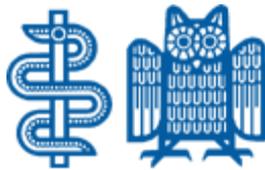


Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Institute für Infektionsmedizin

Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Univ.–Prof. Dr. med. M. Herrmann



**Einfluss verschiedener Antibiotika auf die Transkription des
Adhäsionsprotein Eap in *Staphylococcus aureus* Newman**

**Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin der
medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes**

2014

vorgelegt von

Mira Gensler

geboren am 08. Juli 1981 in Dachau

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Tabellenverzeichnis | VII |
| 1 Zusammenfassung | 1 |
| 1.1 Zusammenfassung | 1 |
| 1.2 Abstract | 4 |
| 2 Einleitung | 6 |
| 2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 6 |
| 2.2 Infektionen | 8 |
| 2.3 Therapie und Resistenzen | 9 |
| 2.4 Virulenzfaktoren | 12 |
| 2.5 Genexpression | 14 |
| 2.5.1 agr | 15 |
| 2.5.2 SarA | 15 |
| 2.5.3 Sae | 16 |
| 2.5.4 σ^B | 16 |
| 2.6 Das extrazelluläre Adhäsionsprotein (Eap) | 17 |
| 2.6.1 Charakterisierung | 17 |
| 2.6.2 Wirkungen | 17 |
| 2.7 Verwendete Antibiotika | 20 |
| 2.7.1 Bakteriostatische Antibiotika | 20 |
| 2.7.2 Bakterizide Antibiotika | 21 |
| 2.8 Ziel | 24 |
| 3 Material und Methoden | 25 |
| 3.1 Material | 25 |
| 3.1.1 Bakterienstämme, Nährmedium, Primer | 25 |
| 3.1.2 Antibiotika | 27 |
| 3.1.3 Laborgeräte, Kits | 27 |
| 3.2 Methoden | 29 |
| 3.2.1 Kulturen | 29 |
| 3.2.2 Resistenztestungen | 29 |
| 3.2.3 Wachstumskurven | 31 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2.4 | Zellzahlbestimmung..... | 32 |
| 3.2.5 | RNA-Präparation | 32 |
| 3.2.6 | cDNA..... | 33 |
| 3.2.7 | Generierung eines Standards | 34 |
| 3.2.8 | Real-Time PCR | 37 |
| 3.2.9 | Statistik..... | 40 |
| 4 | Ergebnisse | 41 |
| 4.1 | Resistenztestungen | 41 |
| 4.2 | Newman Wachstumskurven und Zellzahlbestimmungen | 43 |
| 4.2.1 | Kontrolle | 44 |
| 4.2.2 | Bakteriostatische Antibiotika | 44 |
| 4.2.3 | Bakterizide Antibiotika | 47 |
| 4.3 | <i>eap</i> -Transkriptionsanalysen..... | 50 |
| 4.3.1 | Kontrolle | 50 |
| 4.3.2 | Bakteriostatische Antibiotika | 51 |
| 4.3.3 | Bakterizide Antibiotika | 53 |
| 5 | Diskussion | 55 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 63 |
| 7 | Danksagung | 74 |
| 8 | Lebenslauf..... | 75 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| APC | Antigen-präsentierende Zellen |
| CA-MRSA | „Community acquired MRSA“ |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CLSI | „National Committee on Clinical Laboratory Standards“ |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| Eap | „Extracellular adherence protein“ |
| Emp | „Extracellular matrix binding protein“ |
| EUCAST | „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“ |
| gDNS | genomische DNS |
| gyrB | Gyrase B |
| ICAM-1 | „intercellular adhesion molecule 1“ |
| KBE | Kolonie bildende Einheiten |
| MAP | MHC ähnliches Protein |
| MBK | Minimale bakterizide Konzentration |
| MHB | Müller-Hinton-Medium |
| MHC | „Major-histocompatibility complex“ |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| MRSA | Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MSSA | Methicillin sensibler <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MSCRAMM | „Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ |
| OD | Optische Dichte |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| RNA | Ribonucleinsäure |

| | |
|------------------|--|
| RT-PCR | Real-Time-PCR |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| SERAM | „Secretable expanded repertoire adhesion molecules“ |
| VISA | Vancomycin intermediär empfindlicher <i>Staphylococcus aureus</i> |
| VRSA | Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> |

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Haufenförmige Anordnung von *S. aureus*, Gram-Färbung (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar) 6
- Abbildung 2:** *S.-aureus*-Wachstum auf Blutagar (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar) 7
- Abbildung 3:** MRSA in Europa (EARSS 2010) 10
- Abbildung 4:** Wirkungsweise von Daptomycin (Silverman, 2003) 22
- Abbildung 5:** Wachstumskurve von *S.-aureus*-Newman in MHB. (n=20) 44
- Abbildung 6 (A - D):** Einfluss verschiedener Linezolid- und Tigecyclin-Konzentrationen auf das Wachstum von *S.-aureus*-Newman in MHB. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte inkl. Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe eines „Student’s t-test“ ermittelt. (A) Wachstumskurven von *S.-aureus*-Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 1 µg/ml (1/2 MHK), 2 µg/ml (MHK) und 256 µg/ml (MBK) Linezolid. (B) Nach EUCAST-Referenzwerten zur Bestimmung der MHK ist der Stamm Newman auf alle getesteten Antibiotika sensibel. KBE–Bestimmung der Kulturen aus (A). (C) Wachstumskurven von *S.-aureus*-Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 0,0625 µg/ml (1/2 MHK), 0,125 µg/ml (MHK) und 64 µg/ml (MBK) Tigecyclin. (D) KBE–Bestimmung der Kulturen aus (C). 45
- Abbildung 7 (A - F):** Einfluss verschiedener Ciprofloxacin-, Daptomycin- und Oxacillin-Konzentrationen auf das Wachstum von *S. aureus* Newman in MHB. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe eines „Student’s t-test“ ermittelt. (A) Einfluss von Ciprofloxacin auf das Wachstum von *S. aureus* Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 0,0625 µg/ml (1/2 MHK), 0,125 µg/ml (MHK) und 0,25 µg/ml (MBK). (B) KBE–Bestimmung der Kulturen aus (A). (C) Einfluss von Daptomycin auf das Wachstum von *S. aureus* Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 0,25 µg/ml (1/2 MHK), 0,5 µg/ml (MHK) und 5 µg/ml (5xMBK). (D) KBE–Bestimmung der Kulturen aus (C). (E) Einfluss von Oxacillin auf das Wachstum von *S. aureus* Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 0,125 µg/ml (1/2 MHK), 0,25 µg/ml (MHK) und 0,5 µg/ml (MBK). (F) KBE–Bestimmung der Kulturen aus (D). 48

Abbildung 8: *eap*-Transkription in *S. aureus* Newman während des Wachstums in MHB. Auf der x-Achse sind die Untersuchungszeitpunkte eingetragen, auf der y-Achse die *eap*-Transkription relativ zu *gyrB*. Jede Messung wurde in Duplikation durchgeführt (n=34). 50

Abbildung 9: Einfluss von Linezolid und Tigecyclin auf die *eap*-Transkription relativ zur Kontrolle. Auf der x-Achse sind die Untersuchungszeitpunkte, auf der y-Achse ist die *eap*-Transkription relativ zur Kontrolle eingetragen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. * = $p < 0,05$. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe einer nicht parametrischen „Wilcoxon-rank-sum“-Statistik ermittelt. (A) Wirkung von Linezolid auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 1 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 2 $\mu\text{g/ml}$; MBK, 256 $\mu\text{g/ml}$). (B) Wirkung von Tigecyclin auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 0,0625 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 0,125 $\mu\text{g/ml}$; MBK, 64 $\mu\text{g/ml}$). 51

Abbildung 10: Einfluss von Ciprofloxacin, Daptomycin und Oxacillin auf die *eap*-Transkription relativ zur Kontrolle. Auf der x-Achse sind die Untersuchungszeitpunkte, auf der y-Achse ist die *eap*-Transkription relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. * = $p < 0,05$. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe einer nicht parametrischen „Wilcoxon-rank-sum“-Statistik ermittelt. (A) Wirkung von Ciprofloxacin auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 0,0625 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 0,125 $\mu\text{g/ml}$; MBK, 0,25 $\mu\text{g/ml}$). (B) Wirkung von Daptomycin auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 0,25 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 0,5 $\mu\text{g/ml}$; MBK (5x) 32 $\mu\text{g/ml}$). (C) Wirkung von Oxacillin auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 0,125 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 0,25 $\mu\text{g/ml}$; MBK, 0,5 $\mu\text{g/ml}$). 53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der Resistenztestungen von *S. aureus* Newman und AH12 (Δeap) nach CLSI-Standard. Unterschiede zwischen Wild-Typ und Mutante > 4 sind rot markiert. 41

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Einleitung

Staphylococcus aureus bildet zahlreiche Virulenzfaktoren, die eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Infektionen spielen. Das extrazelluläre Adhäsionsprotein (Eap) ist einer dieser Virulenzfaktoren, durch die *S. aureus* die Fähigkeit zur Internalisierung in verschiedene eukaryote Zelltypen besitzt. Diese wichtige Eigenschaft kann das Bakterium unter anderem vor dem Einfluss von nicht intrazellulär wirksamen Antibiotika schützen und dadurch auch zu einer erhöhten Rezidivrate nach Therapieende führen. Da eine Reihe jüngerer Studien darauf hinweisen, dass die klinische Effizienz eines Antibiotikums nicht nur von dem primären Wirkungsmechanismus abhängig sein muss, sondern auch von der Fähigkeit, die Expression von Immun- und Virulenzfaktoren bei Wirt und Bakterium zu beeinflussen, wird in dieser Arbeit die Transkription von *eap* in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher Antibiotika untersucht und getestet, ob diese Antibiotika eventuell mit dem stark kationischen Protein zu interagieren vermögen.

