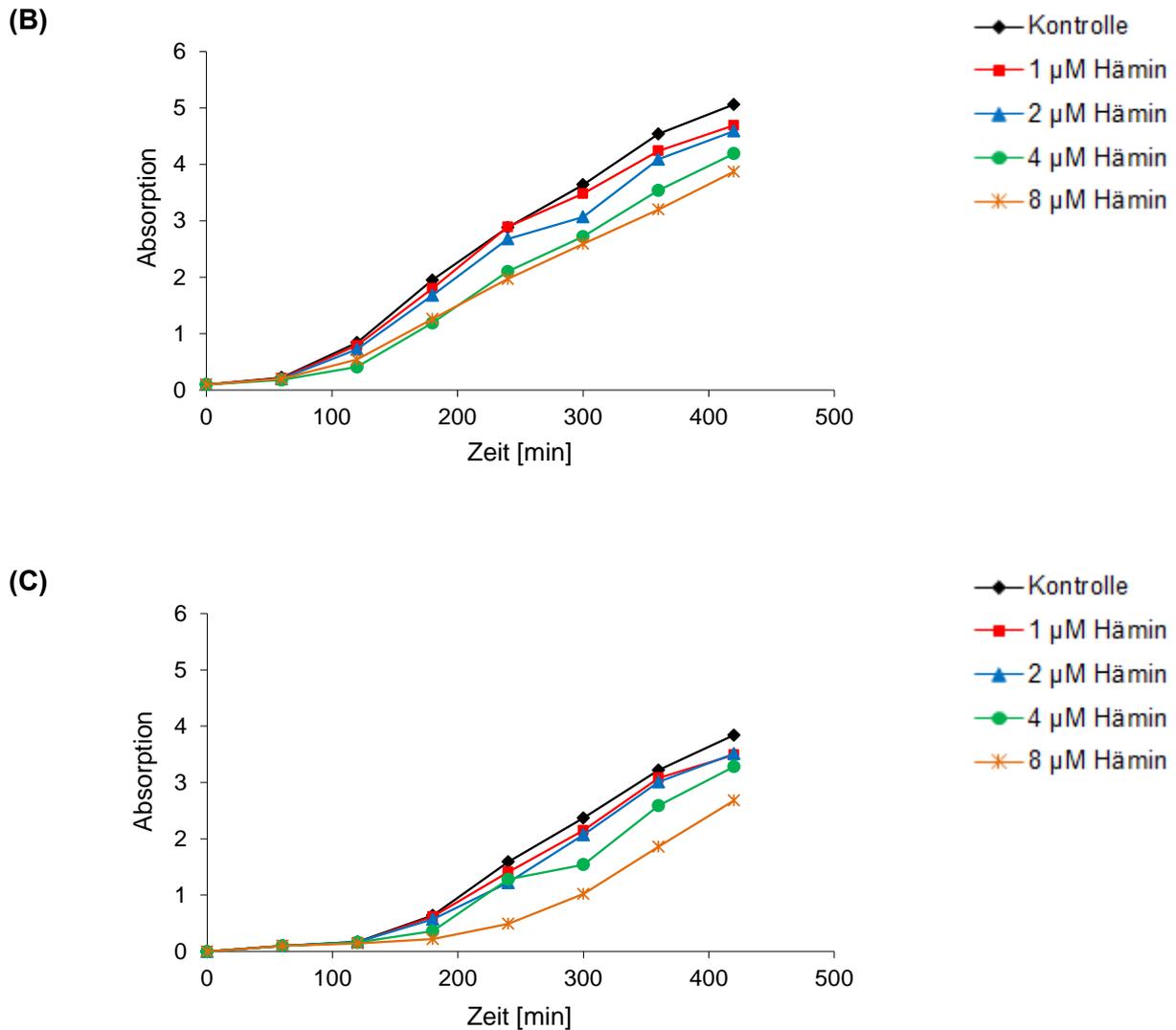
### 4.5.2.1 Wachstumskurven

Zur Vervollständigung wurden ebenfalls Wachstumskurven mit unterschiedlichen Hämin-Konzentrationen mit Newman, NewHG und der Eap-Mutante mAH12 durchgeführt. mAH12 wurde in diesem Experiment untersucht, um zu überprüfen, ob die Anwesenheit von Eap Auswirkungen auf die Sensibilität gegenüber Hämin hat. Eap ist bekannt für seine großen Bindungs- und Wechselwirkungskapazitäten mit anderen Proteinen und Molekülen. Hier sollte getestet werden, ob Eap ebenfalls mit Hämin wechselwirken und somit einen Teil dieses toxischen Moleküls abfangen kann.

In Abb. 4-24 ist deutlich zu erkennen, dass die Wachstumsrate mit zunehmender Hämin-Konzentration in allen drei Stämmen etwas verlangsamt wurde und diese Kulturen schlechter wuchsen. Die Reduktion der Verdopplungsrate war bei diesen drei Stämmen allerdings sehr gering. Bei Newman konnte der größte Effekt beobachtet werden, während NewHG und mAH12 eine geringere Sensitivität gegenüber Hämin zeigten. Damit scheint das Fehlen von Eap in mAH12 keinen Einfluss auf die Toxizität von Hämin gegenüber SA zu haben. Zusätzlich scheint der SA Stamm Newman deutlich weniger sensitiv auf die Toxizität von Hämin zu sein als LS1 (vgl. Abb. 4-14).

(A)





**Abb. 4-24 Auswirkungen unterschiedlicher Hämin-Konzentrationen auf das Wachstum von Newman, NewHG und mAH12.** Newman (A), NewHG (B) und mAH12 (C) wurden in LB mit 0, 1, 2, 4 und 8  $\mu\text{M}$  Hämin kultiviert. Wachstumsraten wurden durch regelmäßige Messungen der optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) bestimmt. Gezeigt ist ein Experiment als Repräsentant für 2 unabhängige Wiederholungen.

#### 4.5.2.2 MHK-Bestimmung

Um die Toxizität von Hämin eindeutiger bestimmen und die Unterschiede zwischen Newman und den Mutanten klarer darstellen zu können wurden MHKs bestimmt. Dazu wurde Hämin in Konzentrationen zwischen 0.125  $\mu\text{M}$  und 128  $\mu\text{M}$  verwendet.

Bei allen drei Newman-Stämmen (Newman, NewHG und mAH12) konnten in diesem Konzentrationsbereich keine MHKs bestimmt werden, da auch bei der höchsten verwendeten Hämin-Konzentration ein Wachstum der Bakterien beobachtet wurde. Damit konnte auch mit diesem Test gezeigt werden, dass Newman deutlich weniger sensitiv auf die Hämin-Toxizität reagiert als LS1 (Tab. 4-4).

## 4.6 Testen von Wundisolaten auf Eap-Präsenz

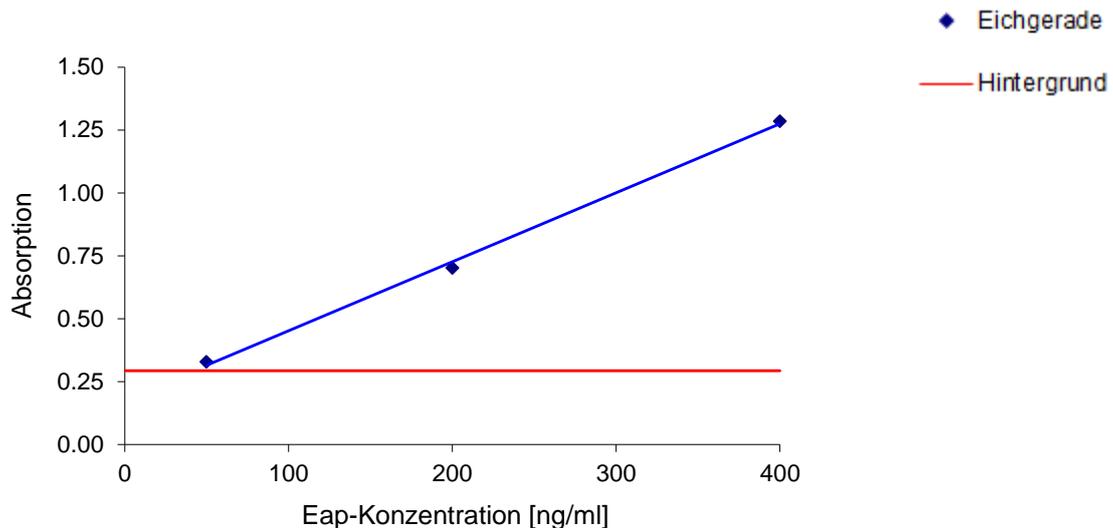
### 4.6.1 Bestimmung des Tests mit der kleinsten Detektionsgrenze für Eap

Die menschliche Blutbahn oder Wunden werden oft von SA besiedelt. In diesen Bereichen kommt so gut wie kein freies Eisen vor. SA nutzt daher seine hämolytischen Eigenschaften, um sich Eisen aus z. B. Erythrozyten zu beschaffen. Bei der Regulation aufgrund eines Eisenmangels wird neben den Hämolysinen auch Eap in seiner Expression hochreguliert<sup>[47]</sup>. Da Eap eines der Proteine ist, die in allen bisher getesteten SA Stämmen vorkommen<sup>[43]</sup> und z. T. auch in großen Mengen, sollten Wundisolate auf die Anwesenheit von Eap getestet werden. Um kleine Proteinmengen spezifisch nachweisen zu können, gibt es zwei gängige Methoden, die beide auf den bindungsspezifischen Eigenschaften von Antikörpern beruhen, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) und Western Blot. Um die Wundisolate zu testen sollte zunächst festgestellt werden, welcher dieser beiden Tests die niedrigere Detektionsgrenze für Eap besitzt.

Da noch kein Protokoll für einen ELISA zur Eap-Detektion vorhanden war, musste dieser Test zunächst etabliert werden. Es sollte ein Sandwich-ELISA aufgebaut werden, bei dem der Boden einer Mikrotiterplatte zunächst mit einem polyklonalen anti-Eap-Antikörper beschichtet wurde und mit einem monoklonalen anti-Eap-Antikörper Eap detektiert werden sollte. Die Etablierung ergab als günstigste Konzentration für die Beschichtung 1 µg/ml polyklonalen anti-Eap-Antikörper und zur Detektion 250 ng/ml monoklonalen Anti-Eap-Antikörper.

Um die Detektionsgrenze des neu etablierten ELISAs für Eap zu bestimmen, wurde in diesem Test eine Eichgerade für dieses Protein erstellt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von Eap in Konzentrationen zwischen 50 und 400 ng/ml verwendet. In Abb. 4-25 sind die Messwerte der verschiedenen Eap-Konzentrationen gegen die Absorption aufgetragen. Durch unspezifische Bindungen kann es im ELISA zu einer Hintergrundlumineszenz kommen. Diese ist zur besseren Einschätzung der Eichgerade mit in das Diagramm eingetragen worden.

Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass sich durch die Messwerte eine Eichgerade mit großer Steigung ergab. Bei einer Konzentration von 50 ng/ml Eap erreichte der Messwert ungefähr die gleiche Absorption wie der Hintergrund. Damit ist diese Eap-Konzentration nicht eindeutig vom Hintergrund zu unterscheiden und als Detektionsgrenze ungeeignet. Diese Grenze konnte zwischen einer Konzentration von 100 - 200 ng/ml festgelegt werden. Da bei einem ELISA immer 50 µl einer Probe vermessen werden, können daraus die absoluten Grenzwerte des Proteins berechnet werden. Diese Detektionsgrenze liegt demnach bei 5 - 10 ng Eap in einem Volumen von 50 µl.

