

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



**Einfluss definierter Umweltbedingungen auf die Expression der  
Adhäsionsproteine Eap und Emp in *S. aureus***

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

vorgelegt von  
Myriam Groß  
geb. am 10.09.1982 in Saarbrücken

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BHI	Brain-heart infusion
BLAST	basic local alignment search tool
Bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinacid
dNTP	desoxynukleosidtriphosphat
EB	Elution Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
GFP	green-fluorescence-protein
GTP	Guanidintriphosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL-2	Interleukin-2
LB	Lennox Broth
MAP	MHC ähnliches Protein
MBB	Modified Basic Broth
MDB	Membrane desalting buffer
MHC	Major-Histocompatibility complex
MSCRAMM	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
OD	Optical Density
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleinacid
RT-PCR	Real-time-PCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SERAM	Secretable Expanded Repertoire Adhesion Molecules
SSSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TF	Tissue factor
TLR-2	Toll like receptor-2

TSB	Tryptic Soy Broth
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung .....	- 1 -
2.	Einleitung .....	- 7 -
2.2	Charakterisierung von <i>S. aureus</i> .....	- 7 -
2.3	Infektionen .....	- 8 -
2.4	Virulenzfaktoren .....	- 10 -
2.4.1	Zellwand .....	- 10 -
2.4.2	Kapsel .....	- 11 -
2.4.3	Oberflächenproteine .....	- 11 -
2.4.4	Toxine und Enzyme .....	- 12 -
2.4.5	Biofilm .....	- 13 -
2.5	Eap und Emp .....	- 14 -
2.5.1	Eap .....	- 14 -
2.5.2	Emp .....	- 14 -
2.5.3	Bislang bekannte Wirkungen von Eap (Emp) .....	- 14 -
2.6	Regulatoren von Eap und Emp .....	- 18 -
2.6.1	Schema des globalen Zusammenhangs .....	- 18 -
2.6.2	<i>agr</i> (akzessorischer Genregulator) .....	- 18 -
2.6.3	<i>sar</i> (staphylokokken akzessorischer Aktivator) .....	- 18 -
2.6.4	<i>sigmaB</i> .....	- 19 -
2.6.5	<i>sae</i> ( <i>S. aureus</i> exoprotein expression) .....	- 19 -
2.7	Bedeutung der Dissertation und Ausblick .....	- 20 -
3.	Material und Methoden .....	- 21 -
3.1	Materialien .....	- 21 -
3.1.1	Bakterienstämme, Plasmide und Primer .....	- 21 -
3.1.2	Medien .....	- 24 -
3.1.3	Software .....	- 25 -
3.2	Methoden .....	- 25 -
3.2.1	Anzucht und Lagerung von Bakterien .....	- 25 -
3.2.2	DNA .....	- 26 -
3.2.3	Cloning .....	- 29 -

3.2.4	RNA.....	- 33 -
3.2.5	Protein.....	- 37 -
3.2.6	Assays zur Analyse des Verhaltens der Bakterien .....	- 39 -
4.	Resultate .....	- 41 -
4.1	Herstellung des <i>emp-gfp-lux</i> .....	- 41 -
4.1.1	Präparation des <i>emp</i> -Promotors für das Klonieren in pSB 2035.....	- 41 -
4.1.2	Vorbereitung von pSB2035 für die Klonierung .....	- 41 -
4.1.3	Konstruktion von <i>emp-gfp-lux</i> , Ligation, Transformation in <i>E. coli</i> , Sequenzierung und Transduktion in Newman .....	- 42 -
4.2	Wachstumskurve und Reporter-Gen-Assay.....	- 45 -
4.2.1	Bestätigung der <i>emp-gfp-lux</i> Variante mittels Reporter-Gen-Assay .....	- 45 -
4.2.2	Umweltbedingungen, welche die <i>eap</i> - und <i>emp</i> -Expression beeinflussen	- 46 -
4.2.3	Effekt von Osmolarität auf <i>eap</i> und <i>emp</i> .....	- 56 -
4.2.4	Effekt von Gyrase Inhibitoren .....	- 59 -
4.3	<i>arlRS</i> -Mutanten Herstellung.....	- 61 -
4.4	RNA .....	- 70 -
5.	Diskussion .....	- 75 -
5.1	Herstellung von MGH0 und Reporter-Gen-Assay .....	- 75 -
5.2	Analyse der Ergebnisse .....	- 76 -
5.2.1	Umweltbedingungen, die die Expression von <i>eap</i> und <i>emp</i> beeinflussen.	- 76 -
5.2.2	Beweis für DNA Supercoiling als Mechanismus der Regulation für Eap	- 82 -
5.2.3	Identifikation des <i>arlRS</i> -Systems als neuer Regulator von Eap.....	- 85 -
5.2.4	RT-PCR .....	- 87 -
5.3	Schlussfolgerung.....	- 89 -
6.	Literaturverzeichnis.....	- 90 -
7.	Publikationen.....	- 98 -
8.	Danksagung.....	- 99 -
9.	Lebenslauf .....	- 100 -

## 1. Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* ist ein wichtiges humanmedizinisches Pathogen und hat in den letzten Jahren vor allem als nosokomialer Erreger an Bedeutung gewonnen: Insbesondere primäre Septikämien, aber auch Endokarditis, Wund- und Knochen-Infektionen sowie andere Abszess-bildende Infektionen werden häufig von *S. aureus* verursacht. Seit Einführung antimikrobieller Therapie hat der Erreger dabei Resistenzen gegen nahezu alle Antibiotika-Stoffklassen entwickelt und die globale Ausbreitung multiresistenter Stämme ist inzwischen von eminenter Bedeutung für Patienten und Kliniker.

Für die Entwicklung invasiver *S. aureus* Infektionen ist die Expression von Virulenzfaktoren von entscheidender Bedeutung, da sie letztlich die Pathogenität des Mikroorganismus vermitteln. Hier hat sich bereits in mehreren Studien gezeigt, dass *S. aureus* sich hinsichtlich der Virulenzgen-Expression als Reaktion auf eine Reihe von Umweltfaktoren adaptieren kann. In der hier vorgelegten Arbeit wurden nun zwei in ihrer Umweltbedingung-Abhängigkeit bisher noch nicht untersuchte Gene, *eap* und *emp*, die für das „extrazelluläre Adhäsivprotein“ (Eap) sowie das „extrazelluläre Matrix-Bindeprotein“ (Emp) kodieren, hinsichtlich ihrer Expressionsabhängigkeit von Umweltbedingungen untersucht.

Unterschiedliche Umweltbedingungen für *S. aureus* als Erreger - zwischen Persistenz auf unbelebten Oberflächen über Kolonisation von Häuten und Schleimhäuten bis hin zu invasiver Infektion - sind unter anderem durch eine extreme Variabilität in Umgebungs-Osmolarität sowie in der Konzentration bivalenter Kationen charakterisiert. Für diese Arbeit wurden daher die Gen-Expressions-Bedingungen zunächst unter verschiedenen Ionenkonzentrationen (NaCl, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) und Umweltstress (in Form von Osmolarität) untersucht. Die Gen-Expression wurde in einem Lumineszenz-Reporter-Gen-Assay überprüft. Parallel wurde durch detaillierte Analyse des Bakterienwachstums sichergestellt, dass die untersuchten Umweltbedingungen das Wachstum der Bakterien nicht nachhaltig beeinflussten.

Alle Experimente wurden mit MBB durchgeführt, das mit den jeweiligen Zusätzen supplementiert wurde. Die Ergebnisse der Wachstumskurven ergaben für die meisten Kulturbedingungen keine größeren Unterschiede, das bakterielle Wachstum war ähnlich der Vergleichskurve mit nicht supplementiertem MBB. Allerdings zeigte das MBB Medium unter einer 0,5 mM EDTA-Supplementierung eine deutliche Wachstums-Reduktion, während die

Wachstums-Kurve unter Zugabe von 0,25 % Citrat eine leichte Wachstums-Steigerung anzeigte.

Die Analyse der Expression von *eap* und *emp* ergab eine konzentrations-abhängige Reduktion unter MBB-Supplementierung mit NaCl. Die für die *eap*-Expression optimale NaCl-Konzentration lag dabei zwischen 0 und 0,25 mM und entspricht damit annähernd der normalerweise in MBB enthaltenen Konzentration. Im Unterschied hierzu wurde nach Supplementierung mit 1 M NaCl eine deutliche Hemmung der Genexpression nachgewiesen. Dass dieser Effekt durch die Osmolarität und nicht durch die Natrium-Konzentration bedingt war, konnte durch die Supplementierung von MBB mit anderen osmolar wirksamen Substanzen wie 1 M Sucrose und 1 M KCl bestätigt werden. Für eine MBB-Supplementierung mit dem Chelator EDTA oder nach Supplementierung mit CaCl<sub>2</sub> ergab sich ebenfalls eine Expressions-Reduktion. Für den Chelator Citrat sowie MgCl<sub>2</sub> zeigte sich hingegen ein Unterschied in der Regulation von *eap* und *emp*. Während Citrat die *eap*-Expression steigerte, fand sich für *emp* eine Steigerung unter MgCl<sub>2</sub>-Supplementierung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter unterschiedlichen Umweltbedingungen *S. aureus* in der Lage ist, die Expression von *eap* und *emp* zu beeinflussen. Ein Mechanismus, der diese Adaptivität der Genexpression erklären könnte, ist eine Veränderung im „Supercoiling“ der DNA. Frühere Studien haben bereits eine Veränderung des „Supercoiling“ auf Modifikation des Umwelt pH-Wertes oder der Osmolarität nachgewiesen. Nachdem die Ergebnisse eine deutliche Gen-Expressions-Reduktion unter entweder 1 M NaCl oder den anderen osmolar wirksam supplementierten Medien zeigten, wurde der Einfluss einer Veränderung der tertiären DNA-Struktur auf die Eap-Expression untersucht. Hierzu wurde ein Gyraseinhibitor, Novobiocin, in subinhibitorischer Konzentration benutzt. Die optimale subinhibitorische Konzentration wurde dabei durch die Analyse von Wachstumskurven bei verschiedenen Konzentrationen von Novobiocin gesichert. Daraus ergab sich, dass nach Supplementierung von 0,5 ng/ml und 5 ng/ml Novobiocin keine Verminderung des Wachstums resultierte, hingegen für die höheren Konzentrationen von 20 und 40 ng/ml Novobiocin eine deutliche Wachstumsreduktion konstatiert wurde. Bei einer Konzentration von 5 ng/ml ergab sich jedoch im Reporter-Gen-Assay die größte Steigerung der Gen-Expression. Dies ließ tatsächlich eine Modifikation des „Supercoiling“ bakterieller DNA als Ursache der unter unterschiedlicher Osmolarität festgestellten Genexpression vermuten.

Das *ar/RS*-System ist bekannt für seinen Einfluss auf das „Supercoiling“. Zur Untersuchung der Bedeutung des *ar/RS*-Systems hinsichtlich seiner Beeinflussung der umweltabhängigen Genexpression in *S. aureus* wurde daher eine Deletions-Mutation, die in

*S. aureus* Stamm BF21 bereits konstruiert vorlag, zur Vergleichbarkeit mit den Vorergebnissen in den hier verwendeten *S. aureus* Stamm Newman mittels Phagen-Transduktion übertragen. Zunächst wurde die Eap-Expression auf Protein-Ebene mittels SDS-PAGE untersucht, anschließend wurde auf Gen-Ebene die mRNA-Expression mittels „real time PCR“ (RT-PCR) analysiert. Auf Proteinebene zeigte sich in der  $\Delta arlRS$ -Mutante eine geringere Eap-Produktion als im Vergleich mit dem Wildtyp (WT); dieser Befund konnte auch auf Gen-Ebene durch die Ergebnisse der RT-PCR bestätigt werden. Interessanterweise zeigten die parallel durchgeführten Wachstumskurven-Analysen, dass die  $\Delta arlRS$ -Mutante keine postexponentielle Wachstumsphase aufweist und nach der exponentiellen Wachstumsphase vielmehr direkt in die stationäre Phase übergeht. Ein ähnlicher Befund hinsichtlich eines Defekts der postexponentiellen Wachstumsphase konnte in der Vergangenheit in unserer Arbeitsgruppe bereits bei anderen metabolischen Defekten, die mit einer Änderung des Krebszyklus-abhängigen Stoffwechsels einhergehen, gezeigt werden. Entsprechend zeigte ein mit unserer  $\Delta arlRS$  Mutante durchgeführter Azetat-Assay eine geringere Fähigkeit der Mutante, Azetat zu metabolisieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Expression der wichtigen *S. aureus* Virulenzfaktoren Eap und Emp, insbesondere durch Osmolarität- und Kationen-bedingte Umweltbedingungen, nachhaltig beeinflusst werden. Als Mechanismus für diese Beeinflussung konnten wir durch Exposition mit „Supercoiling“-Inhibitoren und einer Analyse einer *S. aureus arlRS*-Deletionsmutante (mit konsekutivem Defekt im DNA „Supercoiling“) eine Änderung der Transkriptionsbedingungen wahrscheinlich machen. Diese detaillierte Analyse der Eap- und Emp-Expression erlaubt damit ein besseres Verständnis über die Virulenz-Adaptation von *S. aureus* unter unterschiedlichen, *in vivo* vorliegenden Bedingungen und damit den Bedingungen für bakterielle Invasion und nachfolgende Infektion. Diese Beobachtungen sind insbesondere wichtig, da sie neue Wege aufzeigen können, die Pathogenese oder den Verlauf einer invasiven Infektion durch diesen potentiell hoch virulenten Erreger zu beeinflussen.

## Summary

*S. aureus* is a human pathogen, which has become increasingly important with respect to nosocomial infections in recent years. It has been implicated in septicemia, endocarditis, bone and wound infections as well as abscess formation. Since the inception of antimicrobial treatment, the bacteria has developed resistance to nearly all classes of Antibiotics and the global dissemination of multi-resistant strains has become an important issue for Patients and medical staff alike.

The expression of virulence factors is of immense importance in the development of invasive *S. aureus* infections, due to the fact that they mediate the pathogenicity of the Bacteria.

Various studies have shown that *S. aureus* is able to adapt its virulence gene expression to many environmental factors. This work is focused on the genes *eap* and *emp*, which code for the extracellular adhesion protein and extracellular matrix protein, respectively. These genes have not been investigated for differences in expression due to environmental conditions.

The environmental conditions which affect the pathogenicity of *S. aureus* from its persistence on organically inert surfaces, to its colonisation of the skin and finally invasive infection are characterised by a marked variation in both environmental osmolarity and the concentration of bivalent cations. Gene expression was examined under both different ion concentration (NaCl, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>), and environmental stress (in the form of osmolarity). The gene expression was tested in a luminescence-reporter-gene assay. In addition, it was established by detailed analysis of growth of the bacteria that the examined environmental conditions were not affecting it in an adverse way.

All the experiments were performed in MBB supplemented with the various additives. The resultant growth curves were similar to that of the reference medium with the exception of the medium supplemented by 0.5 mM EDTA which demonstrated a considerable reduction in growth while the medium supplemented with 0.25 % citrate showed a slight increase in growth.

The analysis showed that there was a correlation between the expression of both *eap* and *emp* and the concentration of NaCl in the medium. The optimal NaCl concentration for *eap* expression was between 0 and 0.25 M, which is approximately the normal concentration in MBB. In contrast, there was a clear inhibition of gene expression noted after a supplementation of 1 M NaCl. That this was due to the osmolarity and not to the NaCl concentration was confirmed in tests with other additives which affect osmolarity, i.e. 1 M sucrose and 1 M KCL. When MBB was supplemented by the chelator EDTA, or with CaCl<sub>2</sub>,

it was noted that there was also a reduction in the expression of both genes. Addition of the chelator citrate showed an increase in the expression of *eap* while addition of  $MgCl_2$  showed an increase in the expression of *emp*.

These results showed that under different environmental conditions *S. aureus* is able to change the expression of *eap* and *emp*. One mechanism that could explain the adaptivity of the gene-expression is a change in supercoiling of the DNA. Previous studies demonstrated a change of supercoiling due to modifications of pH of the environment or the osmolarity. After our results showed a massive reduction of the gene-expression under 1 M NaCl or the other osmolar-effective supplemented mediums, we started an investigation on changes on the tertiary structure of the DNA and correlated changes in the *eap*-expression. For these experiments we used a gyraseinhibitor, Novobiocin, in subinhibitory concentrations. The optimal subinhibitory concentration was proved by analysis of growth curves of different concentration of Novobocin. These showed that supplements of 0.5 ng/ml and 5 ng/ml Novobiocin, respectively, did not show any reduction in growth, whereas concentrations of 20 ng/ml and 40 ng/ml did so. The greatest increase in gene expression in the reporter-gene assay was noted at the concentration of 5 ng/ml Novobiocin. These results led us to conclude that a modification of the supercoiling of bacterial DNA gyrase was a cause of the differences noted in gene expression under different osmolarities.

The *arlRS*-system is known to influence DNA supercoiling. A deletion mutant was constructed to assess the extend to which the *arlRS*-system influenced environmentally dependent gene expression in *S. aureus*. This mutant existed already in the *S. aureus* strain BF21 and was transformed for a better comparison with our results to our strain Newman by phage transduction. At first the Eap-expression was tested on the protein level with an SDS-PAGE followed by tests on the gene-level by mRNA expression with RT-PCR. On the protein-level, a lower Eap production was observed in the *arlRS*-mutant than in the wildtype (WT); this result was confirmed by the results on the gene level with the analysis of the RT-PCR results. Interestingly, the parallel growth curves showed that the *arlRS*-mutant has no post-exponential growth phase; the stationary phase starting directly after the exponential growth phase. Similar results regarding the absence of the post exponential growth phase were noted in studies of those metabolic defects which cause changes in the TCA cycle. We therefore performed an acetate assay with the *arlRS* mutant in which it was noted that it was less able to metabolize acetate.

To summarize the results, we can say that the expression of the important *S. aureus* virulence factors *eap* and *emp* is substantially influenced by differences in osmolarity and

cation concentration. A possible mechanism of this influence may be a change in transcription, as evidenced by the results of experiments with supercoiling inhibitors and a *S. aureus* deletion mutant (with a consequent defect in DNA supercoiling). This detailed analysis of *eap*-and *emp* expression allows for a better understanding of the virulence adaption of *S. aureus* under different in vivo conditions and therefore the factors predisposing to bacterial invasion and subsequent infection. These observations are important because they show new ways to influence the pathogenicity or the process of invasive infection due to this highly virulent pathogen.

## 2. Einleitung

### 2.2 Charakterisierung von *S. aureus*

Seit seiner Erstbeschreibung durch Alexander Ogston vor über 100 Jahren ist die Bedeutung von *Staphylococcus aureus* als Erreger schwerer, auch unter wirksamer antimikrobieller Therapie nicht selten tödlich verlaufender, Infektionen gesichert. Der Erreger gehört zu den am besten untersuchten humanmedizinisch bedeutsamen Erregern, und im Laufe der jahrzehntelangen Forschung haben sich unzählige Aspekte ergeben, die insgesamt unser Verständnis von diesem hochadaptiven, an den Warmblüter-Wirt aber auch an adverse Umgebungsbedingungen sich optimal anpassenden Erreger vervollständigen.

*S. aureus* gehört zur Familie der *micrococcaceae*, die wiederum zu den gram-positiven Kokken gehören. Die Bakterien dieser Gruppe besitzen eine kugelige Form von der Größe 1 µm und bilden keine Sporen. Ihre nicht-parallelen Teilungsebenen resultieren in einem Kolonie-Wachstum in Form von Haufen oder „Trauben“, daher rührt auch dem Name, denn σταφυλος aus dem Griechischen bedeutet „Traube“ (Abbildung 1). Zur Gruppe der Staphylokokken gehören 30 Spezies und Subspezies, darunter auch andere humanpathogene Erreger wie *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus haemolyticus*. In dieser Gruppe ist *S. aureus* der wichtigste Vertreter für die Human-Medizin in Bezug auf bakterielle Infekte (Murray, 2007). Auch für die Veterinärmedizin spielt *S. aureus* eine bedeutende Rolle, besonders beim Krankheitsbild der bovinen Mastitis. Hier nimmt *S. aureus* nach den koagulase-negativen Staphylokokken eine führende Rolle ein (Ferguson, 2007). Ebenfalls konnte eine Transmission von Tier zu Mensch gezeigt werden. In einer Studie von Farmarbeitern und Kühen mit Mastitis konnte eine hohe Übereinstimmung des *S. aureus*-Isolates bei Mensch und Tier gefunden werden (Tiwari, 2007).

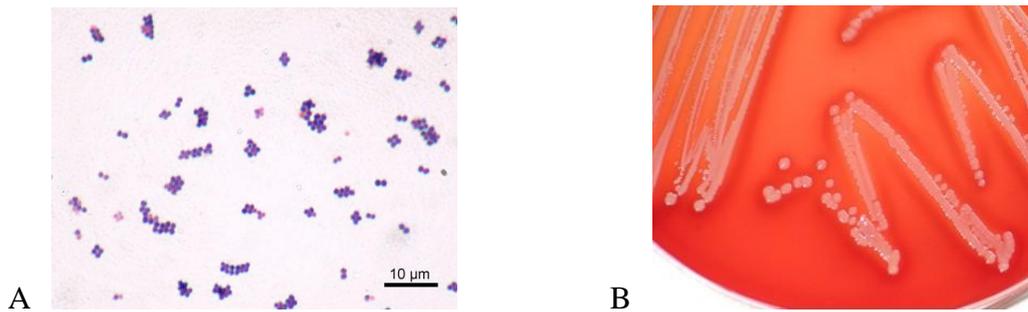


Abbildung 1: A Mikroskopisches Bild: traubenartiges Wachstum von *S. aureus*  
B Wachstum von *S. aureus* auf einer Blutagarplatte

*S. aureus* ist ein fakultativer Anaerobier, der auf Nährmedien porzellanartige, gelbliche, konvex geformte Kolonien bildet (Abbildung 1). Oft bilden sich Hämolysezone um die Kolonien, die durch membranwirksame Toxine, insbesondere  $\alpha$ -Toxin, verursacht werden. Die Ansprüche an die Nährböden sind gering. Die Pathogenese der verschiedenen Krankheiten durch *S. aureus* beruht auf den von diesem Erreger produzierten Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren (u.a. Toxine und Exo-Enzyme). Die Diagnose einer *S. aureus*-Infektion erfolgt im Regelfall durch klassisch-mikrobiologische Verfahren, insbesondere Mikroskopie mit Gramfärbung und anschließende kulturelle Anreicherung. Nach Isolierung des Erregers erfolgt die Genus- und Speziesdifferenzierung mittels Plasmakoagulase- und/oder Clumping-Faktor-Test; Bestätigungsteste können durch den Nachweis von *S. aureus*-spezifischen Genen (insbesondere *nuc*, verschiedene *fem*-Faktoren, oder – wie kürzlich beschrieben – auch das in dieser Arbeit untersuchte *eap* (Hussain et al., 2007) mittels Nukleinsäure-Amplifikations-Testung (NAT) erfolgen. Das Vorhandensein spezifischer Enterotoxine oder des Toxischen-Schock-Syndrom-Toxins-1 (TSST-1) kann immunbiologisch bestimmt werden; auch hier sind jedoch heutzutage molekulare Nachweisverfahren etabliert und werden zunehmend primär eingesetzt. Weiterhin existieren die Mannitose-Fermentation und der Desoxyribonuklease-Test zur Identifizierung (Murray, 2007).

## 2.3 Infektionen

*S. aureus* ist der häufigste nosokomiale Erreger. Dort tritt er häufig als MRSA auf. Die Voraussetzung für die Infektion ist die Kolonisation; einer Kolonisation muss nicht zwangsläufig eine Infektion folgen. Neben Patienten können auch Krankenhaus-Mitarbeiter

mit *S. aureus*/MRSA kolonisiert sein (Lee, 2007). Ob eine Infektion erfolgt, hängt von den Wirtsfaktoren und der Pathogenität und Virulenz des Bakteriums ab.

Prädilektionsstellen von *S. aureus* sind Haut und Schleimhäute, Nase, Achsel, Vagina und Rachen. Häufigstes Gebiet ist die Schleimhaut des vorderen Nasenraumes. In der Nase scheint Mucin der kritische Wirtsfaktor zu sein, der zur Kolonisation führen kann. Das Risiko für eine Infektion steigt bei Vorhandensein von Fremdkörpern im Organismus, wie z. B. Katheter.

Die Erregerausbreitung erfolgt über Hautkontakt, sowie aerob. Eine weitere Quelle sind unbehandelte Oberflächen in der Umgebung des Patienten, da *S. aureus* fähig ist, bis zu mehreren Wochen auf Oberflächen zu überleben (Boyce, 2007; Kolmos, 2007). Patienten mit erhöhtem Risiko für eine *S. aureus*-Infektion sind Diabetes mellitus Erkrankte, Drogensüchtige, Dialysepatienten, HIV-Infizierte sowie Menschen mit angeborener Immunschwäche.

Krankheiten, die *S. aureus* verursacht, können in vier Gruppen eingeteilt werden; diese können durch die unterschiedlichen Angriffspunkte im Körper definiert werden.

Zum einen zu nennen ist die invasive Infektion. Ein charakteristischer Vertreter ist hier die Endokarditis. Diese Infektionen entstehen nach dem Eindringen der Erreger durch die Haut; entweder verursachen sie direkt eine lokale Entzündung oder breiten sich über den Blutweg aus und penetrieren verschiedene Gewebe. Hierbei spielen die MSCRAMM eine große Rolle bei der Invasion, sogar in Knochen und Gelenke (Tierversuch), vermittelt über das Kollagenbindende Protein. *S. aureus* ist ebenfalls fähig direkt an das Endothel zu binden, oft erleichtert durch kleinere Endothelläsionen. Die Wundheilung im menschlichen Körper läuft über die Aktivierung der Faktoren Fibronectin und Kollagen, die Thrombusvernetzung über Fibrinogen. An diese Faktoren kann *S. aureus* binden; über eine Art Phagozytosemechanismus kann das Bakterium in die Zelle aufgenommen werden und damit eine zelluläre Veränderung bewirken, die dann die Formation von Absiedlungen begünstigt.

Die nächste Gruppe sind die Intoxikationen, die entstehen, indem präformierte Toxine aufgenommen werden. Hier sind zu nennen: Enteritiden und Lebensmittelvergiftungen. Die Toxine sind Enterotoxine (A-H); diese sind Superantigene mit pyrogener Aktivität. Superantigene sind gekennzeichnet durch ein Molekulargewicht von ca. 35 kDA und einer Hitzestabilität bis über 100°C. Sie weisen eine gewisse Ähnlichkeit mit T-Zellen auf, daher binden sie an MHCII-Moleküle mit einer nachfolgenden Immunaktivierung über eine T-Zellaktivierung, Makrophagenaktivierung und Zytokinfreisetzung als Mediatoren.

Die dritte Gruppe sind Toxin-vermittelte Erkrankungen. Darunter fallen SSSS und TSS. Diese agieren über ähnliche Mechanismen wie die Toxikosen, da hier ebenfalls Toxine eine Immunreaktion hervorrufen. Diese Toxine sind zum Teil Exfoliativ-Toxine.

Die letzte Gruppe sind die Biofilm-assoziierten Infektionen. Das Einbringen jeglicher Fremdkörper stellt ein Infektionsrisiko dar. Das Bakterium bildet auf der Katheteroberfläche einen Polysaccharidfilm, der eine Infektion erleichtert (Kap.2.4.5). Prädisponiert für diese Infektionen sind Menschen mit AIDS, langjähriger IL-2 Behandlung und Personen mit schwerer Niereninsuffizienz sowie Diabetes mellitus. Bei diesen besteht die Gefahr, dass die Infektionen schwerer, zum Teil auch mit Bakteriämie verlaufen (Lowy, 1998; Mandell, 2007/2008).

## **2.4 Virulenzfaktoren**

Das Genom besteht aus einem zirkulären Chromosom (seine ungefähre Länge beträgt 2.800 Mbp). Erst vor wenigen Jahren war es möglich, das komplette Genom zu sequenzieren (Kuroda, 2001). Das Genom besteht aus vielen unterschiedlichen Genen. Viele davon scheinen durch lateralen Transfer übertragen worden zu sein. Dabei finden sich auf dem Chromosom multiple mobile *S. aureus* Pathogenitätsinseln, z. B. „toxic shock syndrome toxin island“ (SaPII 15kb) (Ruzin, 2001), „exotoxin island“, „endotoxin island“; diese sind dafür verantwortlich, dass *S. aureus* Gene anderer Organismen übernehmen kann, z. B. die diversen Antibiotikaresistenzen. Weiterhin konnten Duplikationen von Genen für Superantigene analysiert werden. Dies könnte erklären, warum *S. aureus* Organismen verschiedener genetischer Herkunft infizieren kann (Kuroda, 2001).

### **2.4.1 Zellwand**

Die *S. aureus* Zellwand besteht zu 50 Prozent aus Peptidoglykan. Das Peptidoglykan wiederum setzt sich zusammen aus abwechselnden Polysaccharid-Untereinheiten von N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure, die über 1,4-Positionen  $\beta$ -glykosidisch verbunden sind (Lowy, 1998). Unterschiedliche Strukturen, wie z.B. Adhäsionsmoleküle, die in der Zellwand verankert sind, bedingen auch eine unterschiedliche Koagulationsfähigkeit. Wichtige Bestandteile der Zellwand sind die Lipoteichonsäuren (LTA) und die Wandteichonsäuren (WTA). Die Lipoteichonsäure (LTA) ist ein Glycerolphosphat-Polymer, das kovalent mit einem Glykopeptidende an einem Peptidoglykan in der Zytoplasmamembran verankert ist. Das Peptidoglykan selbst ist resistent gegen die hydrolytische Aktivität von Lysozymen. Eine Verbindung mit Teichonsäuren verstärkt diese Resistenz noch. Die WTA

sind komplexer aufgebaut als die LTA und ebenso mit einem Peptidoglykan verankert (Kohler, 2005). Ein Effekt der LTA sowie den Peptidoglykanen besteht in der Modulation der phagozytischen Antwort über TLR-2. TLR-2 (toll-like receptor) ist ein Membranrezeptor des angeborenen Immunsystems, der bakterielle Bestandteile erkennt. Sobald Bakterien zugrunde gehen, werden die Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane frei. Diese binden an das Membranprotein CD14 auf Makrophagen. Zusammen mit TLR-2 wird die Zelle aktiviert, NF-kappaB, einen Transkriptionsfaktor, der auch für Entzündungsproteine kodiert, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auszuschütten. Es erfolgt eine Immunreaktion (Schwandner, 1999; Hennecke, 2005). Ein Fehlen der WTA führte in Experimenten (in vitro) zu einer bis zu 70% verminderten Interaktion mit dem Endothel und somit auch zu einer verringerten Virulenz (Weidenmaier, 2005).

#### **2.4.2 Kapsel**

Die Kapsel spielt eine wichtige Rolle in der Virulenz des Bakteriums; sie besitzt verschiedene Funktionen: zum Einen der Schutz vor Phagozytose, Schutz des Bakteriums vor Austrocknung sowie Erleichterung der Anhaftung an Oberflächen (Lowy, 1998; Mandell, 2007). Mehr als 90 % der *S. aureus* Stämme produzieren eine Kapsel (Lee, 1994). Die Kapsel besteht aus Polysacchariden. Eine Analyse der Feinstruktur der Polysaccharide ermöglicht eine genaue Unterteilung in bislang 11 Serotypen. Die Typen 5 und 8 sind zu 92 % verantwortlich für menschliche Infektionen. Die restlichen 8 % konnten nicht über Antikörper gegen 5 und 8 typisiert werden. Allerdings konnte man das Antigen 336 identifizieren, das ein Polyribitol-phosphate-N-acetylglucosamin ist, ähnlich den Teichonsäuren (Roghmann, 2005). Die meisten Methicillin-resistenten *S. aureus* Stämme exprimieren einen Kapseltyp 5 (Pak, 1999).

#### **2.4.3 Oberflächenproteine**

Es existieren zwei große Gruppen von Oberflächenproteinen. Einmal die Gruppe der „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMM). Diese besitzen ein LPXTG-Motiv. Dieses Motiv dient zur Verankerung des Adhäsionsmoleküls und der bakteriellen Zelloberfläche (Foster, 1998). Ein wichtiger Faktor dieser Verankerung stellt das Enzym Sortase dar, das in der bakteriellen Zellmembran verankert ist. Dieses wird benötigt, um die Oberflächenproteine mit der Zellwand zu verbinden und stellt somit ebenfalls einen Pathogenitätsfaktor dar. Homologe Enzyme konnten in anderen Bakterienspezies nachgewiesen werden (Mazmanian, 2000). Zu dieser Gruppe gehören

Protein A (spa), clumping faktor A und B (ClfA und ClfB), die Fibronectin-Bindeproteine (FnBPA und FnBPB) sowie das Kollagen-Bindeprotein (Cna). Neben Genannten existieren in *S. aureus* jedoch noch eine weitaus größere Zahl von Sortase-abhängigen Oberflächenproteinen, deren biologische Bedeutung erst in jüngster Zeit zu verstehen begonnen wird (Chavakis et al., 2007). Die zweite Gruppe von *S. aureus* Oberflächenproteinen ist die Gruppe der SERAM („secretable expanded repertoire adhesive molecules“), zu denen die Koagulase (Coa), „von Willebrandt factor binding protein“ (vWbp), „extracellular fibrinogen binding protein“ (Efb), „extracellular matrix binding protein“ (Emp) und das „extracellular adhesive protein“ (Eap) gehören. Diese Proteine besitzen kein LPXTG-Motiv und sind nicht kovalent, im Wesentlichen durch bisher nicht identifizierte Bindemechanismen mit der Zelloberfläche verbunden (Chavakis, 2005).

#### **2.4.4 Toxine und Enzyme**

Für die Virulenz und Pathogenität sind die gebildeten Toxine und Enzyme zu einem großen Teil mitverantwortlich. Die wichtigsten Toxine sind: Supertoxine (Entero-Toxine, Exfoliativ-Toxine), Hämolyisin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) sowie Leukotoxine. Weiterhin sind einige Enzyme zu erwähnen: Koagulase, DNase, Staphylokinase und Hyaluronidase. Diese sind wichtig für das Überleben des Bakteriums im Körper (z.T. durch Fibrinpfropfbildung und Auflösung).