Methoden

Vertreter fünf klinisch aktuell bedeutender Antibiotikagruppen wurden ausgewählt: Ciprofloxacin (Fluorchinolone), Linezolid (Oxazolidine), Tigecyclin (Glycylcycline), Oxacillin (β -Laktame) und Daptomycin (Lipopeptide). Das stark *eap* exprimierende *S.-aureus*-Isolat Newman wurde als Teststamm gewählt. Mittels der Mikrodilutionsmethode nach CLSI-Standard wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) und die minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBK) von *S. aureus* Newman und einer isogenen *eap*-Mutante ermittelt. Zusätzlich wurden Wachstumskurven und Zellzahlbestimmungen durchgeführt und die *eap*-Transkription mittels Real-Time (qRT-PCR) bestimmt.

Ergebnisse

Der Vergleich der Resistenztestungen von Newman und der *eap*-Mutante ergab, mit Ausnahme von Tigecyclin, keine wesentlichen Unterschiede. Für Tigecyclin wurde für den Wildtyp im Vergleich zur *eap*-Mutante eine vier- bis achtmal niedrigere MHK ermittelt. Bei den Wachstumstestungen zeigte sich bei den Kontrollen ein biphasischer Verlauf des Bakterienwachstums, der durch Zugabe der Antibiotika zum Teil markant beeinflusst wurde. Dabei waren, wie erwartet, Unterschiede in den subinhibitorischen, den inhibitorischen und den bakteriziden Konzentrationen zu sehen. Die Transkriptionsanalysen ergaben, dass die Behandlung der *S.-aureus*-Newman-Kulturen mit Antibiotika, je nach Antibiotikum und eingesetzter Konzentration, zum Teil zu signifikanten Veränderungen in der *eap*-Transkription führten. Während Oxacillin, Ciprofloxacin und Tigecyclin, unabhängig von der eingesetzten Antibiotikamenge, die *eap*-Transkription nur in einem geringen Maße beeinflussten, führte die Behandlung mit Linezolid in der bakteriziden Konzentration zu einer Inhibierung der Transkription. Der Einsatz von Daptomycin hingegen führte in der fünffach bakteriziden Konzentration zu einer signifikanten Hochregulierung der Transkription dieses Virulenzfaktors.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass das stark anionische Protein Eap nicht mit den hier getesteten Antibiotika direkt zu interagieren vermag und so keinen direkten Schutz gegenüber diesen Antibiotika bietet. Die beobachtete Inhibierung der *eap*-Transkription durch Linezolid lässt spekulieren, dass in hoher Dosierung die Internalisierung von *S. aureus* vermindert werden könnte. Dies könnte letztlich einen über die rein antibakterielle Aktivität von Linezolid hinaus gehenden Effekt vermitteln, dessen etwaige therapeutische Bedeutung beispielsweise in der Behandlung chronisch rezidivierender Verlaufsformen eher, denn in der Behandlung akuter Infektion liegen könnte. Umgekehrt könnte die unter Daptomycingabe beobachtete erhöhte *eap*-Transkription über vermehrte intrazelluläre, *eap* vermittelte Internalisierung eben

zu solchen chronischen Verläufen beitragen. Diese Arbeit zeigt daher Beobachtungen mit potenzieller Bedeutung für von der Hauptwirkung unabhängige oder zusätzliche Antibiotikawirkungen auf und schafft daher mögliche Grundlagen für neue oder ergänzende Aspekte in der antiinfektiven Therapie gegen *S. aureus*.

1.2 Abstract

Introduction

Staphylococcus aureus produces a large number of virulence factors that are important for its infectivity. One of these virulence factors is the extracellular adhesions protein, Eap, which contributes to the pathogene's ability to internalize into different types of eukaryotic cells. This intracellular niche is thought to protect the bacterium against antibiotics that are not intracellular effective, and may lead to an increased rate of relapses after the end of the antibiotic therapy. Based on recent observations, indicating that the clinical efficiency of an antibiotic might not solely depend on its mode of action but also on its ability to influence the expression of immune- and virulence factors, it was wondered whether some of the antibiotics currently in use to treat *S. aureus* infections might physically interact with the highly cationic protein, and how different concentrations of these antibiotics might affect the expression of this adhesion- and immune-modulatory factor.

Methods

The following representatives of five groups of antibiotics, ciprofloxacin (fluoroquinolones), linezolid (oxazolidinones), tigecycline (glycylcycline), oxacillin (β -lactams) and daptomycin (lipopeptides) were chosen to test their impact on *eap*-transcription in *S. aureus* strain Newman, a highly *eap* expressing isolate. The minimal inhibitory concentrations (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) of the aforementioned antibiotics were determined for strain Newman and its isogenic *eap*-mutant mAH12 by a microplate dilution method following the CLSI guidelines. The impact of the antibiotics on growth and *eap*-transcription of the isolates were determined by optical density measurements at 600 nm, colony forming unit (CFU) determinations, and real-time (qRT-PCR) assays, respectively.

Results

No clear differences between the MICs and MBCs of strain Newman and its *eap* derivative mAH12 were found for all antibiotics tested here, with the only exception being tigecycline, which showed a 4- to 8-times lower inhibitory activity against the *eap*-mutant if compared to the wild-type. Adding increasing (sub-inhibitory [0,5x MIC], inhibitory [1x MIC], and bactericidal [1 to 5x MBC]) concentrations of the antibiotics to exponentially growing cultures reduced the bacterial growth in a concentration-dependent manner, and testing the impact of the antibiotics on *eap*-transcription revealed class- and dose-dependent effects. Oxacillin, ciprofloxacin and tigecycline only marginally affected *eap*-transcription, irrespective of the concentration used. However, the treatment with the bactericidal concentration of linezolid led to a strong inhibition of *eap*-transcription, while high concentrations of daptomycin (5x MBC) markedly increased the production of *eap*-mRNAs.

Conclusion

The data presented here indicate that the highly cationic protein Eap does not interfere with the activity of the antibiotics tested, suggesting that Eap is not directly protective against these antibiotics. The observed inhibitory effect of linezolid and promoting effect of daptomycin on *eap*-transcription, however, suggests that a high dosage of the former antibiotic may reduce the internalization capacity of *S. aureus*, and thus might be of particular value for the treatment of chronic and recruiting *S. aureus* infections, while high concentrations of the latter antibiotic might have the adverse effect and contribute to the formation of chronic infections.

By showing that some of the antibiotics currently in use for the treatment of *S. aureus* infections have some additive effect on virulence determinant production in addition to their primary mode of action, these findings may help to improve the anti-infective therapy against *S. aureus*.

2 Einleitung

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus gehört zu den am besten untersuchten humanpathogenen Erregern. Im Laufe der jahrzehntelangen Forschung haben sich zahlreiche Aspekte ergeben, die insgesamt das Verständnis dieses hochadaptiven Erregers verbessern.

Der Gattungsname geht auf den schottischen Chirurgen Sir Alexander Ogston zurück, der 1883 traubenförmige Bakterien aus eitrigen Abszessen isolierte (Ogston, 1883). Ein Jahr später erfolgte die Benennung des Speziesnamen durch den Mikrobiologen Rosenbach, der die Bakterien als erstes kultivieren konnte. Seinen Namen erhielt *S. aureus* aufgrund seiner goldgelben bis orangefarbenen Pigmentierung (Rosenbach, 1884).

S. aureus gehört zur Familie der *Micrococcaceae*, von der 42 Spezies und Subspezies bekannt sind (Ghebremedhin, 2008). Es ist ein grampositives, kugelförmiges, in Haufen- oder Traubenform (griechisch: staphyle) gelegenes, fakultativ anaerobes sowie katalasepositives Bakterium. *S. aureus* ist unbeweglich, bildet keine Sporen und weist eine Größe von durchschnittlich 1 µm auf (Abbildung 1).

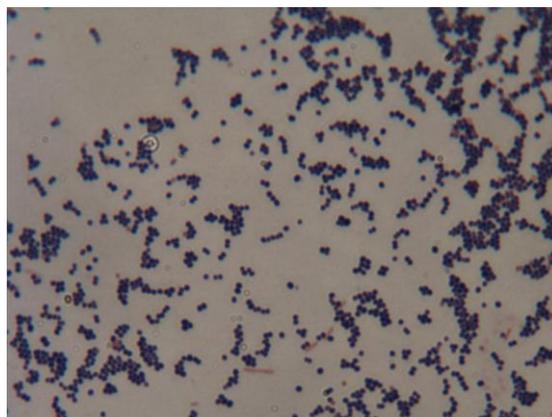


Abbildung 1: Haufenförmige Anordnung von *S. aureus*, Gram-Färbung (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar)

Beim Wachstum auf Blutagar zeigen sich bei den meisten *S.-aureus*-Isolaten Hämolysezonen um die Kolonien, die durch membranwirksame Toxine verursacht werden (Abbildung 2).



Abbildung 2: *S.-aureus*-Wachstum auf Blutagar (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar)

Dieser Mikroorganismus erhält neben seiner humanpathogenen Wirkung auch eine immer wichtigere Bedeutung in der Veterinärmedizin. Beim Krankheitsbild der bovinen Mastitis nimmt er neben den Koagulase-negativen Staphylokokken eine wichtige Rolle ein (Ferguson, 2007). Des Weiteren konnten Transmissionen von Tier zu Mensch in einer Studie mit Farmarbeitern und Mastitis-infizierten Kühen gezeigt werden (Tiwari, 2007).

S. aureus kann aus klinischen Materialien (z. B. Blut oder Abstriche) problemlos nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt durch klassisch mikrobiologische Nachweisverfahren. Die mikroskopische Betrachtung eines Gram-Präparates, sowie die kulturelle Anreicherung liefern einen ersten Hinweis. Zur weiteren Speziesdifferenzierung werden die Nachweise der Plasmakoagulase und des Clumpingfaktors angeschlossen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Identifizierung von *S.-aureus*-spezifischen Genen, insbesondere des für die Thermonuclease kodierenden Gens *nuc*, oder des in dieser Arbeit untersuchten *eap* (Hussain, 2008) durch NAT (Nukleinsäure Amplifikations Test), oder des Nachweises spezifischer Toxinen mittels immunologischer Verfahren.