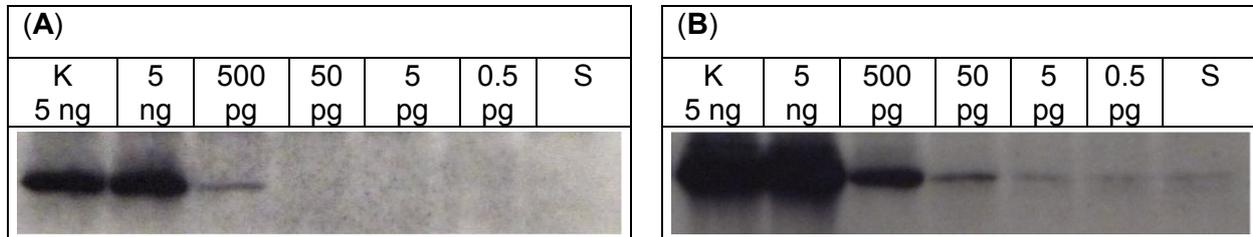


**Abb. 4-25 Eichgerade der Absorption eines ELISAs mit unterschiedlichen Eap-Konzentrationen.** In einem ELISA wurden verschiedene Eap-Konzentrationen (50, 200 und 400 ng/ml) verwendet und mit den gemessenen Absorptionen eine Eichgerade erstellt. Die Hintergrundabsorption wurde durch eine rote Gerade in das Diagramm integriert.

Um die Detektionsgrenze von Eap im Western Blot zu ermitteln, wurden ebenfalls Verdünnungen von Eap vorgelegt und im Western Blot analysiert. Dazu wurde ausgehend von 50 ng in 10 µl eine Verdünnungsreihe angelegt, bei der jede Probe 1:10 verdünnt wurde um die nächste Verdünnungsstufe zu erhalten. Eap wurde hierbei in gepooltem Serum verdünnt, um ähnliche Bedingungen zu erhalten, wie in den zu untersuchenden Wundisolaten. Diese Proben wurden mit dem Protein "gespikt" und anschließend 1:10 in PBS verdünnt, da im Serum so viele Proteine vorhanden sind, die zu einer unspezifischen Antikörperbindung auf dem Blot führen könnten. Die Ansätze wurden anschließend per Western Blot analysiert, wobei die Eap-Konzentrationen durch die Verdünnung nun zwischen 0.5 ng/µl und 0.05 pg/µl lagen. Alle Proben wurden auf zwei verschiedene Gele aufgetragen, da zwei verschiedene anti-Eap-Antikörper (monoklonal und polyklonal) getestet werden sollten.

In Abb. 4-26 sind die erhaltenen Blots abgebildet. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass es zwischen der Kontrolle (K: 5 ng Eap), die nicht gespikt wurde, und der gespikten Probe mit 5 ng Eap bei beiden verwendeten Antikörpern keine Unterschiede in der Intensität der Banden erkannt werden konnte. Das heißt, dass Eap auch nach dem Spiken in gleicher Form vorhanden war und mit dieser Methode in Serum spezifisch nachweisbar ist. Des Weiteren ist es möglich an diesen Blots die Detektionsgrenze der Antikörper abzulesen. Mit dem monoklonalen anti-Eap-Antikörper wurde bei einer aufgetragenen Menge von 500 pg Eap die letzte Bande detektiert. Alle kleineren Mengen konnten nicht mehr sichtbar gemacht werden. Bei Verwendung des polyklonalen anti-Eap-Antikörpers konnte auch 50 pg Eap noch eindeutig als Bande erkannt werden. Allerdings verläuft bei diesem Antikörper eine

unspezifische Bande auf der Höhe des zu detektierenden Proteins, die auch in den negativen Kontrollen zu sehen und vermutlich auf unspezifische Bindungen zu Serumbestandteilen zurückzuführen ist.



**Abb. 4-26 Ermittlung der Detektionsgrenze von Eap im Western Blot.** Gespiktes Eap in Serum wurde zu Konzentrationen von 5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg, 0.5 pg und 0 pg in PBS verdünnt und im Western Blot mit monoklonalem anti-Eap-Antikörper (A) und polyklonalem anti-Eap-Antikörper (B) detektiert, K= Kontrolle ohne Spiken, S= nur Serum.

Damit ist im Western Blot der polyklonale Anti-Eap-Antikörper zehnmal sensitiver gegenüber Eap als der monoklonale. Des Weiteren können mit dieser Methode etwa 20-fach schwächer konzentrierte Proben noch eindeutig bestimmt werden, als es mit dem ELISA möglich wäre (vgl. Abb. 4-25). Aus diesem Grund wurde der Western Blot unter Verwendung des polyklonalen Anti-Eap-Antikörpers zur Untersuchung der Wundisolate ausgewählt.

#### 4.6.2 Untersuchung der Wundisolate

Die Wundisolate wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Eming, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Uniklinik Köln, zur Verfügung gestellt.

Abb. 4-27 bildet den Blot mit den getesteten Wundisolaten ab. Zur Kontrolle wurde eine Probe nur mit gepoolter Wundflüssigkeit aufgetragen sowie zwei verschiedene Konzentrationen an Eap (0.5 ng und 5 ng), die ebenfalls in gepoolter Wundflüssigkeit verdünnt wurden. Die beiden Eap-Kontrollen konnten gut sichtbar gemacht werden und die gepoolte Wundflüssigkeit diente als Orientierung für unspezifische Banden und zur Abschätzung des Hintergrundes. Es ist deutlich zu erkennen, dass in keiner der untersuchten Proben eine Eap-Bande eindeutig identifizierbar war. Die dünne, auf der Höhe von Eap verlaufende Bande, geht vermutlich auf unspezifische Wechselwirkungen zurück, da sie ebenfalls in der negativen Kontrolle auftrat.

Proben der Wundisolate								Eap	
2	4	6	8	13	15	17	g WF	0.5 ng	5 ng
									

**Abb. 4-27 Untersuchung der Wundisolate auf die Präsenz von Eap.** Alle Proben der Wundisolate wurden mit PBS auf 10  $\mu$ l aufgefüllt und im Western Blot mit dem polyklonalen anti-Eap-Antikörper untersucht, g WF= gepoolte Wundflüssigkeit.

## 5 Diskussion

### 5.1 Auswirkung der Eisenverfügbarkeit auf die Expression verschiedener Proteine

Die Reaktionen von Staphylokokken auf eisenreduzierende Bedingungen sind schon von vielen Arbeitsgruppen untersucht worden. Diese Konditionen sind den Gegebenheiten im Wirt, insbesondere in z. B. Abszessen oder der Blutbahn<sup>[80, 88]</sup> in ihrer fast eisenfreien Umgebung sehr ähnlich. Friedman *et al.*<sup>[29]</sup> konnten unter Eisenabwesenheit eine Induktion der Expression von Proteinen erkennen, die bei der Eisenakquirierung beteiligt sind, wie z. B. Proteine der Siderophoren-Synthese. Zusätzlich konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass diese Expression über die eisenabhängige Inaktivierung des Repressors Fur induziert wird. Des Weiteren werden unter Eisenmangel das Isd- (iron-regulated surface determinant system) und das Hts-System (heme transport system) von Staphylokokken ebenfalls Fur-abhängig aktiviert<sup>[69, 94]</sup>. Diese Systeme sind bei der Aufnahme von Häm in das bakterielle Zytoplasma beteiligt. Das durch Hämolyse von Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin bindet dabei an Oberflächenproteine des Isd-Systems. Die anschließende Internalisierung der Häm-Untereinheit erfolgt über die membranassoziierten Transportsysteme HtsABC oder IsdDEF<sup>[69, 94]</sup>. Torres *et al.*<sup>[101]</sup> konnten zusätzlich in einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit zeigen, dass Virulenzfaktoren, wie z. B. Hämolsine und Zytotoxine, unter eisenlimitierenden Bedingungen vermehrt exprimiert werden. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Hierbei konnte auf transkriptioneller sowie auf Proteinebene eine erhöhte Transkription verschiedener Hämolsine (Abb. 4-3) bzw. eine größere Hla-Proteinmenge (Abb. 4-2) unter Eisenmangel-Bedingungen festgestellt werden. Diese Daten zeigen, dass die Regulation der Hämolsine unter den gewählten Bedingungen bereits auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Die induzierte Transkription (Abb. 4-3) führt dabei über eine erhöhte Proteinexpression (Abb. 4-2) zu einer größeren Lyse von humanen Erythrozyten (Abb. 4-1) und damit zu einer erhöhten Freisetzung von eisenbeinhaltendem Hämoglobin. Dieser Mechanismus stellt eine der Maßnahmen des Bakteriums dar, Eisen bei Bedarf vermehrt zu akquirieren. Die Hämolsine bewirken dabei durch Lyse der Erythrozyten die Freisetzung von Hämoglobin, welches an bakterielle Rezeptoren bindet. Anschließend werden die eisenkomplexierenden Häm-Untereinheiten freigesetzt, durch die zuvor genannten Transporter von den bakteriellen Zellen aufgenommen, das Eisen intrazellulär aus den Häm-Untereinheiten herausgelöst und so für intrazelluläre Prozesse verfügbar gemacht. Der Eisenmangel wird somit gezielt erkannt und resultiert in kompensatorischer Genregulation. Umgekehrt stellte sich die Frage, ob eine große Eisenverfügbarkeit ebenfalls erkannt wird. Zu ca. 75% wird Häm als

Eisenquelle von den Bakterien genutzt<sup>[59]</sup>, da dies das größte Eisenreservoir im Wirt darstellt<sup>[88]</sup>. Auf der anderen Seite ist die Toxizität von Häm für SA ebenfalls bekannt. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass nicht nur die vermehrte Aufnahme dieses Moleküls unter Eisenmangel, sondern auch die extrazelluläre Freisetzung von Häm (durch eukaryote Zellen) bei ausreichender, intrazellulärer Eisenverfügbarkeit unter einer gezielten Kontrolle durch den Einfluss von Staphylokokken-Toxinen stehen könnte.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit durch Hämin-Zugabe meist ein gegensätzlicher Effekt beobachtet werden als unter Eisenmangel-Bedingungen. Der gerade beschriebenen Induktion der Hämolyse und der Hämolyse unter Eisenmangel, steht bei ausreichender Eisenverfügbarkeit nach Hämin-Zugabe eine Reduktion gegenüber. Dieser Versuch zeigt deutlich, dass beide Extreme, Eisenmangel und Eisenverfügbarkeit, eine gegensätzliche Auswirkung auf die Hämolyse-Aktivität haben (Abb. 4-1). In Einklang mit den Hämolyse-Daten konnte nach Hämin-Zugabe ebenfalls eine verminderte Hla-Expression ermittelt werden (Abb. 4-2). Dieser Trend konnte zum Teil auch auf der Transkriptionsebene beobachtet werden. Die in Abb. 4-3 gezeigten Transkriptionsdaten bestätigen eindeutig, dass durch Hämin die Transkriptionsrate der durch *hlyB* und *hlyA* kodierten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Hämolyse bereits sehr schnell signifikant reduziert wurde. Die Reduktion der Transkription der untersuchten Gene war dabei meist größer als die Induktion unter Eisenmangel. Des Weiteren beweist die Reaktion auf transkriptioneller Ebene, dass Hämin über diese Ebene Einfluss auf die Proteinexpression der Hämolyse und damit auch auf die Hämolyse hat. Der gesamte durch Hämin ausgelöste Effekt scheint einem transkriptionellen Mechanismus zu Grunde zu liegen. Eine Ausnahme stellen jedoch die Untersuchungen der *hla* Transkription dar. Die zuvor im Western Blot (Abb. 4-2) durch Hämin dargestellte Reduktion der Hla-Expression konnte auf transkriptioneller Ebene nicht gezeigt werden. Hier konnte im Gegensatz zu den Transkriptionsraten von *hlyB* und *hlyA* kein signifikanter Effekt durch Hämin gemessen werden (Abb. 4-3). Vermutlich hätten für die Darstellung der Effekte auf *hla* andere Zeitpunkte für die Probenentnahme gewählt werden müssen. Dies stellt einen wichtigen Punkt dar, der in zukünftigen Experimenten nochmals näher untersucht werden sollte, um die hier beschriebene Diskrepanz dieser zwei Experimente zu lösen.