Seit längerem ist bekannt, dass die Expression von Toxinen und Zelloberfläche-Molekülen eine starke Abhängigkeit von der jeweiligen Wachstumsphase, in der sich die Mikroorganismen befinden, aufweist.

Anhand der dargestellten Wachstumskurve (Abbildung 2) ist ersichtlich, dass das Bakterium verschiedene Phasen durchläuft. Die Wachstumskurve beginnt mit der lag-Phase (ca. 1-2 h); hier beginnt das Wachstum der Bakterien; darauf folgt die log-Phase; dies ist die Phase des exponentiellen Wachstums. Danach geht die Kultur in die post-exponentielle Phase über; diese stellt eine Übergangsphase zwischen der exponentiellen und der stationären Phase dar. Die stationäre Phase ist durch eine stabile Bakterienzahl gekennzeichnet und geht am Ende in den langsamen Tod der Kultur über, da die Überlebensbedingungen, also Nahrungsangebot/pH-Wert, sich zunehmend verschlechtern. In den verschiedenen Phasen werden unterschiedliche Proteine produziert. Für diese Arbeit wurden Eap und Emp betrachtet, die zu den Oberflächenproteinen gehören und in der Exponentialphase (log-Phase) produziert werden. In den späteren Phasen werden Toxine und Exoenzyme produziert.

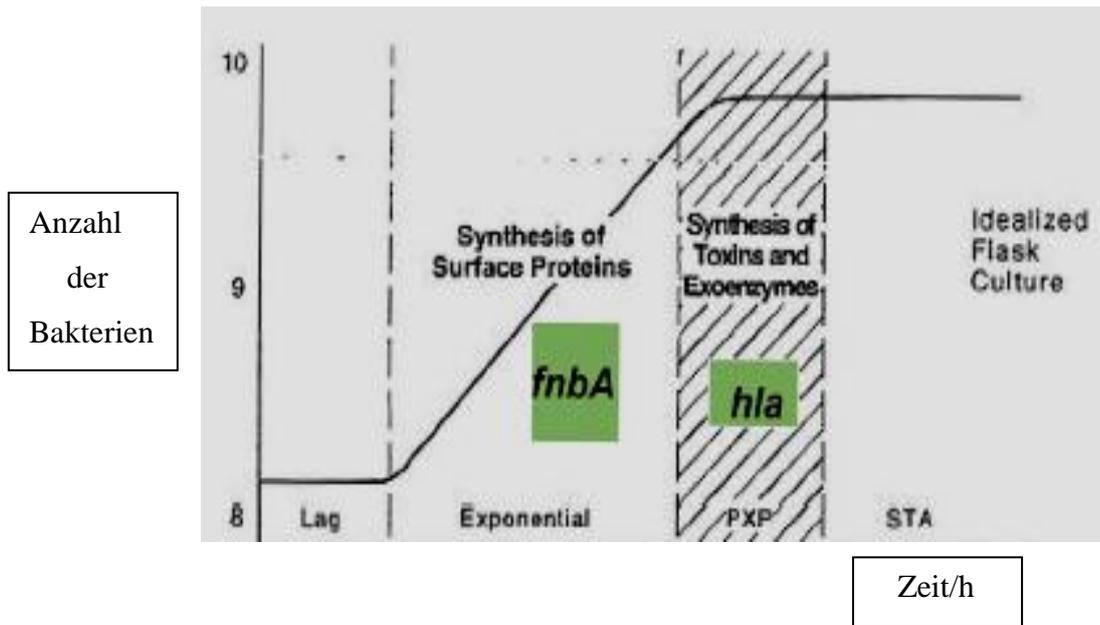


Abbildung 2: schematische Darstellung einer bakteriellen Wachstumskurve (Cheung, 2002)

### 2.4.5 Biofilm

Der Biofilm entsteht, indem Bakterien nach der Adhäsion beginnen Polysaccharide zu produzieren, die miteinander verkleben und so einen einheitlichen Film bilden können (Harraghy, 2006) (Abbildung 3). Das Einbringen von Fremdkörpern allein stellt schon einen Risikofaktor für eine Infektion dar (Seifert, Farr, 2004). Nach *S. epidermidis* stellt *S. aureus* den zweithäufigsten Erreger bei Katheter-assoziierten Infektionen dar. Allerdings sind nur einige Stämme von *S. aureus* fähig, sich zu einem Biofilm zu gruppieren. Auf den Kathetern sammeln sich Faktoren aus dem Blut, wie Fibronectin, an und stellen eine Adhäsionsmöglichkeit für das Bakterium dar. Dadurch wird die Infektion erleichtert und ein Angreifen von Antibiotika erschwert. Somit ist die Produktion eines Biofilms als Virulenzfaktor zu werten.

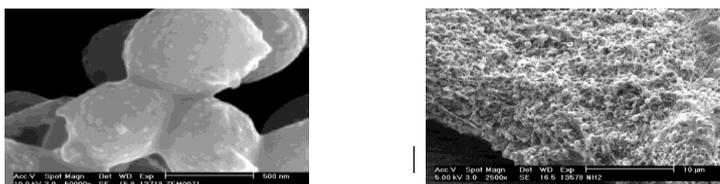


Abbildung 3: Biofilm produziert von *S. aureus* (Harraghy, 2006)

## **2.5 Eap und Emp**

### **2.5.1 Eap**

Eap gehört zur Gruppe der „secretable expanded repertoire adhesive molecules“ (SERAM) (siehe 2.4.3). Die Größe des Proteins ist Stamm-abhängig. Sie variiert zwischen 60 und 72 kDa. Eap kann in fast allen Stämmen von *S. aureus* gefunden werden (Hussain, 2007), im Gegensatz zu Koagulase-negativen Staphylokokken Spezies, wie *S. epidermidis*, welche kein Eap besitzen (Hussain, 2007). Mittels PCR konnten drei verschieden große PCR-Stücke isoliert werden. Eine Analyse ergab eine Länge von 689 Aminosäuren. Darin enthalten ist eine Signalsequenz sowie eine Domäne, die sich sechs Mal wiederholt. Ein Teil dieser Domäne weist eine große Ähnlichkeit mit einem MHCII-Komplex auf, weshalb Eap zuerst Map („MHCII analogous protein“) genannt wurde (Harraghy, 2003).

### **2.5.2 Emp**

Das im Vergleich zu Eap bisher deutlich weniger untersuchte SERAM Emp besitzt ein Molekulargewicht von 40 kDa. Man weiß, dass Emp mit Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen und Vitronectin interagiert. Durch Studien wurde belegt, dass Emp-Mutanten weniger an Fibronectin und Fibrinogen binden als der Wildtyp, sodass eine Rolle bei der Adhäsion wahrscheinlich ist, was aber noch nicht genauer untersucht wurde (Hussain, 2001).

### **2.5.3 Bislang bekannte Wirkungen von Eap (Emp)**

#### **2.5.3.1 Adhäsion**

Eap kann eine Agglutination bewirken, wobei sich die Bakterien gruppieren. Dies geschieht durch eine Veränderung der Proteinstruktur in eine oligomere Form (Palma, 1999). Dadurch wird die Adhäsion verbessert. Ebenso besteht offensichtlich ein größerer Schutz vor der Immunabwehr des Wirts. Dies muss aber noch weiter erforscht werden.

Eap kann auch an extrazelluläre Matrixproteine binden, zum Beispiel an Kollagen I, allerdings nicht an Kollagen II, sodass hier die Annahme besteht, dass Eap eine spezielle Bindungskonfiguration erkennt. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht geklärt und bedarf weiterer Erforschung (Hussain, 2002).

Sezerniertes Eap bindet an die Oberfläche von *S. aureus* zurück. Eap ist in der Lage, mit sich selbst zu interagieren. Darüber hinaus bindet Eap offensichtlich an bakterielle Strukturen, die zur Verankerung sezernierten Eap's mit der Zelloberfläche dienen. Hier ist insbesondere

eine neutrale Phosphatase beschrieben worden. Auch an andere *S. aureus* Zellwandstrukturen, wie Teichonsäuren (insbesondere Teichonsäuren mit kationischen D-Alanin-Resten), kann Eap binden (Harraghy, 2003). Die Eap-vermittelte Agglutination stellt man sich daher als molekulare Brückenbildung von einem oder mehreren Eap-Molekülen mit Bindungsstellen auf der Staphylokokken-Zelloberfläche vor. Im Unterschied zu *S. aureus* konnte gezeigt werden, dass für andere bakterielle Spezies wie *S. epidermidis*, *S. mutans* und *E. coli* eine geringere Eap-vermittelte Agglutination (und auch mögliche Bindung) nachweisbar war (Harraghy, 2003).

### 2.5.3.2 Interaktion mit eukaryontischen Zellen

#### 2.5.3.2.1 Adhäsion an eukaryontische Zellen

Eap ist ein wichtiger Bestandteil bei der Adhäsion von *S. aureus* an eukaryontische Zellen, da einige Studien mit Eap-Deletions-Mutanten eine um 80 % verringerte Adhäsion an eukaryontische Zellen zeigten (Kreikemeyer, 2002). Ein Versuch mit Eap-Antikörpern zeigte ebenfalls eine verminderte Adhäsion (Hussain, 2002). ICAM-1 wurde als Bindungsmolekül an der eukaryontischen Zelle identifiziert. Vor allem ist von Bedeutung, dass Eap zu *S. aureus* zurückbinden kann, sodass es die Verbindung im Sinne einer Brücke zwischen eukaryontischer Zelle, sezerniertem Eap und Eap des Bakteriums darstellt. Eap bindet vor allem an APC's, T-Zellen, Epithel-, Endothelzellen und Fibroblasten.

#### 2.5.3.2.2 Invasion von eukaryontischen Zellen

Eap spielt eine Rolle in der Internalisation von *S. aureus* in eukaryontische Zellen. Einige Studien belegten, dass eine Adhäsion zunächst an nicht spezialisierte Phagozyten erfolgt und dann eine Internalisation. Diese Anbindung war bei Eap-Deletions-Mutanten schlechter als beim Wildtyp. Darüber hinaus zeigte eine vorherige Behandlung von *S. aureus* Zellen mit Anti-Eap Antikörpern eine verschlechterte Internalisation sowohl beim Wildtyp als auch bei der Deletions-Mutante (Haggar, 2003). Der genaue Weg der Internalisation ist noch nicht geklärt (Dziwnowska, 1999).

#### 2.5.3.2.3 Veränderung der Angiogenese und verschlechterte Wundheilung

Isoliertes Eap kann eine verzögerte Wundheilung vermitteln. Die körpereigene Immunabwehr wird gehemmt und eine Vaskularisierung des Wundgebietes verhindert. Eine Blockade der mitotischen und Wachstumstendenzen erfolgt über eine Blockade von VEGF (vascular endothelial growth factor) und bFGF (basic endothelial growth factor). Weiterhin

wird auch die Expression von TF (tissue factor) inhibiert (Athanasopoulos, 2006; Sobke, 2006).

### 2.5.3.3 Immunmodulatorische Effekte

Allgemein gesprochen hat sich durch zahlreiche Studien der letzten Jahre eine anti-inflammatorische Wirkung für Eap herauskristallisiert. Die einzelnen Komponenten werden im Folgenden genauer beschrieben.

#### 2.5.3.3.1 Interaktion mit ICAM-1

Durch die vorher beschriebenen Effekte im Zusammenhang auf Bindung an eukaryontische Zellen inhibiert Eap eine über  $\beta_2$ -Integrin- und Urokinase-vermittelte Leukozyten-Reaktion. Dadurch ist keine Adhäsion der Leukozyten ans Endothel sowie keine Extravasation durch das Endothel möglich. Darüber hinaus wird die Interaktion von ICAM-1 mit Mac-1 und LFA-1 (lymphocyte function associated molecule) geblockt. Dies bewirkt eine negative Interaktion mit APC's und T-Zellen. Weiterhin wird in der Anwesenheit von Eap die Invasion von Neutrophilen und Makrophagen ins Gewebe unterdrückt. In dieser Studie wurde ebenfalls festgestellt, dass Mäuse, die mit einem Eap-positiven Stamm infiziert waren, im Falle einer bakteriellen Peritonitis ein 2-3fach geringeres Neutrophilen-Recruitment aufwiesen, als Eap-negative Stämme (Chavakis, 2002). In einer Studie (Xie, 2006) konnte belegt werden, dass Eap eine antiinflammatorische Wirkung im medizinisch wichtigen Krankheitsbild der Multiplen Sklerose hat. Eap blockiert das  $\beta_2$ -Integrin abhängige Neutrophilen-Recruitment und interagiert mit ICAM-1. Daraus ergibt sich eine verringerte T-Zell-Adhäsion an ICAM-1 und TNF-aktiviertes menschliches Gewebe. Letztendlich bewirkt Eap eine Unterdrückung der Autoimmun-Enzephalitis, bisher allerdings nur experimentell. Erst 2004 konnte gezeigt werden (Haggart, 2004), dass Eap Neutrophile daran hindert, an nicht stimulierte und TNF- $\alpha$  stimulierte Endothelzellen zu binden. Daraus folgt eine verminderte Transmigration der neutrophilen Zellen. Dies begründet eine verminderte Inflammation des betroffenen Gewebes.

#### 2.5.3.3.2 Interaktion mit Lymphozyten

T-Helferzellen sind ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems. Unterschieden werden zwei Typen: Th1-Zellen und Th2-Zellen. Diese unterscheiden sich unter anderem durch ihre unterschiedliche Aktivierung mittels Interleukinen. So werden Th1-Zellen durch IL-12 aktiviert, während Th2-Zellen durch dieses Zytokin gehemmt werden. Die

umgekehrte Reaktion erfolgt durch IL-4. Th1-Zellen bewirken vor allem eine Interferon-Ausschüttung und eine IgG2 Produktion, wohingegen die Th2-Zellen-Antwort in einer Aktivierung eosinophiler Granulozyten und IgG1 und IgE Induktion resultiert. B-Zellen bilden den humoralen Teil der Immunantwort. Sie können sowohl durch T-Zellen, hier Th2, als auch unabhängig davon aktiviert werden.

Eap kann die Proliferation von B-Zellen fördern. Dadurch kann die IL4 Produktion gesteigert werden. Dies wiederum bewirkt durch eine vermehrte Differenzierung von T-Zellen zu Th2 eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Th1- und Th2-Zellen. Als zugrunde liegenden Prozess kann man die Interaktion mit ICAM-1 oder eine Ähnlichkeit der bakteriellen Superantigene mit denen von Eap vermuten (Jahreis, 2000). Für Map wurde eine Veränderung der T-Zell-Funktion bestätigt. Versuche mit rekombinantem Map zeigten eine verringerte T-Zell Proliferation und eine verringerte allergische Spätreaktion. In vivo ergaben sich verminderte Arthritis, Osteomyelitis, sowie verminderte Abszessbildung in einem Mausmodell bei den Minusmutanten (Lee, 2002).

An peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) konnten verschiedene Reaktionen auf Eap beobachtet werden. Niedrigere Konzentrationen induzierten eine Proliferation, während höhere Konzentrationen eine Inhibierung der T-Zell-Proliferation zur Folge hatten. Ebenfalls ergaben sich nach einer inhibierenden Konzentration gehäuft B-Zell und T-Zell Tod. Diese Effekte konnten durch einen speziell hergestellten Anti-Eap Antikörper verhindert werden. (Hagggar, 2005).



„exponential Phase“ produziert, wohingegen das Maximum für *sarP3* in der postexponentiellen Phase liegt. Diese drei Loci enden an derselben Stelle und kodieren gemeinsam für SarA. SarA selbst kann an seinen eigenen Promotor binden und damit die Expression herunterregulieren (Cheung, 2008). Nach weiteren Untersuchungen wurden noch weitere SarA-ähnliche Produkte gefunden, die nun zur SarA-Homologen Familie zusammengefasst werden. Dabei können zwei Gruppen unterschieden werden; einmal kleine basische Proteine und zum anderen Zwei-Domänen Proteine, in denen eine Region enthalten ist, die Ähnlichkeit mit den kleinen basischen Proteinen aufweist (Cheung, 2002). In den neuesten Studien konnten die früheren Annahmen, dass es 3 verschiedene Gruppen (1. einzelne Domäne, 2. doppelte Domäne sowie 3. MarR Homologe) gibt, korrigiert werden. Wahrscheinlich ist die Struktur der ganzen SarA-Homologen Familie eine „winged helix Proteinstruktur“ (Cheung, 2008). Dabei wurde auch die vorher schon erwähnte Rolle in der Regulation von *agr* untersucht. SarA und SarR binden an *agr* und laut einer Geluntersuchung auch an derselben Stelle des *agr* Promotors (Manna, 2006). Nach diesen Ergebnissen soll SarA an den P2 Promotor binden und darüber sowohl *RNAII* und daher auch *RNAIII* positiv reguliert werden. Somit kann es auch in einer indirekten Funktion in die Regulation von Eap und Emp eingreifen.

#### **2.6.4 *sigmaB***

Denaturierter *Sigma*-Faktor ist einer der Regulatoren für viele Virulenzgene wie *sarC*, *agr* und vermutlich *sarA*. Allerdings ist  $\sigma^B$  auch fähig, andere Virulenzgene direkt zu regulieren. Zuerst wurde  $\sigma^B$  in *Bacillus subtilis* gefunden. Dort ist der Faktor für die Stress- und Hitzeschock-Antwort verantwortlich. Es existieren drei Promotoren für *sigmaB*. *sigBP1* wird vermehrt am Anfang, *sigBP2* während des ganzen Wachstums und *sigBP3* vor allem am Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase transkribiert. Man vermutet, dass *sigBP2* die Transkriptionsprozesse steuert (Senn, 2005). Weiterhin existiert ein 4-Gen-Operon aus *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB*, dessen Produkt insgesamt die Aktivierung von  $\sigma^B$  vermittelt.  $\sigma^B$  hat keine direkte regulatorische Wirkung auf Eap, es wirkt negativ regulatorisch auf *RNAIII* (Bischoff, 2004).

#### **2.6.5 *sae* (*S. aureus* exoprotein expression)**

*sae* ist ein Regulator der Virulenzgenexpression. Gefunden wurde es durch eine Mutante, die verschiedene Exoproteine nicht produzieren konnte (Giraud, 1999; 1994). Der Locus

besteht aus 4 ORF`s (open reading frames), zwei davon kodieren ein klassisches 2-Komponentensystem (Novick, 2003; Steinhuber, 2003). Der Genlokus ist sehr groß. Drei der Transkripte beginnen oberhalb von *saeRS*. Diese kodieren für zwei „Reading Frames“ *saeP* und *saeQ*. *RNAIII* soll einen positiven Einfluss auf den Genlokus besitzen. So wie *RNAIII* kann auch *sae* durch Umweltfaktoren beeinflusst werden. Eine *sae* Mutation hat keinen Einfluss auf die Expression von *agr* und *sar* (Giraud, 1997). Eine Aktivierung durch *agr* konnte in einigen Stämmen beschrieben werden, allerdings ist der genaue Mechanismus dafür noch ungeklärt (Novick, 2003; Giraud, 2003; Goerke, 2005). *sae* ist einer der wichtigsten Regulatoren für *Eap* und *Emp*.

## **2.7 Bedeutung der Dissertation und Ausblick**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Umweltbedingungen, die die Expression von *eap* und *emp* beeinflussen, zu untersuchen. *S. aureus* ist in der Lage, an hohe Unterschiede in der Osmolarität der Umgebungsbedingungen zu adaptieren. Die Untersuchung der Auswirkung, insbesondere der Konzentration- mono- und divalenter Kationen- auf die *eap* und *emp* Expression kann uns dann helfen, die Rolle dieser Virulenzfaktoren im Rahmen der Adaptationsvorgänge des Erregers an verschiedene Umweltbedingungen zu verstehen. Unterschiede in der Regulation können uns darüber hinaus Aufschluss über Mechanismen, der bisher immer noch nicht vollständig aufgeklärten Regulationsmechanismen von *eap* und *emp* geben. Insgesamt erhoffen wir uns von diesen Untersuchungen ein verbessertes Verständnis der Pathomechanismen von *S. aureus*, insbesondere hinsichtlich seiner adaptierten Virulenzgen-Expression.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Bakterienstämme, Plasmide und Primer

Stämme	Stamm oder Plasmid	Beschreibung
<i>S. aureus</i>		
Newman	Wildtyp	T. Foster, Dublin
SH1000	8325-4 Abkömmling rsbU+	Horsburgh et al. (2002)
RN4220	Restriktions-negativer Strang, 8325 Abkömmling	Kreiswirth et al. (1983)
<i>E. coli</i>		
XL-10		Stratagene
DH5 $\alpha$		
<i>Plasmide</i>		
pPCRScrip	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp <sup>®</sup>	Stratagene
pKO10	$\beta$ -galactosidase reporter plasmid	Ohlsen et al. (1997)
pSB2035	gfp-lux dual reporter plasmid	Qazi et al. (2001)
pEmp-pKO10	emp-promotor cloned an den Platz des hla-Promotor in pKO10	Niamh Harrahy
pEmp1	DNA Fragment, den emp-Promtor und die partial coding Sequenz umfassend	in dieser Studie

pEap1	DNA Fragment, das eap-Promotoren-Sequenz und ein Teil des PCR Skripts enthält	Niamh Harraghy; in dieser Studie
pEmp-gfp-lux	pEmp-gfp-lux auf P3-Promotor Platz klonierter emp-Promotor in pSB2035	Quazi et al. ( 2001)
<i>Primer</i> 5`-3`	Primer Sequenz	Funktion
empPF1	ACAGA <u>AATTC</u> AATTATTTATAATGCACC	Amplifikation des <i>emp</i> -Promotors, <i>EcoRI</i> Abschnitt unterstrichen
empPR1	CCTA <u>AAGCTTT</u> TATATAGACTCAATATTATAAC	Amplifikation des <i>emp</i> -Promotors, <i>HindIII</i> Abschnitt unterstrichen
empPF21	CTCAAATCACAAACCTGCATCTC	Amplifikation eines Teiles des <i>emp</i> -Promotors und codierender Sequenzen für S1 Mapping und Primer Extensions Analyse
empPR2	GCGTGATATCCAGGAACTGC	Amplifikation eines Teiles des <i>emp</i> -Promotors und

		codierender Sequenzen für S1 Mapping und Primer Extensions Analyse
BF23	ACC AGG ATT AGC GAA TAA GAT AGC A	Amplifikation eines Teiles des Sequenz von <i>arlRS</i> zur Primer Extensions Analyse
BF24	AAC TCT ATT CAG GAA TTG TCA GAT A	Amplifikation eines Teiles des Sequenz von <i>arlRS</i> zur Primer Extensions Analyse
BF2	CGG CAT TAT CTA GAA TTA TAA AAG CCA	Amplifikation eines Teiles des Sequenz von <i>arlRS</i> zur Primer Extensions Analyse
BF9	ACC GAA GTT TAC AGG AGC CTC T	Amplifikation eines Teiles des Sequenz von <i>arlRS</i> zur Primer Extensions Analyse
EapRT_F	AAGCGTCTGCCGAGCTA	RT-PCR von <i>eap</i>
EapRT_R	TGCATAGGAACATGGACTTTAGAA	RT-PCR von <i>eap</i>
EmpRT_F	CAGAATCGCCTAGATATACACATCCA	RT-PCR von <i>emp</i>
EmpRT_R	GCATGCCCTGGTGTAACAAAATT	RT-PCR von <i>emp</i>
GyrBRT_ F1	GACTGATGCCGATGTGGA	RT-PCR von <i>gyrB</i>
GyrBRT_ R1	AACGGTGGCTGTGCAATA	RT-PCR von <i>gyrB</i>
SaeRT_F	AAACTTTGCTTGATAATGCGCTAAA	RT-PCR von <i>sae</i>
SaeRT_R	GTTCTGGTATAATGCCAATACCTTCA	RT-PCR von <i>sae</i>
sarART_F	TCAATGGTCACTTATGCTGACAAA	RT-PCR von <i>sarA</i>

sarART_ R	TCAATACAGCGAATTCTTCAAAGC	RT-PCR von <i>sarA</i>
RNAIII RT_F	AGGAGTGATTTCAATGGCACAAG	RT-PCR von <i>RNAIII</i>
RNAIIIRT_ R	TGTGTCGATAATCCATTTTACTAAGTCA	RT-PCR von <i>RNAIII</i>
Asp23RT_ F	CAAGAACAAAATCAAGAGCCTCAAT	RT-PCR von <i>sigB</i>

### 3.1.2 Medien

Als Grundmedium wurde MBB benutzt, weiterhin in einigen Versuchen TSB, BHI, LB (für *E. coli*) benutzt.

Die Angaben beziehen sich auf 1 Liter:

TSB	5 g NaCl, 17 g Pancreatic Digest of Casein, 2,5 g Glucose, 3 g Enzym abgebautes Sojamehl, 2,5 g Dikaliumphosphat
LB	5 g Yeast Extrakt, 5 g NaCl, 10 g Pancreatic Digest of Casein
BHI	5 g NaCl, 3 g Glucose, 2,5 g Dinatriumhydrogenphosphat, 6 g Hm-Herzmuskelinfusion, 6 g Peptisch abgebautes Tiergewebe, 14,5 g Pancreatic Digest of Gelatine
MBB	10 g Pepton, 5 g NaCl, 5 g yeast extract, 0,1 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

Zur Herstellung der Medien für die weiteren Versuche wurde MBB supplementiert mit:

0-1 M NaCl, 0,02 M-1 M Sucrose, 1 M KCl 0,25 % Citrat, 0,5 mM EDTA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 ng-40 ng /ml Novobiocin

Zur Elektroporation wurden weiterhin verwendet:

SOC	20 g Bacto Trypton, 5 g Bacto yeast extract, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl, 5 ml 2 M MgCl <sub>2</sub> , 20 ml 1 M Glucose
SMM	1,1 ml SSM8 (2x), 1 M Sucrose, 0,04 M Maleic Acid, 0,04 M MgCl <sub>2</sub> , pH 6,5 0,1 ml BSA (0,5%) 0,8 ml PAB (4x): 1,5 g Beef extract, 1,5 g yeast extract, 5 g Pepton, 1 g Glucose, 3,5 g NaCl, 3,68 g K <sub>2</sub> HP0 <sub>4</sub> , pH 7

### 3.1.3 Software

Für die RT-PCR wurde die Software von AbiPrism Biosystems und Excel verwendet.

Für das Reporter-Gen-Assay die Software der Workstation und Excel.

Für die Darstellung der Grafiken SigmaPlot, Microsoft Excel und Powerpoint.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

#### 3.2.1.1 Anzucht auf Agarplatten

Für die Agarplatten wird 1,5 % Agar verwendet, das bedeutet für 100 ml Medium 1,5 g Agar.

Agar und Medium werden zusammen in der Mikrowelle erhitzt, danach wird der Agar auf ca. 40°C abgekühlt; anschließend wird das entsprechende Antibiotikum in obiger Dosierung hinzugefügt. Pro Platte benutzt man 25-30 ml flüssigen Agar. Wenn die Platten trocken sind, werden die Bakterien durch Ausstrich 1-2 Tage inkubiert bei 37°C.

Verwendet wurden Blutagar, TSB-, BHI-, LB-Platten.

#### 3.2.1.2 Anzucht in Flüssigmedium

Hierzu wurden für *E. coli* LB, für *S. aureus* TSB oder MBB verwendet. Zur Anzucht fügt man entweder eine Kolonie einer Platte oder eine Beimpfungsöse einer Kultur bzw. eines

-70°C Stocks hinzu. Nach Bedarf werden Antibiotika verwendet. Chloramphenicol in den Konzentrationen 5 oder 10 µg/ml oder 10 µg/ml Erythromycin, weiterhin 100 µg/ml Ampicillin. Für die Übernachtskultur werden 5 ml Kulturmedium mit der entsprechenden Menge Antibiotika versetzt, die Bakterien hinzugefügt und je nach Experiment 12-16 h in einem Schüttelinkubator (MultitronII der Infors Ag) bei 37°C und 150 Rpm inkubiert. Dies sind die angewendeten Standardbedingungen für alle Versuche; Abweichungen werden angegeben.

#### 3.2.1.3 Erstellen einer Wachstumskurve mittels Bestimmung der optischen Dichte

Am nächsten Tag wird die Kultur geschüttelt. Dann wird jeweils 1 ml der Kultur in 19 ml des entsprechenden Mediums gefüllt, diese weiter 10 h unter den vorigen Bedingungen inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 und danach zu jeder Stunde wird die optische Dichte mittels Photometer bestimmt.

#### 3.2.1.4 Kryokonservation von Bakterien

Hierzu wird eine Übernachtskultur angesetzt und am nächsten Tag werden 850 µl Bakterienkultur und 150 µl 100 % Glycerol in ein spezielles Gefrierrohrchen pipettiert und bei -70°C aufbewahrt. Das Glycerol wird zur leichteren Verwendung auf 60°C im Wasserbad erhitzt und heiß verwendet.

### 3.2.2 DNA

#### 3.2.2.1 Isolation von Plasmid DNA mittels Qiagen Miniprep Kit

Die Übernachtskultur wird am nächsten Tag zuerst geschüttelt, dann wird 1 ml davon in ein 1,5 ml Röhrchen gefüllt. Nach der Zentrifugation bei 5000 x g wird mit dem Protokoll vom Qiagen Miniprep Kit weitergearbeitet. *S. aureus* wird nach der Resuspension des Sediments mit Puffer P1, zur Aufspaltung der Zellwand mit 10 µl Lysostaphin (2 mg/ml) versetzt und danach für 15 min bei 37°C im Schüttler inkubiert.

Nach Beendigung des Protokolls werden die Proben bei -20°C eingefroren.

#### 3.2.2.2 Isolation von Plasmid DNA ohne Kit

Die Kultur wird geschüttelt, um die Bakterien wieder vom Boden zu lösen. Ein 1,5 ml Röhrchen wird unter sterilen Bedingungen gefüllt. Danach wird das Röhrchen bei 14000 x g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird ganz von dem gebildeten Sediment entfernt und

verworfen. Das Sediment wird nun in 100 µl P1 von Qiagen Kit gelöst. Zur Zellyse werden dann 200 µl 1% SDS/0,2 M NaOH dazugegeben und mehrmals abgekippt. Danach gibt man 150 µl Natriumcitrat hinzu und mischt erneut. Die Mischung wird 10 min bei 14000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wird in ein neues Gefäß gegeben und 2x das Volumen an 100 % Ethanol hinzugefügt. Die DNA fällt nun aus. Die Reagenzien werden gemischt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wird nun bei 14000 x g 3 min zentrifugiert. Der gebildete Überstand wird vollständig entfernt und 1 ml 70 % Ethanol hinzugegeben. Sediment und Ethanol werden durch Kippen suspendiert. Erneut bei 14000 x g 3 min zentrifugieren. Der Überstand wird verworfen und das Sediment 1 h bei Raumtemperatur trocknen lassen. Danach wird das Sediment in 30 µl EB-Buffer (10 mM TrisCl Qiagen) resuspendiert. Die Lösung wird bei -20°C eingefroren.

### 3.2.2.3 Isolierung genomischer DNA

Nach der erwünschten Zeit wird 1 ml dieser Kultur unter sterilen Bedingungen in ein 1,5 ml Röhrchen gefüllt. Das Röhrchen wird danach zentrifugiert, um die Zellen zu sedimentieren; der Überstand wird verworfen. Das Sediment wird durch Zugabe von 150 µl TE-Buffer und anschließendem Schütteln resuspendiert. Dazu kommt nun 1 µl „Ready Lyse“ Lysozym. Diese Mischung wird nun 30 min bei 37°C inkubiert (entgegen des Protokolls). Die weitere Verarbeitung richtet sich wieder nach dem Protokoll der Firma Qiagen. Die DNA kann nun bei -20°C aufbewahrt werden.

### 3.2.2.4 Herstellung von Gel zur Analyse von DNA und PCR Produkten

#### 0,5 % Agarose Gel neu

Die Mischung von TAE und Agarose wird in der Mikrowelle erhitzt, bis die Flüssigkeit klar ist. 60 ml der Flüssigkeit werden in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Dazu wird Ethyidium-Bromid gegeben. Die Endkonzentration beträgt 0,5 µg/ml. Die Flüssigkeit durch Schütteln vermischen und dann in eine vorbereitete Gelform geben. Das Gel trocknen lassen.

### 3.2.2.5 Gelelektrophorese zur Analyse von DNA und PCR Produkten

Das getrocknete Gel wird in eine Kammer, die mit TAE Puffer (Tris 2 M, EDTA 0,1 M, Essigsäure 1 M, pH 8,2) gefüllt ist, gelegt, so dass das Gel bedeckt ist. Die Probenzusammensetzung ist abhängig vom vorangegangenen Versuch. Das Endvolumen ist 24 µl. Bei einer Restriktionsanalyse werden 20 µl des Digest und 4 µl Farbpuffer 10x (1x

TAE, 40 mM TrisAzetat) benutzt. Für die Analyse von PCR Produkten werden 10 µl Wasser, 10 µl PCR Produkt und 4 µl Farbpuffer benutzt. Die Mischung wird dann jeweils in eine Vertiefung im Gel pipettiert. In die erste Vertiefung kommen 10 µl eines 1 kb Größenstandards (Ladder/Invitrogen). Dann wird Strom mit 120 V angeschlossen.

### 3.2.2.6 Extraktion von DNA aus einem Gel

Hierfür wird zunächst eine Gelelektrophorese durchgeführt. Das Ergebnis dieser Elektrophorese wird unter UV-Licht betrachtet und die Banden ausgeschnitten, in Röhrchen gefüllt und anschließend unter Beachtung des Leergewichts des Röhrchens gewogen.

Danach wird nach Protokoll weitergearbeitet. Für kleine Banden bis 600 bp entspricht dies dem Protokoll von „QuiAquick Gel Extraction Kit“.

Das „Qia ExII Agarose Gel Extraction“ Protokoll wird für die größeren Banden benutzt.