2.2 Infektionen

S. aureus ist einer der wichtigsten nosokomialen Erreger, der eine Vielzahl von Resistenzdeterminanten aufweisen kann und als MRSA (Methicillin resistenter *S. aureus*) Vancomycin intermediärer resistenter (VISA) oder resistenter *S. aureus* (VRSA) viele Probleme verursacht. In jüngerer Vergangenheit sind zudem außerhalb der Klinik vorkommende, aus der Gesellschaft erworbene, sogenannte „community-acquired“ MRSA (CA-MRSA) nachgewiesen worden, die im Vergleich zu ihren nosokomialen Pendanten neben den Resistenzspektren zum Teil markante Unterschiede in ihrem Repertoire an Virulenzfaktoren aufweisen (Vandenesch, 2003).

S. aureus besiedelt bevorzugt den Nasen-Rachen-Raum, die Haut und Schleimhäute sowie die Axilla- und Leistengegend. Häufig ist Krankenhauspersonal in der Nase kolonisiert (Lee, 2007). Die Erregerausbreitung ist über Hautkontakt möglich. Ein weiterer wichtiger Übertragungsweg sind unbehandelte Oberflächen, auf denen der Erreger über mehrere Wochen überleben kann (Boyce, 2007; Kolms, 2007). Das Spektrum der Infektionen reicht von harmlosen Hautinfektionen bis zu lebensbedrohlichen septischen Krisen.

Mögliche Verläufe bei *S. aureus* Infektionen können in drei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen sind pyogene Infektionen zu nennen, wie Furunkel, Karbunkel, Arthritis, Osteomyelitis und Wundinfektionen. Bei den ebenfalls dieser Gruppe zugehörigen Biofilm-assoziierten Infektionen stellt das Einbringen von Fremdkörpern ein großes Risiko dar. Bei immunsupprimierten Patienten oder Patienten mit Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus besteht eine deutlich erhöhte Gefahr, dass die Infektion sehr schwer, bis hin zum septischen Schock, verläuft (Lowy, 1998; Mandell 2007/2008). In der nächsten wichtigen Gruppe sind Toxin-vermittelte Infektionen zusammengefasst. Dazu gehören das „Toxic Shock Syndrom“, welches durch das als Superantigen wirkende Toxic Shock Syndrom Toxin-1 (TSST-1) ausgelöst wird. Eine weitere zu dieser Gruppe gehörende Erkrankung ist das „Skald Skin Syndrom“, eine Hauttoxikose, die bei Kleinkindern und Säuglingen auftritt und durch Exfoliativtoxine wie das Exfolitan A (ETA) und B

(ETB) ausgelöst wird (Ladhani, 2001). Die letzte Gruppe sind Intoxikationen, die durch vielfach hitzestabile Enterotoxine wie die Staphylokokken Enterotoxine A (SEA) und B (SEB) ausgelöst werden, die ebenfalls zur Gruppe der Superantigene zu zählen sind und unter anderem Enteritiden, Lebensmittelvergiftungen bis hin zum „Toxic Shock Syndrom“ verursachen können (Holmberg, 1984).

2.3 Therapie und Resistenzen

In der Prä-Antibiotika-Ära verliefen 90% der durch *S. aureus* ausgelösten Infektionen tödlich (Smith/Vickes, 1960). Heute können Infektionen in der Regel erfolgreich antibiotisch behandelt werden. *S. aureus* ist grundsätzlich empfindlich gegen β -Laktam-Antibiotika wie das Penicillin, jedoch entwickelte das Bakterium im Laufe der Zeit immer mehr Resistenzmechanismen gegen diese Antibiotikagruppe. Dieser Mikroorganismus besitzt auch die Fähigkeit, sich schnell dem Selektionsdruck von Antibiotika anzupassen (Deurenberg, 2007). In der PEG Resistenzstudie von 2007 zeigte sich, dass die heutigen *S.-aureus*-Isolate zu 75% resistent gegenüber Penicillin G und zu 20% resistent gegenüber Oxacillin sind (nach EUCAST-Grenzwerten). Des Weiteren ist eine vermehrte Resistenz gegenüber den gebräuchlichen Antibiotika Ciprofloxacin, Clindamycin und Erythromycin zu erkennen. Aktuell steht jedoch trotz der Zunahme an multiresistenten *S.-aureus*-Isolaten immer noch ein schmales Spektrum an Antibiotika zur Verfügung, das bei Infektionen mit diesem Bakterium eingesetzt werden kann. Dazu gehören auch Reserveantibiotika wie Vancomycin, Linezolid, Daptomycin oder Tigecyclin. Prinzipiell sollten diese Antibiotika für normale Infektionen nicht zur Therapie in Betracht gezogen werden, um die Gefahr einer Resistenzentwicklung zu reduzieren. Da aber immer mehr gegenüber den derzeit im Klinikalltag gebräuchlichen Antibiotika resistente *S.-aureus*-Isolate entstehen, bekommen diese Reserveantibiotika eine immer größere Bedeutung. Bei einer Infektion ist das Anfertigen eines Antibiogramms daher von großer Bedeutung, denn durch die steigende Zahl resistenter Formen des Erregers kann nur hiermit

eine adäquate Therapie sichergestellt werden, und schwerwiegende Komplikationen können aufgrund von inadäquaten antibiotischen Therapien vermieden werden (Schramm, 2006).

In den 60er Jahren wurden erstmals methicillinresistente Stämme entdeckt (Barber, 1963), die sich in den kommenden Jahren rapide ausbreiteten und ein großes Problem der industrialisierten Länder darstellen. Abbildung 3 zeigt die momentane Resistenzlage in Europa.

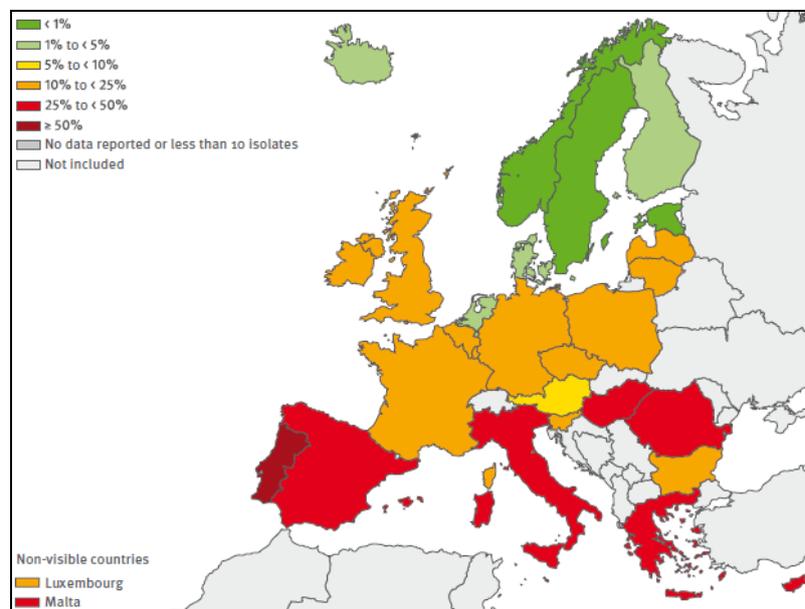


Abbildung 3: MRSA in Europa (EARSS 2010)

Die Methicillin-Resistenz wird durch das *mecA*-Gen vermittelt, welches für ein alternatives Penicillinbindeprotein kodiert, PBP2A (Hartmann, 1981). Dieses weist eine stark verminderte Bindungsaffinität zu Penicillinen auf und erlaubt es den PBP2A exprimierenden *S. aureus* Isolatn auch in Anwesenheit von klinisch relevanten β -Laktam Konzentrationen noch eine ausreichende Quervernetzung des Peptidoglykangerüsts zu gewährleisten. Für die Therapie von MRSA-Infektionen werden bevorzugt Glykopeptide wie z.B. Vancomycin eingesetzt. Aufgrund der stetigen Zunahme an MRSA und dem damit einhergehenden

vermehrten Einsatz von Glykopeptidantibiotika haben sich in den letzten Jahren jedoch auch Vancomycin-resistente *S. aureus* Isolate entwickelt, so dass auch diese Therapieoption vermehrt an Wirksamkeit verliert.

Wichtige präventive Maßnahmen zur Vermeidung von Infektionen im Krankenhaus und Resistenzbildungen sind die Händedesinfektion und allgemeine Hygienemaßnahmen, die Sanierung bekannter MRSA-Träger und ein gewissenhafter Umgang mit Antibiotika (RKI, 1999).

In Deutschland wurden MRSA-Infektionen bis vor kurzem nahezu ausschließlich in Krankenhäusern beobachtet. In den letzten Jahren sind aber zunehmend unabhängig von einem Krankenhausaufenthalt erworbene MRSA-Infektionen nachgewiesen worden. Durch diese speziellen, als „community acquired MRSA (CA-MRSA) bezeichnete Stämme hervorgerufene Infektionen zeigen in der Regel ein verändertes Infektionsspektrum. Sie werden insbesondere im Zusammenhang mit tiefgehenden, nekrotisierenden Haut- und Weichteilinfektionen, nekrotisierenden Pneumonien und schweren septischen Verläufen mit Purpura fulminans isoliert (Adem, 2005). Diese Krankheitsbilder sind wahrscheinlich mit der Bildung von PVL (Panton-Valentin-Leukozidin) assoziiert (Gillet, 2002).

VISA (Vancomycin-intermediär empfindliche *Staphylococcus aureus*) aber auch VRSA (Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus*) besitzen in der Regel eine durch die Akkumulation von Punktmutationen aufgrund von Antibiotikadruck verminderte Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin. VRSA können aber auch durch Aufnahme des *vanA* Genclusters aus Enterokokken eine Glykopeptid-Resistenz entwickeln (Sievert, 2008), die vermutlich über Konjugation von Vancomycin-resistenten Enterokokken mit *S. aureus* zustande kam (Noble, 1992). 2002 wurden erstmals VRSA durch das „Michigan Department of Community Health“ in den USA beschrieben (Weigel, 2003; Chang, 2003; Sievert, 2008). In Deutschland sind bisher noch keine VRSA im Klinikalltag isoliert worden. Der steigende Verbrauch an Glykopeptiden und Carbapenemen aufgrund der hohen

Prävalenz multiresistenter *S. aureus* führt aber zu einer stetigen Erhöhung des Selektionsdrucks, so dass auch hier zukünftig mit einem vermehrten Auftreten solcher Stämme zu rechnen ist (Kipp, 2004).