Die Adaptation des Bakteriums auf unterschiedliche Eisenkonzentrationen ist sinnvoll, da unter Eisenmangel durch vermehrte Lyse eukaryoter Zellen weiteres Eisen in Form von Häm freigesetzt wird, während nach Hämin-Zugabe die Hämolyse und somit auch die weitere Eisenakquirierung reduziert werden. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass dieser Effekt erst ab Zugabe subinhibitorischer Hämin-Konzentrationen (2 - 4  $\mu$ M in LB) zu beobachten war (Abb. 4-11). Diese reaktiv-adaptative Anpassung der Mikroorganismen verschafft einen potentiellen Fitness-Vorteil einerseits durch verminderte Expression von

Hämolytinen und damit einem entsprechenden energetischen Vorteil, andererseits führt dies auch zu einer Begrenzung des Anfalls und damit einem Schutz vor einer zu großen Aufnahme des bei hohen Konzentrationen toxisch wirkenden Moleküls Hämin. Diese Erkenntnisse vervollständigen bereits bekannte Auswirkungen von Hämin auf SA. Es konnten z. B. Auswirkungen von Hämin auf IsdG beobachtet werden. IsdG ist ein zytoplasmatisches Protein von SA, das zu dem Isd-System gehört. Dieses Enzym kann von außen aufgenommenes Hämin degradieren und Eisen freisetzen<sup>[93]</sup>. Reniere *et al.*<sup>[89]</sup> konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Hämin auf posttranskriptionellem Weg die Stabilität des Proteins verlängert. Dies ist ein weiterer Mechanismus, mithilfe dessen SA eine Toxizität des Häm-Moleküls gegenreguliert. Durch eine längere Lebensdauer von IsdG kann dann mehr Hämin abgebaut und die Spaltprodukte exportiert werden. Dieser posttranskriptionelle Mechanismus stellt somit eine weitere Regulationsebene neben der transkriptionellen Ebene dar.

Friedman *et al.*<sup>[29]</sup> konnten zusätzlich Auswirkungen von Hämin auf andere Proteine zeigen. Der mit Abstand größte Effekt in dieser Studie wurde bei dem Protein HrtA (heme-regulated transporter ATPase) beobachtet, welches am Export von Hämin aus dem bakteriellen Zytoplasma beteiligt ist. Nach Hämin-Zugabe konnte eine Zunahme der Expression von HrtA um einen Faktor von 45 beobachtet werden. Erst später wurde HssRS (heme-sensor system) identifiziert und gezeigt, dass dieses System durch Hämin aktiviert wird und dieses wiederum für die Aktivierung des HrtAB-Export-Systems verantwortlich ist, zu dem das Protein HrtA zählt<sup>[100]</sup>. Durch Mutation von HrtA ist der Export von Hämin gestört und dies führt neben einer erheblich größeren Anfälligkeit gegenüber dessen Toxizität<sup>[100]</sup> zu einer Reduktion von Hla und HlgA in den Überständen der Bakterien<sup>[2]</sup>. Möglicherweise kommt es durch die Mutation von HrtA zu einer Akkumulation von Hämin im Zytoplasma. Dadurch ist SA einer höheren Konzentration ausgesetzt, die ebenfalls eine höhere Toxizität hervorruft. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass SA auf Eisenmangel mit einer Induktion von Proteinen reagiert, die an der Eisenakquirierung beteiligt sind. Dagegen sind ab einer bestimmten Hämin-Konzentration, diese Proteine in ihrer Transkription reduziert und Enzyme für den Abbau und den Export von Häm vermehrt vorhanden.

## 5.2 Regulationsmechanismen der Hämolytine

Die Expression von Virulenzfaktoren wird in SA durch ein hochkomplexes regulatorisches Netzwerk kontrolliert, welches sich, je nach SA Isolat, markant voneinander unterscheiden kann. Diese Vielfalt sowie das stammspezifische Repertoire an Regulatoren erschwert die Erforschung der meist sehr komplexen Mechanismen<sup>[10]</sup>. Im Allgemeinen haben die Wachstumsphase sowie die Wachstumsbedingungen einen großen Einfluss auf die

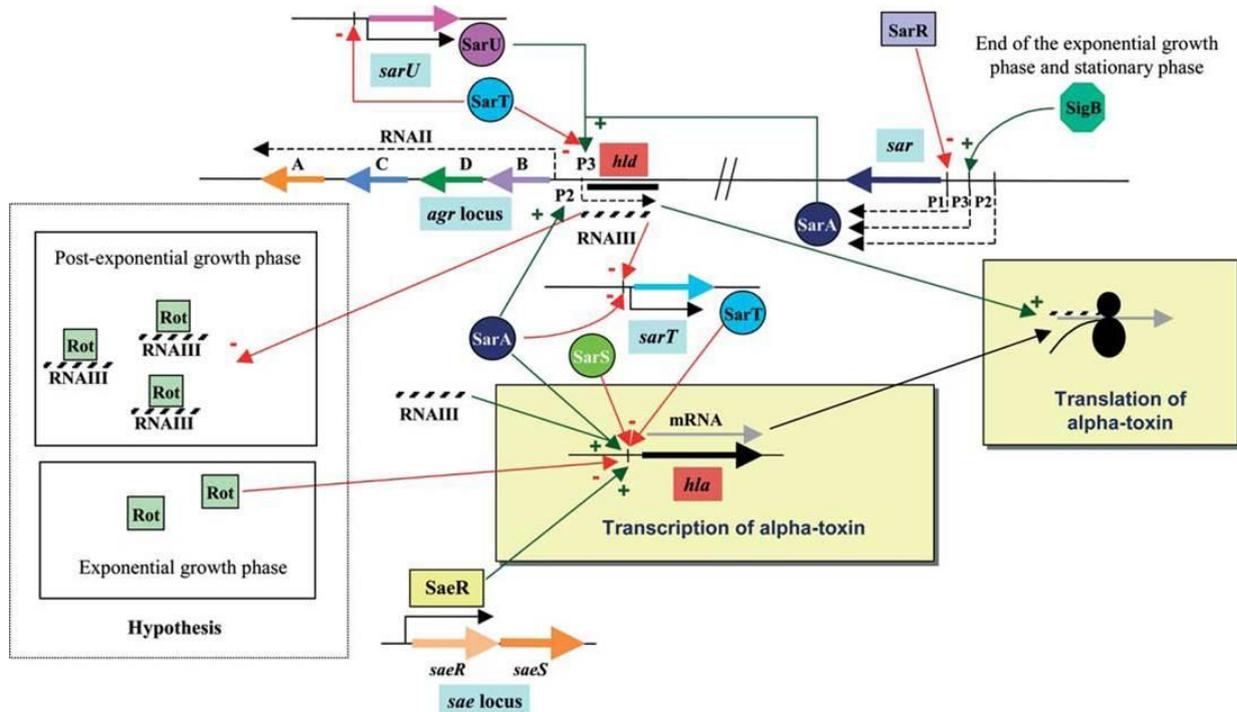
Expression der Virulenzfaktoren. Dazu zählen äußere Faktoren wie z. B. die Zelldichte, der pH-Wert oder die CO<sub>2</sub>-Konzentration<sup>[10]</sup>. Im Fokus dieser Arbeit steht die Regulation der zu den Virulenzfaktoren zählenden Hämolsine.

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente konnte beobachtet werden, dass die Expression der Hämolsine unter Eisenmangel induziert und ab einer bestimmten Hämin-Konzentration gehemmt wird. Es ist schon seit längerem bekannt, dass eine große Bakteriendichte die Expression der Hämolsine in Schüttelkultur erhöht. Diese induzierte Produktion an Hämolsinen ermöglicht es, verstärkt Erythrozyten zu lysieren, wenn der Bedarf an Eisen durch Anwesenheit vieler Bakterien hoch ist<sup>[22, 46]</sup>, was vergleichbar mit Eisenmangel-Bedingungen ist. Die Zugabe von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika führt ebenfalls zu einer Induktion der Expression von *hla*<sup>[75]</sup>, während der Aspirin-Metabolit Salicylsäure eine Reduktion zur Folge hat<sup>[54]</sup>. Die genannten Beispiele zeigen, dass verschiedene äußere Faktoren unterschiedliche Auswirkungen auf die Expression der Hämolsine haben. Das Erkennen solcher Faktoren sowie die Aktivierung oder Hemmung der Genexpression wird dabei von verschiedenen Regulator-Systemen, die zum Teil untereinander vernetzt sind, gesteuert.

Zu diesen Systemen gehören u. a. Agr (accessory gene regulator), SarA (staphylococcal accessory regulator),  $\sigma^B$  (Sigmafaktor B) und Sae (SA exoprotein expression). Das Zusammenspiel dieser, für die Virulenz von SA sehr bedeutenden Regulatoren ist komplex und bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Der *agr* Locus induziert beispielsweise neben dem  $\alpha$ -Hämolsin ebenfalls das  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Hämolsin<sup>[10]</sup>, wobei letzteres Hämolsin durch den *agr* Locus selbst kodiert wird. Chan *et al.*<sup>[12]</sup> konnten zeigen, dass in einer *agr* Mutante die *hla* Expression reduziert wurde. SarA hat ebenfalls einen positiven Effekt auf die Produktion von Exoproteinen einschließlich der  $\alpha$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Hämolsine, der zum Teil *agr*-unabhängig ist<sup>[10, 54]</sup>. Der alternative Transkriptionsfaktor  $\sigma^B$  hat wiederum Einfluss auf die Produktion und Aktivität von SarA und Agr und damit indirekt auf die Produktion der Hämolsine<sup>[54]</sup>. Der wahrscheinlich wichtigste regulatorische Locus in SA für die Expression der Hämolsine ist das Sae-Operon. Die meisten *sae* Transkripte werden in der postexponentiellen Wachstumsphase maximal exprimiert<sup>[97]</sup>. Zu den von Sae regulierten Genen gehören u. a. *fnbA* (fibronectin-binding protein A), *coa* (Koagulase), *hla*, *hly*, *hlg*, *eap* und *emp* (extracellular matrix binding protein)<sup>[31, 37, 62, 97]</sup>. Diese Gene kodieren zum Teil für Proteine, die an der Adhäsion und Invasion von SA beteiligt sind, als Toxine fungieren oder bei der Biofilmbildung eine wichtige Rolle übernehmen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten Hämolsine *hla*, *hly* und *hlgA* unter der direkten Kontrolle des Sae-Operons stehen<sup>[62]</sup>. Dieser Befund konnte in den hier durchgeführten Experimenten nochmals bestätigt werden. In der LS1  $\Delta$ *sae* Mutante konnte nur noch eine

sehr geringe Transkription von *hla*, *hlb* und *hlgA* im Vergleich zum WT beobachtet werden (Tab. 4-1), was die starke Abhängigkeit von diesem Regulator unterstreicht.

Dies sind Beispiele für die Vielfältigkeit der Regulationsmöglichkeiten der Hämolyse. Bronner *et al.* versuchten die komplexen Regulationsmechanismen für das  $\alpha$ -Hämolyse *hla* in einem Schaubild graphisch darzustellen (Abb. 5-1). Diese Abbildung zeigt, dass eine Vielzahl an Regulatoren die Expression dieses Proteins beeinflussen kann. Des Weiteren fällt auf, dass diese Regulatoren sich zu einem großen Teil auch gegenseitig aktivieren bzw. hemmen. Zudem nimmt das *Sae*-Regulon eine Sonderstellung ein, da es direkt und weitgehend unabhängig von anderen Mechanismen die *hla* Expression induziert. So zeigten Novick und Jiang bereits 2003, dass *sae* keinen anderen Regulator beeinflusst und weitgehend unabhängig aktiv ist, wobei die Expression des *sae* Operons durchaus von *Agr*, *SarA* und  $\sigma^B$  beeinflusst wird<sup>[74]</sup>.