Es wird 3x Buffer „QuiI“ zum Gel in 1 ml Röhrchen gegeben und 30 µl des geschüttelten Buffer „QiaExII“ dazugegeben. Der Mix wird bei 50°C 10 min in einen Tischschüttler gegeben, bis das Gel vollständig aufgelöst ist. Danach wird die Mischung 30 s zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Nun werden 500 µl Buffer QxI hinzugefügt und damit das Sediment unter leichtem Anschnippen resuspendiert. Wiederum wird das Gemisch 30 s zentrifugiert und der Überstand verworfen; dazu werden 2x 500 µl PE-Buffer gegeben und durch Anschnippen gemischt. Das Gemisch wird erneut zentrifugiert und der Überstand weggekippt. Das Sediment 30 min bei Raumtemperatur trocknen lassen und danach 20 µl EB-Buffer in jedes Röhrchen geben.

Plasmid	4 kb	5 min	bei Raumtemperatur
Vektor	10 kb	10 min	bei 50°C inkubieren

Wieder 30 s zentrifugieren und den Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen pipettieren.

### 3.2.2.7 Reinigung von DNA

Dazu wird das Resultat eines Digest DNA 50 µl benötigt. Hinzu werden 5x PB-Buffer hinzugefügt und in eine QiAquick-Säule gegeben. Das Röhrchen wird nun 30 s zentrifugiert und der Überstand verworfen; dazu kommt PE-Buffer 750 µl und wird 30 s zentrifugiert.

Der Überstand kann abgeschüttet werden. Erneut wird 1 min bei mehr als 10000 U zentrifugiert.

Die Säule wird nun in ein neues 1,5 ml Röhrchen gestellt. Auf die Säulenmembran wird EB Buffer 50 µl gegeben. Danach wird die Mischung 1 min zentrifugiert und der Überstand weggeschüttet. Die DNA befindet sich im Röhrchen.

### 3.2.3 Cloning

Ligation mit pPCR Skript (Stratagene)

pPCR-Skript-Amp Sk(+)-cloning vektor ist ein Vektor, der „blunt“ endet und in den man PCR Produkte mittels des Restriktionsenzymes *SrfI* ligieren kann.

In ein 0,5 ml Röhrchen werden folgende Reagenzien pipettiert:

pPCR-Skript Amp Sk(+)-cloning vector	1	µl
PCR-Script mit Buffer 10x	1	µl
10 mM+ATP	0,5	µl
PCR-Produkt	5,5	µl
<i>SrfI</i> Restriktionsenzyme	1	µl
T4 DNA Ligase	1	µl
Endvolumen	10	µl

Die endgültige Mischung wird mit der Pipette gemischt und dann 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das Gemisch für 10 min auf 65°C in einem Thermoschüttler inkubiert. Das Resultat wird bei -20°C eingefroren.

#### 3.2.3.1 Ligation mit Vektor und Plasmid

Das Mischungsverhältnis von Vektor und Plasmid soll 1:3 sein. Die Menge wird anhand der Bandenbreite nach einer Gelelektrophorese bestimmt. Um die Menge an DNA abschätzen zu können, wurde der Gellauf mit verschiedenen Mengen DNA durchgeführt.

H <sub>2</sub> O	2	µl
Plasmid	x	µl
Vektor	x	µl
Ligase Puffer	2	µl
Ligase (Promega)	2	µl

Die Mischung wird nun für 3 h bei 22°C inkubiert, danach für 10 min auf 72°C erhitzt und dann bei -20°C eingefroren.

### 3.2.3.2 Elektroporation mit *E. coli*

Für die Elektroporation mit *E. coli* wird eine 1:10 Verdünnung aus Ligations-Mix und Wasser in einem Röhrchen erstellt. Davon werden 10 µl entnommen und zu 40 µl elektrokompenten Zellen gefügt. Diese Mischung wird 30 min in einer Eisbox gekühlt. Danach wird die Elektroporation mit den folgenden Geräteeinstellungen vorgenommen:

2,5 kV    200 Ω    25 µF

Danach wird 500 µl SOC-Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37°C geschüttelt.

Auf vorbereiteten LB-Agarplatten, angereichert mit 100 µg/ml Ampicillin, wurden 100 µl und 200 µl der Suspension verteilt und bei 37°C erneut inkubiert, bis Bakterien gewachsen sind und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

### 3.2.3.3 Screening

Die Antibiotikaplaten für das Wachstum werden zuvor mit 100 µl 2 % X-Gal und 100 µl 1 mM IPTG behandelt. *E. coli* besitzt das Enzym β-Galactosidase (*lacZ*). Dieses kann zum Screening eingesetzt werden. β-Galactosidase kann X-Gal verstoffwechseln, was sich in einem Farbumschlag ins Blaue äußert. Durch die Insertion in *lacZ* verlieren die Bakterien die Fähigkeit β-Galaktosidase zu verstoffwechseln. Somit bilden sie weiße Kolonien.

### 3.2.3.4 Elektroporation von *S. aureus*

Für die Elektroporation von *S. aureus* werden 10 µl Plasmid DNA mit 40 µl elektrokompenten *S. aureus*-Zellen zusammengeführt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektroporation wird mit 2 kV    100 Ω    25 µF durchgeführt. Danach wird dem Produkt 1 ml SMMP zugefügt und für 4 h bei 37°C und 150 Rpm geschüttelt. 100 µl wurden direkt auf Antibiotika-Nährböden verteilt. Die übrige Flüssigkeit wird durch Zentrifugation sedimentiert und schließlich wieder in 100 µl SMMP resuspendiert und ebenfalls auf Antibiotikaplaten verteilt. Die Platten bleiben 24 h bei 37°C im Inkubator.

### 3.2.3.5 Phagentransduktion

#### *Phagenlysate*

Übernachtskultur nach Protokoll mit RN4220+ (pEmp1). Nach dieser Zeit werden 100 µl CaCl<sub>2</sub> zur Kultur hinzugefügt. Das Phagenlysate (Phage 85) wird zunächst mit Phagenbuffer (5 mM CaCl<sub>2</sub> LB Medium) verdünnt in der Folge 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> und danach für 2 min auf 52°C erhitzt.

Danach werden 300 µl Kultur und 100 µl Phagenlysate in Röhren gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den Röhren wird jeweils 4 ml LB-Softy (LB + 0,6 % Agar), sowie 5 mM CaCl<sub>2</sub> gegeben, gemischt und dann zügig auf Blutplatten verteilt. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die braunen Platten am nächsten Tag sind ein Indikator des Wachstums und klares LB-Softy zeigt eine Lyse an. Auf den Platten wird dann 2 ml Phagenpuffer gemischt und damit das LB-Softy von der Platte heruntergekratzt und in ein Röhren gefüllt. Das Röhren wird nun für 10 min bei 9000 x g zentrifugiert. Danach wird der Überstand abpipettiert und mit einem 0,45 µm Millipor-Filter gefiltert. Das Lysate kann bei 4°C einige Jahre aufgehoben werden.

#### *Transduktion*

Der Empfänger-Stamm wird in 20 ml TSB 18 h bei 37°C und 150 Rpm inkubiert. Am nächsten Tag wird die Übernachtskultur für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das entstandene Sediment wird in 1 ml resuspendiert. Danach werden 0,5 ml der Zellsuspension zu 0,5 ml LB, das mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> versetzt ist, gefügt. Dazu kommt noch dieselbe Menge an Phagen Lysate. Diese Mischung wird nun 20 min bei 37°C und unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dieser Zeit wird 1 ml eiskaltes 20 mM Natriumcitrat hinzugefügt. Danach wird die Mischung zentrifugiert und das Sediment wiederum in 1 ml 20 mM Natriumcitrat resuspendiert. 100 µl davon werden nun auf TSB Platten, die mit 20 mM Natriumcitrat und selektiven Antibiotika versetzt sind, ausgestrichen und für 24-36 h bei 37°C inkubiert.

Nach dieser Zeit werden einzelne Kolonien wiederum auf TSB-Platten ausgestrichen, die dieses Mal 5 mM CaCl<sub>2</sub> enthalten. Diese Prozedur wird noch einmal wiederholt. Die Kolonien, die dann wachsen, sollten die Transduktion enthalten und werden nochmals phänotypisch (Antibiotika-Resistenz) überprüft.

### 3.2.3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die PCR wird eine Endmenge 50 µl benötigt. Die benötigten Reagenzien werden in einer Eisbox kühl gelagert. Es werden autoklavierte PCR-Röhren und Filterpipetten sowie

autoklaviertes Milliporwasser verwendet. Die PCR wurde in einem „Gene Amp PCR System 9700“ von der Firma Applied Biosystem durchgeführt.

Aus den Reagenzien wird wie folgt ein Mastermix erstellt:

H <sub>2</sub> O	38,75	µl	H <sub>2</sub> O	37,75	µl
Vent/10x buffer	5	µl	10x buffer	5	µl
MgSO <sub>4</sub>	0,5	µl	MgCl <sub>2</sub>	2	µl
dNTP`s	2	µl	dNTP`s	2	µl
Primer1 (60pmol/µl)	1	µl	Primer1 (60pmol/µl)	1	µl
Primer2 (60pmol/µl)	1	µl	Primer2 (60pmol/µl)	1	µl
Vent	0,25	µl	Taq	0,25	µl
Endvolumen	49	µl		49	µl
DNA	1	µl		1	µl
Endvolumen	50	µl		50	µl

Die Reagenzien, außer dem Enzym, werden aufgetaut und kurz anzentrifugiert.

Der Mastermix wird kurz geschüttelt und dann in die Röhrchen aufgeteilt und die DNA hinzugefügt.

PCR Programm:

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

### 3.2.3.7 Restriktionsenzymanalyse

Die DNA wird zusammen mit Restriktionsenzymen 1 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit schneiden die Enzyme die DNA an bestimmten Stellen. Das Ergebnis stellt sich in einer Gelelektrophorese dar.

Mischung:

H <sub>2</sub> O	13,5	µl
Puffer	2	µl
Restriktionsenzyme	0,5	µl
DNA	5	µl
Endvolumen	20	µl

### 3.2.4 RNA

#### 3.2.4.1 Isolierung von RNA

Nach der angegebenen Zeit wird 1 ml Übernachtskultur in 19 ml des zu testenden Mediums gegeben und erneut unter den vorherigen Bedingungen inkubiert. Nach 3 h und 6 h werden die Proben genommen. Dazu werden 0,8 ml der Kultur in ein 1,5 ml Röhrchen gegeben und 5 min in einer Zentrifuge bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert.

In der Zwischenzeit werden „RAI“ 500 µl und 5 µl β-Mercaptoethanol durch Schütteln gemischt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgekippt und das Sediment in 100 µl TE-Buffer durch Schütteln resuspendiert. Dann den Mix („RAI“) dazugeben und mixen. Danach wird die Flüssigkeit zur Ribolyse 20 s mit „Lysing Matrix B“-Röhrchen im „Fast Prep“ (FP 120) der Firma Bio Savant zentrifugiert. Nachfolgend wird die Mischung mit 15000 x g 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Röhrchen abpipettiert. Nun ein weiteres Mal bei 15000 x g 2 min zentrifugieren. Ein „Nucleospin“-Filter wird in ein „Collecting“-Röhrchen gesetzt und der Überstand hineingegeben. Nun wieder bei 11000 x g 1 min zentrifugieren. Dazu werden 350 µl 70 % Ethanol gegeben und durch Pipettieren gemischt. Dieses Lysat wird auf eine „NucleoSpin RNA II“ Säule gegeben und 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. Nun werden 350 µl „Membrane desalting Buffer“ zur Säule gegeben, die in einem frischen Röhrchen steht. Dann wird 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Den Überstand abschütten, sofort wieder bei 11000 x g zentrifugieren. In ein 0,5 ml Röhrchen wird die Mischung aus 10 µl „DNase“ und 90 µl „DNase Reaction Buffer“ gegeben und durch Anschnappen gemischt. Anschließend werden 95 µl der Mischung auf die Membranen der Säulen gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach den 15 min werden 200 µl „RA2“ auf die Säule gegeben und 30 s bei 8000 x g zentrifugiert.

Die Säule wird in ein neues Röhrchen gestellt und 600 µl „RA3“ auf die Säule gegeben, 30 s bei 8000 x g zentrifugiert und der Überstand abschüttet. Danach werden 250 µl „RA3“ auf die Säule gegeben und 2 min bei 11000 x g zentrifugiert; den Überstand abschütten. Erneut 2 min bei 11000 x g zentrifugieren und die Säule in ein neues Röhrchen stellen. Dann werden 60 µl „RNase“ freies Wasser dazugegeben und 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Nun Aufteilen in 2x 20 µl, 1x10 µl.

#### 3.2.4.2 Verifizierung der Reinheit der RNA mittels Screening nach genomischer DNA

Die Reagenzien werden in einem Mastermix zunächst zusammenpipettiert; die RNA bleibt bis zur Verwendung in der -70°C Gefriertruhe. Der Transport erfolgt in einer Eisbox.

Angaben zu verwendeten Substanzen finden sich im RT-PCR Kapitel.

Der Mix wird in die Röhrchen bzw. Platte für die RT-PCR pipettiert und danach die jeweilige RNA hinzugefügt.

Für den Check wird das Gerät vorbereitet, das Screening wird auf *gyrB* eingestellt.

Die Geräteeinstellungen sind:

	95°C	10 min
40 Zyklen	95°C	15 s
	60°C	1 min
Schmelzkurve	95°C	15 s
	60°C	20 s
	95°C	15 s

#### 3.2.4.3 Reinigung und Aufbereitung der RNA

Die Reinigung ist notwendig, um Reste genomischer DNA nach der Präparation, die eine Analyse mittels RT-PCR unmöglich machen, zu entfernen.

Zur Reinigung wird die verunreinigte RNA wieder zusammenpipettiert zu einem Volumen von 50 µl; gegebenenfalls mit „HPLC“-Wasser auffüllen. Dann werden 175 µl „RAI-Buffer“ hinzugegeben und die Reagenzien durch Schütteln gemischt. Danach werden 175 µl 70% Ethanol hinzugefügt und erneut geschüttelt. Dieses Gemisch wird nun auf den Filter einer blauen „RNA II Säule“ aufgetragen und 30 s bei 8000 x g zentrifugiert. Die Säule wird danach in ein neues Röhrchen gestellt. Auf die Säule werden nun 350 µl „MDB“ gegeben und erneut 1 min bei 11000 x g zentrifugiert; danach für 30 s zentrifugieren.

Aus 90 µl „DNase Reaction Buffer“ und 10 µl „DNase“ wird nun eine Mischung hergestellt und 95 µl davon auf die Säule aufgetragen. Dies wird 15 min bei Raumtemperatur einwirken lassen. Nach dieser Zeit werden 200 µl „RA2“ auf die Säule aufgetragen und bei 8000 x g 30 s zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues Röhrchen platziert. Darauf kommen 600 µl „RA3“. Die Zentrifugation erfolgt bei 8000 x g für 30 s. Dann erneute Waschung mit 250 µl „RA3“ und Wiederholung der Zentrifugation (2x). Dazwischen wird der Durchlauf verworfen. Zur Elution trägt man nun 60 µl „RNase“-freies Wasser auf die Säule, die jetzt in einem neuen Röhrchen steht, und zentrifugiert 1 min bei 11000 x g.

#### 3.2.4.4 Herstellung eines RNA-Gels

Zur Herstellung eines RNA-Gels müssen zunächst alle zu benutzenden Materialien gereinigt werden, um die Zerstörung der RNA durch RNAsen zu verhindern.

Für 30 ml Gel werden benötigt:

Agarose	0,3	g
H <sub>2</sub> O	25	ml
10x Mops	3	ml
Formaldehyd	2	ml

Das Gel nun trocknen lassen.

#### 3.2.4.5 Bereitung von cDNA

Zur cDNA-Herstellung wird das Ergebnis der Umrechnung der gemessenen RNA benötigt. In jede Probe werden 3,5 µg RNA gegeben. Die errechnete µl-Zahl wird nun mit Wasser zu 25 µl ergänzt. Die Mischung wird kontinuierlich in einer Eisbox gekühlt gehalten.

Buffer	5	µl
dNTP	2	µl
Random Primer	5	µl
Reverse Transkriptase	2,5	µl
RNAse out	0,625	µl
HPLC H <sub>2</sub> O	0,875	µl

Dieser Mix wird nun zu dem vorbereiteten Mix aus Wasser und RNA gegeben und vermischt.

Das Endvolumen beträgt nun 50 µl.

Die cDNA wird im PCR-Gerät hergestellt.

Die Geräteeinstellungen sind:

25°C für 10 min

37°C für 2 h

Nach den zwei Stunden wird die cDNA möglichst sofort aus der Maschine entfernt und aliquotiert; dies ergibt ein Röhrchen mit 28,6 µl und eines mit dem Rest. Zu den 28,6 µl kommen 71,4 µl HPLC Wasser, so dass eine Endkonzentration von 20 ng/µl entsteht.

#### 3.2.4.6 Analyse der RNA/cDNA mittels RT-PCR

*Primer:*

Die benutzte Primer-Konzentration beträgt 5 µM. Die Tabelle stellt die Endkonzentration der Primer in nM dar

	Forward Primer	Reverse
gyrB	300	300
Eap	300	300
Emp	100	100
Asp23	300	300
RNAIII	300	300
Sae	50	100
sarA	300	300

Für die RT-PCR wird der Reagenzienmix wie folgt präpariert:

Sybr Green	12,5	µl
Primer F	x	µl
PrimerR	x	µl
HPLC H <sub>2</sub> O	x	µl
Endvolumen	22,5	µl
cDNA	2,5	µl
Endvolumen	25	µl

Dieser Mix wird nun in eine „Micro Amp optical 96-well Reaction Plate“ pipettiert. Die Messungen erfolgen jeweils als Doppelmessungen. Die Analyse erfolgt im „AbiPrism 7 sequence detection system“ der Firma Applied Biosystems. Die Geräteeinstellungen entsprechen denen der gDNA.

### **3.2.5 Protein**

#### 3.2.5.1 Herstellung der Proteinproben

Nach 16 h wird jeweils 1 ml der Übernackkultur in 19 ml (1:20) des zu messenden Mediums pipettiert und diese wieder bis zu den erwünschten Zeitpunkten zur 3., 6. und 10. Stunde im Schüttler zu den vorherigen Bedingungen belassen.

Zum jeweiligen Zeitpunkt erfolgt zunächst eine Probenentnahme zur OD-Messung (OD600).

Bei der Probenentnahme möchte man eine OD von 6 erreichen und passt dementsprechend die Menge der verwendeten Bakterien nach OD-Messung an.

Die entsprechende Menge wird in ein Röhrchen gegeben und auf Eis gelegt. Die Röhrchen werden bei 6000 x g 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der so entstandene Überstand über dem Sediment wird abpipettiert. Zu dem Sediment wird nun 2x „SDS Extraktionspuffer“ (125 mM Tris HCL, pH 7) gegeben. Das Sediment wird mit einem Endvolumen von 100 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Die Flüssigkeit wird nun für 3 min bei 95°C unter Schütteln inkubiert. Danach wird das Röhrchen bei 4°C 10000 x g 3 min zentrifugiert. Dieses Mal wird der Überstand in ein frisches Röhrchen gegeben und mit 40 µl 4x SDS Probenpuffer (200 mM Tris HCL, pH 6,8, 400 mM DTT, 8 % SDS, 0,4 % Bromphenolblau, 40 % Glycerin) versetzt.

Diese Mischung wird erneut 8 min bei 95°C inkubiert. Die Proben werden nun bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2.5.2 Analyse der Proteinproben mittels SDS-PAGE

Für den Gellauf wird die Apparatur nach Plan aufgebaut und auf seine Dichtigkeit überprüft.

Danach werden die verschiedenen Gele zusammenpipettiert.

#### *Separating Gel 10 %*

Acrylamid	3,3	ml
1 M TRIS Puffer pH 8,8	3,5	ml
H <sub>2</sub> O	2,6	ml
SDS (20%)	50	µl
APS	100	µl
Temed	83	µl
Endvolumen ca.	10	ml

Mit einer 1 ml Pipette wird das Gel in die Apparatur hineingegeben. Das Gelfenster ist nun zu 2/3 gefüllt, das restliche Drittel wird mit Wasser aufgefüllt und 30 min stehen lassen.

Sobald das Gel trocken ist, kann das Wasser abgeschüttet werden.

#### *Stacking Gel*

Acrylamid 30 %	0,6	ml
1 M TRIS pH 6,8	0,4	ml
H <sub>2</sub> O	1,5	ml
SDS 20 %	16	µl
10 % APS	3,3	µl
Temed	2,7	µl
Endvolumen ca.	3	ml

Dieses Gel auf das vorherige pipettieren und den Kamm einstecken. Das Ganze wird nun unter einer klaren Folie 30 min trocknen lassen.

Wenn das Gel trocken ist, kann der Kamm entfernt und das restliche Wasser mit Filterstreifen aus den Öffnungen herausgesaugt werden. Die Gelplatten werden nun in den Kasten für den Stromlauf gesetzt. Dann wird ein „Running Buffer“ eingefüllt. In die erste Vertiefung werden 15 µl eines Größenstandards „Page Ruler“ (Fermentas) gefüllt. Danach werden 35 µl Proben in die nächsten Taschen gefüllt. Das Gel wird 2 h mit 80-100 Volt inkubiert. Nach dem Lauf wird das Gel vorsichtig aus der Verankerung gelöst. Das Gel wird nun zum Färben in eine Wanne gelegt. Hinzu kommt ein „Coomassie Blue Buffer“ (500 ml Methanol, 400 ml Wasser, 100 ml Glacial acetic acid). Die Wanne wird nun 30 min auf eine Wippe gestellt. Der „Blue Buffer“ wird abgekippt und „Destain“ (300 ml Methanol, 600 ml Wasser, 100 ml Glacial acetic acid) zum Reinigen hinzugegeben und erneut 30 min unter Wippen inkubiert. Danach auch den „Destain“ entfernen und das Gel über Nacht in H<sub>2</sub>O stehen lassen.

Zum Trocknen wird das Gel zwischen zwei Stücke von cellophanfreiem Papier gelegt und mit dem „Biorad Gel Airdryingsystem“ getrocknet.

### **3.2.6 Assays zur Analyse des Verhaltens der Bakterien**

#### 3.2.6.1 Reporter Gene Assay

Am Messungstag wird zunächst ein Mastermix aus Bakterienkultur und des jeweiligen Mediums erstellt im Verhältnis 1:100. Davon werden je 200 µl in eine „96-well-plate“ pipettiert zu einer dreifach Messung. Der „Victor2“ der Firma Perkin Elmer schüttelt die Platte bei 37°C und führt alle 30 min eine Lumineszenz- und Absorptions-Messung durch. Zur Analyse wird die Lumineszenz durch die Absorption geteilt. Die Absorption entspricht der OD-Messung bei Wellenlänge 595.

#### 3.2.6.2 Analyse des pH-Wertes in Flüssigmedien

Am nächsten Tag wird 1 ml der Kultur in 19 ml des zu messenden Mediums gegeben und diese Mischung wieder bis zur Messung zu den vorherigen Bedingungen geschüttelt. Die Messungen erfolgen zur 3., 6. und 10. Stunde. Dazu wird 1 ml der Kultur in ein neues Röhrchen gefüllt und 15 min bei 72°C im Wasserbad inkubiert, um die Bakterien abzutöten. Danach wird der pH-Wert mittels pH-Meter ermittelt.

### 3.2.6.3 Herstellung von Proben zur Analyse des Azetatgehaltes in Flüssigmedien und Analyse der Proben

Von der Übernachtskultur wird 1 ml in das jeweils vorbereitete Medium gegeben. Die neuen Kulturen werden bei denselben Bedingungen weitergeschüttelt. Nach der vorgegebenen Zeit, also zur 3., 6. und 10. Stunde werden jeweils 2 ml in ein Röhrchen gefüllt und 5 min bei 20000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches 15 ml Röhrchen gefüllt und die gleiche Menge an eiskaltem 1 M „Perchlorid acid“ dazugegeben. Alles wird durch Schütteln gut gemischt und 2 min bei 4°C stehen lassen. Danach muss die Mischung für 10 min bei 300 x g zentrifugiert werden.

2 ml dieses Überstandes werden in eine neues Röhrchen gefüllt; dieses enthält schon 200 µl 5 M KOH. Zum Reagieren wird die Mischung wieder 15 min bei 4°C aufbewahrt. Nach dieser Zeit wird noch einmal für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Röhrchen gefüllt und kann bei 4°C längere Zeit aufbewahrt werden.

#### Messung:

Bei einem neuen Kit müssen zunächst die Inhaltsstoffe nach Packungsanleitung resuspendiert werden.

Zunächst wird eine Leerprobe aus 1 ml „Solution1“, 200 µl „Solution2“ und 2 ml Wasser hergestellt. Für die Proben werden jeweils 1 ml „Solution1“, 200 µl „Solution2“, 1,9 ml Wasser und 100 µl Probe zusammenpipettiert. Beides wird mit einem Stäbchen gemischt und die OD bei 340 nm genommen. Nun werden 10 µl „Suspension3“ hinzugefügt, wieder mit demselben Stäbchen wie zuvor gemischt und 3 min stehen gelassen. Danach wird wiederum die Absorption gemessen.

Dann werden 20 µl von „Solution4“ dazugegeben, wiederum gemischt und 10-15 min ruhen lassen. Nach diesem Zeitraum sollte die Reaktion gestoppt haben; wenn nicht, wird alle 2 min weiterkontrolliert.

Die Konzentration wird nach der Formel des Protokolles von „Boehringer Mannheim/R-Biopharm Essigsäure UV-Test“ errechnet.

## 4. Resultate

### 4.1 Herstellung des *emp-gfp-lux*

Die Herstellung einer *emp-gfp-lux* Variante war notwendig, um die Expression von Emp näher untersuchen zu können, wie im weiteren Verlauf noch näher beschrieben werden wird. Die entsprechende Variante für *eap-gfp-lux* lag bereits im Labor vor (N. Harraghy).

Das hier benutzte Reporter-Gen-Assay ist das *gfp-lux*-System, das mittels des *lux* Teils eine Ermittlung der Lumineszenz ermöglicht, die wiederum die Aktivität des *emp/eap*-Promotors widerspiegelt.

#### 4.1.1 Präparation des *emp*-Promotors für das Klonieren in pSB 2035

Die Vorarbeiten für *emp-gfp-lux* wurden in *E. coli* durchgeführt, da dieser die höhere Replikationszahl besitzt. Der *emp*-Promotor existierte bereits geklont in pKO10 (N. Harraghy) mit den Seiten *HindIII* und *EcoRI*. Um zum Klonieren mit pSB2035 kompatibel zu sein, musste die *HindIII*-Seite in eine *SmaI*-Seite geändert werden. Nachdem aus DH5 $\alpha$  (*E. coli*) die pEmp-pKO10 Plasmid DNA extrahiert wurde, wurde mit der Plasmid-DNA als Matrize eine PCR mit den spezifischen Primern empPF1(1) und empPR1(2) durchgeführt, um den *emp*-Promotor zur Ligation vorzubereiten. Hierdurch entstand ein PCR-Produkt von ca. 600 bp. Das PCR-Produkt wurde mit dem „pPCR Skript-Amp SK(+) cloning vektor Kit“ für die Weiterverarbeitung gereinigt und anschließend in pPCR Skript-Amp SK(+) ligiert und in DH5 $\alpha$  transformiert. Entsprechende rekombinante Klone wurden nach Induktion auf X-Gal Medien mittels des blue/white Screening identifiziert.

#### 4.1.2 Vorbereitung von pSB2035 für die Klonierung

Der Plasmid pSB2035 (Quazi et al.) enthält die *gfp-lux*-Reporter-Sequenz. Oberhalb davon liegt der P3-Promotor mit den Schnittstellen *EcoRI* und *SmaI*. Im nächsten Schritt wurde Plasmid-DNA sowohl aus dem rekombinanten DH5 $\alpha$  (enthält pEMP-pPCR Skript-Amp Sk(+)) und aus XL-10 (pSB2035) isoliert und mit *EcoRI* und anschließend mit *SmaI* restringiert. Die Analyse folgte in einem Agarosegellauf.

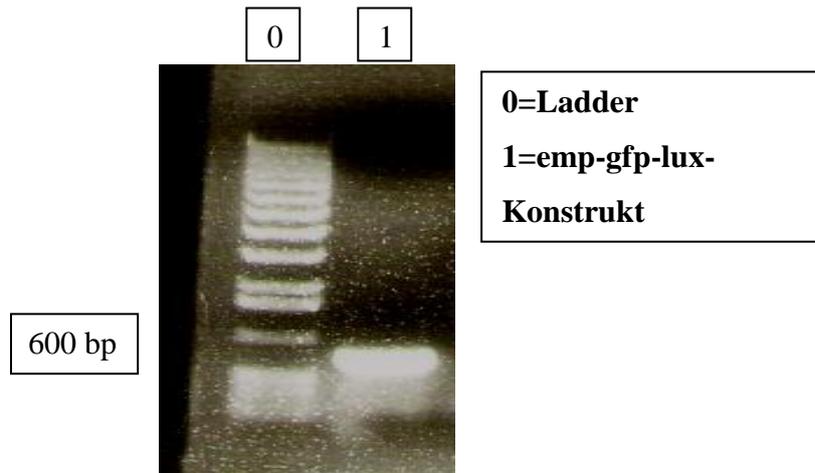


Abbildung 5: PCR Produkt der Größe 600 bp Ergebnis der Amplifikation des *emp*-Promotors

Die entsprechenden Banden, die *emp*-Promotor-Sequenz (600 bp) sowie pSB2035 mit der *gfp-lux*-Sequenz (12 kb) enthielten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt.

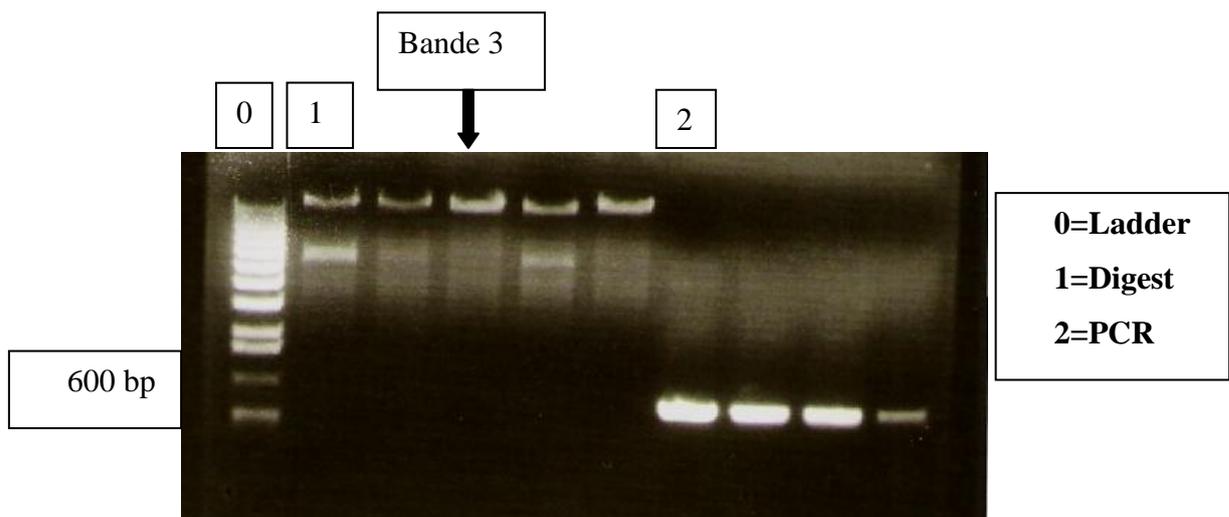


Abbildung 6: Darstellung von DH5 $\alpha$  mit lux-Vector und *emp*-Promotor

#### 4.1.3 Konstruktion von *emp-gfp-lux*, Ligation, Transformation in *E. coli*, Sequenzierung und Transduktion in Newman

Die gereinigten Fragmente wurden an den kompatiblen Seiten ligiert und durch Elektroporation in DH5 $\alpha$  integriert. Aus den gewachsenen Kolonien wurde Plasmid DNA isoliert und mittels PCR sowie Gel analysiert. Die Kolonie der besten Bande im Gel wurde für die Sequenzierung ausgewählt. Zur Überprüfung der Richtigkeit der Sequenz, vor der Transformation in Newman, wurden 3  $\mu$ g DNA zur Analyse in die Firma MWG Biotech AG

gesendet. Nachfolgend dargestellt ist die Sequenzfolge von Bande drei (Abbildung 7). Die Sequenz wurde von der Firma mit bereits in der „GenBankDNA Database“ vorhandenen Sequenzen mittels des „BLAST“-Programmes abgeglichen; dies ergab, dass die vWF-Bindeprotein-Sequenz Übereinstimmungen aufweist. Dies ist damit zu erklären, dass die Sequenz vor dem eigentlichen Gen anfängt und die von-Willebrand-Faktor-Sequenz direkt vor *emp* liegt; somit ist auch klar, dass die nachfolgende Sequenz die von *emp* ist. Der Buchstabe, der in der ersten Reihe nicht angezeigt wird, kann allerdings in einem Chromatogramm (Ausschlagsdiagramm) deutlich als A identifiziert werden.

```
protein (vwb) gene, complete cds
Length=1740AAGTCATGATTTTCACA-CAACGCATCAATCACCAACAACCTTCAAATCACACGCATAATAA 62

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

Query 4          ||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1395 AAGTCATGATTTTCACAACAACGCATCAATCACCAACAACCTTCAAATCACACGCATAATAA 1454

Query 63      TGTGTGTTGAATTTGAAGAAACGCTCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGGTTGG 122
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1455 TGTGTGTTGAATTTGAAGAAACGCTCTGCTTTACCTGGTAGAAAATCAGGATCACTGGTTGG 1514

Query 123     TATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAAATTAAGCGTGA 182
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1515 TATAAGTCAAATTGATTCTTCTCATCTAACTGAACGTGAGAAGCGTGTAAATTAAGCGTGA 1574

Query 183     ACACGTTAGAGAAGCTCAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATAAAGA 242
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1575 ACACGTTAGAGAAGCTCAAAGTTAGTTGATAATTATAAAGATACACATAGTTATAAAGA 1634

Query 243     CCGAATAAATGCACAACAAAAGTAAATACTTTAAGTGAAGGTCATCAAAAACGTTTTTAA 302
```

Abbildung 7: Sequenzanalyse von *emp*, durchgeführt von der Firma MWG Biotech AG mittels der „GenBankDNA“ Database und verglichen mit vorhandenen Sequenzen mittels des „BLAST“-Programmes. Die erste Reihe (query) zeigt die eingesendete *emp*-Sequenz, die zweite (subject) die Database Sequenz

Nachdem die Sequenzanalyse die *emp*-Sequenz in pSB2035 bestätigte, konnte mit der Transformation in *S. aureus* Stamm Newman fortgefahren werden. Hierzu wurde zunächst durch Elektroporation das *emp*-Plasmid in *S. aureus* Stamm RN4220 eingebracht. Dieser Stamm ist restriktionsnegativ und kann Fremd-DNA aufnehmen. Nach diesem Schritt erfolgte

wiederum eine DANN-Isolation mit anschließender PCR und Gelelektrophorese. Danach wurde mittels Phagen-Transduktion mit Phage 85 das *emp-gfp-lux* Insert auf Newman übertragen. Die Selektion erfolgte durch Selektion auf Ampicillin wie in Material und Methoden 3.2.3.3 beschrieben. Zur Analyse des Produktes, ob die Transduktion erfolgreich war, wurde eine PCR mit den Primern empPR1 und empPF1 durchgeführt. Die abschließende Gelelektrophorese stellt das Endergebnis der Herstellung von *emp-gfp-lux* (MGH0) dar.