2.4 Virulenzfaktoren

S. aureus bildet eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, deren Auftreten sich jedoch von Isolat zu Isolat zum Teil markant unterscheiden kann. Vor einem Jahrzehnt wurde das erste komplette Genom eines *S. aureus*-Stammes veröffentlicht (Kuroda, 2001). Heutzutage liegen die Genomsequenzen von mindestens 17 verschiedenen *S. aureus*-Isolaten vor. Ein Vergleich dieser Sequenzen erbrachte, dass nur ca. 80% des *S. aureus*-Genoms konserviert ist und insbesondere im Repertoire an Virulenzfaktoren große stammspezifische Unterschiede vorzufinden sind.

Die Expression der Virulenzfaktoren wiederum unterliegt einer komplexen Regulation, die sowohl von intra- als auch von extrazellulären Signalen abhängig ist (Fournier, 2001). Im Folgenden werden die wichtigsten Virulenzfaktoren kurz dargestellt:

Die Zellwand von grampositiven Bakterien besteht zu 50% aus einer dicken Peptidoglykanschicht. Peptidoglykan ist ein lineares β -1,4-verknüpftes Polymer alternierender N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc)-Einheiten, das über die Peptidseitenketten der Peptidoglykan-untereinheiten zusätzlich quervernetzt ist (Ghuysen, 1963; Lowy, 1998). Der Quervernetzungsgrad ist dabei bei Staphylokokken Spezies sehr hoch und wird durch Transpeptidasen katalysiert, die zur Gruppe der Penicillinbindeproteine (PBPs) gehören. β -Laktam-Antibiotika, wie das Penicillin, hemmen die Transpeptidaseaktivität dieser Proteine und daher die Quervernetzung der Peptidketten (Ghuysen, 1991).

Es existieren zwei wichtige Gruppen von Oberflächenproteinen. Zum einen sind es die Zellwand-gebundenen Adhäsine, die als MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) bezeichnet werden. Diese besitzen ein LPXTG-Motiv, welches der Verankerung der Adhäsionsmoleküle dient (Foster, 1998) und durch das Enzym Sortase kovalent an die Seitenketten des Peptidoglykans gebunden wird (Mazmanian, 1999). Zu den MSCRAMMs gehören unter anderem das Protein A (*spa*), die Fibronectinbindeproteine A und B (FnBPA/B) sowie die Fibrinogen-bindenden Proteine Clumping-Faktor A und B (ClfA/B).

Die zweite wichtige Gruppe stellen die löslichen Adhäsine dar, die als SERAM (secreted expanded repertoire adhesive molecules) bezeichnet werden. Diese Oberflächenproteine besitzen kein LPXTG-Motiv, sind daher nicht kovalent in der Zellwand verankert, sondern werden von den Bakterien sezerniert und zum Teil an verschiedene Komponenten der Zellwandoberfläche zurückgebunden (Chavakis, 2005). Zu dieser Gruppe gehört die Koagulase (*coa*), das „Extracellular fibrinogen binding protein“ (Efb), das „Extracellular matrix binding protein“ (Emp), das „Extracellular adherence protein“ (Eap) und das „von Willebrandt factor binding protein“ (vWbp). Diese Moleküle spielen sowohl bei der Adhäsion als auch bei der Invasion eine wichtige Rolle.

S. aureus sezerniert eine Vielzahl von unterschiedlichen Toxinen und Enzymen. Zu den wichtigsten Toxinen gehören die Hämolyse (α , β , γ , δ) und Leukozidine, wie das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL). Diese können Erythrozyten, Leukozyten und andere Wirtszellen lysieren bzw. deren Apoptose induzieren und damit die spezifische und die unspezifische Immunantwort markant beeinflussen (Foster, 2005). Weitere wichtige Toxine sind die zuvor schon erwähnten, als Superantigene wirkenden, Enterotoxine und das TSST-1 (Monday, 2001). Weiterhin gibt es einige wichtige Exoenzyme wie DNAsen, Lipasen, Proteasen, Hyaluronidasen und Staphylokinasen (SAK). Die Staphylokinasen spielen bei der Inaktivierung humaner α -Defensine eine wichtige Rolle und ist ein wirtsfremder Aktivator eukaryonter Plasminogene, welche als Plasmin in die Lyse von Fibrin-haltigen Blutgerinnseln involviert sind und eine Reihe von Blutplasma-proteinen

abbauen (Bokarewa, 2006). Des Weiteren spaltet SAK die auf der bakteriellen Zelloberfläche gebundenen Moleküle C3b und IgG und reduziert damit die Phagozytose (Rooijackers, 2005). Diese Enzyme sind wichtig für das Überleben innerhalb des menschlichen Organismus.

Die Fähigkeit von Staphylokokken Biofilme auszubilden, stellt einen weiteren wichtigen Virulenzmechanismus dar. Die Biofilmbildung beginnt mit der Adhäsion an das Wirtsgewebe und/oder Implantationsmaterial und der darauf folgenden Produktion einer aus Polysacchariden bestehenden Matrix (Harraghy, 2006), dem sogenannten PIA („polysaccharid intercellular adhesin“). PIA ist ein β -1,6-verknüpftes Glukosaminoglykan, das für die Ausbildung von mehrschichtigen Strukturen von großer Bedeutung ist (Mack, 1996). Die PIA-Synthese wird durch Faktoren, die über das *ica*-Operon kodiert sind, vermittelt (Cramton, 1999). Die Biofilmbildung schützt die Bakterien weitestgehend vor dem Immunsystem des Wirtes und einer antibiotischen Therapie.

2.5 Genexpression

Unter Genexpression wird die Gesamtheit aller zellulären Prozesse verstanden, die zur Realisierung des genetischen Programms ablaufen. Da es jedoch alleine schon aus ökonomischen Gründen nicht sinnvoll ist, immer alle Gene gleichzeitig zu exprimieren, gibt es eine Reihe von Regulationsmechanismen, die auf unterschiedliche Außenbedingungen, z. B. ein verändertes Nahrungsangebot oder Antibiotikastress, reagieren können. Bakterielle Regulationsmechanismen zeichnen sich häufig durch starke Anbindung an den Wachstumszyklus aus. Viele Bakterien sind in der Lage, über Autoinduktionssysteme ihre eigene Zelldichte zu messen und Gene dadurch dichteabhängig zu exprimieren (de Kievit, 2000). *S. aureus* exprimiert zu Beginn der Wachstumsphasen bevorzugt Adhäsionsfaktoren wie Fibronektinbindeproteine und Protein A. Werden dann höhere Zelldichten erreicht, werden vermehrt Exoproteine exprimiert und die Bildung der Oberflächenproteine inhibiert. Die Expression von Virulenzfaktoren,

wie die von *Eap*, wird durch ein komplexes Netzwerk an Regulatoren gesteuert, welches auf eine Vielzahl von extrazellulärer wie intrazellulärer Stimuli reagieren kann. So reagiert *S. aureus* z. B. auf subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika mit der Regulation verschiedener Virulenzfaktoren. So zeigte sich bei MRSA Isolaten eine bis zu 30-fach erhöhte Produktion von α -Toxin durch subinhibitorische Konzentrationen von Methicillin (Ohlsen, 1998). Im Nachfolgenden wird eine Auswahl der wichtigsten Regulatoren, die für die Fragestellung dieser Arbeit relevant sind, dargestellt.

2.5.1 agr

Im Zentrum der Regulation von Virulenzfaktoren bei *S. aureus* steht der *agr* (accessory gene regulator) Locus, der unter anderem ein „Quorum Sensing-“ und ein Zweikomponentensystem enthält. Der *agr* Locus kontrolliert die Regulation der meisten Exo- und Zellwand-assoziierten Proteine (Novick, 2003) und besteht aus fünf Genen: *agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* und *hld*. Die Komponenten des *agr*-Locus werden über zwei verschiedene Transkripte, RNAII und RNAIII, produziert, wobei RNAIII, neben seiner Funktion als mRNA für das δ -Hämolysin Hld, als regulatorische RNA das eigentliche Effektormolekül dieses Locus darstellt, welches vor allem am Übergang der postexponentiellen Phase zur stationären Phase exprimiert wird (Lindsay, 1999). Die transkriptionelle Aktivität des *agr*-Locus ist dabei von einer Reihe weiterer Regulatoren, wie SarA und σ^B , aber auch von der Bakteriendichte abhängig, die mithilfe der Komponenten AgrA-D erkannt und weitergeleitet wird (Yarwood, 2003). Frühere Arbeiten unseres Institutes konnten zeigen, dass die Expression von *eap* über *agr* beeinflusst wird (Harraghy, 2005).

2.5.2 SarA

Als weiterer wichtiger Regulator ist das DNA-Bindeprotein SarA (staphylococcal accessory regulator), zu nennen. Die Produktion dieses Regulators erfolgt sowohl in der exponentiellen Phase als auch in der postexponentiellen Phase (Cheung, 2005). SarA ist in der Lage, sich an seinen eigenen Promotor zu binden und damit seine Expression zu regulieren (Cheung, 2008). SarA ist co-regulatorisch über die

Expression von *agr*, wie auch direkt an der Bildung einer Vielzahl von Virulenzfaktoren, so auch von Eap, beteiligt (Clements, 1999; Harraghy, 2005).