**Abb. 5-1** Schematische Darstellung der Regulation der Expression des  $\alpha$ -Hämolyse *hla* in SA<sup>[10]</sup>.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit bestand darin, die Expressionsveränderungen der Hämolyse nach Hämin-Zugabe zu verstehen und die beteiligten Regulationssysteme zu bestimmen. Es konnte dabei nur in der *sae* Transkription eine Veränderung der Expression durch Hämin beobachtet werden. Das eisenkomplexierende Molekül Hämin reduzierte dabei die *sae* Transkription (Abb. 4-4), was vergleichbar mit der Reduktion der Transkription der Hämolyse war (Abb. 4-3). Die restlichen untersuchten Regulator-Transkripte (*arl*, *RNAIII*, *sarA* und *sigB*) verhielten sich vergleichbar der unbehandelten Kontrolle (Abb. 4-4). Diese

Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass das Sae-Regulationssystem die Anwesenheit von Hämin erkennt und für die Reduktion der Expression verantwortlich ist. Diese Hypothese wird u. a. auch dadurch unterstützt, dass in der *sae* Mutante keine Auswirkungen mehr auf die Expression der Hämolsine nach Hämin-Zugabe beobachtet werden konnten (Abb. 4-10). Es muss allerdings angemerkt werden, dass in der *sae* Mutante nur noch eine sehr geringe Expression der Hämolsine vorlag. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die aufgrund der Mutation schon sehr schwache Expression der Hämolsine durch Hämin nicht zusätzlich in dem Maße wie bei dem WT reduziert werden konnte. Dem widersprechen allerdings die Resultate der real-time PCR in RPMI (Abb. 4-12). Hier konnte die Expression von *hla* und *hnb* in der *sae* Mutante durch FeSO<sub>4</sub>-Zugabe noch weiter reduziert werden. Dies zeigt, dass die schwache Expression trotzdem weiter reduziert werden kann und dass die Auswirkungen von Hämin vermutlich über Sae reguliert werden, da dieser Mechanismus, anders als in der *fur* Mutante, in der *sae* Mutante nicht mehr sichtbar ist.

Es ist bereits bekannt, dass Sae auf Umweltfaktoren reagiert<sup>[74]</sup>. So wird Sae z. B. durch hohe Salzkonzentrationen, durch Absenkung des pH-Wertes im Medium nach Glukose-Zugabe und durch subinhibitorische Konzentrationen von Clindamycin gehemmt<sup>[74]</sup>. Diese Substanzen stellen ebenfalls wie Hämin einen Stress für SA dar. Die Reaktion von SA auf den Hämin-Stress könnte dahingehend gedeutet werden, dass die durch Sae vermittelte Reduktion der Hämolsine zu einer reduzierten Hämolyse führen. Dadurch wird weniger Hämoglobin freigesetzt, was eine Senkung der Hämin-Konzentration in der Umgebung des Bakteriums bedeutet. Auf der anderen Seite konnten Kuroda *et al.*<sup>[55]</sup> durch Behandlung von SA mit dem Antibiotikum Cefoxitin *saeRS* und *hlgC* Sae-abhängig induzieren, während unter gleichen Bedingungen *hla*, *hnb* und *fnbB* reduziert wurden. Diese Diskrepanz in der Reaktion von Sae und den Hämolsinen auf äußere Stressfaktoren verdeutlicht, dass diese Regulation deutlich komplexer ist und die Hämolsine nicht nur über Sae reguliert werden. Des Weiteren zeigt dies, dass SA zwischen verschiedenen Stressfaktoren differenzieren und unterschiedlich darauf reagieren kann. Demnach haben äußere Faktoren z. T. spezifische Effekte und können daher nicht unter einer allgemeinen Stressreaktion zusammengefasst werden.

Es ist ebenfalls bereits bekannt, dass unter Eisenmangel die Expression der Hämolsine über den Regulator Fur erhöht wird<sup>[101]</sup>. Unter diesen Versuchsbedingungen konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Induktion von *sae* beobachtet werden (Abb. 4-5), so dass möglicherweise der induzierende Effekt von Fur auf *sae* für die sich anschließende Induktion der Hämolsine unter Eisenmangel verantwortlich ist (Abb. 4-3). Diese Annahme wird durch jüngste Untersuchungen von Johnson *et al.* unterstützt, in der die Autoren postulieren, dass *fur* bei Eisenabwesenheit *sae* aktiviert<sup>[48]</sup>. Dies wäre ein völlig neuer Ansatz, da Fur bisher

nur als Repressor gesehen wurde, der durch Eisen aktiviert wird. Unter fast eisenfreien Bedingungen wurde der Repressor als inaktiv angenommen. Diese These könnte die Aktivierung von Sae unter Eisenmangel erklären, falls die aktive Form von Fur Sae hemmen würde. Allerdings spielt Fur bei der Regulation durch Hämin-Zugabe keine weitere Rolle, da in der LS1  $\Delta fur$  Mutante durch Hämin-Zugabe eine Reduktion der Expression von *sae* und den Hämolytinen beobachtet werden konnte (Abb. 4-10), die dem Hämin-Effekt im WT sehr ähnlich ist. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass in der *fur* Mutante die basale *sae* wie *hla* Expression im Vergleich zum WT stark reduziert war. Dies würde die These von Johnson *et al.* stärken, dass Fur einen positiven Einfluss auf Sae und damit auch auf Hla haben könnte. Die beiden anderen Hämolytine, *hlyB* und *hlyA*, unterschieden sich in ihrer Expression in der *fur* Mutante jedoch nicht vom WT (Tab. 4-1). Dies lässt vermuten, dass an deren basaler Transkriptionskontrolle andere Regulatoren entscheidend beteiligt sind und somit das Fehlen von Fur in diesem Fall keine vergleichbar großen Auswirkungen aufweist wie bei *sae* und *hla*.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass neben dem bereits zuvor genannten Hämin-Sensor-System HssRS in dieser Arbeit mit Sae ein weiterer Regulator aufgezeigt werden konnte, der auf Hämin-Anwesenheit reagiert und für die Veränderung des Expressionsmusters der untersuchten Hämolytine verantwortlich zu sein scheint. Unter Eisenmangel war Sae ebenfalls aktiviert und ist damit wahrscheinlich auch unter diesen Bedingungen an der Aktivierung der Hämolytine beteiligt.

Um die gerade beschriebene zentrale Rolle von Sae noch auf eine zweite Art zu bestätigen, wurde neben den Hämolytinen ein weiteres Sae-abhängiges Gen, *eap*, welches für das extrazelluläre Adhärenzprotein Eap kodiert, untersucht<sup>[37]</sup>. Dieses Protein besitzt eine große Bindungskapazität, wird nach der Synthese exportiert und kann im extrazellulären Milieu die Verbindung zwischen dem Zielgewebe und den Bakterien herstellen, um damit die Adhärenz und Internalisierung von SA zu initiieren<sup>[34, 42, 77]</sup>. Des Weiteren trägt Eap zur Biofilmbildung bei, kann die Neogenese von Blutgefäßen hemmen sowie die Immunantwort auf eine bakterielle Infektion verzögern<sup>[14, 47, 95]</sup>. Da die Eap Expression vorrangig über Sae reguliert wird, anders als die Hämolytine jedoch einer nicht ganz so komplexen Regulation unterliegt, sind Expressionsanalysen dieses Proteins einfacher zu interpretieren.

Analog zu den Hämolytine-Expressionsdaten konnte auch für Eap unter Eisenmangel eine Zunahme und durch Hämin-Zugabe eine Abnahme der Proteinmenge auf der bakteriellen Oberfläche beobachtet werden (Abb. 4-17). Dieser Trend wurde ebenfalls auf transkriptioneller Ebene bestätigt (Abb. 4-16). Die *sae* Transkription (Abb. 4-4, Abb. 4-5) verhielt sich unter den genannten Versuchsbedingungen dabei vergleichbar der *eap* Transkription. Auch hier wurde eine Reduktion durch Hämin und eine Induktion unter Eisenmangel beobachtet. Damit konnte auch hier gezeigt werden, dass Sae eine zentrale

Rolle bei der Erkennung von Eisenmangel bzw. Verfügbarkeit von Hämin spielt. Diese Befunde bestätigen zudem Beobachtungen von Johnson *et al.*, die die eisenabhängige Biofilmbildung untersuchten<sup>[47]</sup>. Sie zeigten, dass die Transkription von *eap* unter Eisenmangel induziert wird, dadurch zu einer vermehrten Biofilmbildung beiträgt und dass dieser Prozess unabhängig von Fur, aber abhängig von Sae und Agr ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch Hämin-Zugabe über den Regulator Sae die Hämolyisin-Expression reduziert wird. Es ist nicht auszuschließen, dass an diesem Mechanismus auch noch andere, in dieser Arbeit nicht untersuchte, Regulatoren eine Rolle spielen könnten. Dennoch wird Sae vermutlich der wichtigste Sensor in diesem Zusammenhang sein. Eisenmangel-Bedingungen stellen einen großen Stress für die Bakterien dar. Sae wird zwar auch unter diesen Bedingungen beeinflusst und reguliert auch sicherlich die Hämolyisin-Expression, aber in diesem Fall sind auch viele andere Regulatoren betroffen, vor allem Fur. Eine eindeutige Erklärung für die Expressionsveränderungen der verschiedenen Gene unter Eisenmangel-Bedingungen und die Rolle von Sae ist durch die dichte Vernetzung der verschiedenen Regulatoren zum jetzigen Kenntnisstand der Forschung noch nicht möglich.

### 5.3 Abhängigkeit der Regulation vom Nährmedium und dem Zusatz verschiedener Eisenquellen

Die Transkriptionsanalysen wurden in dem Nährmedium LB sowie in dem weitgehend eisenfreien Medium RPMI durchgeführt. Der Vorteil von RPMI ist dessen chemisch definierte Zusammensetzung und dass kein 2,2'-Bipyridin zur Komplexbildung von freiem Eisen zugeführt werden muss. Somit ist eine eventuelle Einflussnahme des toxischen 2,2'-Bipyridins auf die Genregulation ausgeschlossen. Jedoch ist das Wachstum der Bakterien in diesem nährstoffarmen Medium stark verlangsamt. Da in allen hier durchgeführten Expressionsversuchen die Kulturen immer nach einer bestimmten Inkubationszeit geerntet wurden, unterschieden sich die Proben, die in LB bzw. RPMI kultiviert wurden, in ihrer OD<sub>600</sub> zum Zeitpunkt der Probenentnahme erheblich. Da wiederum bekannt ist, dass sich die Wachstumsphase ebenfalls auf die Genregulation auswirkt, sind die Expressionsdaten der verschiedenen Medien nur eingeschränkt miteinander vergleichbar. Die Expression in LS1 von *sae* und *hla* ist in RPMI um ein Vielfaches geringer als in LB, obwohl in eisenfreien Medien eine Induktion dieser beiden Gene erwartet wurde (Tab. 4-1, Tab. 4-3). Da aber die OD<sub>600</sub> zum Zeitpunkt der Probenentnahme in RPMI sehr viel kleiner war als die der Kulturen in LB, befanden sich die geernteten Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen. Die Aktivität des Sae-Regulationssystems ist aber auch abhängig von der Wachstumsphase und erreicht erst in der postexponentiellen Phase ihr Maximum<sup>[97]</sup>. Das könnte eine Erklärung für

die unerwartet kleinen Transkriptionsraten in RPMI sein. Die Expression von *hIb* hingegen ist in RPMI deutlich größer als in LB. Da die *sae* Expression aber gleichzeitig sehr klein ist, scheint diese Induktion evtl. über einen anderen Mechanismus zu verlaufen. In der *sae* Mutante waren allerdings trotz deutlich kleinerer  $OD_{600}$  in RPMI keine Unterschiede zu der Expression der Hämolsine in LB zu beobachten. Dies könnte aber auch mit der durch die Mutation schon sehr reduzierten Expression erklärt werden. In der *fur* Mutante ist die *hIa* und *hIb* Expression in RPMI stark erhöht im Vergleich zu LB. Da aber in der Expression von *sae* in der *fur* Mutante in den beiden Medien kein Unterschied zu beobachten ist, ist vermutlich auch in diesem Fall ein anderer Regulator für diese Induktion verantwortlich. Um die Unterschiede dieser beiden Medien auf die Expression im Detail untersuchen zu können, müssten die Proben zusätzlich bei der gleichen Wachstumsphase geerntet und analysiert werden.