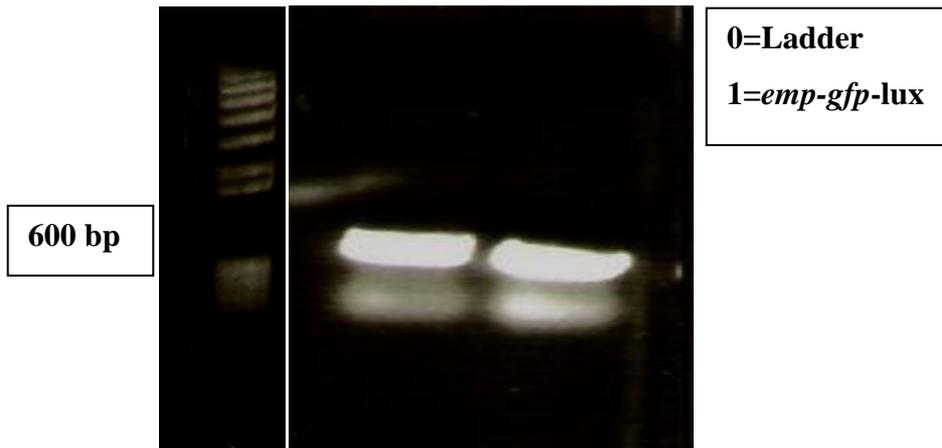


Abbildung 8: PCR-Produkt, das die Größe von 600 bp besitzt und somit als *emp-gfp-lux* (MGH0) in Newman betrachtet werden kann.

## 4.2 Wachstumskurve und Reporter-Gen-Assay

### 4.2.1 Bestätigung der *emp-gfp-lux* Variante mittels Reporter-Gen-Assay

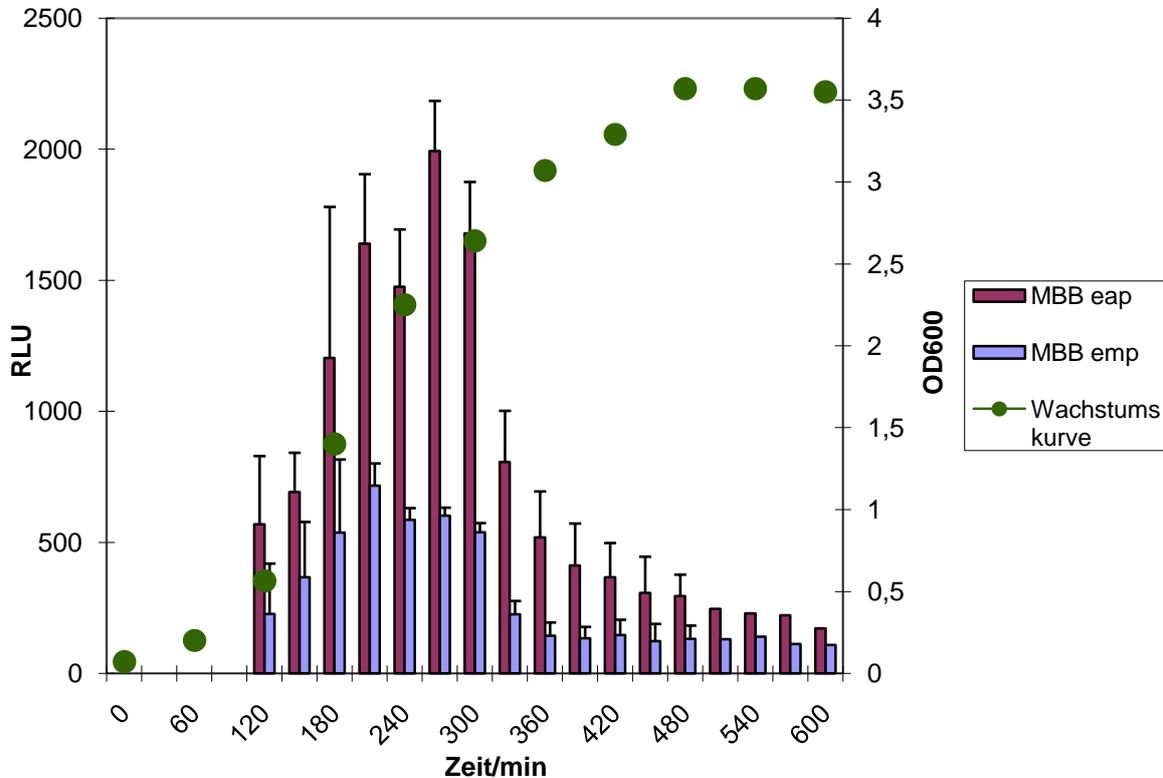


Abbildung 9: Wachstumskurve des Stammes Newman im Medium MBB über 10 h im Vergleich mit den Ergebnissen der Biolumineszenz der Konstrukte *eap-gfp-lux* und *emp-gfp-lux* inkubiert in MBB

Die angefertigte Wachstumskurve von Newman im Wachstumsmedium MBB zeigt den typischen Verlauf einer *S. aureus*-Wachstumskurve. Die einzelnen Wachstumsphasen sind zu erkennen. Die Kurve beginnt mit einer langsamen Zunahme der Zelldichte innerhalb der ersten zwei Stunden, einem exponentiellen Wachstum bis ca. 6 Stunden und Eintritt in die stationäre Phase ab 8 Stunden Bebrütungsdauer.

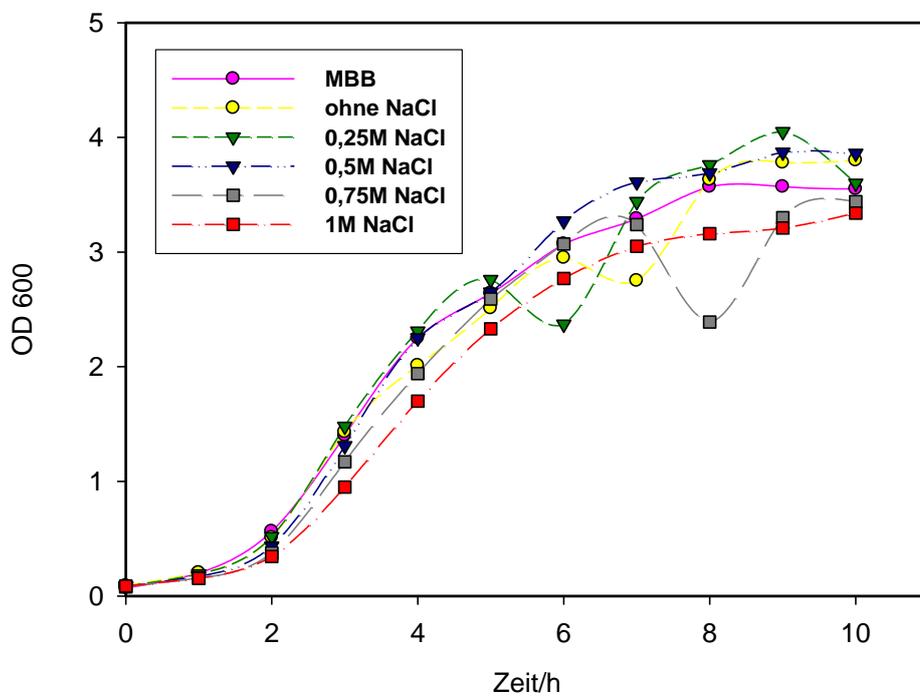
Die Ergebnisse der Biolumineszenz, mit den Konstrukten *eap-gfp-lux* und *emp-gfp-lux* inkubiert in MBB, zeigten ein ansteigendes Wachstum bis zur vierten Stunde. Die höchsten Werte wurden für beide Konstrukte zwischen der 4. und der 6. Stunde erzielt. Die Kurven nehmen einen ähnlichen Verlauf, die Aktivität des *emp*-Konstruktes beträgt weniger als die Hälfte der Aktivität des *eap*-Konstruktes. Diese Werte wurden konstant in mehreren Versuchsreihen erzielt.

## 4.2.2 Umweltbedingungen, welche die *eap*- und *emp*-Expression beeinflussen

### 4.2.2.1 Ioneneffekte

#### 4.2.2.1.1 Effekte von NaCl

NaCl ist schon in einer bestimmten Konzentration von 0,08 M im Referenzmedium MBB enthalten. Durch gezielte Veränderung sollen nun verschiedene Effekte gezeigt werden. Die Darstellung verschiedener Konzentrationen erfolgte zur engmaschigeren Darstellung der Veränderungen auf die Osmolarität. Außerdem können die Veränderungen so im Verlauf beurteilt werden.



A

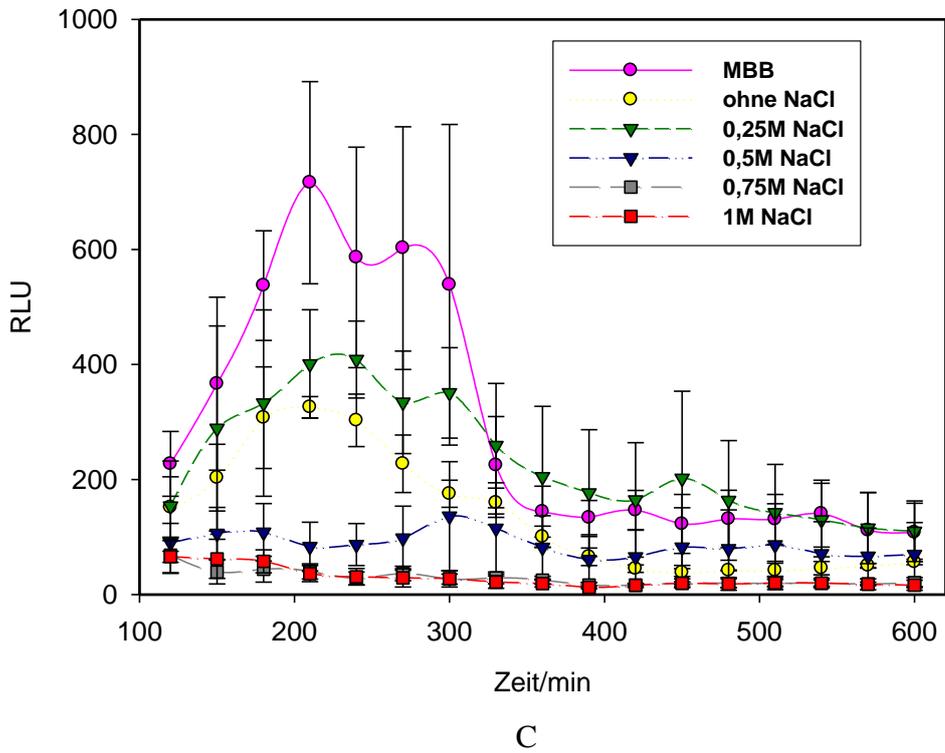
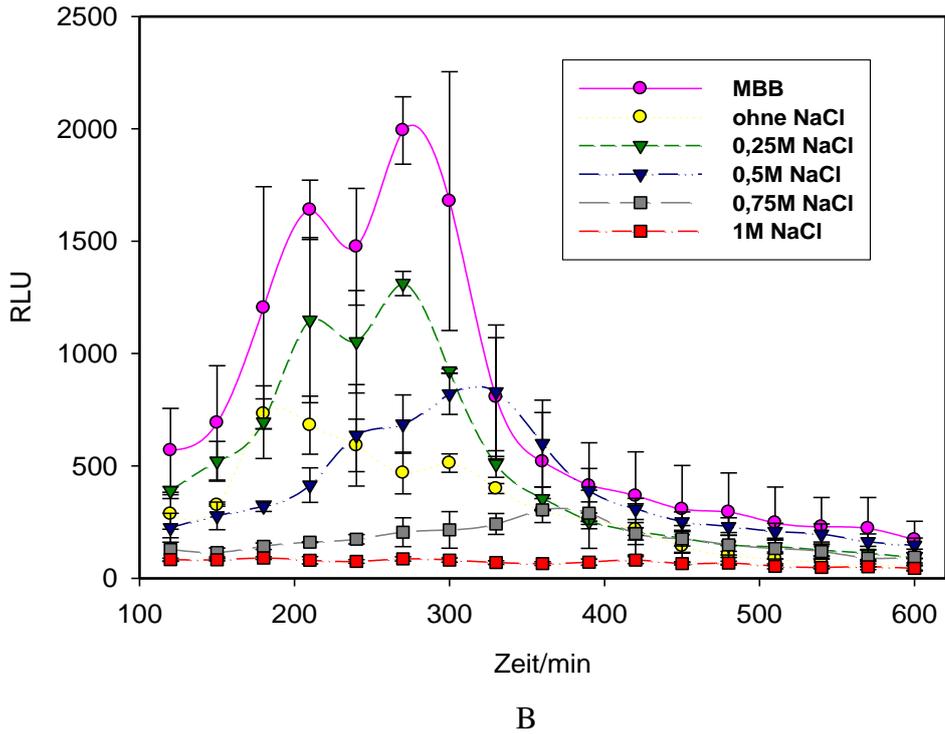


Abbildung 10:

A Darstellung der Wachstumskurven verschiedener Konzentrationen von NaCl

B Darstellung der Ergebnisse des Reporter-Gen-Assay mit *eap-gfp-lux*

C Darstellung der Ergebnisse des Reporter-Gen-Assay mit *emp-gfp-lux*

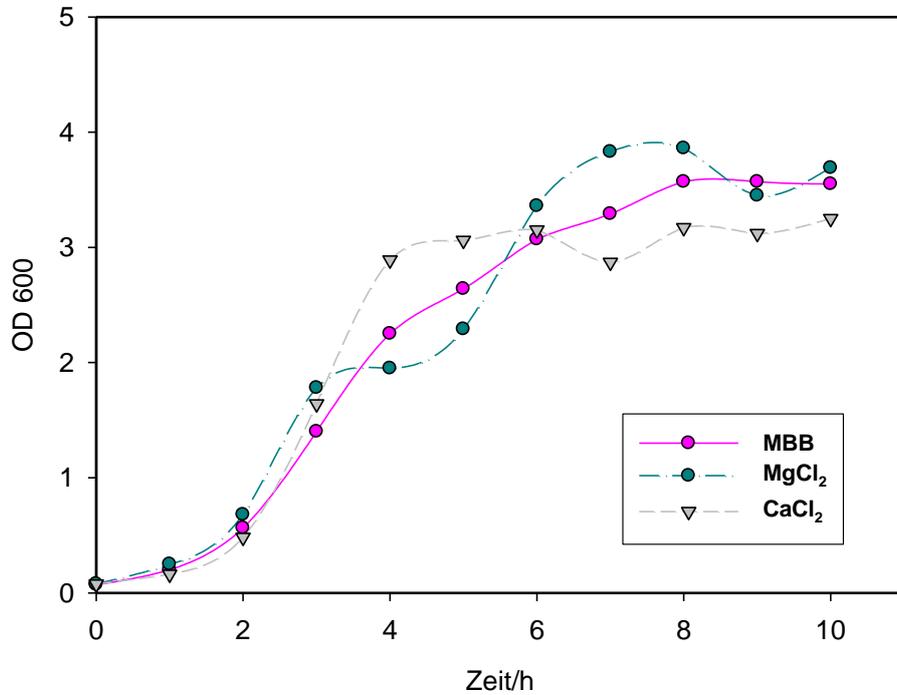
Zunächst wurden die Wachstumskurven mit Newman in MBB und in MBB supplementiert mit unterschiedlichen Konzentrationen von NaCl untersucht. Hierbei zeigte sich bei der Anzucht in un-supplementiertem MBB sowie bei allen untersuchten Konzentrationen von NaCl-Supplementierung von MBB (0,25 M; 0,5 M; 0,75 M; 1,0 M) eine für *S. aureus* typische Wachstumskurve. Interessanterweise differierten die zeitabhängig gemessenen Zelldichten der untersuchten Konstrukte bei den unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen nur geringfügig, allerdings war bei zunehmender NaCl-Supplementierung des Mediums eine Tendenz zu reduzierter Zelldichte bei Eintritt in die stationäre Wachstumsphase erkennbar.

Eine deutliche Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration wiesen jedoch die Bestimmungen der Biolumineszenz (gemessen als „relative light units“, RLU) als Ausdruck der Reporter-gen-Aktivierung in Abhängigkeit von NaCl-Konzentrationen und Zeit auf. Sowohl die Reporter-gen-Aktivität des Newman pEap-gfp-lux Konstrukts als auch die des Newman pEmp-gfp-lux Konstrukts resultierte in den höchsten RLU Werten bei Untersuchung von un-supplementiertem MBB. Im Medium ohne NaCl waren hingegen die gemessenen RLU-Werte deutlich niedriger und erreichten Spitzen-Werte, die nur noch ca. halbmaximal waren im Vergleich zu Bestimmungen in MBB. Darüberhinaus nahmen mit zunehmender NaCl-Supplementierung die gemessenen RLU-Werte deutlich ab: Während die Spitzenwerte bei Supplementierung von 0,25 M NaCl nur mäßig niedriger als in un-supplementiertem MBB lagen, war bei Supplementierung mit 1 M NaCl praktisch keine Reporter-gen-Aktivität mehr detektierbar. Einige der gemessenen RLU-Bestimmungen wiesen dabei einen angedeutet zweigipfligen Verlauf auf. Maximale Reporter-gen-Aktivität war zwischen 4 und 6 Stunden Bebrütungsdauer zu verzeichnen und korrelierte dabei mit der spätexponentiellen Wachstumsphase. Interessanterweise war die gemessene Biolumineszenz des pEap-gfp-lux-Konstrukts deutlich (ca. um die Hälfte) höher als die des pEmp-gfp-lux-Konstrukts. Es ist unklar, ob dies Ausdruck einer tatsächlich erhöhten Reporter-gen-Aktivität ist und damit im Wildtyp-Stamm mit einer entsprechend erhöhten Transkript-Bildung einhergeht, oder ob dies vielmehr Konsequenz von Unterschieden in der Biolumineszenz der einzelnen Reporter-gen-Konstrukte (z.B. durch unterschiedliche Plasmid-Kopienzahl) ist.

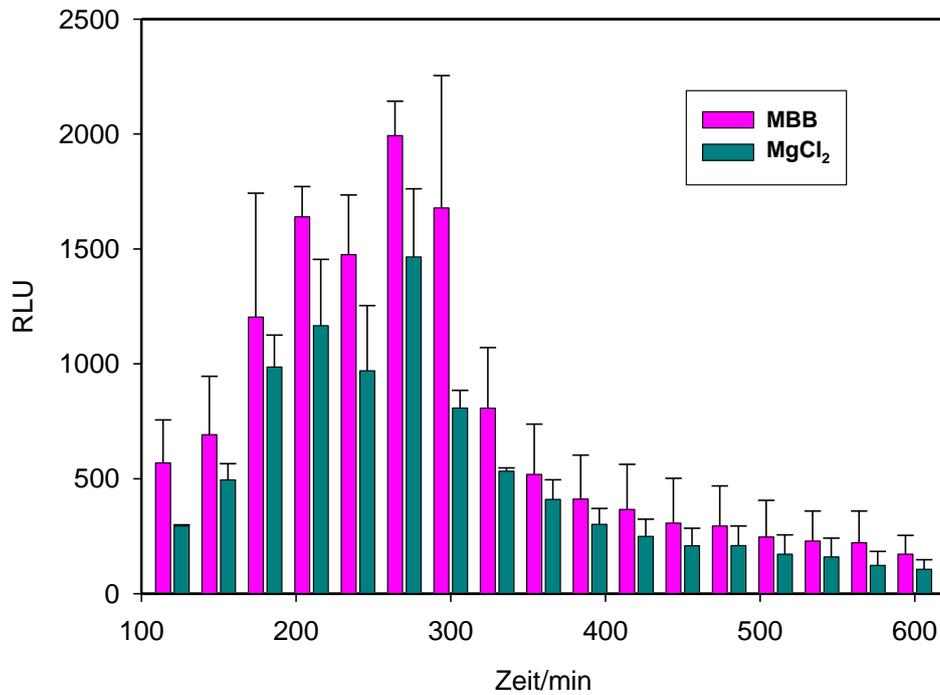
Da in diesem Versuch beide, sowohl Osmolarität, als auch ionaler Einfluss, einen Effekt bewirken können, musste danach geklärt werden, welcher Bestandteil verantwortlich ist. Der nächste Ansatz war der Einfluss anderer Ionen auf die Expression.

#### 4.2.2.1.2 Effekte von $Mg^{2+}$ und $Ca^{2+}$ auf *eap* und *emp*

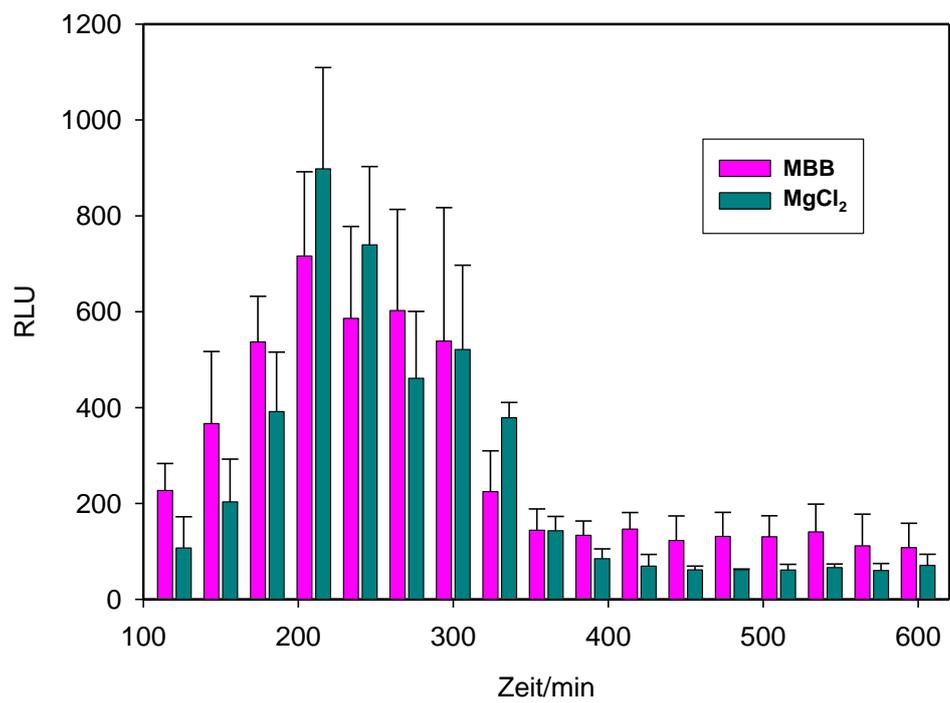
Für die Versuche wurde  $MgCl_2$  in der Konzentration 20 mM, sowie  $CaCl_2$  in der Konzentration 5 mM benutzt.



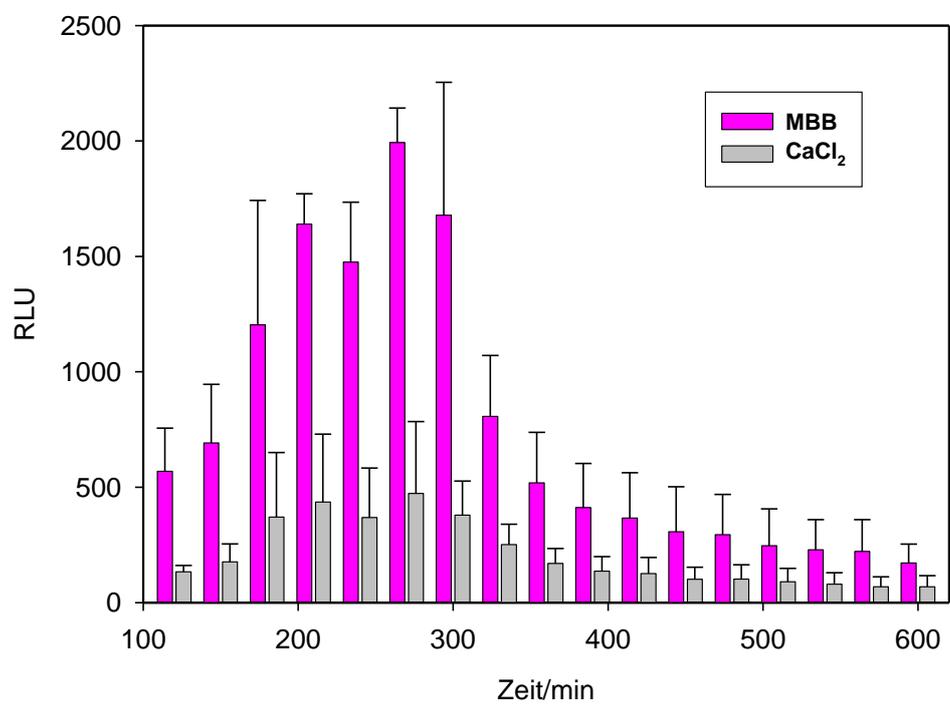
A



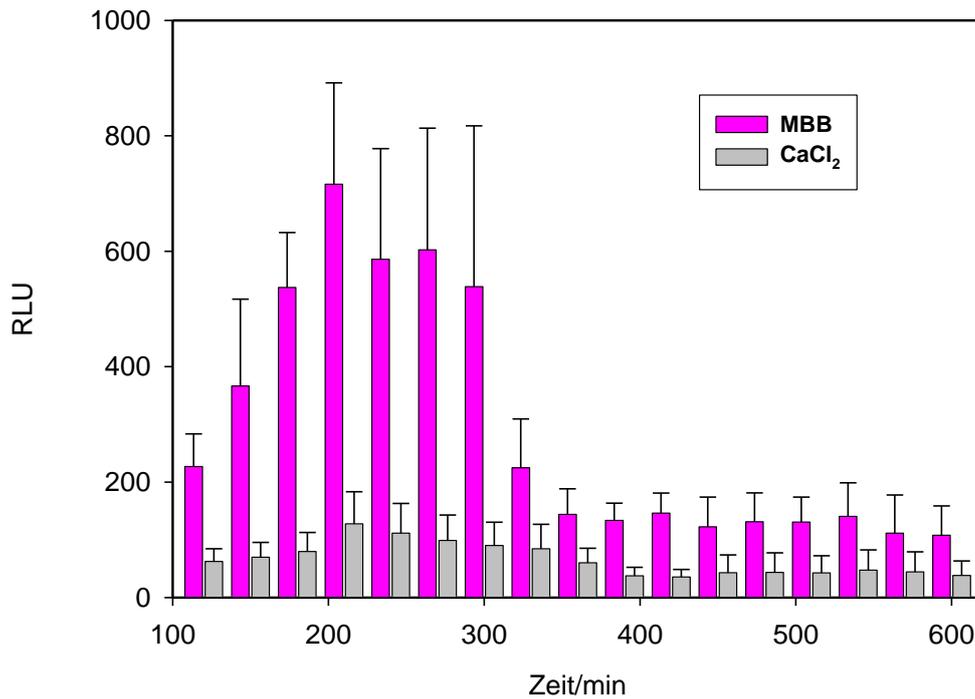
B



C



D



E

Abbildung 11:

- A Wachstumskurve der Medien MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> im Vergleich mit MBB
- B Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays mit MgCl<sub>2</sub> *eap-gfp-lux*
- C Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays mit MgCl<sub>2</sub> *emp-gfp-lux*
- D Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays mit CaCl<sub>2</sub> *eap-gfp-lux*
- E Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays mit CaCl<sub>2</sub> *emp-gfp-lux*

Für Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> wurden ebenfalls zunächst Wachstumskurven mit Newman im Vergleich mit dem Referenzmedium MBB erstellt. Es zeigt sich in den supplementierten Medien nahezu derselbe Verlauf einer typischen Wachstumskurve wie im Referenzmedium. Im Vergleich der Biolumineszenz von mit MgCl<sub>2</sub> supplementiertem MBB, sowie den Konstrukten *eap-gfp-lux* und *emp-gfp-lux*, zeigt sich im Grunde ein ähnlicher Aufbau wie im Vergleichsmedium: ein Anstieg bis zur 4. Stunde, die Maxima zwischen der 4. und der 6. Stunde. Die Unterschiede bestehen in der Höhe der RLU. Diese zeigen sich am Besten im Vergleich der höchsten Werte: für *eap-gfp-lux* bleibt der Wert ca. ein Drittel unter dem Vergleichswert, wohingegen *emp-gfp-lux* etwa ein Drittel höhere Werte erreicht.

Die Ergebnisse der Biolumineszenz für das mit CaCl<sub>2</sub> supplementierte Medium mit den Konstrukten *eap-gfp-lux* und *emp-gfp-lux* zeigten stark reduzierte RLU Werte, die sich für *emp-gfp-lux* während der gesamten Messung kaum ändern. Die Werte für *eap-gfp-lux* lassen

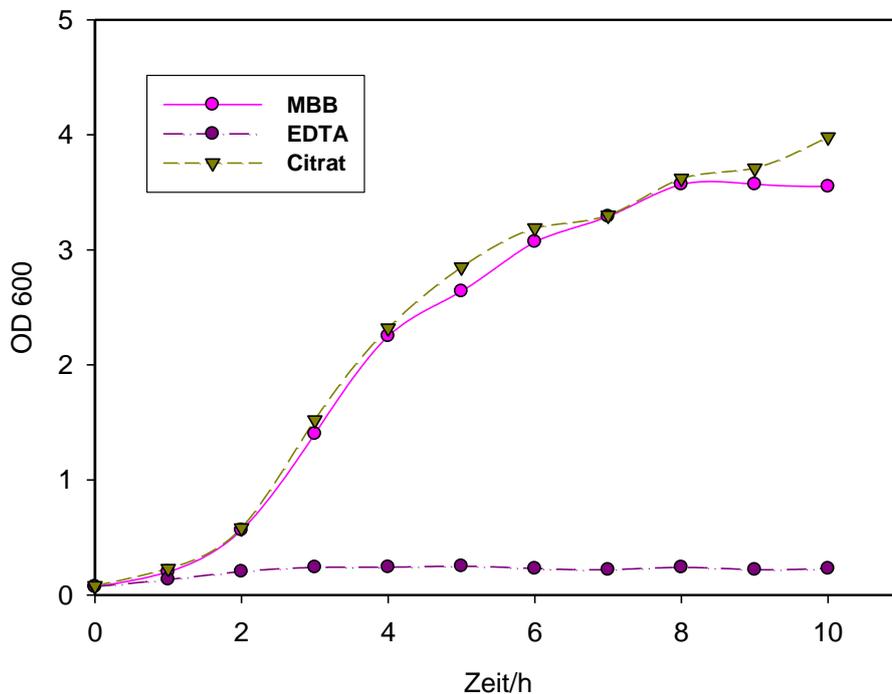
noch andeutungsweise höhere RLU-Werte im Sinne von Hochpunkten ähnlich der Vergleichskurve erkennen.

Nachdem die Effekte durch Hinzufügen von Ionen getestet wurden und die Expression nicht so definitiv beeinflusst war, dass man von der Ursächlichkeit des Ioneneinflusses ausgehen konnte, musste geklärt werden, welchen Einfluss es hat, wenn man Ionen aus der Lösung bindet.

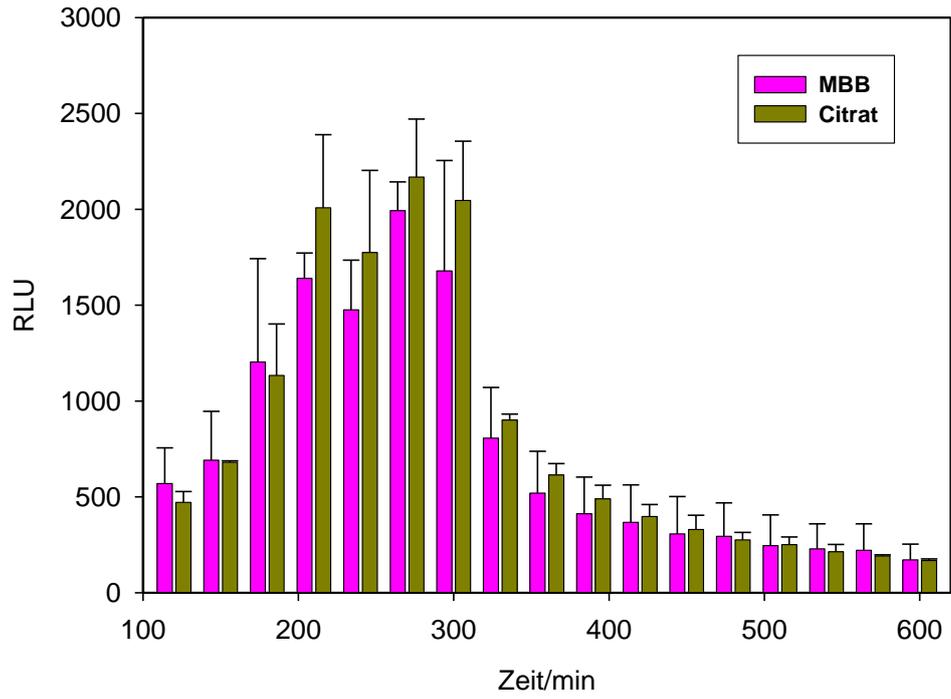
#### 4.2.2.1.3 Effekt von $Mg^{2+}$ - und $Ca^{2+}$ -Chelatoren auf die Expression von *eap* und *emp*

Da für die Medien MBB mit  $MgCl_2$  und  $CaCl_2$  eine Veränderung für die *eap*- und *emp*-Expression gefunden werden konnte, stellte sich die Frage, ob eine Chelat-Bildung dieser Ionen die Veränderungen aufhebt oder weitere Veränderungen hervorruft.