2.5.3 Sae

Der *sae* (*S. aureus* exoprotein expression) Lokus kodiert für ein Zweikomponenten-System (Giraud, 1999), dessen Regulator für die Expression vieler extrazytoplasmatischer Virulenzfaktoren, wie den Hämolsinen, der Koagulase, den FnBPs und Eap von Bedeutung ist. Durch eine *sae*-Aktivierung kommt es zu einer Induktion von Genen, die an der Adhäsion, Immunmodulation und an der Toxizität beteiligt sind (Kuroda, 2007; Liang 2006). Besonders für das *sae*-System ist bekannt, dass seine Aktivität durch verschiedene Antibiotika-Klassen moduliert werden kann. So kann Sae z. B. durch verschiedene Glykopeptide und β -Laktame aktiviert (Kuroda, 2007), aber auch durch Antibiotika wie Clindamycin inhibiert werden (Novick, 2003). Eine Besonderheit weist hierbei das *sae*-System des Stammes Newman auf, der in dieser Arbeit verwendet wurde. Hierbei zeigt sich ein Aminosäureaustausch in der ersten Transmembran-Domäne von SaeS, der zu einer permanenten Aktivität dieser Sensor-Histidinkinase führt (Mainiero, 2010).

2.5.4 σ^B

Als weiterer globaler Regulator sollte noch σ^B genannt werden. Dieser alternative Transkriptionsfaktor zeigt in der späten exponentiellen Phase seine Hauptaktivität, kann aber auch durch verschiedene Stresssignale aktiviert werden (Giachino, 2001). Auch wenn σ^B keine direkte regulatorische Wirkung auf *eap* ausübt, so wirkt es aber regulatorisch auf RNAlII, SarA und Sae (Bischoff, 2004).

2.6 Das extrazelluläre Adhäsionsprotein (Eap)

2.6.1 Charakterisierung

Eap wurde in den 1990er Jahren unabhängig von verschiedenen Forschungsgruppen isoliert und charakterisiert. Es wurde der Gruppe der löslichen Adhäsionsproteine (SERAM) zugerechnet und weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur N-terminalen-Kette vieler Major Histocompatibility Komplexe (MHC) der Klasse II auf. Es wurde daher zunächst als Map (MHC analogous protein) bezeichnet (Palma, 1999). Eap konnte bei allen getesteten *S. aureus*-Stämmen nachgewiesen werden, fehlte aber bei anderen grampositiven Kokken, wie den Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS) und gehört damit zu den artspezifischen Genen dieses Pathogens (Hussain, 2008). In Abhängigkeit des Stammes variiert die Größe zwischen 48 und 72 kDa. Aufgrund von PCR-Analysen kann Eap in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden: Gruppe I hat ein 1,8-kb-PCR-Produkt, Gruppe II hat ein 2-kb-PCR-Produkt, und die Gruppe III hat ein 2,4-kb-PCR-Produkt (Harraghy, 2003). Die Expression variiert je nach Medium und Inkubationsbedingungen und wird über die globalen Regulatoren RNAIII, SarA und insbesondere über das Sae-System reguliert (Dunman, 2001; Harraghy 2005). Eap ist ein stark kationisches Protein.

2.6.2 Wirkungen

2.6.2.1 Adhäsion

Eap ist in der Lage, Oligomere auszubilden und eine Agglutination durch Bindung an die Zellwand der Staphylokokken hervorzurufen (Harraghy, 2003). Dies führt zu einer verbesserten Adhäsion an die extrazelluläre Matrix. Es ist ein Protein mit einer breiten Bindungsspezifität. Eap kann an extrazelluläre Matrixproteine, z. B. Kollagen I, aber auch an Plasmaproteine binden (Hussain, 2002; Hussain, 2008). Eine ungewöhnliche Eigenschaft dieses Proteins ist, dass sezerniertes Eap zurück an die Oberfläche von *S. aureus* binden kann. Es kann dabei sowohl mit sich selbst, als auch mit anderen Oberflächenstrukturen interagieren (Hussain, 2002).

S. aureus besitzt Oberflächenstrukturen, die unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu Eap aufweisen. Hier sind die neutrale Phosphatase (Flock, 2001) und Teichonsäuren (Vuong, 2002) beschrieben worden. Eap hat große Bedeutung bei der Adhäsion an eukaryotische Zellen, was durch Studien mit *eap*-Deletionsmutanten gezeigt werden konnte (Kreikenmeyer, 2002). ICAM-1 wurde als Bindungsmolekül identifiziert. Eine Interaktion mit APCs, T-Zellen (Lee, 2002), Endothelzellen (Chavakis, 2002), Fibroblasten und Epithelzellen wurde beschrieben (Hussain, 2002; Kreikenmeyer, 2002; Haggar, 2003).

2.6.2.2 Invasion in eukaryotischen Zellen

Es bestand lange Zeit die Annahme, dass *S. aureus* lediglich ein extrazelluläres Pathogen sei. Die Internalisierungsfähigkeit von *S. aureus* konnte jedoch in jüngster Zeit durch mehrere Studien belegt werden (Dziewnowska 1999, Haggar 2003) und es wurde gezeigt, dass *eap* hierbei eine wichtige Rolle einnimmt. Es ist eine der bedeutenden Eigenschaften von Eap, und es soll in dieser Arbeit ein wichtiger Punkt sein. So zeigten Haggar und Kollegen (Haggar, 2003) unter anderem, dass der Stamm Newman effizienter internalisiert wurde, als eine *eap*-negative Mutante. Es zeigte sich auch, dass eine vorherige Behandlung mit Anti-Eap-Antikörpern (zuvor Inkubation mit Eap) eine verringerte Internalisierung sowohl bei dem Wildtype als auch bei der Deletionsmutante bewirkte (Haggar, 2003). Der genaue Weg der Internalisierung muss noch geklärt werden. In verschiedenen Studien wurde bereits untersucht, wie verschiedene Substanzen auf die Eap-Expression wirken und ob dadurch eine vermehrte Internalisierung von *S. aureus* in eukaryote Zellen erreicht wird (Alvarez, 2011). In einer 2013 publizierten Studie (Bur, 2013) mit Keratinozyten zeigte sich, dass Eap sowohl die Zahl der infizierten eukaryotischen Zellen, als auch die bakterielle Last pro infizierte Zelle erhöhte.

2.6.2.3 Angiogenese und Wundheilung

Eap, als wichtiger Virulenzfaktor, hat auch Einfluss auf die Angiogenese und

vermittelt eine verzögerte Wundheilung. Es wirkt inhibierend auf die Chemotaxis und kann somit die Angiogenese indirekt behindern (Chavakis, 2005). Die Immunabwehr wird gehemmt und eine vermehrte Vaskularisierung verhindert. Eap führt zu einer Blockade von VEGF (vascular endothelial growth factor) und bFGF (basic endothelial growth factor) sowie zu einer Inhibition von TF (tissue factor) (Athanasopoulos, 2006; Sobke, 2006).

2.6.2.4 Immunmodulation

In vielen Studien der letzten Jahre hat sich gezeigt, dass Eap auch eine immunmodulatorische und eine antiinflammatorische Wirkung zeigt.

Die immunmodulatorischen Eigenschaften von Eap sind unter anderem durch eine Bindung an ICAM-1 bedingt. Dadurch wird die Aktivierung und die Diapedese von Leukozyten und deren Extravasation verhindert (Chavakis, 2002). In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass Mäuse, die mit einem Eap-positiven Stamm infiziert wurden, im Fall einer bakteriellen Peritonitis ein 2- bis 3-fach geringeres Neutrophilen-Recruitment zeigten als solche, die mit einem Eap-negativen Stamm infiziert wurden. Xie *et al.* zeigten 2006 die antiinflammatorische Wirkung von Eap in Zusammenhang mit Multipler Sklerose (Xie, 2006). Das β_2 -Integrin-abhängige Neutrophilen-Recruitment wird blockiert, und es kommt zu einer Interaktion mit ICAM-1. Eap bewirkt eine Unterdrückung der Autoimmun-Enzephalitis, was bisher aber nur experimentell gezeigt werden konnte. Eap zeigt seine antiinflammatorischen Eigenschaften durch eine Hinderung der Neutrophilen an nicht stimulierte und TNF α -stimulierte Endothelzellen zu binden (Haggar, 2004). In einer Studie mit peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) konnte außerdem gezeigt werden, dass Eap Einfluss auf den B-Zell- und T-Zell-Tod hat (Haggar, 2005). Eap ist zudem in der Lage, die Th-1- und Th-2-Antwort zu modulieren (Lee, 2002), was letztendlich zu einer verminderten Phagozytose von *S. aureus* führt. Des Weiteren hat die dreidimensionale Struktur einiger Eap-Einzel-Domänen strukturelle Ähnlichkeit mit bakteriellen Superantigenen (Geisbrecht, 2005).

2.7 Verwendete Antibiotika

2.7.1 Bakteriostatische Antibiotika

Bakteriostatische Antibiotika hemmen das Wachstum und die Vermehrung der Bakterien, sind jedoch nicht in der Lage, diese abzutöten.

2.7.1.1 Linezolid

Linezolid ist ein Antibiotikum aus der Klasse der Oxazolidinone und wirkt auf Staphylokokken bakteriostatisch, kann aber bei Streptokokken einen bakteriziden Effekt zeigen. Linezolid ist der erste Vertreter einer neuen Antibiotikaklasse, die angesichts der zunehmenden Resistenzentwicklung von grampositiven Erregern eine wichtige Bereicherung in der Therapie darstellt (Trautmann, 2004). Das Antibiotikum wirkt durch Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese an der 50S-Untereinheit der Ribosomen, wobei die Bildung eines funktionstüchtigen Initiationskomplexes verhindert wird. Hierbei wird der Beginn der Proteinbiosynthese gehemmt. Da Linezolid eine lipophile Molekülstruktur aufweist, könnte dies die Penetration ins Zellinnere begünstigen. Es zählt zu den Reserveantibiotika. Es kann sowohl i. v. als auch p. o. verordnet werden und wirkt ausschließlich gegen grampositive Mikroorganismen, einschließlich MRSA- und Vancomycin-resistente Enterokokken. Es verfügt über günstige pharmakokinetische Eigenschaften und eine hohe Bioverfügbarkeit, von nahezu 100 % nach oraler Gabe, bei geringem Interaktionspotenzial. Zum Einsatz kommt es vor allem bei schweren nosokomialen Infektionen, wie. Pneumonien und schweren Haut- und Weichteilinfektionen (Halle, 2002). Eine wichtige Therapieoption stellt es bei durch grampositive Pathogene verursachten Septikämien, Endokarditiden, Osteomyelitiden, Katheter- und Endoprotheseninfektionen und bei Patienten mit Penicillin-/Cephalosporinallergien dar (Halle, 2002). In ersten Studien konnte gezeigt werden, dass Linezolid in Granulozyten intrazellulär gut wirksam ist (Wilhelm, 2004), in Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen hingegen so gut wie gar nicht (Düwelhenke, 2006).