Die Expression der untersuchten Gene ist ebenfalls abhängig von der zugegebenen Eisenquelle. *sae*, *hIb* und *hIgA* sind nach Hämin-Zugabe in LB in ihrer Expression stark reduziert, während zugegebenes Eisensulfat, bei äquimolaren Eisenkonzentrationen wie zuvor mit Hämin, keine Auswirkung auf die Expression dieser Gene hatte. In RPMI hingegen wurde ein gegenteiliges Resultat erzielt. Hier konnte durch Hämin-Zugabe zwar eine Reduktion der Expression von *sae*, *hIb* und *hIgA* erhalten werden, die allerdings nicht sehr groß war. Eisensulfat reduzierte die Expression aller vier Gene deutlich um mindestens den Faktor 6 (Abb. 4-11). Dass die Zugabe von Eisensulfat in LB keine Auswirkung auf die Genexpression hatte, ist vermutlich darüber zu erklären, dass in LB bereits eine für das Wachstum von SA relevante Menge an Eisen gelöst vorliegt. Die von außen zugegebene Menge an Eisensulfat ist entweder so gering, dass sie die vorliegende Eisenkonzentration kaum verändert oder dass erhöhte Mengen an Eisen, anders als Hämin, keinen regulatorischen Effekt auf *Sae* ausüben. Da in RPMI kein Eisen vorliegt und nach Eisensulfat-Zugabe ein sehr deutlicher Effekt zu beobachten ist, wird die Theorie verstärkt, dass die verfügbare Eisenkonzentration wesentlich an den beobachteten Effekten beteiligt ist. Die kleinere Reaktion auf Hämin-Zugabe in RPMI im Vergleich zu LB ist vermutlich ebenfalls mit der vorliegenden Eisenkonzentration erklärbar. In RPMI liegt ein viel höherer Eisenbedarf vor als in LB. Deshalb reagiert SA in LB sehr viel sensitiver auf die Hämin-Zugabe als in RPMI. Eine weitere Möglichkeit für die unterschiedliche Sensitivität auf Hämin und Eisensulfat in den beiden Medien könnte durch die unterschiedlichen Wachstumsphasen begründet sein. In RPMI sind die Kulturen zum Zeitpunkt der Probenentnahme (6 h) in einer sehr frühen Phase in der *sae* noch nicht maximal exprimiert wird. In LB hingegen befindet sich die SA Kultur nach 6 h Wachstum in der Übergangsphase zwischen exponentieller und stationärer Phase, in der *Sae* maximal exprimiert wird. Wenn Hämin-Zugabe wirklich über

*sae* erkannt wird und sich eine Aktivierung anderer Gene anschließt, könnte dies in LB größer ausfallen als in RPMI zu diesem Zeitpunkt. Diese Theorie beinhaltet gleichzeitig, dass Eisensulfat über einen anderen Regulator erkannt wird und ein anderer Aktivierungsmechanismus vorliegt, da die Auswirkungen auf die Genexpression in RPMI sehr viel stärker ausgeprägt waren. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche ist es nicht möglich definitiv zu sagen, welche der gerade genannten Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse in RPMI und LB verantwortlich sind.

Torres *et al.* untersuchten 2007 die Aktivität eines durch Hämin aktivierbaren Reporterkonstruktes von *hrtAB* nach Zugabe anderer Eisenquellen<sup>[100]</sup>. HrtAB ist am Export von Hämin und dessen Abbauprodukten beteiligt und bei Hämin-Anwesenheit in seiner Genexpression stark erhöht. Auch in dieser Studie konnte keine Aktivierung des Reporterkonstruktes nach Eisensulfat-Zugabe beobachtet werden. Wurde allerdings das Eisen im Hämin durch Gallium oder Mangan ersetzt, so konnten diese Moleküle eine vergleichbare Reporteraktivität hervorrufen wie zuvor Hämin. Der Porphyrinring ohne komplexiertem Metall hingegen zeigte keine Aktivierung. Dies deutet daraufhin, dass nur die mit einem Metall komplexierten Porphyrinringe den genannten Effekt auslösen können, freies Eisen hingegen nicht. Lee und Kollegen<sup>[59]</sup> untersuchten ebenfalls Porphyrinringe, die sie mit unterschiedlichen Metallen komplexierten. Sie konnten zeigen, dass die Enzyme, die im bakteriellen Zytoplasma Hämin abbauen und das Eisen freisetzen, ebenfalls Porphyrine binden können, die mit Cobalt, Gallium, Mangan und Zink komplexiert sind. Allerdings sind diese Enzyme, IsdG und IsdI, nicht in der Lage diese Moleküle zu spalten und das Metall freizusetzen<sup>[59]</sup>. Das könnte bedeuten, dass für die erste Erkennung ein mit einem Metall beladener Porphyrinring ausreicht, dass aber die eigentliche enzymatische Spaltung nur durch das Eisen initiiert werden kann. Reniere *et al.* postulierten in diesem Zusammenhang, dass in das Zytoplasma importierte Ga-PPIX (mit Gallium beladener Porphyrinring) möglicherweise wie Hämin in der Plasmamembran gespeichert wird, da es nicht durch IsdG und IsdI gespalten werden kann. Aufgrund eines unterschiedlichen Redoxpotentials von Gallium und Eisen kann der in die Membran integrierte Ga-PPIX-Komplex nicht in vergleichbarer Form wie Hämin am Elektronentransport teilnehmen. Dies kann zu einer Anreicherung von Radikalen führen, die für die Zelle toxisch sind<sup>[88]</sup>. Daher könnten solche Phorphyrinringe vielleicht als antimikrobielle Inhibitoren zum Einsatz kommen. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten Orenstein *et al.*. Sie konnten SA in einer Wunde durch Zugabe einer Mischung aus Hämin mit Deuteroporphyrin mit einer Effizienz von fast 100% abtöten. Der Unterschied zum Protoporphyrin besteht in dem Austausch der beiden Vinylseitenketten mit Wasserstoffatomen<sup>[76]</sup>. Diese Erkenntnisse deuten weiter darauf hin, dass Hämin spezifisch erkannt wird, da bisher keine Verbindungen bekannt sind, die die Effekte von Hämin ebenfalls auslösen können.

Interessanterweise konnte in den hier durchgeführten Versuchen mit Hämin in RPMI wie zuvor in LB bei LS1  $\Delta sae$  bei keinem der untersuchten Hämolysin-Gene ein Effekt auf die Expression ausgelöst werden. Durch Zugabe von Eisensulfat hingegen konnten kleine Reduktionen der Expression bei *hla* und *hlb* bestimmt werden (Abb. 4-12). Im Gegensatz dazu erzielte die LS1  $\Delta fur$  Mutante in RPMI wie in LB nach Hämin-Zugabe eine vergleichbare Reduktion der Expressionen wie der WT, während nach Eisensulfat-Zugabe nur ein sehr kleiner Effekt auf die *hla* Expression in der Mutante zu beobachten war. Dies zeigt eindeutig, dass bei Abwesenheit von *sae* Hämin keinen Effekt mehr auf die Hämolysin-Gene ausüben kann und unterstützt damit die Theorie, dass Sae an diesem Mechanismus eine zentrale Rolle einnimmt. Abwesenheit von *fur* hingegen zeigt keinen Unterschied zum WT, was darauf hinweist, dass dieser Regulator hier nicht beteiligt ist. Im Gegensatz dazu hat Eisensulfat eine Auswirkung auf die Genexpression in der *sae* Mutante aber nicht in der *fur* Mutante. Dies wiederum signalisiert, dass Eisensulfat über Fur erkannt wird und dass hier Sae nicht beteiligt zu sein scheint. Dies zeigt, dass verschiedene Eisenquellen wahrscheinlich spezifisch Zielgene beeinflussen. Dass Hämin dabei spezifisch über *sae* reguliert wird, wurde ebenfalls mit Eap bestätigt. Wie zuvor mit Hämin konnte auch in diesen Versuchen keine vergleichbaren Änderungen der Eap-Expression nach Eisensulfat-, Protoporphyrin- oder Transferrin-Zugabe beobachtet werden (Abb. 4-20, Abb. 4-21, Abb. 4-19, Abb. 4-17).

Reniere *et al.* konnten ebenfalls Unterschiede in der Wirkung von Hämin und Eisensulfat feststellen. Hier konnte Eisensulfat die Stabilität von IsdG nicht wie Hämin erhöhen und damit zu einer längeren Lebensdauer des Enzyms führen, obwohl dieses Enzym über Fur eisenabhängig reguliert werden kann<sup>[89]</sup>. Friedman *et al.* veröffentlichten eine umfangreiche Liste mit Proteinen, die durch Eisen oder Hämin in ihrer Expression beeinflusst wurden und gruppieren diese aufgrund ihrer Abhängigkeit von Fur. Diese Studie weist darauf hin, dass die Wirkung, die auf Proteine durch Hämin ausgeübt wird, unabhängig von Fur und Eisen ist. Des Weiteren gibt es Proteine, die durch Fur und Eisen beeinflusst werden sowie andere, die jeweils nur von einem dieser beiden Faktoren in ihrer Expression verändert werden<sup>[29]</sup>. Die eisenabhängige Regulation der Proteinexpression scheint damit auf vielschichtige Weise regulierbar zu sein, nicht zuletzt abhängig von der chemischen Form der Eisenquelle.

Eine weitere wichtige Frage ist, ob die Oxidationsstufe von Eisen ebenfalls eine Rolle bei der vermutlich spezifischen Regulation spielt. Das im Hämoglobin gebundene Eisen liegt fast ausschließlich in der Oxidationszahl +II vor. Die Bindung von Sauerstoff oder Kohlenstoffdioxid zum Transport in der Blutbahn führt dabei nicht zu einer Änderung der Oxidationszahl, sondern nur zu einer Umverteilung der Elektronenstruktur<sup>[79]</sup>. In der Literatur wurde bisher jedoch immer Hämin in den Experimenten eingesetzt. Dieses Molekül

unterscheidet sich vom Häm im Hämoglobin durch die Oxidationsstufe des Eisens. Dieses ist im Hämin oxidiert und liegt in der Oxidationsstufe +III vor. Somit unterscheidet sich die Oxidationsstufe des Eisens im Hämin in den *in vitro* Versuchen von den *in vivo* Bedingungen im Wirt, in denen vermutlich Häm von den Zellen genutzt wird. Zu dieser Fragestellung gibt es noch nicht viele Untersuchungen. Die Gruppe um Pluym *et al.* untersuchten 2008 mittels Magnetocirculardichroismus (MCD) und Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) die Bindungseigenschaften von Häm mit koordiniertem Fe(II) bzw. Fe(III) als Zentralion an Moleküle des Isd-Systems, die an der Aufnahme von Hämin in das bakterielle Zytoplasma beteiligt sind<sup>[82]</sup>. Sie konnten zeigen, dass die axialen Liganden den Oxidationszustand des zentralen Eisenatoms sowie den Spinzustand der Elektronen stabilisieren. Wird durch Reduktionsmittel das Häm-Eisen reduziert, während es an eine Domäne von IsdA gebunden war, wurde anschließend ein anderer axialer Ligand koordiniert als zuvor. Wurde diese Reduktion allerdings durchgeführt, während Häm an einer Domäne von IsdC gebunden war, löste sich dieses Molekül von der Bindungsstelle ab, da kein geeigneter Ligand für die reduzierte Form dieses Moleküls in dem Protein zur Verfügung stand. Dies verdeutlicht, dass die Oxidationsstufe des Häm-Eisens bei der Bindung an Proteine durchaus von Bedeutung ist. Es bleibt aber weiterhin ungeklärt, welche Oxidationsstufe das Eisen im Häm *in vivo* besitzt, wenn es durch die Zellen aufgenommen wird bzw. ob dies für die Aufnahme relevant ist.

#### 5.4 Toxischer Effekt von Hämin

Die Toxizität von Hämin auf SA ist in dessen großer Reaktivität begründet, die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beitragen kann, die wiederum DNA, RNA, Proteine und Lipide schädigen können<sup>[25]</sup>. Aus diesem Grund unterliegt Hämin vermutlich einem so streng kontrollierten Regulationsmechanismus, der eng mit der Aufnahme bzw. dem Export aus der Zelle verknüpft ist.