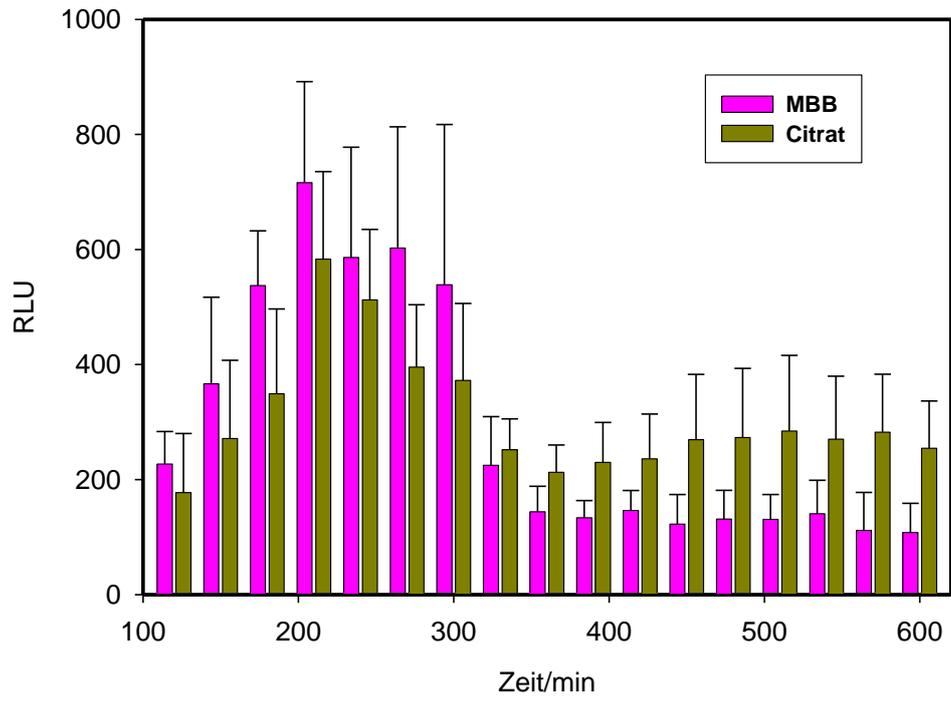
Als Chelatoren wurden 0,25 % Citrat und 0,5 mM EDTA verwendet. Die Chelatoren besitzen unterschiedliche Affinität zu zweiwertigen Ionen. Citrat bildet fast nur Komplexe mit  $Ca^{2+}$ , während EDTA mit  $Ca^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  interagiert, wobei die Affinität zu  $Ca^{2+}$  größer ist.



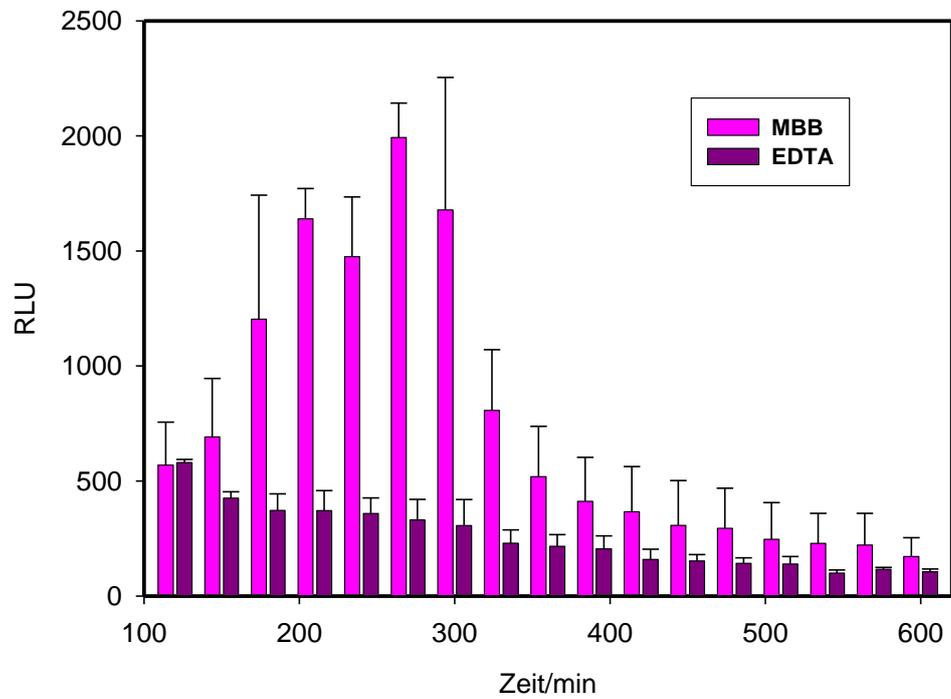
A



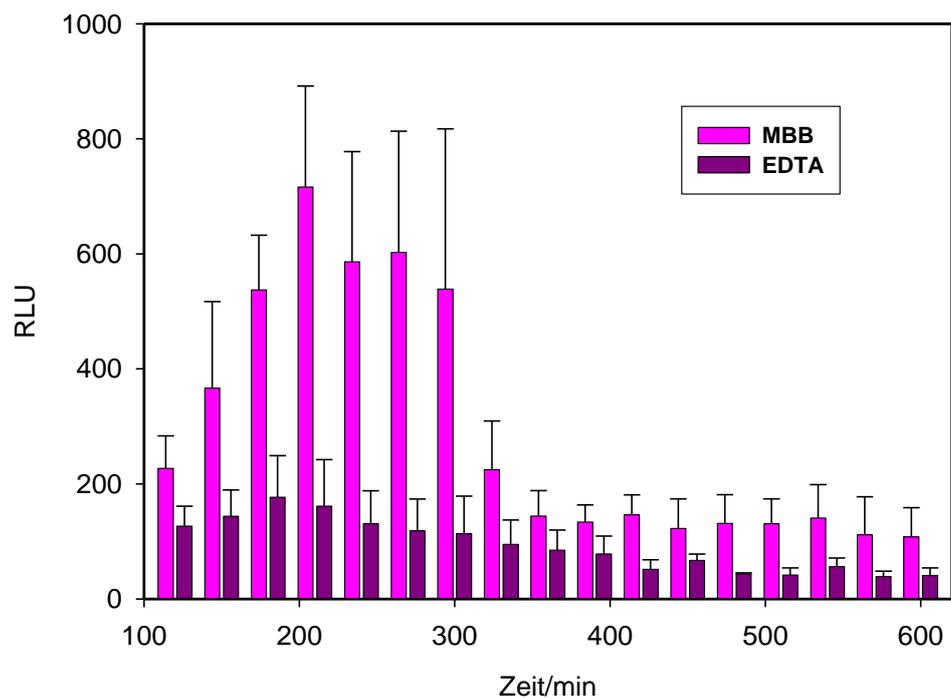
B



C



D



E

Abbildung 12:

- A Wachstumskurve der Medien Citrat und EDTA im Vergleich mit MBB
- B Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays mit Citrat *eap-gfp-lux*.
- C Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays mit Citrat *emp-gfp-lux*
- D Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays mit EDTA *eap-gfp-lux*
- E Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays mit EDTA *emp-gfp-lux*

Die durchgeführte Analyse des Wachstumsverhaltens von Newman in den mit Citrat und EDTA supplementierten Medien zeigte für Citrat zu Beginn einen fast kongruenten Verlauf der typischen Wachstumskurve; der Eintritt in die stationäre Phase erfolgte für Newman in MBB mit der 8. Stunde. Die Kurve von Newman im Citratmedium befindet sich in der 10. Stunde noch in der postexponentiellen Phase, der Eintritt in die stationäre Phase liegt außerhalb des Messzeitraumes. Die Kurve von Newman im EDTA supplementierten Medium lässt kein Wachstum erkennen, die Kurve bleibt immer auf einem niedrigen Niveau ohne einen andeutungsweise typischen Kurvenverlauf.

Die Ergebnisse der Biolumineszenz zeigen für *eap-gfp-lux* in Citrat zu Beginn einen fast identischen Verlauf mit dem Referenzmedium, die Maximalwerte werden ebenfalls zwischen der 4. und 6. Stunde erreicht. Die Maximalwerte liegen ca. ein Viertel über den Vergleichswerten. Nach der 6. Stunde passen sich die Werte denen der Vergleichskurve an.

Die Werte für *emp-gfp-lux* folgen bis zur 6. Stunde den Werten der Vergleichskurve, allerdings um ein Viertel erniedrigt. Nach der 6. Stunde reduzieren sich die Werte wie im Vergleich, bleiben aber bis zur Hälfte darüber. Für das EDTA supplementierte Medium ergaben sich für beide Konstrukte niedrige Werte ohne Auslenkungen, die auf das fehlende Wachstum zurückzuführen sind. Da Citrat als Substrat im Citratzyklus benutzt werden kann, sollte nun durch eine Azetatanalyse geklärt werden, ob im mit Citrat supplementierten Medium eine Aktivitätssteigerung des Citratzyklus zu finden ist. Azetat selbst kann auch im Citratzyklus als Substrat genutzt werden.

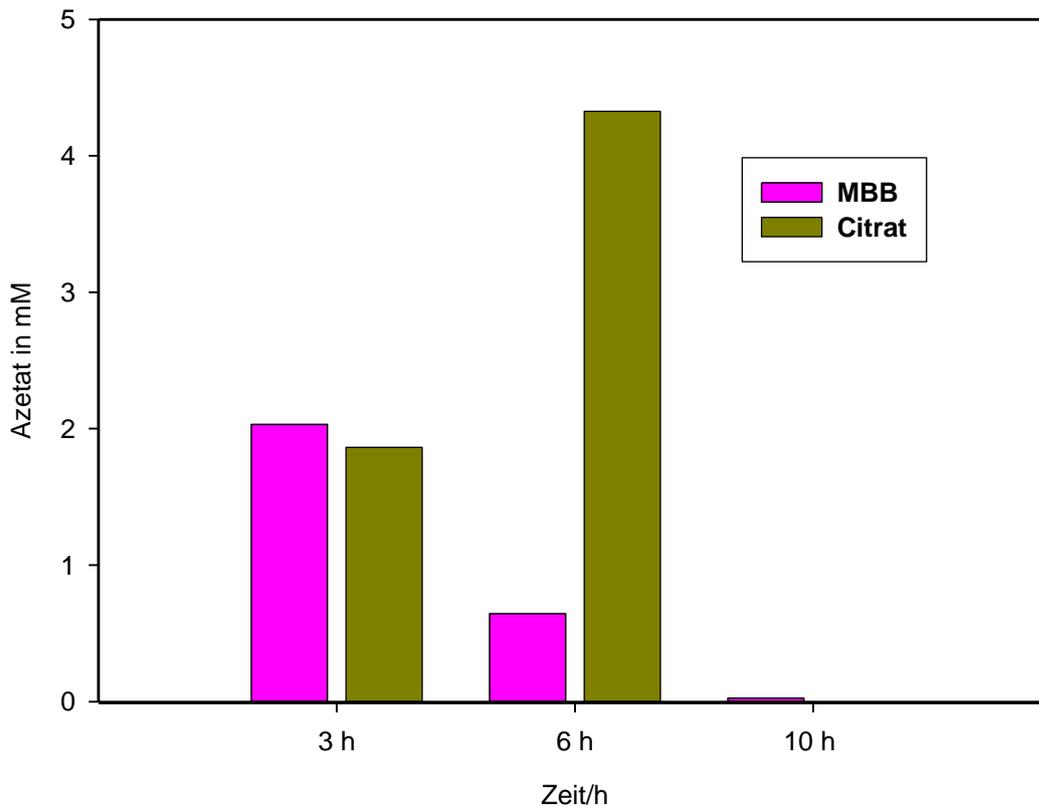


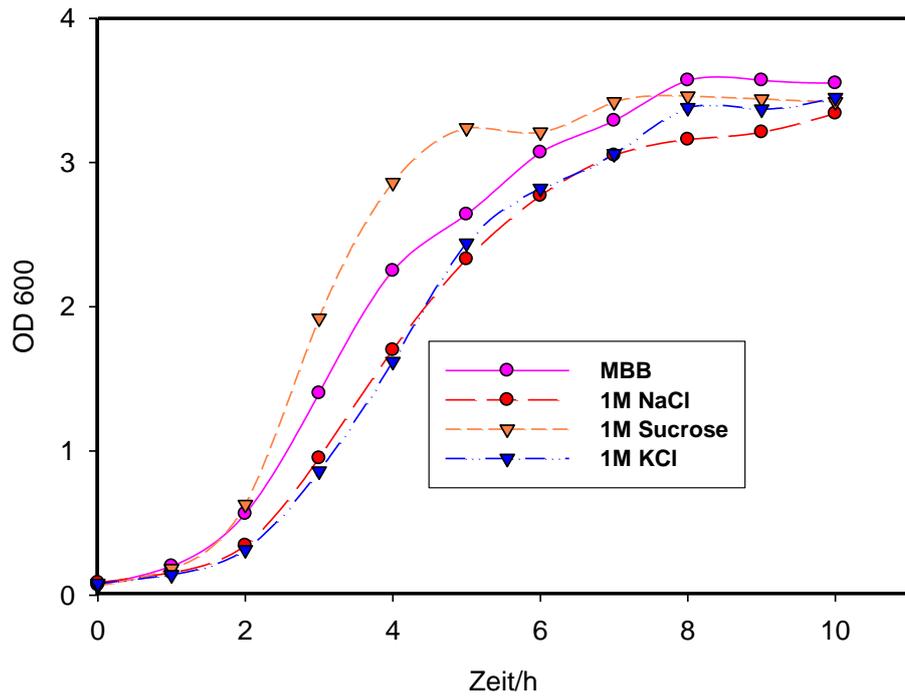
Abbildung 13: Darstellung der Azetatproduktion des mit Citrat versetzten Mediums im Vergleich mit MBB

Die Azetatanalyse (Abbildung 13) zeigt zunächst zur 3. Stunde keinen relevanten Unterschied zwischen der Azetatmenge von Newman in MBB und des mit Citrat supplementierten MBB. Zur 6. Stunde ist im MBB-Medium die Azetatmenge auf ein Drittel des Ausgangswertes gesunken, wohingegen im Citrat-Medium eine im Vergleich zur 3. Stunde auf mehr als das Doppelte gesteigerte Azetat-Konzentration zu finden ist. Nach 10 Stunden ist in beiden Medien kein Azetat mehr zu finden.

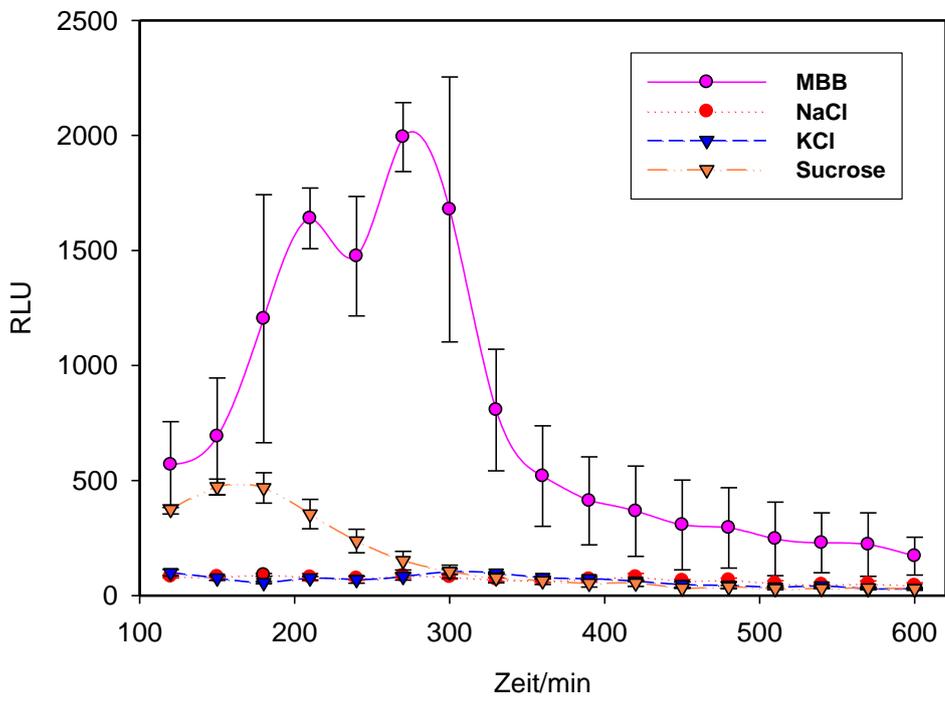
Da die bisherigen Untersuchungen mit dem Ioneneinfluss zwar eigenständig interessante Ergebnisse lieferten, aber keinen Vergleich mit NaCl gestatteten, blieb nur die Möglichkeit, andere Medien mit gleicher Osmolarität zu testen.

### 4.2.3 Effekt von Osmolarität auf *eap* und *emp*

Zum Vergleich, ob die Osmolarität eine Antwort auf das vorherige Verhalten bietet, wurden weiterhin verschiedene 1 M Medien auf ihren Effekt getestet. Hier wurden 1 M KCl, 1 M NaCl und 1 M Sucrose benutzt.



A



B

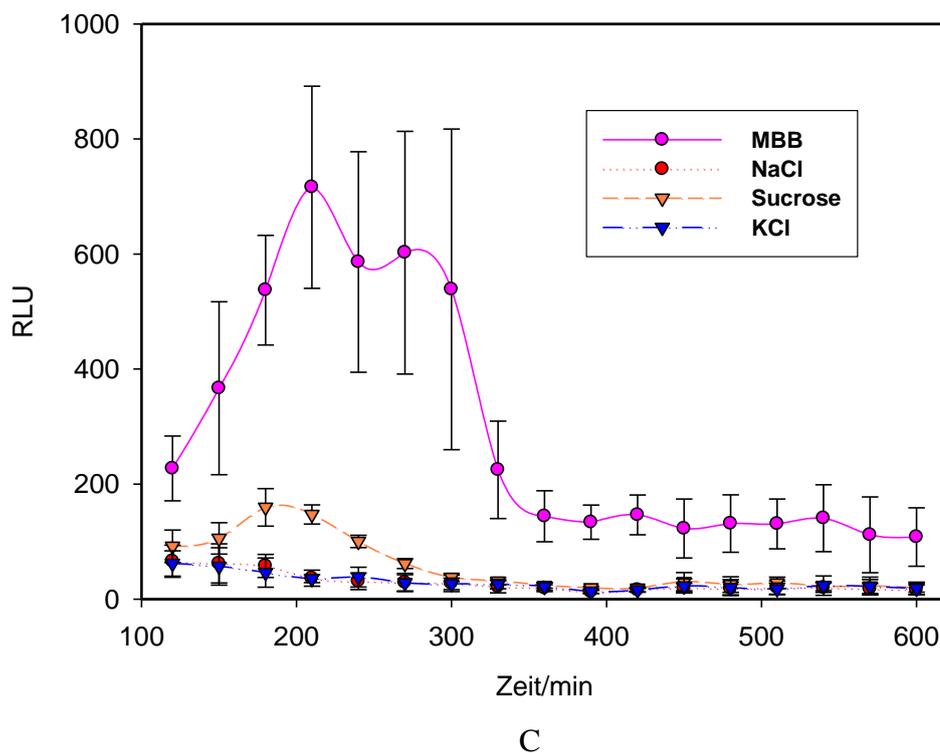


Abbildung 14:

- A Wachstumskurven von MBB, verändert mit verschiedenen 1 M Konzentrationen im Vergleich mit MBB
- B Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays der molaren Medien mit *eap-gfp-lux*
- C Darstellung der Auswertung des Reporter-Gen-Assays der molaren Medien mit *emp-gfp-lux*

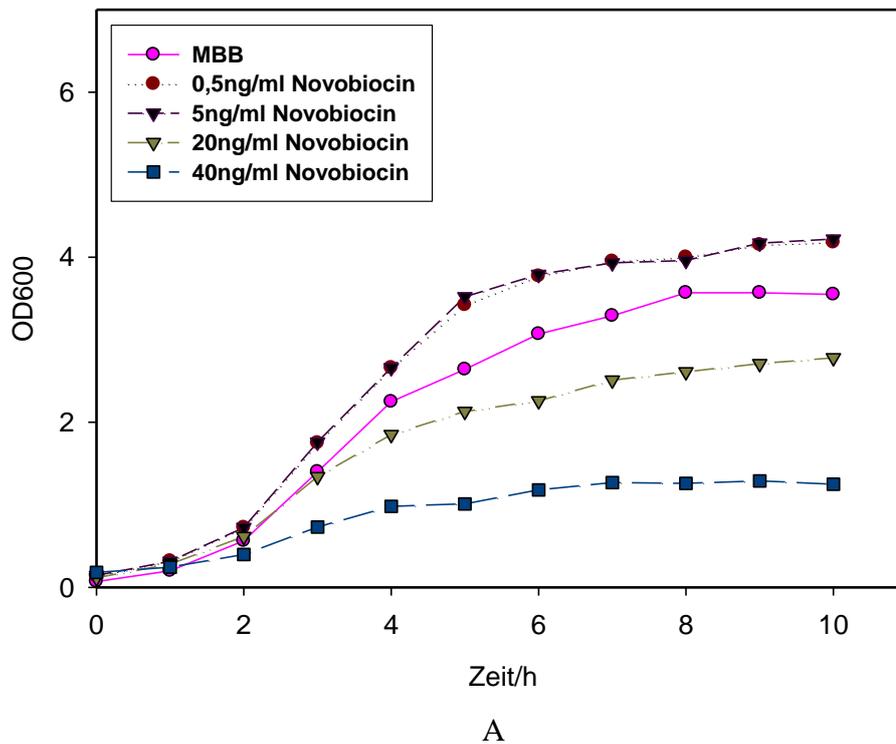
Die Wachstumskurve von Newman in den supplementierten Medien zeigt einen *S. aureus* typischen Kurvenverlauf, allenfalls geringfügig reduziert beim Eintritt in die stationäre Phase. Die Ergebnisse der Biolumineszenz lassen für *eap-gfp-lux* und *emp-gfp-lux* in den mit 1 M KCl und 1 M NaCl supplementierten Medien kaum einen Ausschlag erkennen. Die Werte bewegen sich auf niedrigem Niveau und folgen nicht den Werten der Referenzkurve. Die Werte der Konstrukte im mit 1 M Sucrose supplementierten Medium zeigen einen geringen Ausschlag, der allerdings im Gegensatz zur Referenzkurve schon zu Beginn der 3. Stunde, also etwas vorgezogen, stattfindet. Die Höchstwerte der Kurve erreichen nur ein Viertel der Werte der Referenzkurve. Weiterhin verlaufen die Werte für *eap-gfp-lux* auf einem höheren Niveau als die des *emp*-Konstruktes.

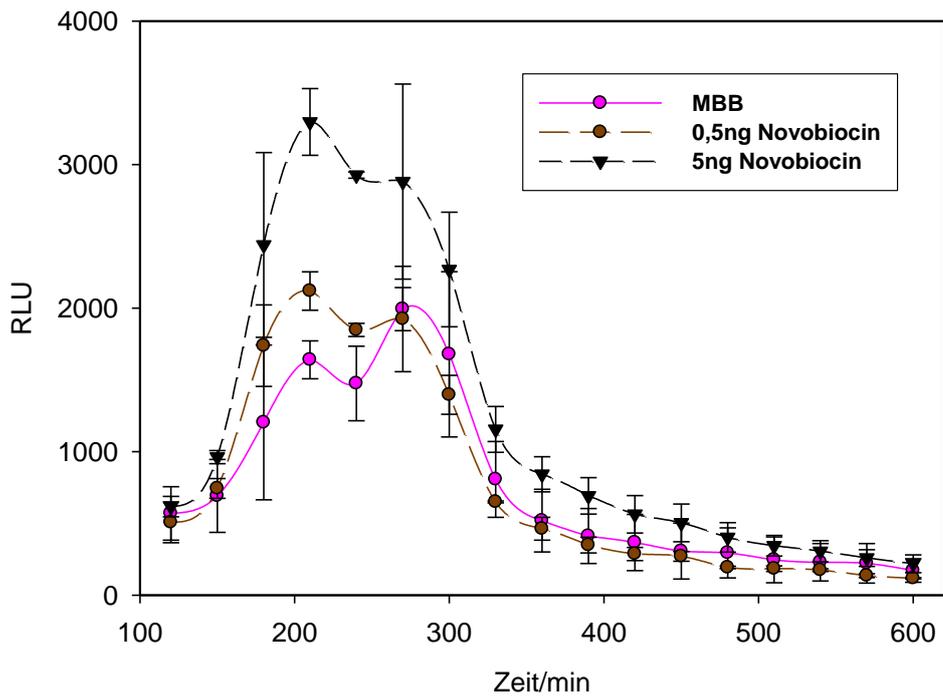
Die Ergebnisse von 1 M NaCl, 1 M Sucrose und 1 M KCl bestärken die Hypothese eines Einflusses der Osmolarität auf die *eap*- und *emp*-Expression. Da die höhere Osmolarität zu einem vermehrten Supercoiling der DNA führt, wurde zur Unterstützung dieser Hypothese

ein Versuch mit Novobiocin durchgeführt. Novobiocin inhibiert die Gyrase und wirkt einer Verdrillung entgegen.

#### 4.2.4 Effekt von Gyrase Inhibitoren

Novobiocin ist ein Antibiotikum, das mit der DNA interagiert. Es inhibiert die DNA-Gyrase, indem es verhindert, dass ATP daran binden kann, sodass die Energiezufuhr unterbrochen ist und vermindert so den Grad des negativen Supercoilings.





B

Abbildung 15:

- A Wachstumskurve unterschiedlicher Konzentrationen von Novobiocin im Vergleich mit MBB
- B Ergebnisse des Reporter-Gen-Assays mit unterschiedlichen Konzentrationen Novobiocin und *eap-gfp-lux*.

Die Wachstumskurven von Newman in MBB supplementiert mit verschiedenen Konzentrationen von Novobiocin (0,5 ng/ml, 5 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml) ergab: Für die 0,5 ng/ml Konzentration einen identischen Verlauf mit der *S. aureus* typischen Wachstumskurve; für 5 ng/ml lässt sich die Form der Kurve noch erkennen, verläuft aber mit reduzierten Dichtewerten. Die höheren Konzentrationen weisen zunehmend geringere Dichtewerte auf und eine stark verkürzte exponentielle Phase mit einem frühen Eintritt in die stationäre Phase. Für die Analyse im Reporter-Gen-Assay wurden aufgrund der Wachstumskurve nur die Konzentrationen 0,5 ng/ml und 5 ng/ml benutzt. Die Werte für *eap-gfp-lux* in diesen Konzentrationen ergaben schon zu Beginn einen steileren Verlauf als die Vergleichskurve, der Kurvenverlauf bleibt ähnlich. Die Maximalwerte liegen zwischen der 3. und der 5. Stunde und sind bis auf das Doppelte gesteigert. Nach dem Abfall nach der 6. Stunde bis zur 10. Stunde bewegen sich alle Kurven auf ähnlichem Niveau. Im Verlauf weist das mit 5 ng/ml supplementierte MBB im Gegensatz zur Wachstumskurve die höchsten Werte auf.

Durch die bisherigen Ergebnisse lag es nahe, dass die Osmolarität ein Regulationsfaktor für Eap darstellt, sodass ein Regulator, der Einfluss auf die Osmolarität hat, auch Einfluss auf Eap haben könnte.

### **4.3 *arlRS*-Mutanten Herstellung**

Die Ergebnisse des Reporter-Gen-Assays förderten Überlegungen nach einem neuen Regulationssystem.

Da zuvor bei den Medien mit 1 M NaCl, 1 M Sucrose und 1 M KCl eine starke Verringerung der Expression gefunden wurde (was möglicherweise aufgrund des verstärkten Supercoilings geschah) und die Untersuchung mit Novobiocin (das ein verringertes Supercoiling bewirkt) eine Steigerung der Expression zur Folge hatte, sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine *arl*-Mutation auf die Expression von Eap hat. Diese Mutation wurde schon in Bezug auf die Expression anderer Proteine, wie Protein A (Fournier, 2004) und ihren Einfluss auf das Supercoiling getestet. Somit war bekannt, dass ein Einfluss dieser Mutation auf das Supercoiling existiert.

Die Stämme RN6390, BF21 wurden von B. Fournier (Partnerinstitut Paris) zur Verfügung gestellt. BF21 enthält bereits die Deletionsmutation. Diese musste zum Zweck der Vergleichbarkeit mittels Phagentransduktion, wie in Kapitel 3.2.3.5 beschrieben, auf Newman übertragen werden. Zur Überprüfung, ob die Transduktion erfolgreich war, wurde eine PCR mit genomischer DNA des Transduktionsclones und den spezifischen Primern BF23/24 und BF2/9 durchgeführt. Diese Primer greifen an spezifischen Stellen an und sollten je ein PCR-Produkt der Größe 2,3 kb und 2,9 kb ergeben. Wie in gezeigt, ergab die PCR mit dem ausgewählten Klon die Produkte mit der erwarteten Größe.

Die Newman *arl*-Deletionsmutante wurde MGH1 genannt.

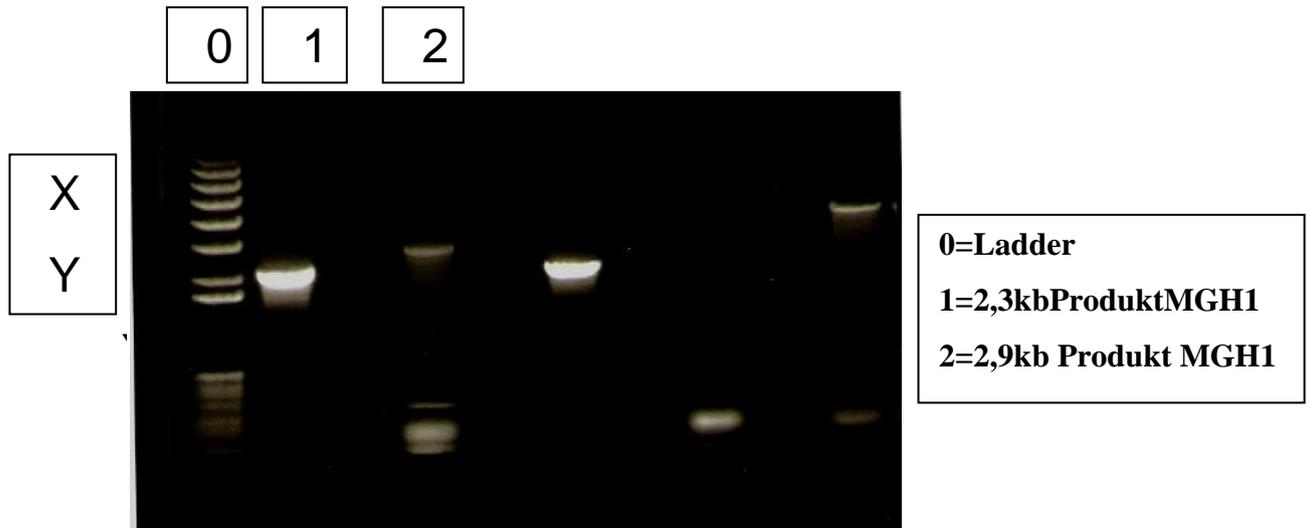


Abbildung 16: Gelelektrophorese nach PCR mit spezifischen Primern

Die PCR mit den beiden spezifischen Primern ergibt zwei spezifische Stücke unterschiedlicher Länge, die im Gel als Banden unterschiedlicher Größe (kb) zu erkennen sind.

Diese Banden stimmen mit der Größe, die aus der Literatur für diesen Mutanten bekannt war überein. Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass die Transduktion erfolgreich war. Zur Erhärtung wurde noch eine genomische DNA angefertigt.

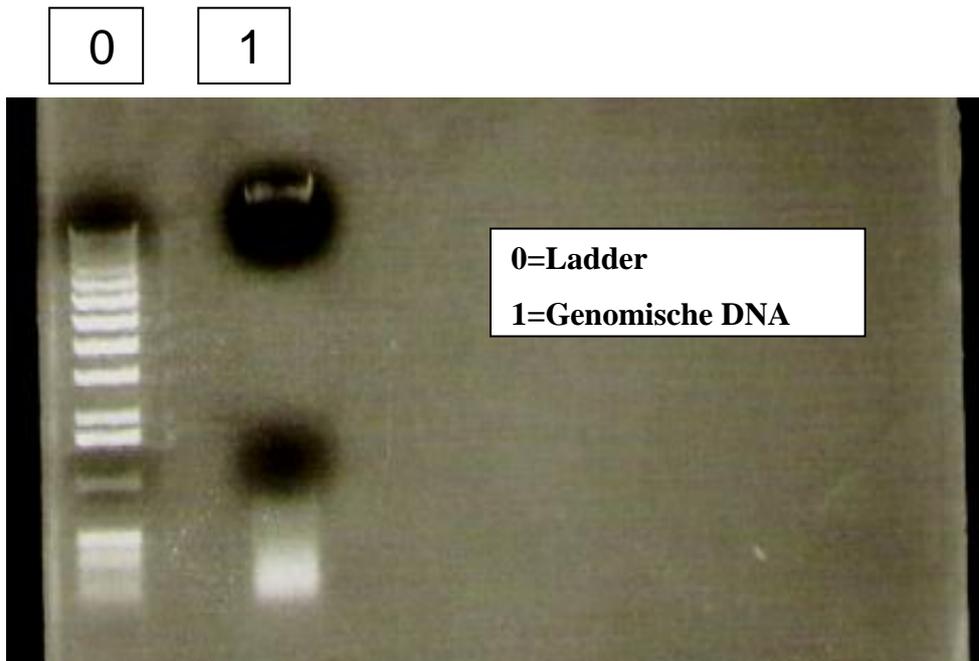


Abbildung 17: Gelelektrophorese nach Anfertigung genomischer DNA

Die Gelelektrophorese zeigt, dass die Größe von MGH1 mit der erwarteten Zielgröße übereinstimmt.