2.7.1.2 Tigecyclin

Tigecyclin gehört in die Gruppe der Glycylcyclin-Antibiotika. Diese Antibiotikaklasse wirkt durch die Hemmung der Translation der bakteriellen Proteinbiosynthese, indem es an die 30S-Untereinheit der Ribosomen gebunden und dadurch die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA verhindert wird. Der Einbau von Aminosäuren an die wachsende Peptidkette wird dadurch verhindert. Die von EUCAST festgelegten Grenzwerte für die MHK liegen für *S. aureus* bei $\leq 0,5$ mg/l. Üblicherweise empfindliche Spezies sind z. B. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, und *Clostridium perfringens*. *Pseudomonas aeruginosa* hingegen besitzt eine natürliche Resistenz gegen dieses Antibiotikum (Rote Liste, 2008). Tigecyclin zeigt eine vergleichsweise gute Aktivität gegen MRSA und VRSA (Manfredi, 2010). Anwendungsgebiete sind komplizierte Haut- und Weichgewebsinfektionen sowie komplizierte intraabdominelle Infektionen. Für Tigecyclin konnte in einer Studie von 2008 eine intermediäre intrazelluläre Wirksamkeit gezeigt werden (Tholema, 2008). 2011 weist der Hersteller Pfitzer in einem Rote-Hand-Brief darauf hin, dass Tigecyclin aufgrund einer erhöhten Mortalitätsrate nur noch eingesetzt werden darf, wenn andere Antibiotika ungeeignet erscheinen (Pfitzer, 2011).

2.7.2 Bakterizide Antibiotika

Bakterizide Antibiotika können Bakterien abtöten, indem sie lebenswichtige Stoffwechselfvorgänge hemmen.

2.7.2.1 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin gehört zur Gruppe der Fluorchinolone, welches aufgrund der hohen antibakteriellen Aktivität und der oralen Wirksamkeit häufig eingesetzt wird. Ciprofloxacin wurde 1981 von der Firma Bayer entwickelt. Dieses Antibiotikum wirkt als Gyrasehemmer und damit auf die DNA-Replikation und die Zellteilung. Es wirkt nicht nur in der Vermehrungsphase, sondern auch in der Ruhephase der

Erreger. Bei gramnegativen Bakterien ist die Zielstruktur die Topoisomerase II, bei grampositiven Erregern ist es die Topoisomerase IV. Dieses Chemotherapeutikum ist gut gewebe- und zellgängig, besonders bei schwer zugänglichen Geweben (Lunge, Knochen, Knorpel), sowie liquorgängig. Chinolone zeigen einen intrazellulären Aktivitätsverlust, jedoch können in therapeutischen Dosierungen bakterizide Wirkspiegel erreicht werden. In einer Studie mit phagozytierten Pneumokokken konnte gezeigt werden, dass Fluorchinolone eine gute bakterizide Wirkung auf diese haben (Mandell, 2000). Es gehört zu den systemisch anwendbaren Flurochinolonen mit breiter Indikation und wird z. B. bei der Behandlung von komplizierten, ambulant erworbenen Harnwegsinfekten und schweren Atemwegsinfektionen eingesetzt (Herrmann, 2009).

2.7.2.2 Daptomycin

Daptomycin ist ein zyklisches Lipopeptid-Antibiotikum. Es besteht aus einem hydrophilen Ring mit 13 Aminosäuren und einer lipophilen Seitenkette. Daptomycinmoleküle inserieren in die Zytoplasmamembran und oligomerisieren zu Membranproteinen. Dieser Ca^{2+} -abhängige Prozess führt dazu, dass Kaliumionen aus der Zelle strömen, es dadurch zu einer Depolarisierung kommt und der Zelltod folgt (Wiedemann, 2008) (Abbildung 4).

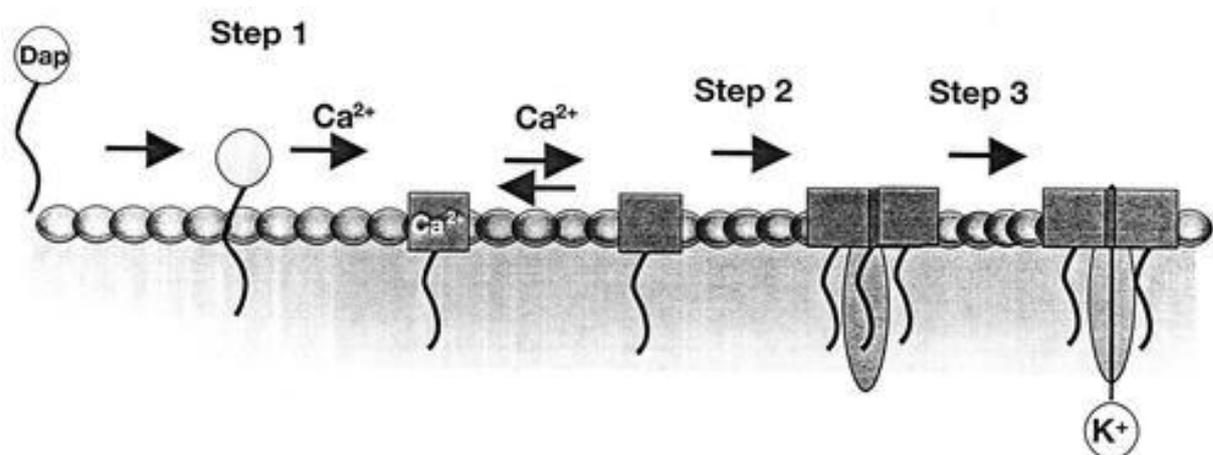


Abbildung 4: Wirkungsweise von Daptomycin (Silverman, 2003)

Durch diesen Prozess werden die Bakterien ohne Zellyse abgetötet und damit Risiken wie eine Exotoxinausschüttung weitgehend verhindert (Ginsburg, 2002).

Nach EUCAST besitzt *S. aureus* eine MHK von 0,5 mg/l. Es zeigt sich, dass *S. aureus* neben *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* sowie den koagulasenegativen Staphylokokken eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Daptomycin aufweist (Wiedeman, 2008). Dieses Antibiotikum zeigt gegen ein breites Spektrum an grampositiven Erregern seine bakterizide Wirkung, nicht aber gegen gramnegative. Daptomycin wird bei der Behandlung von Haut- und Weichgewebeinfektionen eingesetzt. Bei einer simulierten Dosis von 6mg/kg konnte in vivo eine effektive bakterizide Wirkung bei implantierten MRSA-Endokarditis-Vegetationen in Ratten gezeigt werden (Mortin, 2003). Daptomycin zeigt keine intrazelluläre Wirksamkeit (Thomela, 2008). Im Januar 2011 wurde von der Novartis Pharma GmbH ein Rote-Hand-Brief zum Zusammenhang von Daptomycin (Cubicin®) und eosinophiler Pneumonie herausgegeben (Novartis Pharma GmbH, 2011).

2.7.2.3 Oxacillin

Oxacillin ist ein Antibiotikum der Klasse der Isoxazolympenicilline, die auch Staphylokokkenpenicilline genannt werden. Diese Klasse gehört zu den β -Laktam Antibiotika und wirkt daher bakterizid auf alle proliferierenden Erreger. Sie greifen in die Zellwandsynthese ein und reagieren dort mit Penicillin-bindenden Proteinen. Dadurch kommt es zu Zellwanddefekten und zur osmotisch bedingten Bakterizidie. Oxacillin zeichnet sich durch eine Stabilität gegenüber bakteriellen Penicillinasen aus. Isoxazolympenicilline sind schlecht gewebebegänglich und sollten daher nur bei leichteren Infektionen mit penicillinasebildenden Staphylokokken eingesetzt werden (Karow, 2009). β -Laktam Antibiotika sind schlecht zellgänig und weitgehend wirkungslos bei zellwandlosen Bakterien, intrazellulär lebenden Keimen wie Chlamydien oder vorwiegend intrazellulär parasitierenden Bakterien (z. B. Salmonellen).

2.8 Ziel

Die Expression einer Vielzahl der *S. aureus*-Gene wird durch subinhibitorische und inhibitorische Konzentrationen verschiedenster Antibiotikaklassen beeinflusst. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob die Behandlung mit ausgewählten staphylokokkenwirksamen Antibiotika, die eine unterschiedliche Zellgänigkeit aufweisen, in unterschiedlichen Konzentrationen eine Wirkung auf das Wachstum dieses Bakteriums zeigen, durch diese Antibiotikakonzentrationen die Genexpression des Adhäsionsproteins Eap verändert wird, und ob Eap die Effektivität dieser Antibiotika zu beeinflussen vermag. Letztere Fragestellung ergibt sich vor allem aus der stark kationischen Ladung des Adhäsionsproteins, welches aufgrund der Ladung Interaktionen mit verschiedenen Antibiotika möglich macht und so das Bakterium möglicherweise vor Antibiotikawirkungen schützen kann.