Dieser toxische Effekt von Hämin konnte auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumskurven mit unterschiedlichen Hämin-Konzentrationen gezeigt werden. Allerdings konnten hier zum Teil große Unterschiede in der Sensitivität zwischen den verschiedenen Stämmen bestimmt werden. Der Stamm Newman, eine natürliche *saeS* Mutante mit hoher Sae-Aktivität, und seine Derivate NewHG (*sae*<sup>+</sup>) und mAH12 (*eap*<sup>-</sup>) (Abb. 4-24) reagierten dabei auf steigende Hämin-Konzentrationen nicht so sensibel wie das Isolat LS1 und dessen Mutanten LS1  $\Delta$ *sae* und LS1  $\Delta$ *fur* (Abb. 4-14). Die verwendeten Newman-Stämme zeigten bis zu einer Hämin-Konzentration von 8  $\mu$ M nur eine kleine Verzögerung des Wachstums, die bei allen drei Stämmen ähnlich ausfiel. Bei den LS1 Derivaten hingegen gab es deutlichere Unterschiede. LS1  $\Delta$ *fur* zeigte die stärksten Wachstumseinschränkungen durch Hämin und

wurde schon bei Konzentrationen von 2 - 4  $\mu\text{M}$  deutlich im Wachstum gehemmt, während LS1  $\Delta\text{sae}$  die größte Toleranz gegenüber Hämin aufwies. Dies lässt Spekulationen zu, dass sowohl *sae* als auch *fur* an der Stressreaktion, die durch Hämin ausgelöst wird, beteiligt sein könnten. In der *fur* Mutante kann der Fur-Repressor nicht mehr die Genexpression inhibieren. Somit sind die unter Fur-Kontrolle stehenden Aufnahmemechanismen für Eisen ständig aktiviert. Damit wird vermutlich auch vermehrt Hämin aufgenommen, was zur Folge haben sollte, dass dieser Stamm in einem Medium mit hoher Hämin-Konzentration schneller toxische Konzentrationen an Hämin im Zytoplasma akkumuliert als der WT. Warum die *sae* Mutante hingegen besser mit Hämin-Zusätzen wachsen kann als der WT, ist nach jetzigem Wissensstand nicht erklärbar.

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zum Einfluss von Hämin auf das Wachstum von SA sind in Einklang mit Befunden von Torres *et al.*, die ebenfalls das Wachstum von SA nach Zugabe unterschiedlicher Hämin-Mengen untersuchten<sup>[100]</sup>. Sie konnten zeigen, dass der SA Stamm Newman in TSB bereits mit 5  $\mu\text{M}$  Hämin eine deutliche Reduktion der Wachstumsrate aufwies. Mit 10  $\mu\text{M}$  Hämin konnte auch nach 10 h so gut wie kein Wachstum beobachtet werden. Die Gruppe um Torres untersuchten ebenfalls zwei Newman Mutanten und konnten dort unterschiedliche Wachstumsraten nach Hämin-Zugabe beobachten. Eine Mutante der Transpeptidase Sortase A (SrtA) zeigte auch nach 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  Hämin im Nährmedium ein wesentlich besseres Wachstum als der WT. Das Protein SrtA ist ein Membranprotein, das an der Verankerung von Hämin-Importproteinen in die bakterielle Zellwand beteiligt ist. In der SrtA Mutante wird dadurch weniger Hämin aufgenommen. Dadurch verringert sich die Toxizität im Vergleich zum WT und das Wachstum wird somit nicht in dem Maße wie im WT eingeschränkt. Einen gegenteiligen Effekt konnte diese Arbeitsgruppe bei der Wachstumskurve von Newman  $\Delta\text{hrtA}$  beobachten. HrtA ist ein ATP-bindendes Protein, das an dem Häm-Transporter HrtAB beteiligt ist und den Export von Proteinen gewährleistet. In der *hrtA* Mutante kann überschüssiges Hämin oder dessen toxische Abbauprodukte nur noch eingeschränkt exportiert werden und es kommt zur Anreicherung im Zytoplasma. Diese Mutante zeigte mit Hämin im Nährmedium keinerlei Wachstum.

Dieser toxische Effekt von Hämin ist etwas problematisch für Versuchsdurchführungen, die längere Inkubationszeiten benötigen. Für die Western Blot Analysen, bei denen die SA Stämme 6 h mit Hämin inkubiert wurden, hat dessen toxische Wirkung auch das Wachstum der Stämme z. T. markant beeinflusst. Zwar wurde zur Probenentnahme immer die gleiche Zellzahl geerntet, um die Proteinmenge auf die Bakterienzahl normieren zu können. Die Kulturen befanden sich zum Erntezeitpunkt jedoch in unterschiedlichen Wachstumsphasen.

## 5.5 Vergleich der Hämin-Wirkung auf verschiedene SA Stämme

Die Wirkung von Hämin sollte auch in anderen SA Stämmen untersucht werden, um zu prüfen, ob die erhaltenen Resultate nur speziell für LS1 gelten oder eine allgemeine Gültigkeit innerhalb der SA Familie besitzen.

Die Expressionsdaten von *sae*, *hla*, *hlb* und *hlgA* zeigen, dass die untersuchten SA Stämme nach Hämin-Zugabe sich zum größten Teil vergleichbar verhalten (Abb. 4-15). Bei Genen wie z. B. *hla* und *hlb* sind nur sehr geringe bis gar keine Expressionsänderungen durch Hämin zu beobachten. Bei *sae* und *hlgA* sind diese Auswirkungen etwas deutlicher. Die Expression wird hier in fast allen Stämmen durch Hämin reduziert. Lediglich der Faktor der Änderung der Expression ist zwischen den Stämmen unterschiedlich. Dies verdeutlicht, dass der Effekt von Hämin sich vermutlich in allen Stämmen vergleichbar ausprägt. Die einzige Ausnahme stellt der SA Stamm Newman dar. Dieser zeigt durch Hämin eine deutliche Induktion der Expression bei *hla* und ist der einzige Stamm, der in der Expression von *hlgA* durch Hämin nicht wie alle anderen deutlich reduziert wird. Ursächlich hierfür ist aller Wahrscheinlichkeit nach eine Punktmutation in *saeS*, dem Sensor des Zweikomponenten-Systems, die zu einer permanenten Aktivierung der Kinase-Untereinheit führt. Diese wiederum bedingt eine Aktivierung von SaeR, dem Regulator des Systems, und damit eine konstitutive Aktivierung des Sae-Systems. Diese Hypothese wird u. a. dadurch gestützt, dass der Effekt von Hämin in dem Newman Derivat NewHG, welches ein Wildtyp *sae* Operon enthält, ähnlich wie in LS1 und den anderen getesteten Isolaten ist. Dass das Isolat Newman nun auf Hämin anders als die anderen getesteten Stämme reagiert, ist nicht zuletzt deshalb von besonderer Bedeutung, da fast die gesamte Forschung zu Transport und Metabolisierung von Häm in diesem genetischen Hintergrund durchgeführt wurde. Sehr deutlich sind auch die Unterschiede zwischen Newman und NewHG in der basalen Expression von *sae*, *hla* und *hlgA* ohne Zusätze (vgl. Tab. 4-5). Die Expression dieser Gene ist bei Newman um ein Vielfaches höher als bei NewHG. Diese Ergebnisse widersprechen allerdings zum Teil den Beobachtungen von Mainiero *et al.*, die postulierten, dass die Punktmutation in *saeS* in Newman nur auf bestimmte Gene Auswirkungen hat. Während die Expressionen von *eap*, *coa* und *fnbA* von dieser Mutation beeinflusst werden, sollten *hla*, *hlb* und *cap* (capsular polysaccharide) durch das veränderte SaeS nicht anders als in *saeS*-Wildtyp-Stämmen reguliert werden<sup>[65]</sup>. Unterschiede in der Eap-Expression zwischen Newman und NewHG konnten auch in dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 4-23) und stimmen mit den Befunden von Mainiero *et al.* überein. Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede in der *hla* Expression stehen jedoch den Resultaten von Mainiero und Kollegen widersprüchlich gegenüber und weisen darauf hin, dass der Einfluss der *saeS* Mutation je nach Stimulus unterschiedliche Auswirkungen haben kann.

## 5.6 Eap-Nachweis in Wundisolaten

Mitarbeiter um Hussain *et al.*<sup>[43]</sup> konnten zeigen, dass das Gen des extrazellulären Adhärenzproteins Eap in allen bisher untersuchten SA Stämmen vorhanden ist und auch nur auf diese Spezies begrenzt zu sein scheint. In keinem anderen Stamm konnte bisher eine für Eap kodierende Sequenz gefunden werden. Damit könnte Eap evtl. als Nachweis für eine SA Infektion in der Diagnostik genutzt werden. Des Weiteren ist bekannt, dass Eap auch in von SA kolonisierten Wunden exprimiert wird und dies sogar in größerer Menge als in *in vitro* Kulturen<sup>[49]</sup>. Aus diesem Grund sollten im Rahmen der Promotionsarbeit auch Isolate aus Wunden, die auf eine SA Infektion zurückzuführen waren, auf die Präsenz des Proteins Eap getestet werden. Jedoch konnte in keinem der vorhandenen Proben Eap nachgewiesen werden (Abb. 4-27). Dies könnte mit einer zu geringen Konzentration von Eap in den untersuchten Proben begründet sein, die in dem verwendeten Test nicht mehr nachweisbar war. Eap ist aber zusätzlich an der Internalisierung von SA beteiligt und bildet dabei die Verbindung zwischen eukaryotischer Zelle und dem Bakterium<sup>[34]</sup>. Dabei wird Eap ebenfalls in die Zelle aufgenommen und ist somit extrazellulär, also in der Wunde, nicht mehr nachweisbar. Dies könnte ein weiterer Grund dafür sein, dass Eap in den vorliegenden Isolaten nicht detektiert werden konnte.

## 5.7 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Einblick in die komplexen Regulationsmechanismen des Eisenmetabolismus von SA gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass SA die extrazelluläre Eisenkonzentration erkennen und darauf reagieren kann. Unter Eisenmangel wurde durch eine Induktion der Hämolyse-Transkription die Hämolyse von Erythrozyten erhöht und infolgedessen vermehrt Häm aufgenommen, um den Eisenmangel auszugleichen. Im Gegensatz dazu wird bei einer ausreichenden Häm-Verfügbarkeit die Transkription der Hämolyse drastisch reduziert, um eine weitere Lyse von Erythrozyten und damit eine Intoxikation der Zellen durch eine zu hohe Häm-Konzentration zu verhindern.

Zunächst konnte in einem Hämolyse-Test mit LS1 eine Veränderung der Hämolyse abhängig von der verfügbaren Eisenkonzentration im Medium bestimmt werden. Diese veränderte Hämolyse konnte u. a. mit einer erhöhten bzw. erniedrigten Proteinmenge des  $\alpha$ -Hämolyseins im Western Blot erklärt werden. Entsprechend induzierte bzw. inhibierte Transkriptionsraten von *hla*, *hly* und *hlgA* in einer real-time PCR demonstrierten, dass diese Regulation der Hämolyse bereits auf dem Transkriptionslevel vorlag. Dadurch konnte von einer eisenabhängigen Genregulation der Hämolyse ausgegangen werden. Transkriptionsstudien mit anderen SA Stämmen belegten, dass dieser

Regulierungsmechanismus in allen untersuchten Stämmen in vergleichbarer Weise zu finden war.

Das Sae-Regulon konnte als ein zentrales Regulationssystem in diesem Zusammenhang bestimmt werden. Dessen Aktivität konnte indirekt durch Transkription des *saeS* Gens in einer real-time PCR gemessen werden. Die wichtige Rolle von Sae in diesem Mechanismus konnte durch Untersuchungen der eisenabhängigen Eap-Expression zusätzlich unterstrichen werden. Diese Expression kann als indirekter Nachweis für die Sae-Aktivität gewertet werden, da Eap unter der Kontrolle dieses Regulons steht. Mit einer LS1 *sae* Mutante konnte dies ein weiteres Mal bestärkt werden. Die zuvor durch Hämin ausgelösten Effekte im WT konnten in der *sae* Mutante nicht mehr detektiert werden. Dies bestärkt die Theorie, dass dieser Effekt über Sae vermittelt wird. Ein weiteres Indiz für diesen Mechanismus stellten die unterschiedlichen Resultate von Newman und NewHG dar, die sich nur durch den Aminosäureaustausch in *saeS* von Newman unterscheiden. Es war bereits zuvor bekannt, dass diese Punktmutation zu erheblichen Veränderungen in der Expression bestimmter Gene führt. In der vorliegenden Arbeit konnten unterschiedliche Expressions- und Transkriptionsraten abhängig von der Hämin-Konzentration in diesen beiden Stämmen den besonderen Stellenwert von Sae in dem Zusammenhang ebenfalls demonstrieren.