Danach wurde ein Proteingel (SDS-PAGE) zur Analyse der Produktion der Proteine hergestellt.

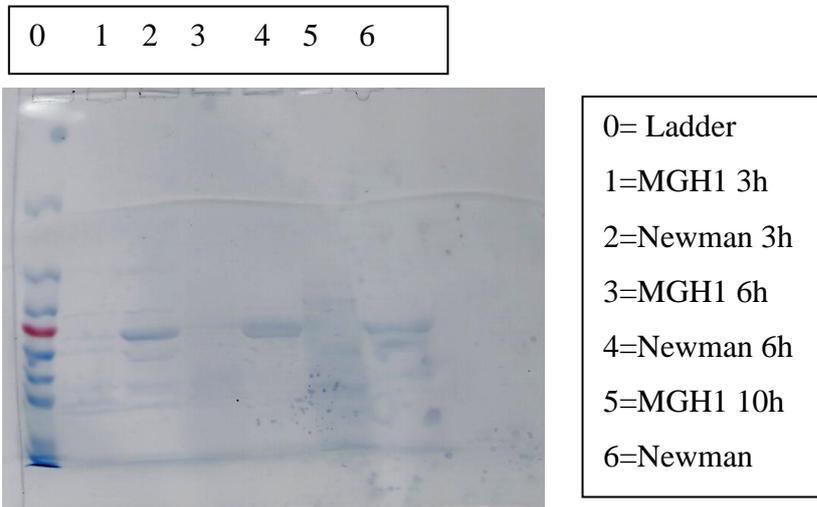


Abbildung 18: Darstellung des SDS-PAGE-Gels Newman und MGH1 nach der Trocknung

Das Proteingel zeigt die Eap-Produktion im Wildtyp Newman und dem *arlRS*-Konstrukt MGH1 an unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Breite und Stärke der Bande korreliert mit der Menge. In den Spalten für Newman kann man zu allen Zeitpunkten eine dicke Bande an der Eap-Stelle erkennen, mit einem Maximum zur 3. Stunde. In den Spalten für das MGH1 ist nur eine ganz dünne Linie ohne Maximum zu erkennen.

Nachdem das Proteingel eine verminderte Expression von Eap gezeigt hatte, stellte sich die Frage, ob dies auf einer direkten Regulation beruht oder über eine Beeinflussung anderer Proteine indirekt die Eap-Produktion beeinflusst. Somit sollte durch die RT-PCR Analyse die Expression von *eap* betrachtet werden.

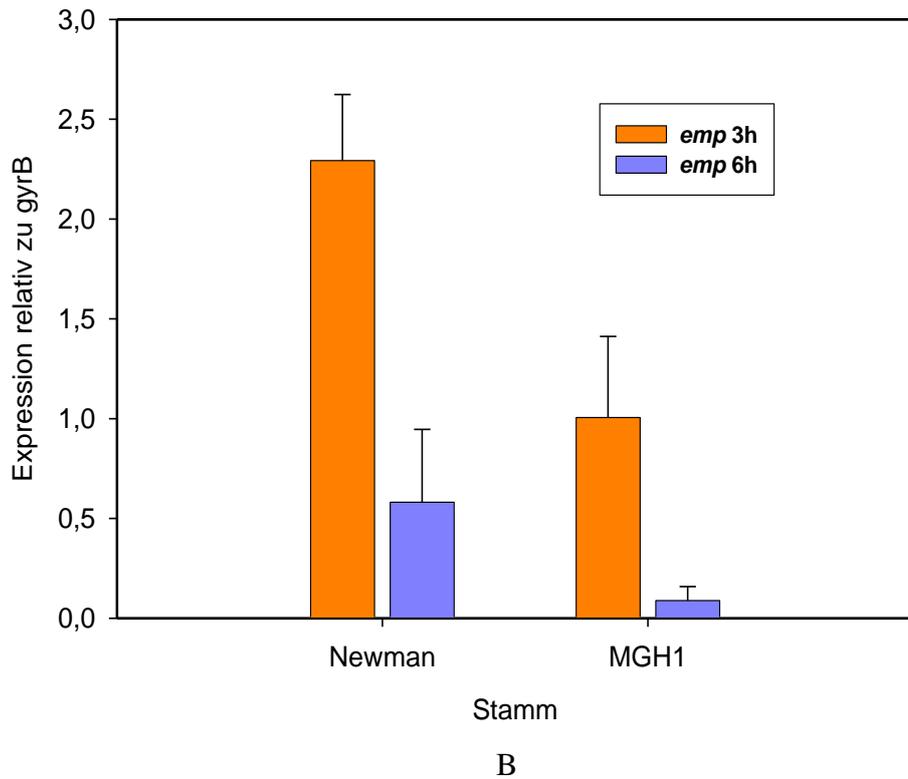
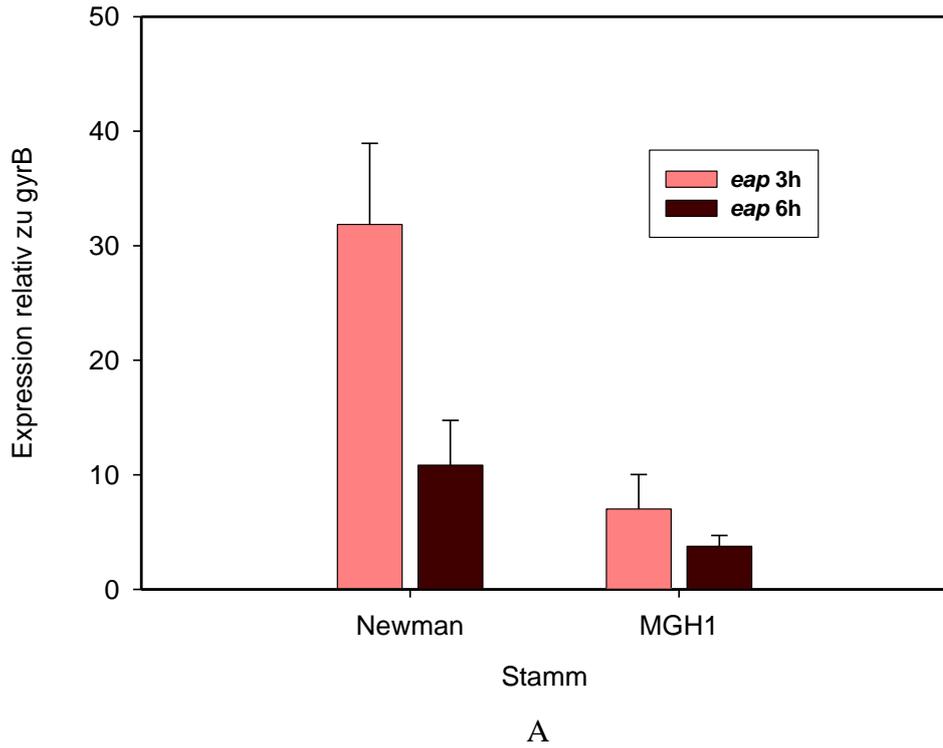


Abbildung 19:

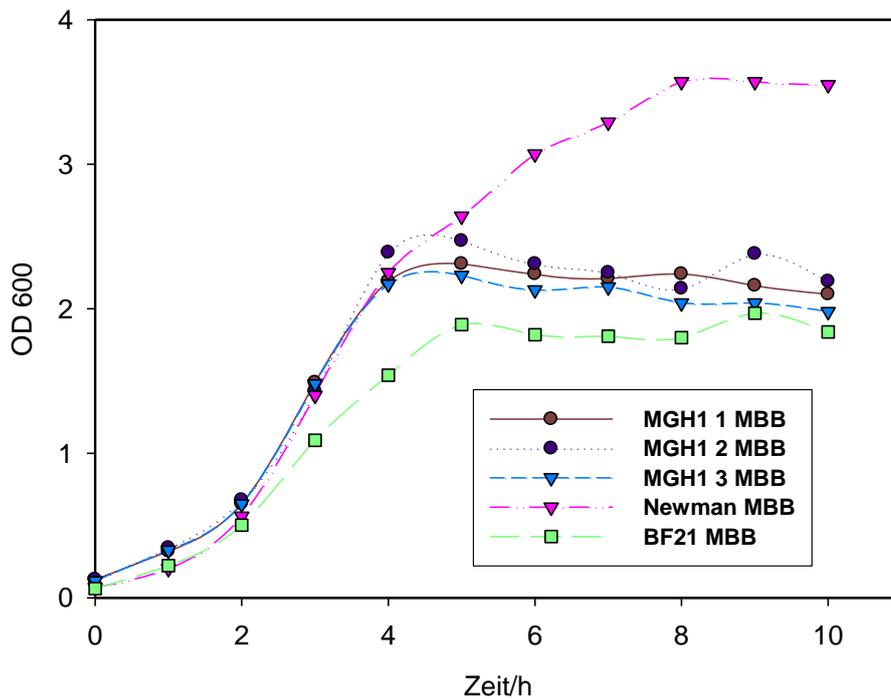
A RNA Ergebnisse in Bezug auf Expression von *eap* von MGH1 im Vergleich mit Wildtyp

B RNA Ergebnisse in Bezug auf Expression von *emp* von MGH1 im Vergleich mit Wildtyp

Die Ergebnisse der RT-Analyse für Newman und MGH1, angefertigt in MBB ergeben im Vergleich zur 3. Stunde für *eap* eine Reduktion auf ca. ein Drittel in MGH1 im Gegensatz zum Wildtyp. Zur 6. Stunde findet sich noch eine Reduktion allerdings auf ca. die Hälfte der Expression in Newman. Die Werte für beide Stämme sind zur 6. Stunde ein Drittel der Werte zur 3. Stunde.

Für *emp* ergibt sich hier eine Reduktion auf ca. ein Fünftel in MGH1 zur 3. Stunde, sowie zur 6. Stunde. Die Werte der 6. Stunde zeigen sich für beide um die Hälfte geringer als zur 3. Stunde.

Nachdem der Einfluss einer *arIRS*-Mutation auf die Expression von *eap* und *emp* nun bestätigt war, musste die Frage geklärt werden, ob auch eine Veränderung des Wachstumsverhaltens vorliegt, die die Ergebnisse erklären kann.



A

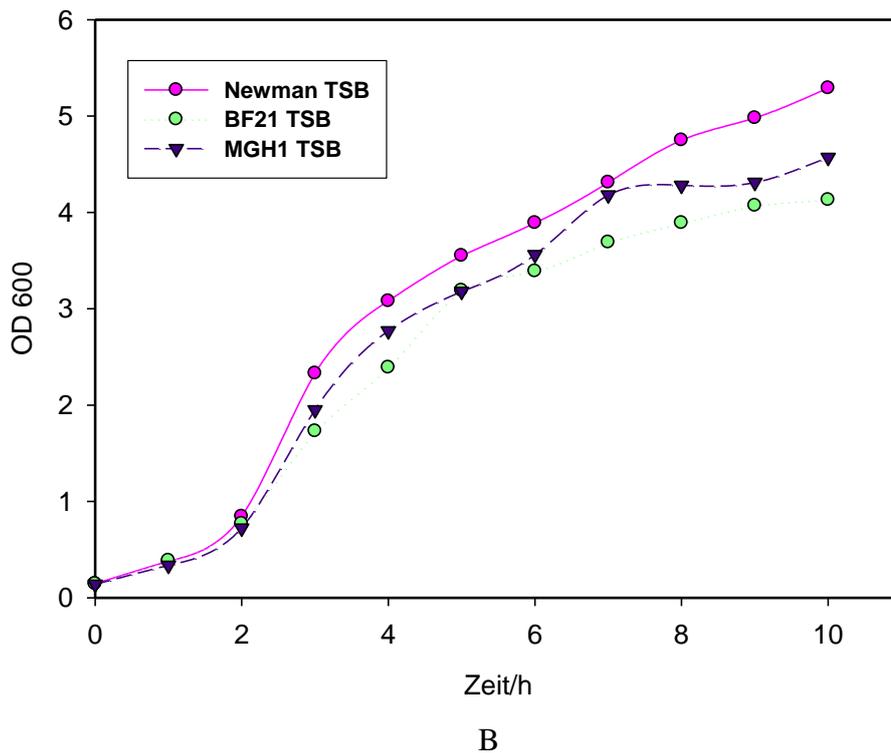


Abbildung 20:

- A Verhalten des *ar/RS* Mutanten in Bezug auf Benutzung unterschiedlicher Antibiotikazusätze (1= komplett mit AB, 2= nur Übernachtkultur, 3= keine AB) und seine Stabilität im Vergleich mit Newman und BF21 in MBB
- B Vergleich *ar/RS* mit BF21 und Newman im Medium TSB

Die durchgeführten Wachstumskurven zeigen in MBB mit Newman als dem Empfängerstamm den typischen Kurvenverlauf. Der Donorstamm BF21 zeigt in MBB einen Verlauf mit geringeren Dichtewerten von Beginn an und einem sehr frühen Eintritt in die stationäre Phase zur 5. Stunde. Die Wachstumskurve des Konstruktes verläuft ähnlich der Kurve des Donorstammes mit etwas höheren Dichtewerten und einem ebenfalls frühen Eintritt in die Wachstumsphase. Die verschiedenen Antibiotikazusätze zeigen keinen relevanten Einfluss auf die Wachstumskurve. In TSB verlaufen die Kurven von Newman, MGH1 und BF21 höher als in MBB und sind nach 10 h noch im Wachstum, sodass noch kein Übergang in die stationäre Phase zu erkennen ist. MGH1 läuft auf einer Kurve zwischen dem Donorstamm BF21 und dem Empfängerstamm Newman. Newman zeigt den höchsten Verlauf.

Nach dem Ergebnis der Wachstumskurve mit Newman und dem Vergleich mit der Literatur sollte durch den Wechsel des Kulturmediums geklärt werden, ob die Veränderung dem Medium oder der Mutation allein zuzuschreiben ist.

Um das veränderte Wachstumsverhalten näher zu beleuchten, wurden Versuche über den pH-Wert und die Azetatkonzentration durchgeführt. Dabei sollte herausgefunden werden, ob die Veränderung des pH-Wertes oder ein metabolischer Defekt für die Veränderung in der Wachstumskurve verantwortlich sind. Diese Messungen wurden mit Leermedium, MBB+Newman und MBB+MGH1 vorgenommen.

In der Darstellung ist zu sehen, dass die Medien sich untereinander nur geringfügig in ihrem pH-Wert unterscheiden. Der Ausgangswert des Mediums war jeweils auf pH 7 eingestellt.

	3h	6h	10h
MBB	6,91	7,98	8,46
MGH1	6,56	7,8	8,38

Tabelle 1: pH-Wert Tabelle

Die Analyse der pH-Werte für Newman und MGH1 (inkubiert in MBB) zeigt, dass der pH-Wert um etwas mehr als eine Einheit ansteigt. Die Werte von MGH1 bleiben stets unter den Werten des Wildtyps, allerdings so gering, dass kein relevanter Unterschied zu erkennen ist.

Weiterhin sind die Ergebnisse des Azetattests dargestellt:

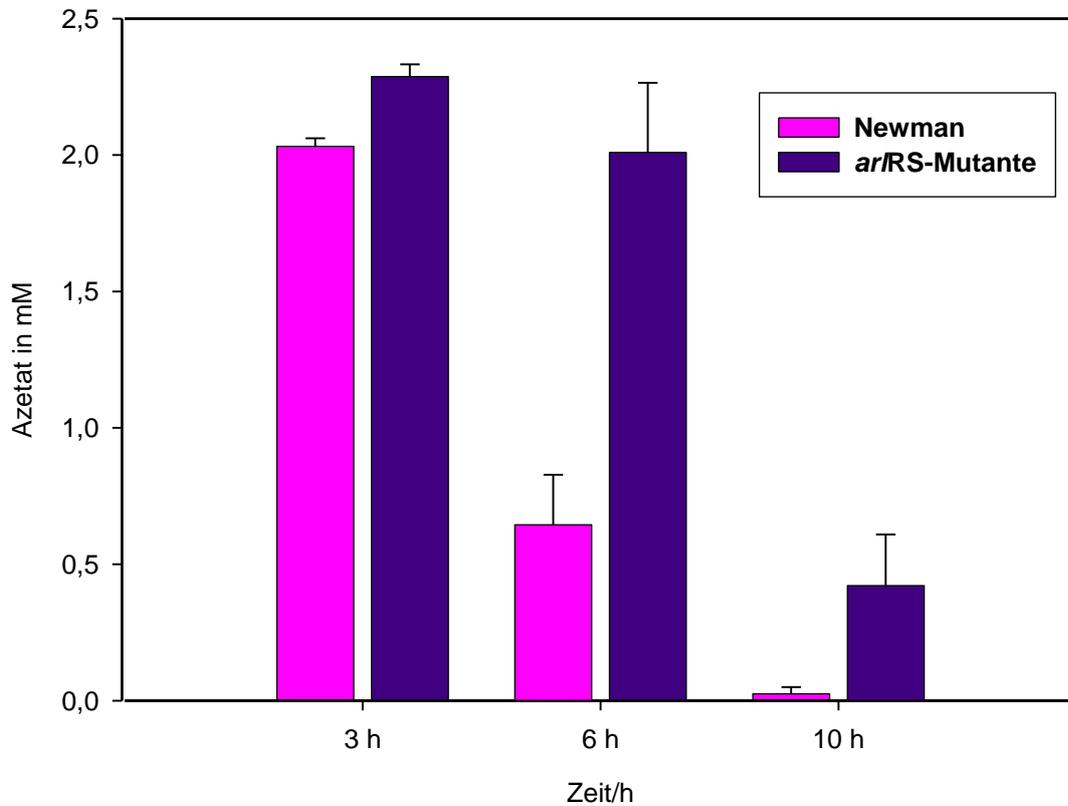
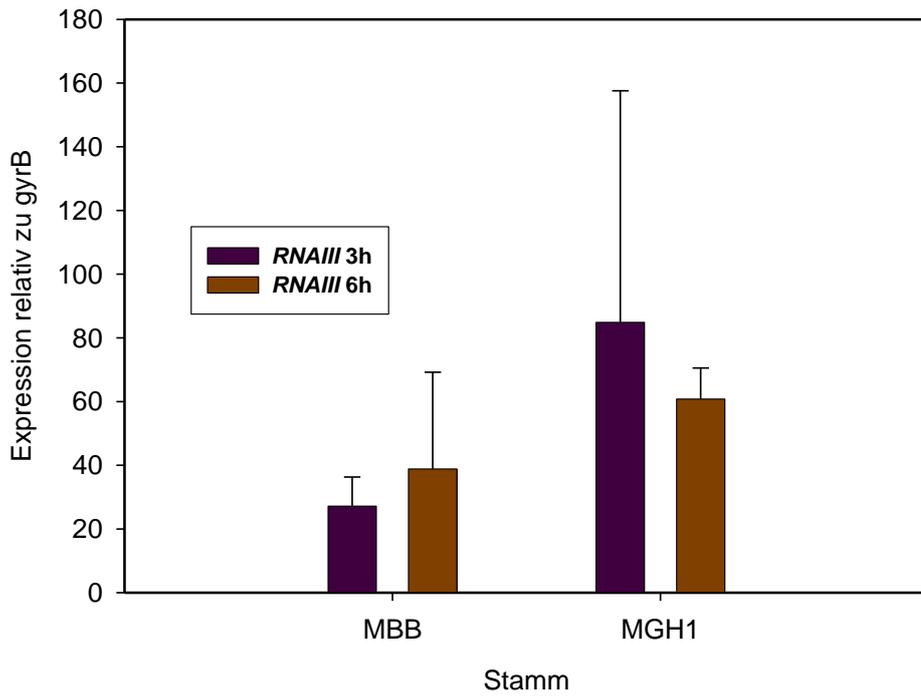


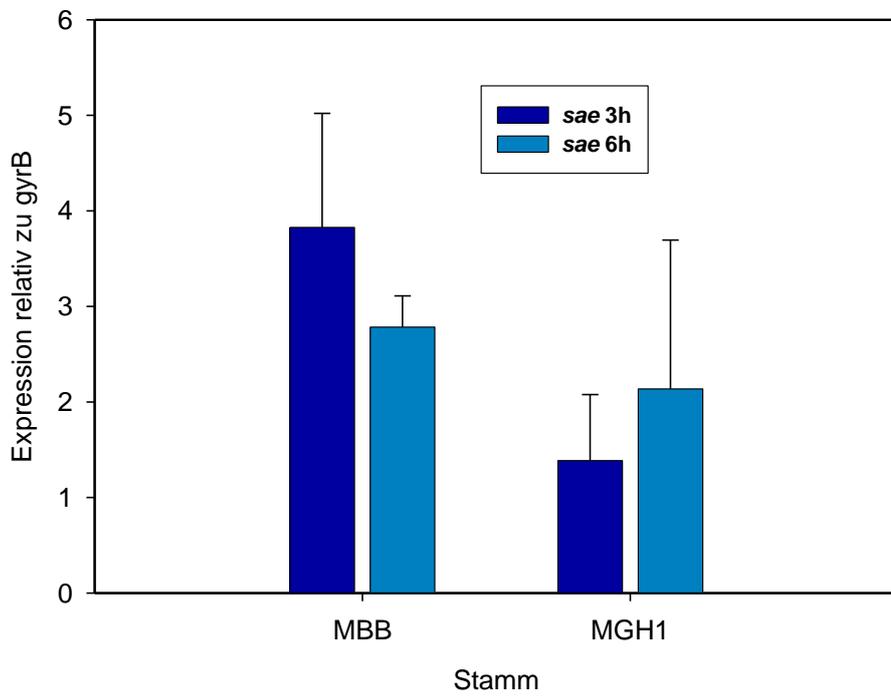
Abbildung 21: Analyse des Azetatverbrauchs von Wildtyp Newman und MGH1 in MBB

In der Analyse des Azetats von Newman und MGH1 (inkubiert in MBB) ist zu erkennen, dass die Medien zum 3 h Zeitpunkt auf ähnlichem Niveau liegen, nach 6 h aber schon stark divergieren. Die Azetatkonzentration von Newman hat sich auf ein Drittel reduziert, wohingegen die Konzentration von MGH1 nur ca. ein Fünftel zurückgegangen ist. Nach 10 h ist nur die *arl*-Mutante noch im positiven Bereich. Der Wert beträgt ca. ein Viertel des Ausgangswertes, wohingegen für Newman kein Azetat mehr zu registrieren war. Insgesamt zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem ursprünglichen Stamm und der hergestellten Mutante.

Danach sollte mittels RNA und RT-PCR eine Analyse der Veränderung der Gene durch die verschiedenen Medien und MGH1 durchgeführt werden.



A



B

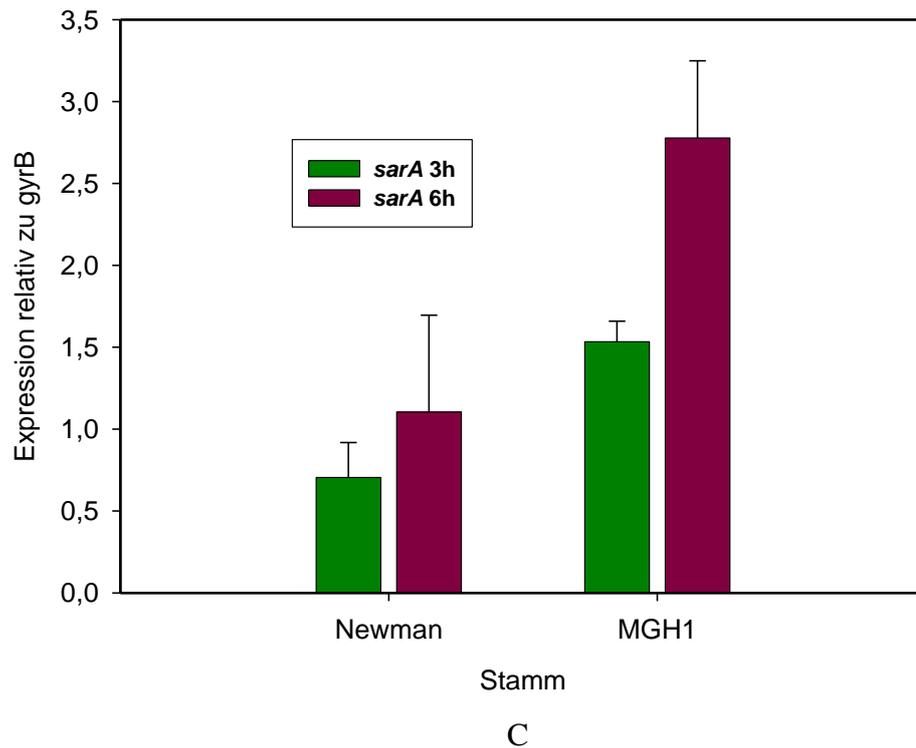


Abbildung 22:

- A Analyse des Regulators *RNAlII* in Wildtyp Newman und MGH1 mittels RT-PCR
- B Analyse des Regulators *sae* in Wildtyp Newman und MGH1 mittels RT-PCR
- C Analyse des Regulators *sarA* in Wildtyp Newman und MGH1 mittels RT-PCR

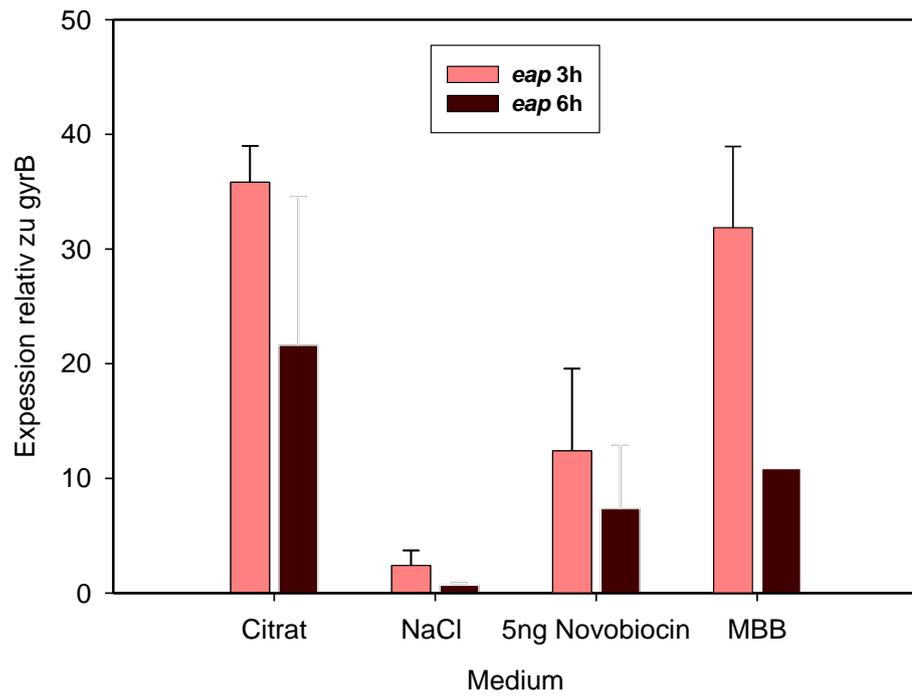
Hier ist zu sehen, dass *RNAlII*, vor allem zum 3 h Zeitpunkt, in MGH1 gesteigert ist. Dagegen ist *sae* im Vergleich zum Wildtyp im MGH1 reduziert. *sarA* ist dahingegen erhöht in MGH1 vor allem zum 6 h Zeitpunkt.

Zuletzt musste noch die Beeinflussung weiterer Gene durch die Mutation und die zugesetzten Umweltfaktoren geklärt werden. Dies erfolgte wiederum mit einer RT-Analyse der verschiedenen Medien.

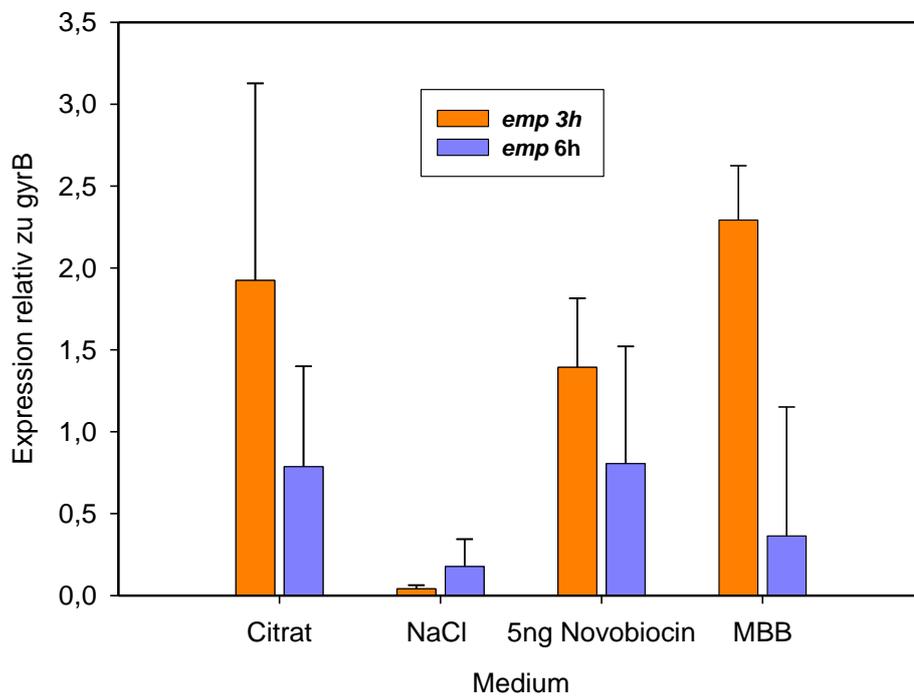
#### 4.4 RNA

Für die RNA wurden nur 3 verschiedene Medien ausgewählt, von denen man sich anhand der Daten des Reporter-Gen-Assays besondere Ergebnisse erwartet hat.

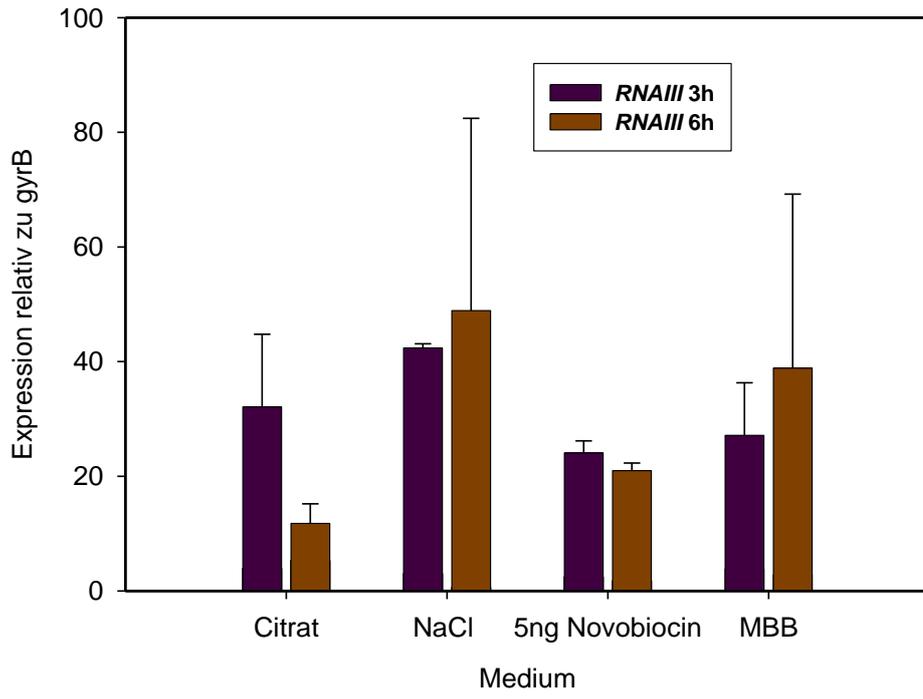
Diese Medien waren MBB jeweils mit Newman und MGH1, 1 M NaCl, 0,25 % Citrat und 5 ng Novobiocin. Die RNA-Herstellung diente dazu, die Ergebnisse des Reporter-Gen-Assays zu komplettieren und zu bestätigen. Als Referenzmedium wurde wieder MBB verwendet.