Da Eap die Internalisierungsfähigkeit von *S. aureus* in humane Zellen zu stimulieren vermag und so das Bakterium vor nicht bis wenig intrazellulär wirksamen Antibiotika geschützt wird, ist es von großem Interesse zu untersuchen, ob die Expression von Eap durch diese Antibiotika beeinflusst werden kann, ähnlich, wie dies für Salizylsäure bereits gezeigt wurde (Alvarez, 2011) und damit die Internalisierung von *S. aureus* unter Antibiotikadruck verändert wird. Als erster Schritt in diese Richtung wurde daher mittels RT-PCR-Analysen untersucht, ob diese Antibiotika zu einer Hochregulation der *eap*-Transkription führten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme, Nährmedium, Primer

3.1.1.1 Bakterienstämme

Zur Untersuchung des Effektes unterschiedlicher Antibiotika auf die Transkription von *eap* wurde der *S.-aureus*-Stamm Newman verwendet, da dieser eine starke *eap*-Expression zeigt und hier eine isogene Δeap -Mutante, AH12, zur Verfügung stand.

| Bakterienstamm: | Eigenschaft: | Beschreibung: |
|-----------------|-----------------------------------|--|
| Newman | Wildtyp erhöhte Eap-Expression | T. Foster, Dublin (Duthie,1951) |
| AH12 | Newman Δeap | M. Hussain, Münster (Hussain, 2002) |

3.1.1.2 Nährmedium

Da das „National Committee on Clinical Laboratory Standards“ (CLSI) für die Testung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von *S. aureus* die Verwendung des Müller-Hinton-Broth II (MHB) Nährmediums vorschreibt, wurden in dieser Studie alle Bakterienstämme in diesem Medium kultiviert. Zur Anzucht der Bakterien wurde Müller Hinton Agar verwendet. MHB wurde als Fertigpulver von der Firma Becton, Dickinson and Company (USA) verwendet.

Inhaltsstoffe:

| | |
|--------------|------|
| Beef Extract | 3,0g |
|--------------|------|

| | |
|-----------------------|-------|
| Acid Digest of Casein | 17,5g |
| Soluble Starch | 1,5g |

3.1.1.3 Primer

Primer Name: Primer Sequenz:

Real-Time-PCR

PrimereapRT3forward 5'- ATT TTA TCA AGC TTA ACA TTT AAT AAG AAT
CAA - 3'

PrimereapRT3.1reward 5'- AAA ACT GAT TTA ACT TAA TTC TCT ATA TCT
TTA TAA CTA A - 3'

PrimereapRT3.2reward 5' - ACT GAT TTA ACTCTA TCC TCT AAA TCT TTA
TAA CTA AT - 3'

Primer gyrase forward 5' - GAC TGA TGC CGA TGT GGA - 3'

Primer gyrase reward 5' - AAC GGT GGC TGT GCA ATA - 3'

RNA-Standard

eapStandard2forwT7 5' - TAA TACGACTCACTA TAG GGA GAT TTA GCA
TTA GGT GTT TTA G - 3'

eapStandard2reverse 5' - GCT TGC TTC GAT AAT CTT AA - 3'

gyrStandardforwT7 5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT AGT
AAA AGT CCT GAA GAA T - 3'

gyrStandardreverse 5' - CAT TGT TGT TTC CCA TAA T - 3'

3.1.2 Antibiotika

| | |
|---------------|-------------|
| Ciprofloxacin | (Fluka) |
| Daptomycin | (Chiron) |
| Linezolid | (Pharmacia) |
| Oxacillin | (Fluka) |
| Tigecyclin | (Weyeth) |

3.1.3 Laborgeräte, Kits

3.1.3.1 Laborgeräte

| | |
|-----------------|--|
| Photometer | Gene Quant Pro (Amersham) |
| Vortexer | VF2 von IKA-Labortechnik (Staufen) |
| Schüttler | Schüttelinkubator System Multitron II (Infors) |
| Steril-Werkbank | HERA Safe |
| Brutschrank | Wärme- und Trockenschrank der Baureihe 5000 (Heraeus) |
| PCR-Geräte | 7000 Sequenze Detektion System (ABI) Gene Amp PCR System 9700 (ABI) |
| Pipetten | Gilson |
| Zentrifuge | Eppendorf |

3.1.3.2 Kits

| | |
|------|--|
| RNA | NucleoSpin RNA II (Machery Nagel) |
| cDNA | HighCapacity cDNA Reverse Transkription Kit (Invitrogen) |

| | |
|-------------------------|---|
| gDNA | MasterPure (Epicentre) |
| Aufreinigung (Standard) | QuiaQuick (Quiagen) |
| In-vitro-Transkription | MegaShort Skript (Ambion) |
| Transkriptionsprodukt | MegaClear Kit (Ambion) |
| Turbo-DNAse | Turbo-DNA-free (Ambion) |
| Standardgenerierung | Fast Star Taq DNA Polymerase (Quiagen) |
| RT-PCR | SYBER Green Master MIX Kit (Appl. Biosyst.) |

3.2 Methoden

3.2.1 Kulturen

Für die Herstellung der Übernachtskultur wurden 12 ml MHB in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Bakterien angeimpft und im Schüttler bei 37°C und 150 rpm für 16 bis 18 Stunden kultiviert. Es wurde immer eine Negativ-Kontrolle mitgeführt (MHB). Für die Starterkultur wurden 12 ml MHB in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben und die zuzugebende Menge an Übernachtskultur berechnet, um eine optische Dichte von 0,1 für die Ausgangskultur der Wachstumskurven zu erreichen. Die Messung der OD erfolgte im Zellkultur-Programm des Photometers, bei einer Wellenlänge von 600 nm.

3.2.2 Resistenztestungen

3.2.2.1 Minimale Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes ($\mu\text{g/ml}$), bei der das sichtbare Wachstum von Bakterien innerhalb einer festgelegten Zeitspanne verhindert wird. Die MHK lässt Rückschlüsse auf die Empfindlichkeit der Bakterien auf die Antibiotika zu.

Als Vorversuch erfolgte die MHK-Bestimmung mit der Mikrodilutionsmethode nach CLSI Standard. Die Mikrodilutionsmethode wurde ausgewählt, da eine darauf folgende MBK-Bestimmung bei diesem Versuchsansatz möglich war. Es wurden die Bakterienstämme Newman und Newman Δeap (AH12) untersucht.

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in MHB im Schüttler bei 37°C und 150 rpm für 16 bis 18 Stunden. Die Übernachtskultur wurde mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung auf einen McFarland Standard von 0,5 eingestellt, um eine Bakteriensuspension mit $1-2 \times 10^8$ koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml zu erhalten. Die fertige Suspension wurde 1:100 mit steriler Kochsalzlösung verdünnt. Die Konzentration betrug danach $1-2 \times 10^6$ /ml. Die 96 well

Mikrotiterplatten (TPP Zellkulturtestplatte) sollten innerhalb von 15 Minuten nach Präparation der Boullionverdünnung beimpft werden. Die zu testenden Antibiotika wurden mit verschiedenen Anfangskonzentrationen 1:2 verdünnt. Als Wachstumskontrolle blieb ein Well antibiotikafrei. Anschließend wurde in den Platten eine Verdünnungsreihe mit MHB hergestellt, wobei je 50 µl in den Wells vorgelegt wurden. Von der vorher hergestellten Bakteriensuspension wurden anschließend je 50 µl zugegeben, um ein Endvolumen von 100 µl/well und ein finales Bakterieninokulum von 0,5 bis 1×10^5 KBE zu erhalten. Die Mikrotiterplatten wurden bei 37°C im Brutschrank für 16 - 20 Stunden inkubiert. Für Oxacillin wurde eine Temperatur von 35°C gewählt. Es sollten nicht mehr als 4 Platten im Brutschrank übereinander gestellt werden. Das Bakterienwachstum ist durch eine weißliche Trübung erkennbar, die homogen grob bis feinkörnig sowie leicht durchscheinend sein kann. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

3.2.2.2 Minimale bakterizide Konzentration

Die minimale bakterizide Konzentration (MBK) ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes (µg/ml), die ein definiertes Inokulum von Bakterien innerhalb einer festgelegten Zeitspanne um > 99,9 % abtötet.

Die MBK wurde für Newman und AH12 untersucht. Nach dem Ablesen der MHK wurden aus dem Well der bestimmten MHK, und aus 5 bis 10 weiteren Verdünnungsstufen, in denen kein Wachstum sichtbar war, jeweils 50 µl abgenommen und auf einer MH-Platte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C als Übernachtskultur inkubiert und am Folgetag das Wachstum dokumentiert.

3.2.3 Wachstumskurven

3.2.3.1 Durchführung

Die Wachstumskurven wurden mit dem Stamm Newman über einen Zeitraum von acht Stunden erstellt. Dabei wurden jeweils eine Kontrolle ohne Antibiotikum und das Antibiotikum in der $\frac{1}{2}$ MHK, MHK und MBK parallel getestet.

Die Bestimmung der MHK und MBK wurde nach dem Protokoll des CLSI-Standards ausgeführt (3.2.2). Da als Wachstumsmedium in diesem Protokoll MH vorgesehen ist, wurde für die Folgeversuche weiterhin dieses Medium verwendet, auch, wenn damit in Kauf genommen werden musste, dass die Kulturen vergleichsweise langsam wuchsen. Wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben, wurde eine Übernachtskultur vom Stamm Newman angelegt. Als Nährmedium wurde MHB verwendet. Am nächsten Tag wurde eine Starterkultur mit einer relativ hohen optischen Dichte von 0,1 hergestellt. Diese wurde so hoch gewählt, um genügend Material nach 3 Stunden Wachstum zu erhalten. Es wird jeweils ein 100-ml-Kolben für die Kontrolle, $\frac{1}{2}$ MHK, MHK und MBK benötigt. Die Kulturen wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt. Die Kolben wurden im Schüttler bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Die optische Dichte wurde stündlich bestimmt. Nach 2 Stunden wurde das Antibiotikum in der jeweiligen Konzentration dazugegeben, außer bei der Kontrolle. Nach drei, fünf und acht Stunden wurden jeweils 10 ml aus den Kolben herausgenommen, in ein Reaktionsgefäß gefüllt und für 5 Minuten bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -71°C gelagert. Es wurde darauf geachtet, dass alle Proben die ganze Zeit gekühlt waren.