Der eisenabhängige Regulator Fur ist im Gegensatz zu Sae nicht direkt an dem von Hämin ausgelösten Mechanismus beteiligt. Versuche mit einer LS1 *fur* Mutante zeigten zwar, dass die Expression der Hämolyse durchaus von diesem Regulator beeinflusst werden, vermutlich indirekt durch eine Aktivierung von Sae, es konnten aber in der Reaktion auf Hämin keine Unterschiede zum WT in der Hämolyse oder der Transkription der Hämolyse festgestellt werden.

Des Weiteren liegt die Vermutung nahe, dass Hämin einen spezifischen Effekt in SA auslöst. Obwohl im WT die Transkription von *sae* und den Hämolysegenen ebenfalls durch Eisensulfat-Zugabe in RPMI signifikant reduziert werden konnte, liegt diesem Fall wahrscheinlich ein anderer Regulationsmechanismus zugrunde. In der *sae* Mutante konnten mit Eisensulfat nämlich ebenfalls kleine Reduktionen der Transkriptionsrate gemessen werden, die mit Hämin nicht aufgetreten sind. Des Weiteren konnte in der *fur* Mutante mit Eisensulfat kein Effekt, aber mit Hämin eine vergleichbare Reaktion wie im WT bestimmt werden. Dies lässt darauf schließen, dass Eisensulfat über den eisenabhängigen Repressor Fur reguliert wird und nicht über Sae. Die Verwendung verschiedener Eisenquellen zeigte auch auf die Expression von Eap keine vergleichbaren Ergebnisse wie zuvor mit Hämin und bestärkt damit die Theorie eines spezifischen Hämin-Effekts.

Diese Resultate vergrößern den Einblick in den Hämin-abhängigen Regulationsmechanismus der Hämolyse und stellen damit einen weiteren Weg für SA dar, sich vor einer Vergiftung durch Hämin zu schützen. Zudem wird der Balanceakt für SA

zwischen lebensnotwendiger Eisenakquirierung und lebensbedrohlicher Intoxikation durch Hämin verdeutlicht.

Obwohl das Sae-Regulon in dieser Arbeit als eines der wichtigsten Systeme aufgezeigt werden konnte, bleibt trotzdem die Vermutung, dass noch weitere Regulatoren an diesem Mechanismus beteiligt sind. Die unterschiedlich großen Reaktionen von Hämin auf die drei Hämolytine und auch die Unterschiede in deren basalen Expressionen in den Mutanten im Vergleich zum WT ist ein klares Indiz für weitere Regulatoren. Das eingangs beschriebene komplexe Netzwerk der Regulatoren (Abb. 1-3) zeigt, dass meist viele Systeme an der Expression einzelner Gene beteiligt sind und dass diese sich oft untereinander zusätzlich induzieren oder hemmen können. Für zukünftige Versuche wäre die Untersuchung weiterer Regulatoren daher zur Vervollständigung der hier gezeigten Resultate sinnvoll.

Neben den Hämolytinen konnte in dieser Arbeit ebenfalls ein Effekt von Hämin auf die Eap-Expression gezeigt werden. Welchen Vorteil die Hemmung der Eap-Biosynthese für SA bedeutet, kann zum momentanen Wissensstand noch nicht beantwortet werden und wäre sicherlich eine interessante Fragestellung für künftige Untersuchungen.

Des Weiteren würde es sich anbieten, die real-time PCR-Versuche, die in LB und RPMI mit 6-stündigen Kulturen gestartet wurden, ebenfalls zu vergleichbaren Wachstumsphasen zu induzieren. Damit könnte die Problematik unterschiedlicher Expressionsmuster der Kulturen zum Zeitpunkt der Probenentnahme umgangen werden. Ein Vergleich dieser beiden Experimente würde Aufschluss darüber geben, ob die in dieser Arbeit erhaltene Diskrepanz in den Transkriptionsraten auf die unterschiedlichen Wachstumsphasen oder Eisenkonzentrationen der Medien zurückzuführen ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist das Verständnis der Aktivierung von SA durch Hämin. Darüber ist bisher noch nicht viel bekannt. Dazu müssten geeignete Versuche ausgewählt werden, mit denen bestimmt werden kann, wo der Effekt ausgelöst wird, ob extrazellulär über einen Rezeptor oder intrazellulär nach dem Import des Moleküls. Des Weiteren ist noch ungeklärt, was genau den Mechanismus induziert. Zwar haben erste Versuche in der vorliegenden Arbeit vermuten lassen, dass ein spezifischer Effekt vorliegt, der nur durch Hämin ausgelöst werden kann, aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Induktion der Genregulation z. B. durch Eisen alleine nach der Degradation im Zytoplasma oder durch Abbauprodukte des Phorphyrinrings ausgelöst wird.

Das Verständnis solcher komplexen und für SA lebensnotwendigen Mechanismen ist für die Erforschung neuer antimikrobieller Therapeutika von Interesse. Nur wenn Einzelheiten bekannt sind, können Methoden für eine Hemmung und damit Abtötung dieser Mikroorganismen etabliert werden. Ein solch sensibles System wie die Regulation der Eisenaufnahme, das für SA überlebensnotwendig ist, stellt einen guten Angriffspunkt für

solche Überlegungen dar. Allerdings bedarf es dazu noch der Erforschung einer ganzen Reihe bisher unbekannter Informationen.

## Literaturverzeichnis

1. Aman MJ, Karauzum H, Bowden MG, Nguyen TL (2010) Structural model of the pre-pore ring-like structure of Pantone-Valentine leukocidin: providing dimensionality to biophysical and mutational data. *J Biomol Struct Dyn* 28:1-12
2. Attia AS, Benson MA, Stauff DL, Torres VJ, Skaar EP (2010) Membrane damage elicits an immunomodulatory program in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 6:e1000802
3. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons
4. Balaban N, Rasooly A (2000) Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol* 61:1-10
5. Ballouche M, Cornelis P, Baysse C (2009) Iron metabolism: a promising target for antibacterial strategies. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 4:190-205
6. Balwit JM, Vanlangevelde P, Vann JM, Proctor RA (1994) Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis* 170:1033-1037
7. Begun J, Gaiani JM, Rohde H, Mack D, Calderwood SB, Ausubel FM, Sifri CD (2007) Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog* 3:526-540
8. Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13:20-26
9. Bremell T, Lange S, Svensson L, Jennische E, Grondahl K, Carlsten H, Tarkowski A (1990) Outbreak of spontaneous staphylococcal arthritis and osteitis in mice. *Arthritis Rheum* 33:1739-1744
10. Bronner S, Monteil H, Prevost G (2004) Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *Fems Microbiol Rev* 28:183-200
11. Casewell MW, Hill RLR (1986) The carrier state - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 18:1-12
12. Chan PF, Foster SJ (1998) The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Microbiology-Uk* 144:2469-2479
13. Chatterjee I, Kriegeskorte A, Fischer A, Deiwick S, Theimarm N, Proctor RA, Peters G, Herrmann M, Kahl BC (2008) In vivo mutations of thymidylate synthase (Encoded by *thyA*) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 190:834-842
14. Chavakis T, Hussain M, Kanse SM, Peters G, Bretzel RG, Flock JI, Herrmann M, Preissner KT (2002) *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat Med* 8:687-693

15. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, 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
16. Cheung AL, Bayer AS, Zhang GY, Gresham H, Xiong YQ (2004) Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in Staphylococcus aureus. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40:1-9
17. Chien YT, Manna AC, Projan SJ, Cheung AL (1999) SarA, a global regulator of virulence determinants in Staphylococcus aureus, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *J Biol Chem* 274:37169-37176
18. D'Autreaux B, Horner O, Oddou JL, Jeandey C, Gambarelli S, Berthomieu C, Latour JM, Michaud-Soret I (2004) Spectroscopic description of the two nitrosyl-iron complexes responsible for fur inhibition by nitric oxide. *J Am Chem Soc* 126:6005-6016
19. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M (2001) Survey of infections due to Staphylococcus species: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32:114-132
20. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Gismondo MR (2007) In vitro evaluation of antibiotics' combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant Staphylococcus aureus severe respiratory infections. *BMC Infect Dis* 7:111
21. Dryla A, Gelbmann D, von Gabain A, Nagy E (2003) Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Mol Microbiol* 49:37-53
22. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ (2001) Transcription profiling-based identification of Staphylococcus aureus genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J Bacteriol* 183:7341-7353
23. Duthie ES, Lorenz LL (1952) Staphylococcal coagulase - mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol* 6:95-107
24. Entenza JM, Vouillamoz J, Glauser MP, Moreillon P (1997) Levofloxacin versus ciprofloxacin, flucloxacillin, or vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to methicillin-susceptible or -resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother* 41:1662-1667
25. Everse J, Hsia N (1997) The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic Biol Med* 22:1075-1099
26. Fischer H, Kirmann A (1929) Syntheses of mesoporphyrin I, IV, XIII and XIV. *Justus Liebigs Ann Chem* 475:266-287
27. Foster TJ, Hook M (1998) Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. *Trends Microbiol* 6:484-488
28. Foster TJ (2009) Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet Dermatol* 20:456-470

29. Friedman DB, Stauff DL, Pishchany G, Whitwell CW, Torres VJ, Skaar EP (2006) Staphylococcus aureus redirects central metabolism to increase iron availability. PLoS Pathog 2:777-789
30. Giachino P, Engelmann S, Bischoff M (2001) sigma(B) activity depends on RsbU in Staphylococcus aureus. J Bacteriol 183:1843-1852
31. Giraudo AT, Cheung AL, Nagel R (1997) The sae locus of Staphylococcus aureus controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. Arch Microbiol 168:53-58
32. Gordon RJ, Lowy FD (2008) Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. Clin Infect Dis 46:350-359
33. Greenwood D (1997) The Staphylococci in human disease - Crossley,KB, Archer,GL. Public Health 111:435-435
34. Hagggar A, Hussain M, Lonnie H, Herrmann M, Norrby-Teglund A, Flock JI (2003) Extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus enhances internalization into eukaryotic cells. Infect Immun 71:2310-2317
35. Hagggar A, Ehrnfelt C, Holgersson J, Flock JI (2004) The extracellular adherence protein from Staphylococcus aureus inhibits neutrophil binding to endothelial cells. Infect Immun 72:6164-6167
36. Hantke K (1981) Regulation of ferric iron transport in Escherichia-Coli-K12 - Isolation of a constitutive mutant. Mol Gen Genet 182:288-292
37. Harraghy N, Kormanec J, Wolz C, Homerova D, Goerke C, Ohlsen K, Oazi S, Hill P, Herrmann M (2005) Sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. Microbiology-(UK) 151:1789-1800
38. Harraghy N, Homerova D, Herrmann M, Kormanec J (2008) Mapping the transcription start points of the Staphylococcus aureus eap, emp, and vwB promoters reveals a conserved octanucleotide sequence that is essential for expression of these genes. J Bacteriol 190:447-451
39. Hecker M, Becher D, Fuchs S, Engelmann S (2010) A proteomic view of cell physiology and virulence of Staphylococcus aureus. Int J Med Microbiol 300:76-87
40. Horsburgh MJ, Ingham E, Foster SJ (2001) In Staphylococcus aureus, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. J Bacteriol 183:468-475
41. Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA (2007) Structure and biological activities of beta toxin from Staphylococcus aureus. J Bacteriol 189:8719-8726
42. Hussain M, Hagggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI, Herrmann M (2002) Insertional inactivation of eap in Staphylococcus aureus strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. Infect Immun 70:2933-2940
43. Hussain M, von Eiff C, Sinha B, Joost I, Herrmann M, Peters G, Becker K (2008) Eap gene as novel target for specific identification of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 46:470-476