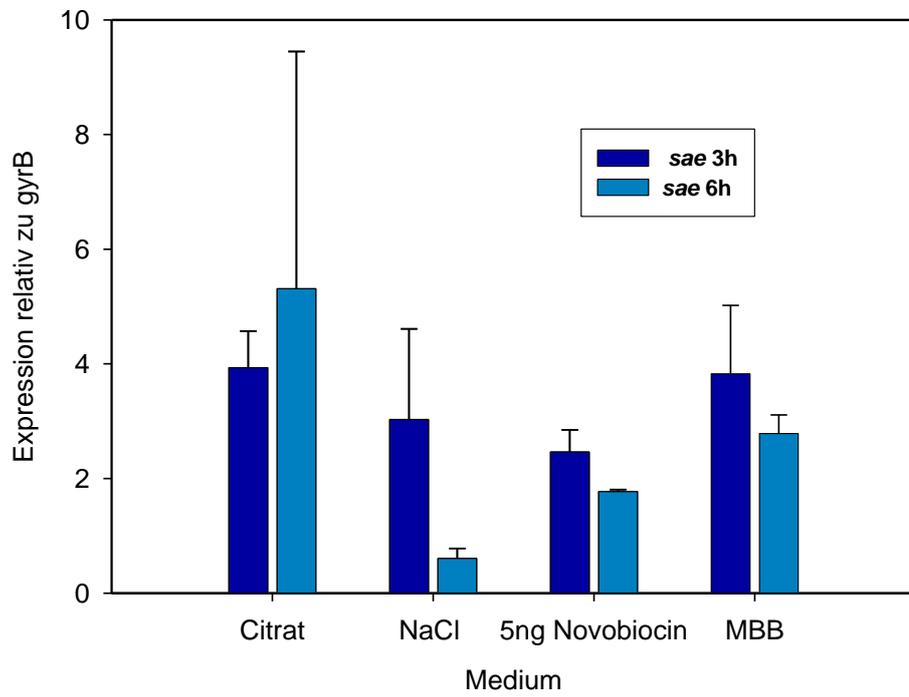
A



B



C



D

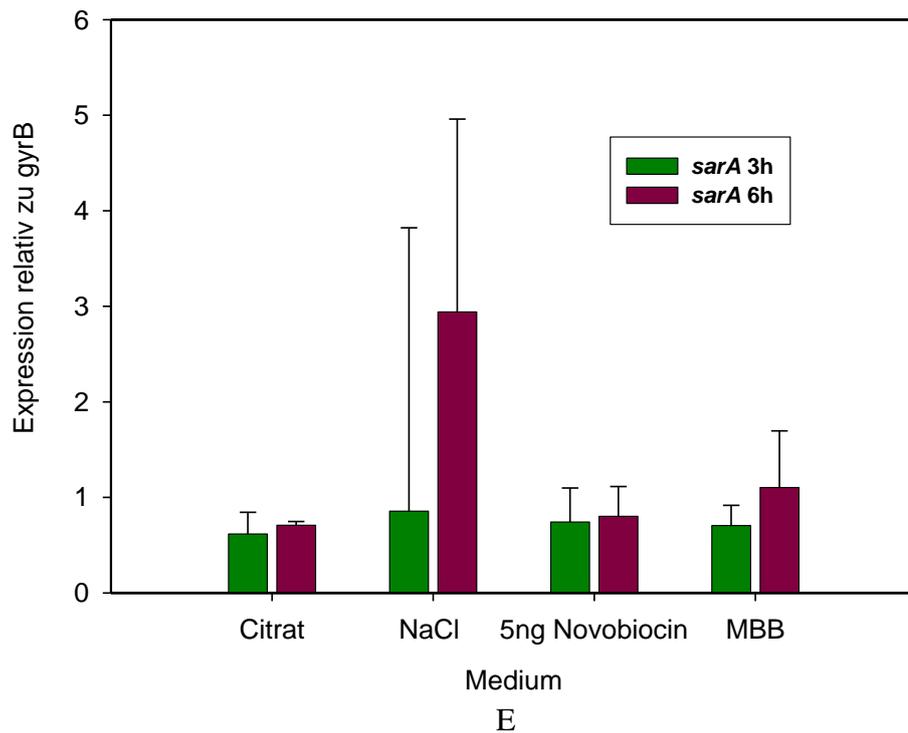


Abbildung 23:

- A Darstellung der Analyse von *eap* im Vergleich von Newman in MBB, Citrat, 1 M NaCl und 5 ng Novobiocin
- B Darstellung der Analyse von *emp* im Vergleich von Newman in MBB, Citrat, 1 M NaCl und 5 ng Novobiocin
- C Darstellung der Analyse wichtiger Gene (*RNAIII*) im Vergleich von Newman in MBB, Citrat, 1 M NaCl und 5 ng Novobiocin
- D Darstellung der Analyse wichtiger Gene (*sae*) im Vergleich von Newman in MBB, Citrat, 1 M NaCl und 5 ng Novobiocin
- E Darstellung der Analyse wichtiger Gene (*sarA*) im Vergleich von Newman in MBB, Citrat, 1 M NaCl und 5 ng Novobiocin

In Bild A konnte die höchste Aktivität für *eap* im Citrat Medium zum 3 h Zeitpunkt festgestellt werden, gefolgt von Novobiocin und schließlich NaCl. Die Werte in Citrat sind ca. 10 fach höher als die von NaCl, die Werte von Novobiocin sind auf ein Drittel reduziert.

Die Ergebnisse für *emp* in Bild B verlaufen in allen Medien reduziert, am höchsten sind die Werte im NaCl Medium.

In Bild C sind die Ergebnisse für die betrachteten Medien und dem Gen *RNAIII* dargestellt. Die höchsten Werte wurden für NaCl sowohl zum 3 h als auch zum 6 h-Zeitpunkt gesehen. Danach folgen die Werte für Citrat, wobei hier der 3 h Wert etwa 2,5-mal so hoch

war wie der 6 h Wert. Die Ergebnisse von Novobiocin waren die Niedrigsten. Hier zeigte sich ebenfalls der 3 h Wert erhöht, aber nur leicht höher als der 6 h Wert.

Bild D stellt die Ergebnisse von *sae* dar. Hier wurde das höchste Ergebnis bei Citrat zum 6 h Zeitpunkt gesehen. Der 3 h Wert von Citrat liegt etwas unter der Hälfte des 6 h Wertes. Übertroffen wird dieser noch vom 3 h Wert von NaCl. Der 6 h Wert von NaCl ist auf ein Drittel des 3 h Wertes reduziert und stellt damit den niedrigsten gemessenen Wert dar. Die Werte von Novobiocin liegen zwischen denen der anderen Medien, hier ist der 3 h Wert leicht erhöht zum 6 h Wert.

In Bild E sind die Ergebnisse für *sarA* dargestellt. Das höchste Ergebnis wurde für NaCl zum 6 h Zeitpunkt festgestellt. Dieser liegt ca. 6-fach höher als die restlichen Werte. Der Wert für NaCl 3 h und die beiden anderen Medien zeigen nur geringfügige Abweichungen und bewegen sich auf demselben Niveau.

## 5. Diskussion

Im Zusammenhang mit *S. aureus* wurden schon verschiedene Gene und ihre Expressionsunterschiede in Bezug auf ihre Antwort bei Veränderungen des Umgebungsmilieus untersucht. Für die Gene *agr*, *sae*, *RNAIII* liegen umfangreiche Untersuchungen vor, woraus ersichtlich ist, dass *S. aureus* in der Lage ist, seine Genexpression den Umweltbedingungen gemäß zu verändern. Die untersuchten Umweltbedingungen bezogen sich auf Osmolarität und Ionenwirkungen.

Das Bakterium benutzt diverse Wege, wie zum Beispiel Veränderung des DNA-Supercoilings oder Membransensoren, sowie verschiedene bislang weitgehend unbekannte Wege, um auf Umweltveränderungen zu reagieren.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Veränderungen der Gene *eap* und *emp* auf verschiedene Umweltbedingungen, die auch im menschlichen Körper eine große Rolle spielen, zu untersuchen.

### 5.1 Herstellung von MGH0 und Reporter-Gen-Assay

Es existieren verschiedene Reporter-Gen-Assays. Die Bekanntesten dabei sind: Cat (Chloramphenicol Acetyltransferase), Luciferase-, Galactosidase-, Glucuronidase-, alkaline Phosphatase und Green-Fluoreszenz Protein. Die meisten dieser Assays benötigen allerdings ein Substrat um eine Reaktion durchzuführen. Dahingegen benötigt das hier benutzte Assay mit *gfp-lux* kein Substrat (Schenborn E, 1999). Das Lumineszenz Reporter-Gene-Assay mit *gfp-lux* wurde außerdem gewählt, da es hier möglich war, möglichst viele Proben der beiden Gene in den unterschiedlichen Medien in Echtzeit zu erfassen und direkt zu vergleichen. Hinzu kommt die gute Handhabung, da nur zu Beginn das Reaktionsgemisch pipettiert werden muss, die halbstündige Messung von Dichte und Lumineszenz erfolgt selbstständig durch das Messinstrument.

Um die Experimente mit dem Reporter-Gen-Assay durchführen zu können, musste zunächst pEmp-gfp-lux hergestellt werden. pEap-gfp-lux war im Labor bereits fertig vorhanden (Harraghy et al 2005). Mittels dergleichen Klonierungsstrategien wurde auch pEmp-gfp-lux hergestellt. Dieser Stamm (MGH0) wurde dann im Reporter-Gen-Assay getestet. In diesem Test konnte ein ähnlicher Verlauf wie der der Eap-Variante festgestellt werden, allerdings mit einer um 10-fach reduzierten Expression. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Klonierung erfolgreich durchgeführt wurde.

## 5.2 Analyse der Ergebnisse

### 5.2.1 Umweltbedingungen, die die Expression von *eap* und *emp* beeinflussen

Im weiteren Verlauf wurden Wachstumskurven in MBB, das für die jeweiligen Experimente dementsprechend modifiziert wurde, angefertigt und danach diese Medien im Reporter-Gen-Assay mit dem Referenzmedium verglichen. Es wurde im Reporter-Gen-Assay die Expression von *eap* und *emp* in den unterschiedlichen Medien verglichen.

#### 5.2.1.1 NaCl

Als ein wichtiger Bestandteil des bakteriellen und humanen Zytoplasmas stellt NaCl auch einen wichtigen Anhaltspunkt für die Forschung dar.

*S. aureus* ist ein sehr halotolerantes Bakterium. Frühere Studien zeigten bereits die Anpassungsfähigkeit in Bezug auf veränderte Umweltsalzkonzentrationen (Vijaranakul, 1995). Aber nicht nur das Überleben des Bakteriums, sondern auch eine Vermehrung und Invasion konnten beobachtet werden.

Die Frage, die sich in Bezug auf *Eap* und *Emp* stellt, ist, ob deren Expression eine Beeinflussung durch eine Veränderung der Umgebungs-NaCl-Konzentration erfährt.

Die Wachstumskurven zeigten keine auffälligen Veränderungen. Auch eine Konzentration von 1 M NaCl suppressierte das Wachstum nicht. Regassa/Betley zeigten in ihrer Veröffentlichung (Regassa, 1993), dass in einem BHI-Medium eine Konzentration von 1,2 M NaCl schon verlangsamt auf das Wachstum wirkt. Wobei dabei zu betonen ist, dass eine gewisse Menge NaCl zum guten Wachstum erforderlich ist, da Wachstum in einem Medium ohne jeglichen NaCl-Gehalt ebenfalls suppressiert ist. Es ist also anzunehmen, dass die bestmögliche Konzentration zwischen einem Medium ohne NaCl und einem mit 0,25 M NaCl liegt. Es steht fest, dass die in MBB (0,08 M) enthaltene Konzentration eine höhere Expression aufwies. Also war die hier verwendete Konzentration noch nicht inhibierend. Dagegen konnte im Reporter-Gen-Assay die schon erwähnte konzentrationsabhängige Verminderung gesehen werden. Da keine Inhibierung des Wachstums vorlag, konnte diese Verminderung nicht durch ein verändertes Wachstum erklärt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die NaCl-Konzentration einen hemmenden Effekt auf die Ausbildung von *Eap* und *Emp* besitzt. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Einer davon lässt vermuten, dass die Bakterien die Veränderung im Umgebungsmilieu „messen“ und über bestimmte Mechanismen, z.B. Zwei-Komponenten-Regulationssysteme, die weitere Genexpression beeinflussen (Fournier, 2000). Dieser Mechanismus hilft dem Bakterium, sich an veränderte

Umweltbedingungen anzupassen. Somit kann das Bakterium zwar in diesem Milieu gedeihen, ist aber in seiner Invasionsfähigkeit eingeschränkt. Der Einfluss der Osmolarität auf die Genexpression von *S. aureus* wurde auch schon von verschiedenen Gruppen getestet. Diese Studien ergaben für die Virulenzgene *spa*, *hla*, *tst* und *eta*, dass eine Konzentration von 1 M NaCl die Expression supprimiert. Für *tst* konnte eine 10%-Verminderung registriert werden. Weiterhin wurde für *hla* und *eta* eine höchste Expression in einem Medium ohne NaCl gemessen. Dies konnte hier nicht festgestellt werden, allerdings wurden in den beiden anderen Studien die Medien BHI und TSB benutzt, die mehr Nährstoffe enthalten und somit das Wachstum besser fördern. Die Divergenz in Bezug auf die Ergebnisse in einem Medium ohne NaCl kann möglicherweise durch die unterschiedlichen Medien und ihren Nährstoffgehalt und die unterschiedlichen Empfindlichkeit der Gene auf dieselben Umweltbedingungen erklärt werden. Es ist denkbar, dass eine Veränderung der Osmolarität in geringeren Konzentrationen unterschiedlichen Einfluss auf die Expression der beiden Proteine hat, höhere Konzentrationen aber generell inhibierend wirken (Ohlsen, 1997), (Sheehan, 1991), (Fournier, Klier, 2004), (Chan, 1998).

Daneben konnte auch der Einfluss hoher Osmolarität auf Regulatorgene wie *sarA* und *sae* gezeigt werden. Vor allem *agr* ist intensiv in Bezug auf Veränderungen bei Beeinflussung durch die Umwelt untersucht worden. Chan und Foster untersuchten den Einfluss auf *sarA* (Chan, 1998). Die benutzte Konzentration in der Studie betrug 1 M NaCl; dieses wurde zum BHI Medium gefügt und das Bakterium wuchs ein wenig schlechter in dieser Konzentration. *sarA* wurde durch diese Konzentration mäßig vermehrt exprimiert. Für *sae* konnte eine Blockade bei Benutzung von 1 M NaCl festgestellt werden (Novick, 2003). Dies könnte die niedrige Expression von *eap* erklären, da der Hauptregulator ebenfalls durch 1 M NaCl supprimiert wird. Somit stimmen die gefundenen Ergebnisse für *eap* und *emp* nahezu vollständig mit den bisherigen Ergebnissen anderer Regulator-Gene überein.

Biologisch gesehen ist Natriumchlorid eine wichtige Voraussetzung für das Transmembranpotenzial, pro- und eukaryontisch. Im Extrazellulärraum liegt Na als wichtigstes Kation in der Konzentration 135-145 mmol/l vor. Die intrazelluläre Konzentration ist mit ca. 12 mmol/l deutlich niedriger. Diese Konzentrationen können die Invasion des Bakteriums beeinflussen. Bei höherer molarer Konzentration besteht eine verminderte Expression von *eap* und *emp*. Dies ist beim Krankheitsbild der Cystischen Fibrose zu sehen. Hier findet sich eine erhöhte Anfälligkeit, bis zum 10. Lebensjahr an einer Infektion mit *S. aureus* zu erkranken. In einer Studie von Verghese und Boucher (Verghese, 1998) wurde die Zusammensetzung der Bronchialflüssigkeit beschrieben. Die Zusammensetzung von NaCl

variiert von 200 bis 285 mM, also von hypo- bis isoosmolar. Allerdings existiert keine generell definierte Aussage über die Zusammensetzung. Diese Konzentration liegt teilweise, wie in den Ergebnissen gesehen, zwischen der Konzentration 0 M NaCl und 0,25 M NaCl. Bei 0,25 M NaCl wurde eine geringere *eap* Expression als bei ungesuppliertem MBB gesehen, das wiederum eine Konzentration von 80 mM enthält. Somit ist es möglich, dass eine Konzentration unterhalb von 0,25 M begünstigend auf die Produktion von Eap wirkt. Diese Konzentration wurde als Konzentrationsreihe aber nicht getestet. Die Annahme der Studie, dass die Neutrophilen-Aktivität dieser Patienten peripher nicht auffällig ist, aber die Zusammensetzung der Bronchialflüssigkeit eine inhibierende Funktion auf die Neutrophilen hat, was einen begünstigenden Faktor für eine bakterielle Infektion darstellen würde, konnte nicht ausreichend mit den vorliegenden Ionenkonzentrationen bewiesen werden (Verghese, 1998).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die meisten Gene ähnlich wie *eap* auf höhere Konzentrationen von NaCl mit einer Verminderung der Expression reagieren. Das Bakterium scheint zwar weiter zu wachsen, wie die Wachstumskurven zeigen, aber die Expression der Virulenzfaktoren zu verringern.

#### 5.2.1.2 Ionenstress mit MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>

Nach den Ergebnissen von NaCl sollte nun der Effekt anderer Ionen auf die Expression von Eap und Emp, sowie das bakterielle Wachstum untersucht werden. Hier sollte die Frage beantwortet werden, ob sich für MBB versetzt mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 20 mM MgCl<sub>2</sub> ebenfalls eine Suppression ergibt wie für NaCl. Im menschlichen Körper ist Mg<sup>2+</sup> vor allem beteiligt als Enzymaktivator in verschiedenen ATP-, GTP-abhängigen Reaktionen, sowie als Cofaktor für die DNA Polymerasen. Die Wachstumskurven von MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub> verliefen ähnlich wie die Vergleichskurve von MBB. Die MgCl<sub>2</sub> Wachstumskurve lässt eine leicht steilere und verlängerte exponentielle Phase erkennen. Im Reporter-Gen-Assay ergab sich für die Expression von *eap* und *emp* keine derartige Verminderung, für *emp* sogar eine Steigerung der Expression, die *eap*-Expression war ca. ein Drittel geringer als die von MBB. Für CaCl<sub>2</sub> ergab sich in dem dargestellten Experiment sowohl bei *eap* als auch bei *emp* eine Verminderung, bei *eap* verlief die Kurve auf ca. 25% reduziert, bei *emp* war ein Kurvenverlauf kaum mehr zu erkennen.

Chan und Foster (Chan, 1998) konnten in einer Studie mit 20 mM MgCl<sub>2</sub> und der Expression von *tst* durchgeführt in BHI zeigen, dass sich eine zweifache Verminderung von *tst* ergab. Diese Konzentration bot die Grundlage für unsere Versuche, allerdings konnten die

Ergebnisse der Literatur nur für *eap* bestätigt werden, da *emp* einen gesteigerten Verlauf nahm. Weitere Vergleiche mit der Literatur ergaben, dass eine geringe Konzentration von Magnesium einen positiven Einfluss auf die Produktion von Exoproteinen hat, aber eine Steigerung der Konzentration eine Verminderung bewirkt hat (Kiyota, 1989). In den Versuchen von Mills, Dodel und Kass (Mills, 1986) wurden verschiedene Konzentrationen von  $Mg^{2+}$  in einem Kulturmedium getestet, von 0,02 mM bis 1,6 mM. Niedrigere Molzahlen wie 0,02 mM-0,04 mM ermöglichen ein leicht suboptimales Wachstum und eine vermehrte Produktion von Exoproteinen. In einer anderen Studie von Bhat, Joseph, Shivananda (Bhat, 1994) stellte sich heraus, dass die Mindestkonzentration zum Wachstum von *S. aureus* 0,01 mM  $Mg^{2+}$  ist. Ein suboptimales Verhalten konnte allerdings anhand der hier vorliegenden Daten (mit 20 mM) der Wachstumskurve im Vergleich zu MBB nicht bestätigt werden. Allerdings wurde hier auch nur eine Konzentration getestet und nicht eine Konzentrationsreihe, sodass nur eine Momentaufnahme existiert und kein Verlauf. Die beschriebene Studie gibt die Möglichkeit, die benutzte Konzentration von 20 mM in ihrer Wirkweise einzuordnen. Das Optimum für das Wachstum soll laut Mills, Dodel und Kass (Mills, 1986) bei 0,4 mM  $Mg^{2+}$  liegen. Hier ist das Wachstum am Besten, die Proteinproduktion aber eingeschränkt.

Für Calcium wurde ebenfalls die von Chan und Foster (Chan, 1998) getestete Konzentration von 5 mM benutzt. Chan und Foster konnten in ihrer Studie eine bis auf 70 % reduzierte Expression für die getesteten Gene feststellen. Für *Eap* konnte hier im Reporter-Gen-Assay sogar eine Reduktion auf 25 % festgestellt werden.

Insgesamt konnte eine Verminderung der Expression verzeichnet werden, außer im Fall  $MgCl_2$  *emp*. Hier besteht ein Regulationsunterschied zwischen *eap* und *emp*. Während die Expression von *eap* in  $MgCl_2$  unter der des Referenzmediums bleibt, steigt die von *emp* in demselben Medium darüber. Dies beweist zunächst, dass Chlorid nicht der supprimierende Faktor sein kann, da das Ergebnis von  $MgCl_2$  *emp* dagegen spricht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *eap* und *emp* nicht immer gleich auf eine Veränderung der Umweltbedingungen reagieren, somit in einigen Bereichen unterschiedlich reguliert werden. Weiterhin ergab sich nur für  $CaCl_2$  eine ähnlich hohe Suppression wie für 1 M NaCl. Die nächste Frage war nun, ob eine Verminderung, anstatt eine Zugabe, zweiwertiger Ionen Einfluss hat.

### 5.2.1.3 Ionenchelatoren Citrat und EDTA

Mittels MBB versetzt mit 0,5 mM EDTA und 0,25 % Citrat sollte, nachdem vorher ein vermehrtes Angebot an Ionen herrschte, die Expression bei der Verminderung zweiwertiger Ionen und dabei vor allem  $\text{Ca}^{2+}$  durch Chelatbildung gezeigt werden. Durch die vorherigen Versuche, die eine Verminderung von *eap* bei  $\text{CaCl}_2$  zeigten, könnte vermutet werden, dass bei der Verminderung von  $\text{Ca}^{2+}$  eine Steigerung erfolgt. Zunächst muss man die unterschiedlichen Wirkweisen von EDTA und Citrat im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Studie betrachten. EDTA fängt zweiwertige und dreiwertige Ionen aus der Lösung; von den Zweiwertigen ist  $\text{Ca}^{2+}$  zwar das spezifischste, aber  $\text{Mg}^{2+}$  kann auch gebunden werden. Citrat dagegen fängt sehr spezifisch nur  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Medium, außerdem kann es als direkter Metabolit im Citratzyklus verwendet werden.

Zunächst wurde auch hier das Wachstum betrachtet. Die Wachstumskurve von Citrat scheint nach 10 h noch nicht in die stationäre Phase übergegangen zu sein. Währenddessen findet sich bei EDTA ein nahezu komplett inhibiertes Wachstum. Die Expression der Gene entspricht der Vorstellung von Vorbetrachtung und Wachstumskurve. Bei Citrat ergibt sich eine Steigerung der Expression von *eap* im Gegensatz zu *emp* und im Vergleich mit MBB, allerdings ist die Expression von *emp* nur gering reduziert.

Die gesteigerte Stoffwechsellage bei Citrat stellt sich als wachstumsbegünstigend aufgrund eines guten Nährstoffangebotes dar. Währenddessen kann bei EDTA ein nahezu komplett inhibiertes Wachstum auf die Komplexbildung verschiedener Stoffwechsel-bedeutsamer zwei- und dreiwertiger Ionen zurückgeführt werden. Wie im Kapitel 5.2.1.2 schon erwähnt, ist laut Literatur eine minimale Konzentration von 0,01 mM  $\text{MgCl}_2$  für ein Wachstum erforderlich. EDTA veranlasst sowohl bei *eap* als auch bei *emp* eine sehr starke Reduktion, die sich aus dem minimalen Wachstum ergibt. Laut Literatur soll sich aus der Komplexbildung von Ionen auch eine Verschiebung des pH-Wertes ergeben (was hier nicht geprüft wurde), die aber weiterhin zur starken Reduktion beitragen könnte. Für *tst* wurde von Chan und Foster (Chan, 1998) bei Bakterien in BHI mit Zusatz von EDTA und Natriumcitrat eine drei- bis fünffache Vermehrung der Expression beschrieben. Die Begründung dafür war, dass die Ionen-Konzentration verringert wurde. Allerdings wurde für die Gene *sarA* und *hla* in derselben Studie kein Einfluss bei Zusatz der voran genannten Ionen auf die Expression nachgewiesen. Im Hinblick auf *spa* ergab sich sogar eine zwei- bis vierfache Verminderung der Expression. Die Wachstumskurve war nicht beeinflusst. Im Vergleich mit den hier vorliegenden Resultaten, die eine Steigerung von *eap* und eine Verminderung von *emp* zeigen, kann man ableiten, dass man keine generelle Aussage über den Einfluss einer Ionen-Konzentration

machen kann, da die individuelle Lokalisation der Gene im Genom oder auch der Einfluss der eingefügten Promotorsequenz bestimmt, wie groß der Einfluss ist.

Durch den Einsatz von Chelatoren wurde zum Einen gezeigt, dass auch hier *eap* und *emp* nicht gleich reagieren und zum Anderen, dass es eine negative Auswirkung hat, zwei- und dreiwertige Ionen zu komplexieren. Somit hat hier eine Verminderung der Ionenkonzentration ebenso eine Verminderung der Expression zur Folge, wie eine zu hohe Osmolarität. Dies ergibt sich aber auch nicht einheitlich, da Citrat eine Steigerung erfährt. Nun sollte geklärt werden, ob die Osmolarität allein eine Suppression bewirkt, oder ob doch mehr eine Einzelionenwirkung vorliegt.

#### 5.2.1.4 Osmotischer Stress

Um letztendlich festzustellen, ob die verminderte Gen-Expression bei 1 M NaCl nun ein Ioneneffekt ist oder regelmäßig bei höherer Osmolarität auftritt, wurden weitere höhermolare Medien getestet. Zu den getesteten Medien gehörten MBB versetzt mit 1 M Sucrose, 1 M KCl und 1 M NaCl.

Die Wachstumskurven verliefen nicht wesentlich verschoben zu der von MBB, so dass kein inhibierender Einfluss auf das Wachstum zu erkennen war. 1 M Sucrose bewirkt ebenso wie 1 M KCl eine Verringerung der Expression ähnlich wie bei 1 M NaCl. Die Expression war zum Teil bis auf ein Zehntel der Vergleichskurve erniedrigt. In einigen Vorversuchen mit Sucrose, in den Konzentrationen 0,02 M und 0,5 M, die nicht im Ergebnisteil dargestellt werden, ergab sich ebenfalls eine Änderung in der Expression, sodass man hier davon ausgeht, dass die Konzentration von 1 M auf jeden Fall inhibierend wirkt, aber auch geringere Konzentrationen (wie schon 0,02 M), vergleichbar mit NaCl, auch eine Repression bewirken. Andererseits ist das Wachstum in Medien, die Glucose enthalten, z.B. TSB, höher als in anderen ohne. Sucrose ist ein Disaccharid Typ II (Saccharose) und kann ebenso wie Glucose als Kohlenhydratquelle für den Stoffwechsel genutzt werden. Saccharose besteht aus D-Glucose und D-Fruktose. Glucose dagegen ist ein Monosaccharid, eine Hexose, die eventuell leichter „verdaulich“ für den bakteriellen Stoffwechsel ist.

Am ehesten ist der Effekt von Sucrose damit zu erklären, dass die Konzentrationen, die einen positiven Einfluss auf die Expression haben, von der im Versuchsaufbau gewählten Konzentration von 0,02 M schon überschritten wurden. Die Repression kann einerseits durch den Einfluss der Osmolarität erklärt werden; eine höhere Osmolarität bedeutet, wie in früheren Studien gezeigt wurde, ein vermehrt negatives Supercoiling und somit eine verminderte Rate an Transkription und Translation. Eine andere Interpretationsmöglichkeit

zeigt, dass durch Glucose (also auch Sucrose) eine Verschiebung des pH-Wertes ins Saure erfolgt. Diese entsteht durch die Fermentation von Glucose, also auch möglich bei Sucrose. Durch die Veränderung des pH-Wertes werden verschiedene Virulenzgene wie *eap* und *emp* in ihrer Expression negativ beeinflusst (Weinrick, 2004). Durch KCl wurde bewiesen, dass  $\text{Na}^+$  allein nicht der inhibierende Faktor ist, da KCl dieselbe Wirkung hat. Allerdings ist in beiden Chlorid enthalten. Durch den Einsatz von 1 M Sucrose wurde gezeigt, dass auch Chlorid allein nicht für die Veränderungen zuständig sein kann.

Fournier (Fournier, Klier, 2004) stellte den Einfluss von NaCl auf Prot. A dar. Prot. A wird über *spa* reguliert. Das Bakterium wurde in dieser Studie in TSB mit 1 M NaCl inkubiert. Ein Galaktosidase-Assay ergab eine vier- bis siebenfache Suppression von *spa* verglichen zum Medium ohne Zusatz von NaCl. Weitere Studien mit höher osmolaren Zusätzen wie 1 M Sucrose und 1 M KCl ergab dieselbe Suppression. Somit war ein osmotischer Effekt zu vermuten. Diese Ergebnisse entsprechen den Vorliegenden für Eap. Weiterhin konnte von Chan und Foster (Chan, 1998) eine drastische Repression der Virulenzgene *tst*, *spa* und *hla* in Gegenwart von 20 mM Sucrose dargestellt werden. In derselben Studie konnte aber kein Einfluss auf das Regulatorgen *sarA* festgestellt werden. Somit stimmen die Ergebnisse der Literatur mit den gefundenen Ergebnissen der Repression für Eap und Emp überein. Da Chan und Foster für das Regulatorgen *sarA* keine Beeinflussung gefunden haben, ist dies als mögliche Ursache für die Repression von Eap und Emp auszuschließen.

Generell ist zu konstatieren, dass die Osmolarität die Expression stark beeinflusst. Die bisherigen Ergebnisse ließen auf einen wichtigen Bestandteil des DNA-Supercoilings bei der Regulation von Eap und Emp schließen.

### **5.2.2 Beweis für DNA Supercoiling als Mechanismus der Regulation für Eap**

Einige Studien (Sheehan, 1991), (Fournier, Klier, 2004) an anderen Genen zeigten, dass hohe Osmolarität eine inverse Wirkung auf die Expression der Gene hat. Daraus wurde gefolgert, dass die Osmolarität das Bakterium dazu veranlasst, mit einer Veränderung des Supercoilings auf Umweltbedingungen zu reagieren. In diesen Studien wurde zur Bestätigung dieser Theorie das Antibiotikum Novobiocin verwendet, das eine Relaxation der DNA bewirkt. Diese Ergebnisse bestätigten das Ergebnis. Novobiocin ist ein Gyraseinhibitor. Die bakterielle Gyrase ist vergleichbar mit der humanen Topoisomerase, die die Ausbildung einer Superhelixstruktur der DNA bewirkt. Demnach bewirkt eine Gyrasehemmung die Ausbildung negativer Superhelices.

Supercoiling bedeutet im biologischen Sinne das Ausbilden der super-helikalen DNA-Quartärstruktur. Diese Struktur ist aber eher eine Ruhestuktur. In diesem Zustand ist normalerweise keine Transkription und Translation möglich. Zur Transkription muss die DNA zunächst wieder „abgerollt“ werden. Durch Umweltbedingungen (pH-Wert, Osmolarität) kann also diese Struktur verändert werden; wenn die Umweltbedingungen ungünstig sind, werden diese registriert und die DNA sozusagen in Ruheposition „verdrillt“; dies resultiert dann in einer verminderten Expression von Genen und Genprodukten. Ein Grundlevel an Produktion ist wohl meistens vorhanden, um ein Überleben zu ermöglichen (Fournier, Klier, 2004).

Die Experimente wurden zuvor schon im Zusammenhang mit der Osmolarität für andere Proteine wie *spa* (Fournier, Klier, 2004) durchgeführt.

Zunächst sollte die optimale subinhibierende Konzentration für Novobiocin gefunden werden, da in der Literatur unterschiedliche Zahlen vorlagen. Die Resultate der verschiedenen Novobiocin-Konzentrationen zeigen in den Wachstumskurven eine deutliche Reduktion, die mit zunehmender Menge an Antibiotikum ebenfalls größer wird. Mittels der Wachstumskurve wurde die subinhibierende Konzentration bestimmt. Die niedrigeren Konzentrationen 0,5 ng/ml und 5 ng/ml zeigen im Reporter-Gen-Assay eine gesteigerte Expression von *eap*. Dies ist damit zu erklären, dass bei den geringeren Konzentrationen die inhibierende Wirkung des Antibiotikums durch die positiven Wirkungen auf das Supercoiling übertroffen wird. Die hohen Konzentrationen bedingen durch die Menge an Antibiotikum die Reduktion, da das normale Zusammenspiel bei Transkription und Translation zu stark gestört wird. Laut Fournier et al. (Fournier, Klier, 2004) wurde die höchste Relaxation mit 20 und 40 ng/ml gefunden; 5 ng/ml zeigten keine Veränderung. Die Ergebnisse von Fournier in Bezug auf *spa* zeigen, dass Konzentrationen unter 1,2 ng/ml Novobiocin keinen Einfluss auf die Expression haben.

In anderen Studien von Fournier et al. (Fournier, Klier, 2004), in denen der Einfluss von Umweltfaktoren auf das Virulenzgen *spa* untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass ein Medium aus 1 M NaCl und 10 ng/ml Novobiocin keine Repression mehr zeigt und sich die beiden Inhaltsstoffe gegenseitig aufheben. Ein derartiger Versuch mit *eap* zeigte immer noch eine Repression. Für *eta* fanden Sheehan und Foster (Sheehan, 1991), dass eine vermehrte Relaxation der DNA auch eine vermehrte Expression von *eta* bewirkt. Da in dieser Studie die *eta*-Expression in Agr+ und Agr- Stämmen untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass das Regulatorgen *agr* nicht auf die Novobiocin induzierte Relaxation reagiert, da beide Mutanten gleich reagierten. In einer weiteren Studie von Chan und Foster (Chan, 1998)

konnte kein Einfluss von Novobiocin auf die Virulenzgene *spa*, *hla* oder das Regulatorgen *sarA* festgestellt werden. Hier ergab sich unter einer Kombination von 1 M NaCl und 0,5 ng Novobiocin keine Veränderung der Expression. Daraus lässt sich schließen, dass nicht alle Genloci gleich empfindlich für Medikamenten-induzierte DNA-Relaxation sind. Für unterschiedliche Genloci existieren bestimmte Optimalkonzentrationen. Für die getesteten Gene *agr*, *sarA* konnte keine Beeinflussung festgestellt werden.