44. James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini ED, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS (2008) Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 16:37-44
45. Jayasinghe LN, Miles G, Bayley H (2006) Role of the amino latch of staphylococcal alpha-hemolysin and leukocidin in pore formation. *Faseb J* 20:518-518
46. Ji GY, Beavis RC, Novick RP (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12055-12059
47. Johnson M, Cockayne A, Morrissey JA (2008) Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires *ica* and the secreted protein Emp. *Infect Immun* 76:1756-1765
48. Johnson M, Sengupta M, Purves J, Tarrant E, Williams PH, Cockayne A, Muthaiyan A, Stephenson R, Ledala N, Wilkinson BJ, Jayaswal RK, Morrissey JA (2010) Fur is required for the activation of virulence gene expression through the induction of the *sae* regulatory system in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 301:44-52
49. Joost I, Blass D, Burian M, Goerke C, Wolz C, von Muller L, Becker K, Preissner K, Herrmann M, Bischoff M (2009) Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. *J Infect Dis* 199:1471-1478
50. Kaneko J, Kamio Y (2004) Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: Structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:981-1003
51. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK, Investigators ABM (2007) Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA-J Am Med Assoc* 298:1763-1771
52. Kluytmans J, vanBelkum A, Verbrugh H (1997) Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10:505-520
53. Kornblum J, Hartman BJ, Novick RP, Tomasz A (1986) Conversion of a homogeneously methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* to heterogeneous resistance by TN551-mediated insertional inactivation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 5:714-718
54. Kupferwasser LI, Yeaman MR, Nast CC, Kupferwasser D, Xiong YQ, Palma M, Cheung AL, Bayer AS (2003) Salicylic acid attenuates virulence in endovascular infections by targeting global regulatory pathways in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest* 112:222-233
55. Kuroda H, Kuroda M, Cui L, Hiramatsu K (2007) Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol Lett* 268:98-105
56. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui LZ, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian JQ, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Uji Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hirakawa H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K

- (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357:1225-1240
57. Lee JW, Helmann JD (2007) Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* 20:485-499
58. Lee LY, Miyamoto YJ, McIntyre BW, Hook M, McCrea KW, McDevitt D, Brown EL (2002) The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J Clin Invest* 110:1461-1471
59. Lee WC, Reniere ML, Skaar EP, Murphy MEP (2008) Ruffling of metalloporphyrins bound to IsdG and IsdI, two heme-degrading enzymes in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 283:30957-30963
60. Lemon KP, Klepac-Ceraj V, Schiffer HK, Brodie EL, Lynch SV, Kolter R (2010) Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. *MBio* 1:10-18
61. Liang XD, Zheng L, Landwehr C, Lunsford D, Holmes D, Ji YD (2005) Global regulation of gene expression by ArIRS, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 187:5486-5492
62. Liang XD, Yu CX, Sun JS, Liu H, Landwehr C, Hohnes D, Ji YD (2006) Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 74:4655-4665
63. Lindsay JA, Holden MTG (2004) *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol* 12:378-385
64. Lowy FD (1998) Medical progress - *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-532
65. Mainiero M, Goerke C, Geiger T, Gonser C, Herbert S, Wolz C (2010) Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS. *J Bacteriol* 192:613-623
66. Maira-Litran T, Kropec A, Abeygunawardana C, Joyce J, Mark G, Goldmann DA, Pier GB (2002) Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* 70:4433-4440
67. Maresso AW, Schneewind O (2006) Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *Biometals* 19:193-203
68. Mason WJ, Skaar EP (2009) Assessing the contribution of heme-iron acquisition to *Staphylococcus aureus* pneumonia using computed tomography. *PLoS One* 4:e6668
69. Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humayun M, Gornicki P, Jelenska J, Joachmiak A, Missiakas DM, Schneewind O (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299:906-909
70. Menestrina G, Dalla Serra M, Prevost G (2001) Mode of action of beta-barrel pore-forming toxins of the staphylococcal alpha-hemolysin family. *Toxicon* 39:1661-1672
71. Modun B, Evans RW, Joannou CL, Williams P (1998) Receptor-mediated recognition and uptake of iron from human transferrin by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 66:3591-3596

72. Novick R (1967) Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology* 33:155-166
73. Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48:1429-1449
74. Novick RP, Jiang DR (2003) The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology-(UK)* 149:2709-2717
75. Ohlsen K, Ziebuhr W, Koller KP, Hell W, Wichelhaus TA, Hacker J (1998) Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2817-2823
76. Orenstein A, Klein D, Kopolovic J, Winkler E, Malik Z, Keller N, Nitzan Y (1997) The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in burn wound infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19:307-314
77. Palma M, Hagggar A, Flock JI (1999) Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J Bacteriol* 181:2840-2845
78. Park RY, Sun HY, Choi MH, Bai YH, Shin SH (2005) *Staphylococcus aureus* siderophore-mediated iron-acquisition system plays a dominant and essential role in the utilization of transferrin-bound iron. *J Microbiol* 43:183-190
79. Pauling L, Coryell CD (1936) The magnetic properties and structure of hemoglobin, oxyhemoglobin and carbonmonoxyhemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 22:210-216
80. Pishchany G, Dickey SE, Skaar EP (2009) Subcellular localization of the *Staphylococcus aureus* heme iron transport components *IsdA* and *IsdB*. *Infect Immun* 77:2624-2634
81. Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G (2009) *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol* 56:597-612
82. Pluym M, Muryol N, Heinrichs DE, Stillman MJ (2008) Heme binding in the NEAT domains of *IsdA* and *IsdC* of *Staphylococcus aureus*. *J Inorg Biochem* 102:480-488
83. Potrich C, Bastiani H, Colin D, Huck S, Prevost G, Dalla Serra M (2009) The influence of membrane lipids in *Staphylococcus aureus* gamma-hemolysins pore formation. *J Membr Biol* 227:13-24
84. Proctor RA, Vanlangevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD (1995) Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus-aureus*. *Clin Infect Dis* 20:95-102
85. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G (2006) Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol* 4:295-305
86. Ratledge C, Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:881-941
87. Raymond KN, Dertz EA, Kim SS (2003) Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3584-3588

88. Reniere ML, Torres VJ, Skaar EP (2007) Intracellular metalloporphyrin metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Biometals* 20:333-345
89. Reniere ML, Skaar EP (2008) *Staphylococcus aureus* haem oxygenases are differentially regulated by iron and haem. *Mol Microbiol* 69:1304-1315
90. Rouault TA (2004) Pathogenic bacteria prefer heme. *Science* 305:1577-1578
91. Schmidt KA, Manna AC, Cheung AL (2003) SarT influences sarS expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 71:5139-5148
92. Sibbald M, Ziebandt AK, Engelmann S, Hecker M, de Jong A, Harmsen HJA, Raangs GC, Stokroos I, Arends JP, Dubois JYF, van Dijk JA (2006) Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:755-788
93. Skaar EP, Gaspar AH, Schneewind O (2004) IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 279:436-443
94. Skaar EP, Humayun M, Bae T, DeBord KL, Schneewind O (2004) Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* 305:1626-1628
95. Sobke ACS, Selimovic D, Orlova V, Hassan M, Chavakis T, Athanasopoulos AN, Schubert U, Hussain M, Thiel G, Preissner KT, Herrmann M (2006) The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation. *Faseb J* 20:2621-2623
96. Somerville GA, Proctor RA (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:233-248
97. Steinhuber A, Goerke C, Bayer MG, Doring G, 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
98. Tajima A, Iwase T, Shinji H, Seki K, Mizunoe Y (2009) Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect Immun* 77:327-334
99. Thöny-Meyer L (1997) Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:337-376
100. Torres VJ, Stauff DL, Pishchany G, Bezbradica JS, Gordy LE, Iturregui J, Anderson KL, Dunman PM, Joyce S, Skaar EP (2007) A *Staphylococcus aureus* regulatory system that responds to host heme and modulates virulence. *Cell Host Microbe* 1:109-119
101. Torres VJ, Attia AS, Mason WJ, Hood MI, Corbin BD, Beasley FC, Anderson KL, Stauff DL, McDonald WH, Zimmerman LJ, Friedman DB, Heinrichs DE, Dunman PM, Skaar EP (2010) *Staphylococcus aureus* Fur regulates the expression of virulence factors that contribute to the pathogenesis of pneumonia. *Infect Immun* 78:1618-1628
102. Touati D (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 373:1-6
103. Walker B, Krishnasastri M, Zorn L, Kasianowicz J, Bayley H (1992) Functional expression of the alpha-hemolysin of *Staphylococcus aureus* in intact *Escherichia coli* and in cell lysates - Deletion of 5 C-terminal amino-acids selectively impairs hemolytic-activity. *J Biol Chem* 267:10902-10909

104. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kulauzovic E, Kohler T, Thumm G, Stoll H, Gotz F, Peschel A (2008) Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Int J Med Microbiol* 298:505-513
105. Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751-762
106. Wijaya L, Hsu LY, Kurup A (2006) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Overview and local situation. *Ann Acad Med Singap* 35:479-486
107. Wiseman GM (1975) Hemolysins of *Staphylococcus-aureus*. *Bacteriological Reviews* 39:317-344

## Publikationen / Kongressbeiträge

### Publizierte Abstracts

#### **Julia Schmitt, Stephanie Bur, Eric P. Skaar, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Hemin induces a *sae*-dependent regulation of Eap production in *Staphylococcus aureus*

*International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 299 (Suppl no. 1), S. 57, 2009

zur 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen

#### **Julia Schmitt, Eric P. Skaar, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Impact of hemin and iron on Sae activity in *Staphylococcus aureus*

*Biospektrum-Abstractband zur 3. Gemeinsamen Tagung von DGHM und VAAM*, S. 147, 2010

zur 3. Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover

#### **Stephanie Bur, Insa Joost, Julia Schmitt, Lutz von Müller, Uwe Schubert, Astrid Sobke, Klaus T. Preissner, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Interaction of the extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* with human keratinocytes

*International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 299 (Suppl no. 1), S. 56, 2009

zur 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Göttingen

#### **Stephanie Bur, Insa Joost, Julia Schmitt, Lutz von Müller, Klaus T. Preissner, Andreas Peschel, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Impact of the extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* on the internalization into human keratinocytes

*Biospektrum-Abstractband zur 3. Gemeinsamen Tagung von DGHM und VAAM*, S. 199 - 200, 2010

zur 3. Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Hannover

### Posterpräsentationen

1<sup>st</sup> International Symposium, Infection of the Endothelium, 2009, Dresden

**Julia Schmitt, Markus Bischoff, Mathias Herrmann**

Impact of hemin on growth and Sae activity of *Staphylococcus aureus*

14<sup>th</sup> International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI), 2010,  
Bath (United Kingdom)

**Julia Schmitt, Eric P. Skaar, Mathias Herrmann, Markus Bischoff**

Impact of hemin on Sae activity and the expression of hemolysins in *Staphylococcus aureus*

## Danksagungen

Vielen lieben Dank an Prof. Dr. Mathias Herrmann für die Bereitstellung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft, Anregung und Kritik sowie die fortwährende Motivation während der gesamten Promotionszeit.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Martina Sester für die Übernahme der Betreuung und der Berichterstattung dieser Arbeit bedanken.

Ich danke auch Dr. Markus Bischoff für die vielen Ideen und Diskussionen und besonders für die Korrekturen sämtlicher Poster, Abstracts und natürlich dieser Arbeit.

Herzlich danken möchte ich auch allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und auch die ein oder andere Ablenkung, Aufheiterung und sinnfreie Kaffeepause.

Ein ganz besonderer Dank gilt Karin Hilgert, die nicht nur alle auftretenden Laborprobleme schnellstens zu lösen wusste (ich sag nur ABI!!!) und durch eine perfekte Organisation mir den Arbeitsalltag um ein Vielfaches erleichtert hat, sondern auch immer eine moralische Unterstützung für mich war.

Dem ganzen Sekretariats-Team möchte ich für die stets freundliche, schnelle und unkomplizierte Hilfe bei allen auftretenden Fragen und Problemen danken.

Zum Schluss möchte ich ganz herzlich meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere Thomas, danken, die mich stets unterstützt und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mir somit die notwendige Ruhe und Sicherheit für die Erstellung dieser Arbeit gegeben haben.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Julia Schmitt  
Geburtsdatum: 08.11.1982  
Geburtsort: Lahnstein  
Familienstand: ledig

### Schulische Ausbildung / Studium

Aug. 1989 – Juli 1993      Grundschule Singhofen

Aug. 1993 – März 2002      Goethe-Gymnasium Bad Ems  
Abschluss Abitur

Okt. 2002 – Aug. 2007      Chemie Studium an der TU Kaiserslautern  
Abschluss Diplom

Okt. 2007 – Nov. 2010      Promotion an der Universität des Saarlandes, Standort Uniklinik  
Homburg, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene

### Stipendium

Okt. 2002 - Sept. 2004      Jubiläums-Stipendium des Stipendienfonds des Verbandes der  
chemischen Industrie (VCI)