Im Allgemeinen wäre bei Verwendung eines Antibiotikums zu erwarten, dass das Wachstum der Bakterien verhindert wird, sofern das Bakterium empfindlich ist. Die Ergebnisse stellen aber dar, dass in einer bestimmten Konzentration nur wenig Beeinflussung des Wachstums und sogar eine Steigerung von Adhäsionsproteinen, die für die Invasion sehr wichtig sind, stattfindet. Aus einer vermehrten Expression dieser Proteine könnte in vivo eine vermehrte Invasion werden. Somit das Gegenteil des Erwünschten. Allerdings muss man bemerken, dass bei steigender Konzentration die gewünschten Effekte eintreten. Die im Handel üblichen Konzentrationen ab 250 mg in Tablettenform liegen deutlich über der hier benutzten Konzentration. Doch ist hier bestätigt, dass ein Abfall des Spiegels, neben Resistenzen, auch unter Umständen die Folge einer vermehrten Invasion haben kann. Wie zuvor erklärt, haben subinhibierende Konzentrationen den Effekt, dass durch eine vermehrte Relaxation eine vermehrte Transkription möglich ist, was auch eine vermehrte Produktion von Virulenzfaktoren bedeutet, die dann die Invasion ermöglichen. Außerdem könnte ein Problem darin liegen, dass Quinolone für Infektionen mit intrazellulären Erregern benutzt werden, aber die Konzentration in der Zelle nur suboptimale Werte erreicht. Allerdings sind die durchgeführten Versuche in vitro und nicht in vivo, somit liegt derzeit kein Beweis für diese Theorie vor.

Eine Studie von Kuroda (Kuroda, 2007) zeigte eine Induktion des *saeRS*-Systems durch die Benutzung subinhibitorischer Konzentrationen von Betalactam-Antibiotika. Dieselben Ergebnisse fanden sich in einer Studie von Blickwede (Blickwede, 2005). Die gesteigerte *sae*-Aktivität hatte auch eine Steigerung der Expression verschiedener Proteine wie Eap, Emp und andere zur Folge. Die Erklärung dafür war, dass das benutzte Antibiotikum Florfenicol eine Stabilisierung der mRNA bewirkt, somit mehr zur Verfügung steht und mehr umgesetzt werden kann.

### 5.2.3 Identifikation des *arlRS*-Systems als neuer Regulator von Eap

#### 5.2.3.1 Herstellung von MGH1

Das *arlRS*-System wurde schon als Regulator für Prot. A identifiziert (Fournier, 2004). In weiteren Versuchen innerhalb dieser Studie in Bezug auf Osmolarität und Supercoiling konnte festgestellt werden, dass das *arlRS*-System Einfluss auf das Supercoiling hat und somit auch die Expression einiger dadurch regulierter Gene beeinflussen kann. Da die dort erzielten Ergebnisse mit denen der vorliegenden Dissertation vergleichbar sind, wurde eine *arl*-Mutante hergestellt, um den Einfluss auf die *eap*-Expression zu untersuchen.

Das *arlRS*-System ist ein klassisches Zwei-Komponenten-System (Fournier, Hooper, 2000). *arlS* bildet zusammen mit dem ein wenig weiter oben liegenden *arlR* ein Operon. *arlR* ähnelt den bekannten Antwortregulatoren, *arlS* gehört zu den Protein-Histidinkinasen. Das Protein selbst ist Bestandteil der OmpR-PhoB Einheit von Antwortregulatoren. *arlRS* hat Einfluss auf *agrABCD* und *sarH2* und einige weitere Regulatoren. Dieses Zwei-Komponenten-System gibt Informationen aus der Umwelt weiter und kann eine Regulation auf genetischer Ebene durchführen. Die Weitergabe der Information erfolgt über induzierte Phosphorylierung. *arlRS* ist bedeutend für die Produktion von Kapseltyp 5 und hat Einfluss auf die Expression von Protein A.

Die Herstellung der *arlRS*-Mutante diente dazu, einen neuen Regulator für Eap zu finden. Eine entsprechende Konstruktion existierte schon im Stamm BF21. Die Eap-Produktion in diesem Stamm ist aber sehr niedrig, so dass diese zum Vergleich mit der Eap-Produktion des Stammes Newman auch in Newman übertragen werden musste. Die *arlRS*-Mutation besitzt Einfluss auf das Supercoiling der DNA, allerdings soll dieser Einfluss laut Literatur für andere untersuchte Proteine nicht übermäßig sein.

#### 5.2.3.2 Wachstumskurven

Zunächst wurde das Verhalten von MGH1 überprüft, indem Wachstumskurven mit Antibiotika-haltigen Medien erstellt wurden. Ohne Antibiotika Zusatz könnte der untersuchte Stamm die Insertions-Mutation verlieren. Eine Analyse des Wachstums musste durchgeführt werden, um den Einfluss der Antibiotika auf das Wachstumsverhalten des Bakteriums zu klären. Diese Kurven verliefen nahezu identisch. Daraus kann man schließen, dass das Wachstum auch mit Antibiotika nicht eingeschränkt ist. Des Weiteren wurde das normale Wachstumsverhalten in MBB im Vergleich mit Newman und BF21 untersucht. Dies ergab, dass das Wachstumsverhalten unterschiedlich ist. MGH1 tritt deutlich früher in die stationäre

Phase ein als MBB Newman. Untersuchungen mit den Stämmen WCUH29 und Sa316ko in TSB zeigten, dass diese ebenfalls nach 5 h in die stationäre Phase übergehen und mit OD 1 im Gesamten keine hohen Werte erreichen (Liang, 2005). Danach wurde eine Vergleichskurve in TSB mit Newman, BF21 und MGH1 angefertigt. Daraus ergab sich, dass die Veränderung in der Wachstumskurve in MBB den vorigen Ergebnissen ähnelt, der Vergleich in TSB zeigt allerdings für alle drei Stämme einen deutlichen Zuwachs im Wachstum und nach 10 h keinen Übergang in die stationäre Phase. Die unterschiedlichen Ergebnisse beruhen wahrscheinlich auf der Konstellation MGH1 in MBB, da der Stamm Newman allein in TSB ebenfalls ein höheres Wachstum aufweist und die Mutation sich zum Anderen in TSB ähnlich verhält wie Newman in MBB. Zu erkennen ist allerdings, dass die Wachstumskurve von MGH1 zwischen dem Donorstamm BF21 und dem Empfängerstamm Newman verläuft, sodass man sagen kann, dass die *arlRS*-Mutation die Wachstumseigenschaften verändert. Die Insertion in Newman war nötig, damit man die Ergebnisse, die mit Newman durchgeführt wurden, mit den neuen Ergebnissen der *arlRS*-Mutante repräsentativ vergleichen kann. Weiterhin sind Ähnlichkeiten mit der Wachstumskurve von Somerville über eine Aconitase-Mutation zu erkennen (Somerville, 2002). Diese Kurve geht direkt von der exponentiellen Phase in die stationäre Phase über. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden Tests zur Überprüfung des pH-Wertes und des Azetates durchgeführt, um festzustellen, ob weitere Übereinstimmungen mit der Aconitase-Mutation zu finden sind. Die Bestimmung des pH-Wertes ergab kleinere Veränderungen. Der pH-Wert von MGH1 lag immer etwas niedriger als in MBB Newman. Die Azetatmessung zeigte, dass Newman in MBB das Azetat nach 10 h abgebaut hatte, MGH1 dagegen baute nur die Hälfte des Azetats in derselben Zeit ab. In der Veröffentlichung von Somerville wird beschrieben, dass *S. aureus* in der postexponentiellen Phase beginnt, das produzierte Azetat zu verbrauchen. Die Aconitase-Mutante verbraucht allerdings kein Azetat (Somerville, 2002). Dies ergibt die Folgerung, dass ein verminderter Verbrauch von Azetat durch eine verminderte Aktivität im Citratzyklus bedingt ist. Da nach einer gewissen Zeit keine anderen Metaboliten mehr abgebaut werden können, geht Azetat als Acetyl-Co-Enzym A in den Citratzyklus ein. Daraus resultiert die Schlussfolgerung, dass die *arlRS*-Mutation ebenfalls einen zumindest eingeschränkten Citratzyklus besitzt, da ein gewisser Verbrauch an Azetat stattfindet. Die *arlRS*-Mutation betrifft also nicht nur Adhäsivproteine sondern wahrscheinlich auch Schritte im Stoffwechsel.

Die eigentlichen Untersuchungen betrafen allerdings die veränderte Proteinproduktion von Eap. Diese ist, wie in den Ergebnissen des SDS-PAGEs klar zu erkennen ist, deutlich reduziert im Vergleich zur Produktion des Stammes Newman. Damit war der erste Beweis für

*arlRS* als Regulationssystem für *eap* geliefert. *Emp* wurde mittels SDS-PAGE nicht untersucht, da es nicht so leicht wie *Eap* aus den anderen Proteinen isoliert werden kann.

Danach wurden die Ergebnisse per RT-RNA bestätigt. Zum besseren Verständnis der Regulation wurden die Gene *RNAIII*, *sae*, *sarA*, *eap* und *emp* untersucht. Diese sind, wie bereits in Kapitel 2.6. dargestellt, wichtig für die Regulation von *eap*. Zunächst die Ergebnisse für *eap* und *emp* im Stamm Newman und MGH1. Hier ergab sich eine ausgeprägte Reduktion von *eap* und *emp* sowohl zum 3 h Punkt als auch zum 6 h Punkt in der *arlRS*-Mutante. Die Beeinflussung von *eap* ist somit kompatibel mit den Ergebnissen des SDS-PAGE und auch der Mechanismus des Supercoilings lässt sich dadurch erhärten. Für den gleichzeitigen Einfluss auf *emp* sprechen die Daten des Reporter-Gen-Assays und der RT-PCR. Eine vollständige Bestätigung muss durch weitere Versuche erfolgen. Für die Regulatoren ergab sich bei *RNAIII* eine große Steigerung bei MGH1, die auch schon bei Fournier (Fournier, Klier, 2001) beschrieben wurde als negativer Einfluss auf die Expression von *eap* bei *RNAIII* in hoher Ausprägung. Ergänzend dazu ist die *sarA* Expression ebenfalls erhöht, was durch den regulatorischen Zusammenhang erklärt werden könnte. Dahingegen ist *sae* vermindert. Da *sae* ein essentieller Regulator für die *eap*-Expression ist und die *eap*-Expression in der *arlRS*-Mutante reduziert wird, muss dies in direktem Zusammenhang gesehen werden. Dazu werden weiter die Medien mit hoher bzw. niedriger *eap*-Expression betrachtet und mit den Ergebnissen der *arlRS*-Mutante im Vergleich gesehen (Kapitel 5.2.4).

#### **5.2.4 RT-PCR**

Die RT-PCR wurde in den Medien MBB und MBB mit 1 M NaCl, 0,25 % Citrat, 5 ng Novobiocin und mit dem Stamm Newman angefertigt, da diese Medien im Reporter-Gen-Assay die vielversprechendsten Ergebnisse zeigten. Die Ergebnisse von Novobiocin konnten nicht die Ergebnisse des Reporter-Gen-Assays bestätigen, da als Referenzgen der RT-PCR die Gyrase verwendet wurde, welche im Labor etabliert war. Novobiocin als Gyraseinhibitor interferiert damit mit dem Referenzgen, sodass die Werte dementsprechend geringer ausfallen. Um die entsprechenden Versuche mit Novobiocin durchführen zu können, müsste ein neues Referenzgen etabliert werden. Die Interpretation der Ergebnisse von Novobiocin im Zusammenhang entfällt somit im Folgenden.

Die höchste Expression von *eap* wurde unter Citrat Supplementierung gefunden. Eine deutlich geringere Expression zeigte dann erwartungsgemäß 1 M NaCl. Für *emp* verhält sich die Expression genauso, nur auf einem viel niedrigeren Niveau. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse des Reporter-Gen-Assays.

*RNAIII* wurde näher untersucht, da es als Transkript von *agr* ebenfalls an der Regulation von *eap* beteiligt ist. *RNAIII* fungiert als indirekter Regulator von *eap* und *emp*. Dieser soll in geringer Ausprägung eine positive Wirkung auf *eap* und *emp* haben, aber in hoher Konzentration repressiv wirken. Möglicherweise existiert ein optimales Fenster von *RNAIII* in Bezug auf *eap*. Die Untersuchung von *RNAIII* ergab unterschiedliche Ergebnisse in den verschiedenen Medien. Das Maximum der RNA-Expression wurde bei Supplementierung von 1 M NaCl beobachtet, die Geringste in Citrat bei 3 h. Die hohe Ausprägung von *RNAIII* in *arIRS* und auch unter 1 M NaCl bestätigen die Ergebnisse über den Einfluss des Supercoilings. In den Medien, die eine geringe Ausprägung von *eap* im Reporter-Gen-Assay aufwiesen, konnte eine gesteigerte Expression von *RNAIII* festgestellt werden, ebenso umgekehrt in dem mit Citrat supplementierten Medium. Für die *arIRS*-Mutante wurde dieses Ergebnis von *RNAIII* schon bei Fournier et al. (Fournier, Klier, 2001) beschrieben. Somit ist das Ergebnis kongruent mit den aus der Literatur ersichtlichen früheren Testreihen (Fournier, Klier, 2001) und bestätigt, dass hohe Konzentrationen von *RNAIII* eine negative Auswirkung auf die Expression von *eap* und *emp* haben.

*sae* ist, wie schon zu Beginn in Kapitel 2.6.5 erwähnt, ein essenzieller Regulator für *eap*. Somit sollte in einem Medium, das eine hohe *eap* Expression aufweist, auch eine hohe *sae* Expression vorliegen, sowie in einem Medium mit niedriger *eap* Expression auch eine niedrige *sae* Expression. Hier findet sich erwartungsgemäß eine hohe Expression in dem mit Citrat supplementierten Medium, die mit den Daten des Reporter-Gen-Assays korreliert. Die Expression bei 1 M NaCl ist, wie zuvor auch die von MGH1, geringer als die Expression in MBB. Beide haben auch eine geringe *eap*- und *emp*-Expression. Für 1 M NaCl konnte dieser Effekt bereits in früheren Versuchen festgestellt werden (Novick, 2003; Geiger et al., 2008). Somit ist *sae* wiederum als Regulator von *Eap* bestätigt und die vermehrte *eap* Expression durch eine up-Regulation zu erklären.

*sar* ist, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, ebenso ein Genregulator. Es wirkt indirekt über eine positive *RNAIII* Beeinflussung (Chan, 1998). Somit wären ähnliche Werte wie bei *RNAIII* zu erwarten, da diese zum Teil abhängig von *sar* sind. Die Daten von *sarA* zeigen ähnliche Ausprägungen wie die Daten von *RNAIII*, somit ist die Reihenfolge der Expression 1 M NaCl und Citrat. Hier zeigt sich ebenfalls wieder, dass die Medien, die eine geringe Expression von *eap* und *emp* im Reporter-Gen-Assay aufwiesen, z.B. 1 M NaCl, auch hier eine höhere Aktivität von *sarA* aufweisen. Dahingegen zeigt Citrat eine geringere Expression. Somit kann man sagen, dass ein Zusammenhang zwischen *RNAIII* und *sar* besteht, der durch den regulatorischen Einfluss von *sar* erklärt werden kann.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl bei der Analyse der Ergebnisse der Deletions-Mutante als auch bei den Ergebnissen der supplementierten Medien festgestellt werden konnte, dass bei einer niedrigen *eap* Expression eine hohe *RNAIII* und *sarA* Expression zu finden ist sowie eine niedrige *sae* Expression. Im umgekehrten Fall bei einer hohen *eap* Konzentration sind entsprechend niedrige *RNAIII* und *sarA* Expression sowie eine hohe *sae* Expression zu sehen.

### **5.3 Schlussfolgerung**

Als Schlussfolgerung zur Fragestellung aus der Einleitung lässt sich sagen, dass verschiedene Umweltbedingungen gefunden werden konnten, die die Expression von *eap* und *emp* positiv wie auch negativ beeinflussen. Darüber hinaus wurde ein Regulationsunterschied zwischen *eap* und *emp* festgestellt, der Ansatz für weitere Forschung bietet. Ebenfalls konnte das *arlRS*-System als neuer Regulator für *eap* und *emp* gefunden werden. Hier ist eine deutliche Reduktion der *eap*-Expression zu sehen. Die Ergebnisse waren reproduzierbar und halten dem Vergleich mit in der Literatur existenten Daten über andere Gene stand. Die gefundenen Ergebnisse bieten die Möglichkeit zur weiteren Erforschung und Entwicklung neuer Therapieansätze.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Athanasopoulos,A.N., Economopoulou,M., Orlova,V.V., Sobke,A., Schneider,D., Weber,H., Augustin,H.G., Eming,S.A., Schubert,U., Linn,T., Nawroth,P.P., Hussain,M., Hammes,H.P., Herrmann,M., Preissner,K.T., and Chavakis,T. (2006). The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 107, 2720-2727.
2. Bhat,K.G., Joseph,K.M., and Shivananda,P.G. (1994). Effect of magnesium on the physiology of *Staphylococcus aureus*. *Indian J. Exp. Biol.* 32, 274-276.
3. Bischoff M, Dunman P, Kormanec J, Macapagal D, Murphy E, Mounts W, Berger-Bächi B, Projan S. (2004). Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* sigmaB regulon, *J Bacteriol.* 2004 Jul;186(13):4085-99
4. Blickwede,M., Goethe,R., Wolz,C., Valentin-Weigand,P., and Schwarz,S. (2005). Molecular basis of florfenicol-induced increase in adherence of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 315-323.
5. Boyce,J.M. (2007). Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *J. Hosp. Infect.* 65 Suppl 2, 50-54.
6. Chan,P.F. and Foster,S.J. (1998). The role of environmental factors in the regulation of virulence-determinant expression in *Staphylococcus aureus* 8325-4. *Microbiology* 144 ( Pt 9), 2469-2479.
7. Chavakis,T., Hussain,M., Kanse,S.M., Peters,G., Bretzel,R.G., Flock,J.I., Herrmann,M., and Preissner,K.T. (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med.* 8, 687-693.
8. Chavakis,T., Wiechmann,K., Preissner,K.T., and Herrmann,M. (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb. Haemost.* 94, 278-285.
9. Chavakis,T., Preissner,K.T., and Herrmann,M. (2007). The anti-inflammatory activities of *Staphylococcus aureus*. *Trends Immunol.* 28, 408-418.
10. Cheung,A.L. and Zhang,G. (2002). Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. *Front Biosci.* 7, d1825-d1842.

11. Cheung,A.L., Bayer,A.S., Zhang,G., Gresham,H., and Xiong,Y.Q. (2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 40, 1-9.
12. Cheung,A.L. and Manna,A.C. (2005). Role of the distal *sarA* promoters in SarA expression in *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 73, 4391-4394.
13. Cheung,A.L., Nishina,K., and Manna,A.C. (2008a). SarA of *Staphylococcus aureus* binds to the *sarA* promoter to regulate gene expression. J. Bacteriol. 190, 2239-2243.
14. Cheung,A.L., Nishina,K.A., Trotonda,M.P., and Tamber,S. (2008b). The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40, 355-361.
15. Dziewanowska,K., Patti,J.M., Deobald,C.F., Bayles,K.W., Trumble,W.R., and Bohach,G.A. (1999). Fibronectin binding protein an host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus*\_by epithelial cells. Infect. Immun. 67, 4673-4678.
16. Seifert,H. ;Jansen,B. , Farr, B.M. (2004). Catheter-related infections, secondary Edition, revised and expanded, Part II, Kapitel 6, 141-164
17. Ferguson,J.D., Azzaro,G., Gambina,M., and Licitra,G. (2007). Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. J. Dairy Sci. 90, 5798-5813.
18. Foster,T.J. and Höök,M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 6, 484-488.
19. Fournier,B., Aras,R., and Hooper,D.C. (2000). Expression of the multidrug resistance transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. J. Bacteriol. 182, 664-671.
20. Fournier B., Hooper DC (2000) A new two-component system involved, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*, J- Bacteriol. Jul; 182(14):3955-64
21. Fournier,B., Klier,A., and Rapoport,G. (2001). The two-component system *ArlS-ArlR* is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 41, 247-261.
22. Fournier,B. and Klier,A. (2004). Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the *ArlS-ArlR* two-component system of *Staphylococcus aureus*. Microbiology 150, 3807-3819.

23. Geiger,T., Goerke,C., Mainiero,M., Kraus,D & Wolz,C. (2008). The virulence regulator *Sae* of *Staphylococcus aureus*: promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J.Bacteriol.* 190, 3419-3428
24. Giraudo,A.T., Raspanti,C.G., Calzolari,A., and Nagel,R. (1994). Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can. J. Microbiol.* 40, 677-681.
25. Giraudo,A.T., Calzolari,A., Cataldi,A.A., Bogni,C., and Nagel,R. (1999). The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 15-22.
26. Giraudo,A.T., Mansilla,C., Chan,A., Raspanti,C., and Nagel,R. (2003). Studies on the expression of regulatory locus *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* 46, 246-250.
27. Goerke,C., Fluckiger,U., Steinhuber,A., Bisanzio,V., Ulrich,M., Bischoff,M., Patti,J.M., and Wolz,C. (2005). Role of *Staphylococcus aureus* global regulators *sae* and *sigmaB* in virulence gene expression during device-related infection. *Infect. Immun.* 73, 3415-3421.
28. Haggar,A., Hussain,M., Lonnie,H., Herrmann,M., Norrby-Teglund,A., and Flock,J.I. (2003). Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 71, 2310-2317.
29. Haggar,A., Ehrnfelt,C., Holgersson,J., and Flock,J.I. (2004). The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infect. Immun.* 72, 6164-6167.
30. Haggar,A., Shannon,O., Norrby-Teglund,A., and Flock,J.I. (2005). Dual effects of extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* on peripheral blood mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* 192, 210-217.
31. Hansen,U., Hussain,M., Villone,D., Herrmann,M., Robenek,H., Peters,G., Sinha,B., and Bruckner,P. (2006). The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biol.* 25, 252-260.
32. Harraghy,N., Hussain,M., Haggar,A., Chavakis,T., Sinha,B., Herrmann,M., and Flock,J.I. (2003). The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* 149, 2701-2707.

33. Harraghy,N., Kormanec,J., Wolz,C., Homerova,D., Goerke,C., Ohlsen,K., Qazi,S., Hill,P., and Herrmann,M. (2005). *sae* is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology 151*, 1789-1800.
34. Harraghy,N., Seiler,S., Jacobs,K., Hannig,M., Menger,M.D., and Herrmann,M. (2006). Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *Int. J. Artif. Organs 29*, 368-378.
35. Henneke P, Morath S, Uematsu S, Weichert S, Pfitzenmaier M, Takeuchi O, Müller A, Poyart C, Akira S, Berner R, Teti G, Geyer A, Hartung T, Trieu-Cuot P, Kasper DL, Golenbock DT. (2005) Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus. *J Immunol.* 2005 May 15;174(10):6449-55
36. Hussain,M., Becker,K., von Eiff,C., Schrenzel,J., Peters,E., and Herrmann,M. (2001). Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton secretory protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma. *J. Bacteriol. 183*, 6778-6786.
37. Hussain,M., Hagggar,A., Heilmann,C., Peters,G., Flock,J.I., and Herrmann,M. (2002). Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun. 70*, 2933-2940.
38. Hussain,M., von Eiff,C., Sinha,B., Joost,I., Herrmann,M., Peters,G., and Becker,K. (2008). *eap* Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol. 46*, 470-476.
39. Jahreis,A., Beckheinrich,P., and Haustein,U.F. (2000). Effects of two novel cationic staphylococcal proteins (NP-tase and p70)and enterotoxin B on IgE synthesis and interleukin-4 and interferon-gamma production in patients with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol. 142*, 680-687.
40. Kiyota,H., Kendrick,M.I., and Kass,E.H. (1989). Influence of magnesium concentration on production of exoprotein and beta-lactamase by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus hemolyticus*. *J. Infect. Dis. 160*, 1061-1063.
41. Kohler, T. (2005). Untersuchungen zur Biosynthese und Wechselwirkung der Zellwandteichonsäuren von *Staphylococcus aureus*.
42. Kolmos,H.J. (2007). [Hospital infections: sources and routes of infection]. *Ugeskr. Laeger 169*, 4138-4142.

43. Kreikemeyer,B., McDevitt,D., and Podbielski,A. (2002). The role of the map protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 283-295.
44. Kuroda,M., Ohta,T., Uchiyama,I., Baba,T., Yuzawa,H., Kobayashi,I., Cui,L., Oguchi,A., Aoki,K., Nagai,Y., Lian,J., Ito,T., Kanamori,M., Matsumaru,H., Maruyama,A., Murakami,H., Hosoyama,A., Mizutani-Ui,Y., Takahashi,N.K., 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., and Hiramatsu,K. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225-1240.
45. Kuroda,H., Kuroda,M., Cui,L., and 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.
46. Lee,J.C., Xu,S., Albus,A., and Livolsi,P.J. (1994). Genetic analysis of type 5 capsular polysaccharide expression by *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 176, 4883-4889.
47. Lee,L.Y., Miyamoto,Y.J., McIntyre,B.W., Hook,M., McCrea,K.W., McDevitt,D., and Brown,E.L. (2002). The *Staphylococcus aureus* Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *J. Clin. Invest* 110, 1461-1471.
48. Lee,S., Park,Y.J., Oh,E.J., Kahng,J., Yoo,J.H., Jeong,I.H., Kwon,Y.M., and Han,K. (2007). Comparison of protocols for surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): medical staff vs ICU patients. *Ann. Clin. Lab Sci.* 37, 248-250.
49. Liang,X., Zheng,L., Landwehr,C., Lunsford,D., Holmes,D., and Ji,Y. (2005). Global regulation of gene expression by *ArlRS*, a two-component signal transduction regulatory system of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 5486-5492.
50. Lindsay,J.A. and Foster,S.J. (1999). Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* 262, 323-331.
51. Lowy,F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520-532.

52. Mandell, B.F. (2008). A report from the department of staph affairs. *Cleve. Clin. J. Med.* 75, 166.
53. Manna, A.C. and Cheung, A.L. (2006). Transcriptional regulation of the *agr* locus and the identification of DNA binding residues of the global regulatory protein SarR in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 60, 1289-1301.
54. Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, Lenoy E, Schneewind O., (2000) *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 9;97(10):5510-5
55. Mills, J.T., Dodel, A.W., and Kass, E.H. (1986). Regulation of staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 and total exoprotein production by magnesium ion. *Infect. Immun.* 53, 663-670.
56. Murray, P. R., Baron, E.J., Jorgensen, J., Tenover, M.A., Tenover, M.L. (2007). *Manual of clinical microbiology*, 9th edition
57. Novick, R.P. and Jiang, D. (2003). The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology* 149, 2709-2717.
58. Ohlsen, K., Koller, K.P., and Hacker, J. (1997). Analysis of expression of the alpha-toxin gene (*hla*) of *Staphylococcus aureus* by using a chromosomally encoded *hla::lacZ* gene fusion. *Infect. Immun.* 65, 3606-3614.
59. Pak, S.I., Han, H.R., and Shimizu, A. (1999). Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dogs in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 61, 1013-1018.
60. Palma, M., Haggar, A., and Flock, J.I. (1999). Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J. Bacteriol.* 181, 2840-2845.
61. Qazi, S.N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C.E., Cockayne, A., Winzer, K., Chan, W.C., Williams, P., and Hill, P.J. (2001). *agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect. Immun.* 69, 7074-7082.
62. Regassa, L.B. and Betley, M.J. (1992). Alkaline pH decreases expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 174, 5095-5100.

63. Kuroda,H., Kuroda,M., Cui,L., and 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.
64. Regassa,L.B. and Betley,M.J. (1993). High sodium chloride concentrations inhibit staphylococcal enterotoxin C gene (*sec*) expression at the level of *sec* mRNA. Infect. Immun. 61, 1581-1585.
65. Roghmann,M., Taylor,K.L., Gupte,A., Zhan,M., Johnson,J.A., Cross,A., Edelman,R., and Fattom,A.I. (2005). Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia. J. Hosp. Infect. 59, 27-32.
66. Ruzin,A., Lindsay,J., and Novick,R.P. (2001). Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 41, 365-377.
67. Schenborn E, Groskreutz D, (1999) Reporter gene vectors and assays, Mol Biotechnol. 1999 Nov;13(1):29-44
68. Schwandner,R., Dziarski,R., Wesche,H., Rothe,M., and Kirschning,C.J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. J. Biol. Chem. 274, 17406-17409.
69. Senn,M.M., Bischoff,M., von Eiff,C., and Berger-Bachi,B. (2005). *sigmaB* activity in a *Staphylococcus aureus* hemB mutant. J. Bacteriol. 187, 7397-7406.
70. Sheehan,B.J., Foster,T.J., Dorman,C.J., Park,S., and Stewart,G.S. (1992). Osmotic and growth-phase dependent regulation of the *eta* gene of *Staphylococcus aureus*: a role for DNA supercoiling. Mol. Gen. Genet. 232, 49-57.
71. Sobke,A.C., Selimovic,D., Orlova,V., Hassan,M., Chavakis,T., Athanasopoulos,A.N., Schubert,U., Hussain,M., Thiel,G., Preissner,K.T., and 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.
72. Somerville,G.A., Chaussee,M.S., Morgan,C.I., Fitzgerald,J.R., Dorward,D.W., Reitzer,L.J., and Musser,J.M. (2002). *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival. Infect. Immun. 70, 6373-6382.

73. Steinhuber,A., Goerke,C., Bayer,M.G., Doring,G., and Wolz,C. (2003). Molecular architecture of the regulatory Locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* *185*, 6278-6286.
74. Tiwari,J.G. and Tiwari,H.K. (2007). *Staphylococcal* zoonosis on dairy farms in Assam and Meghalaya. *Indian J. Public Health* *51*, 97-100.
75. Verghese,M.W. and Boucher,R.C. (1998). Effects of ion composition and tonicity on human neutrophil antibacterial activity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *19*, 920-928.
76. Vijaranakul,U., Nadakavukaren,M.J., de Jonge,B.L., Wilkinson,B.J., and Jayaswal,R.K. (1995). Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine. *J. Bacteriol.* *177*, 5116-5121.
77. Weidenmaier,C., Peschel,A., Xiong,Y.Q., Kristian,S.A., Dietz,K., Yeaman,M.R., and Bayer,A.S. (2005). Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J. Infect. Dis.* *191*, 1771-1777.
78. Weinrick,B., Dunman,P.M., McAleese,F., Murphy,E., Projan,S.J., Fang,Y., and Novick,R.P. (2004). Effect of mild acid on gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* *186*, 8407-8423.
79. Xie,C., Alcaide,P., Geisbrecht,B.V., Schneider,D., Herrmann,M., Preissner,K.T., Luscinskas,F.W., and Chavakis,T. (2006). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.* *203*, 985-994.

## 7. Publikationen

- I. Harraghy, N., Gross, M., Kawasaki, N., Fournier, B., Herrmann, M. (2008). Identification of the *arlRS* regulatory system as a new regulator of the *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein (Eap), voraussichtlicher Abgabetermin September 2008
- II. Teile dieser Arbeit wurden auf einem gemeinsamen Vortrag der Universität des Saarlandes und der Universität Genf vorgestellt:  
„Einfluss definierter Umweltbedingungen auf die Expression der Adhäsionsproteine Eap und Emp in *S. aureus*“  
Genf, 17.01.08-18.01.08

## 8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Mathias Herrmann für die freundliche Überlassung des Themas und für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien. Vielen Dank für die viele Arbeit die er seinerseits in die Fertigstellung der Dissertation investiert hat und dafür, dass er jederzeit ein offenes Ohr für größere und kleinere Probleme hatte, sowie die stete Motivationsunterstützung, die er offeriert hat. Ein Dankeschön auch an das Team des Sekretariats, insbesondere Frau Ebel und Frau Weber, die immer ein Lächeln hatten und bemüht waren, größere und kleinere Probleme aus dem Weg zu räumen.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Niamh Harraghy für die Unterstützung, Fachkompetenz und Geduld, mit der sie mich durch mein Projekt begleitet hat und dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, auch nachdem sie nicht mehr im Saarland arbeitet.

Vielen Dank auch an die gesamte Forschungsgruppe der bakteriellen Abteilung der Mikrobiologie Homburg für die liebevolle Aufnahme ins Team und die Unterstützung, dabei insbesondere Frau Karin Hilgert für die Geduld und ständige Hilfsbereitschaft mit der sie mich in meiner Zeit des wissenschaftlichen Arbeitens unterstützt hat. Ebenso ein Danke für die gute Zusammenarbeit an Sylvain Kerdoudu, Indranil Chatterjee, Insa Jost und Markus Bischoff.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die Geduld und Hilfsbereitschaft in den drei Jahren des experimentiellen Arbeitens mit allen Höhen und Tiefen sowie der Unterstützung beim Korrekturlesen und vor allem auch für die Bereitstellung finanzieller Mittel, die nötig waren, diese Arbeit durchzuführen.

Vielen Dank auch an meinen Freund Patrick Thomas John Lennon, der mich bei der Korrektur des Summaries unterstützt hat und für die unendliche Geduld und Motivation, besonders in der Phase der Textgestaltung.

Für die Unterstützung bei computertechnischen Problemen insbesondere in Form des Layouts, möchte ich mich bei Thomas und Andreas Martin herzlichst bedanken, ohne sie wäre es um Einiges schwieriger geworden.

Weiterhin möchte ich mich bei Nina Kawasaki bedanken, die zusammen mit mir ihre Promotionsarbeit in der Mikrobiologie begonnen hat, für die Zeit, die wir zusammen im Labor verbracht haben, und dafür, dass wir uns gegenseitig immer in unseren Projekten unterstützt haben.

## 9. Lebenslauf

Name	Myriam Groß
Geburtsdatum	10.09.1982
Geburtstort	Saarbrücken
Eltern	Gernot Groß Hermine Groß, geb. Jochum
Familienstand	ledig
Schule	Grundschule Köllerbach 1989-1993 Marie-Luise-Kaschnitz Gymnasium 1993- 2002
Studium	Studium des Faches Medizin an der Universität des Saarlandes 2002-2008 Staatsexamen Oktober/November 2008
Praktisches Jahr	Knappschafts-Krankenhaus Püttlingen Akademisches Lehrkrankenhaus der UdS (Neurologie, Innere, Chirurgie)