3.2.3.2 Antibiotikakonzentrationen

Die verschiedenen MHK und MBK der Antibiotika wurden wie vorher beschrieben ermittelt. Mit Ciprofloxacin, Daptomycin, Linezolid, Oxacillin, Tigecyclin wurden in den einzelnen Konzentrationen Wachstumskurven durchgeführt. Die Antibiotika, die in Pulverform vorlagen, wurden in MHB aufgelöst und in einer Konzentration von 1:100 und 1:1000 verdünnt. Ciprofloxacin wurde in dH₂O gelöst und auf einen pH-Wert von 5,8 eingestellt.

3.2.3.3 Daptomycin

Daptomycin stellt eine Ausnahme bei der Durchführung der Wachstumskurven dar. Um eine Wirkung auf die Bakterien zu haben, benötigt es Calcium. Dafür wurde CaCl_2 in der Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ in MH gelöst und das Antibiotikum darin gelöst. Nach 2 Stunden, gleichzeitig mit der Zugabe der Antibiotika, wurde CaCl_2 in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ in den Kolben gegeben. Des Weiteren wurde mit einer fünffachen MBK gearbeitet.

3.2.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der inhibitorischen bzw. bakteriziden Wirkung der in den Schüttelkulturen eingesetzten Antibiotikakonzentrationen wurden neben der Ermittlung der optischen Dichte bei 600 nm stündlich zusätzlich Proben entnommen um die KBE (Kolonie bildende Einheiten) in den Kulturen zu ermitteln. Die KBE wurden dabei durch das Ausplattieren von seriellen Verdünnungen auf MH-Agarplatten bestimmt. Dazu wurden Verdünnungsreihen (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) der Bakterienkultur in MHB hergestellt und die Verdünnungsstufen (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} für die Kontrollen bzw. 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-7} für die mit Antibiotika behandelten Kulturen) mithilfe steriler Glasspatel ausgestrichen. Das Ausplattieren der Verdünnungsstufen wurde nach 2 Stunden begonnen und dann stündlich bis zu 8 Stunden weitergeführt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte die Zählung mit Hilfe eines Kolonie-Counters. Von den gut auswertbaren Verdünnungsstufen einer Probe wurde jeweils der Mittelwert bestimmt.

3.2.5 RNA-Präparation

3.2.5.1 NucleoSpin RNA II

Für die Präparation wurden die bei -71°C eingefrorenen Bakterien-Pellets der Wachstumskurven verwendet. Die Durchführung verlief nach Herstellerprotokoll.

Die Konzentration der Proben wurde photometrisch bestimmt.

3.2.5.2 Nachbehandlung mit Turbo DNase

Um Verunreinigungen der Proben mit genomischer DNA vorzubeugen, wurde im Anschluss an die RNA-Isolierung eine Behandlung mit einer Turbo-DNase durchgeführt. Dabei wurden die Proben für 80 Minuten bei 37°C im Brutschrank mit 1µl TurboDNase (Quiagen) inkubiert. Danach wurde 1µl einer Stopp-Reagenz dazugegeben, für 2 min inkubiert und bei 10000xg für 1,5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet bei -71°C erneut eingefroren.

3.2.5.3 Reinheitsüberprüfung der RNA mittels Screening nach genomischer DNA (gDNA)

Die Reagenzien wurden in einem Mastermix zusammenpipettiert. Angaben dazu, sowie die Geräteeinstellungen bei der Durchführung, finden sich im Kapitel 3.2.8.2. Der Mix (22,5 µl) wurde in eine Platte für die RT-PCR vorgelegt und danach die jeweilige RNA (2,5 µl) dazu gegeben. Bei positiven Signalen in der RT-PCR, die eine starke Verunreinigung der RNA Proben mit gDNA nahelegen, konnte eine erneute Aufreinigung der Proben angeschlossen werden.

3.2.6 cDNA

Für die Herstellung der cDNA wurde das Gerät Gene Amp PCR System 9700 (ABI) verwendet. Die Herstellung erfolgte mit dem High-Capacity-cDNA-Reverse-Transkription-Kit (ABI). Die mit Turbo DNase aufgereinigten und bei der Reinheitsüberprüfung negativen Proben wurden aufgetaut und mit 18,45 µl HPLC-H₂O (Merck) verdünnt. Es lag danach eine Konzentration von 2,1 µg in dem 60 µl Endvolumen vor. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|------------------|--------|
| 10xRT-Buffer | 6,0 µl |
| 25xdNTP's | 2,4µl |
| 10xRandom Primer | 6,0 µl |

| | |
|--------------------------------------|---------------|
| reverse Transkriptase (50U/ μ l) | 3,0 μ l |
| demineralisiertes Wasser | 11,85 μ l |
| RNAse out (40U/ μ l) | 0,75 μ l |

Es wurden 30 μ l Master Mix und 30 μ l der verdünnten Probe in 0,2 ml Tubes pipettiert. Die Reaktion wurde wie folgt durchgeführt:

| | |
|-----|-------------|
| 25° | 10 Minuten |
| 37° | 120 Minuten |
| 85° | 5 Sekunden |

Nach Beendigung des Laufs wurden die Proben sofort aus dem Gerät entfernt und aliquotiert. Das fertige Produkt wurde bei -21°C eingefroren.

3.2.7 Generierung eines Standards

Für die Quantifizierung der Genexpression wurde für diese Arbeit ein Real-Time-PCR-Ansatz gewählt, in dem die Transkriptmengen in Relation zu einem externen Standard ermittelt werden. Dazu wurden Standards in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt.

3.2.7.1 „template“ Herstellung

Um das Templat für den Standard herzustellen wurde eine Übernachtskultur von Newman angesetzt. Daraufhin wurde mit Hilfe des MasterPure-Kit die genomische DNA aus Newman präpariert.

3.2.7.2 PCR für Standardgenerierung

Die präparierte DNA wurde als Templat für eine konventionelle PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer enthielten eine T7-Promotersequenz. Um das Ausgangstemplat für den Eap-Standard zu erzeugen, wurde das von Joost und Kollegen (Joost, 2009) publizierte Eap-Standard-Primerpaar verwendet, entsprechend für den Gyrase-Standard das *gyrB*-Primerpaar. Die PCR Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

| | |
|---|---------|
| 10x Puffer | 15 µl |
| MgCl ₂ | 6 µl |
| dNTPs | 3 µl |
| Q-Solution | 30 µl |
| Primer gyr forw/Primer eap forw (60 µM) | 3 µl |
| Primer gyr rev/Primer eap rev (60 µM) | 3 µl |
| Taq-Polymerase | 1,5 µl |
| HPLC-H ₂ O | 85,5 µl |

Es wurden 49 µl Mastermix + 1 µl gDNA zusammenpipettiert.

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

| Temperatur (°C) | Zeit (sec) | Wiederholungen |
|--------------------------------------|------------|----------------|
| 94 | 300 | 1x |
| 94 | 45 | |
| 57 (<i>gyrB</i>)/58 (<i>eap</i>) | 30 | 25x |
| 72 | 60 | |
| 72 | 600 | 1x |

Die PCR-Produkte wurden photometrisch bestimmt und die Qualität mittels Gelelektrophorese kontrolliert.

3.2.7.3 In-vitro-Transkription

Die in-vitro-Transkription wurde mit dem Ambion MEGAscript-Kit durchgeführt. Dabei wurde dem Protokoll des Kits gefolgt. Für den Reaktionsansatz zur in-vitro-Transkription wurde eine Konzentration des Templates zwischen 25 nM und 125 nM gewählt, und die Templatlänge lag zwischen 200 und 500 Nukleotiden. Dabei gilt, dass, je länger das Templat ist, desto geringer sollte die eingesetzte Konzentration sein. Das eingesetzte Volumen

sollte 8 µl nicht übersteigen. Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wird 1 µl Turbo DNase dazugegeben.

3.2.7.4 Aufreinigung der in-vitro-Transkriptionsprodukte

Die Aufreinigung wurde mit dem MEGAclean-Kit (Ambion) durchgeführt. Es wurde dem Protokoll des Kits gefolgt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

3.2.7.5 Berechnung der Standardverdünnung

Die Verdünnung erfolgt nach folgendem Schema:

Es werden X µl RNA in Y µl MS II RNA von Roche gelöst, so dass ein Volumen von 10 µl mit einer Konzentration von 10^{12} Kopien/µl entsteht. 1 µl dieser Lösung werden dann mit 1,25 µl MS II RNA und 7,75 µl Natriumcitrat (Ambion Storage Solution 1mM pH 6,4) gemischt (Konzentration: 10^{11} Kopien/µl). Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Die dadurch entstandene Lösung kann dann weiter mit RNase-freiem Wasser verdünnt werden. Bei der Quantifizierung wurden jeweils im Doppelansatz Verdünnungstufen von 10^9 Kopien/µl bis 10^4 Kopien/µl des *eap*-Standards und des *gyrB*-Standards mitgeführt.

3.2.7.6 Reverse Transkription

Die hergestellte RNA für die Standards wurden in cDNA umgeschrieben. Verwendet wurde das „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Invitrogen). Die Durchführung ist gleich dem Kapitel „Generierung von cDNA“. Die sechs Verdünnungstufen (10^9 – 10^4 Kopien/µl) wurden aliquotiert und bei -21°C eingefroren. Die fertigen Standards wurden nun für die Real-Time-PCR verwendet.

| | |
|---------------------------|---------|
| PrimereapRT3forw 50µM | 0,45 µl |
| PrimereapRT3.1rev 50µM | 0,45 µl |
| PrimereapRT3.2rev 50µM | 0,45 µl |
| HPLC H ₂ O | 8,65 µl |
| für <i>gyrB</i> : | |
| Primer gyrase forward 5µM | 1,5 µl |
| Primer gyrase reward 5µM | 1,5 µl |
| HPLC H ₂ O | 7,0 µl |

Es wurden erst 22,5 µl Master-Mix und dann 2,5 µl Proben zusammenpipettiert. Der Master-Mix, die Proben und die jeweiligen Standards konnten daraufhin in eine 96-Well-Platte (Micro Amp, ABI) pipettiert werden. Die Probenkonzentration betrug 2,5ng/well. Die verwendeten Standards wurden in einer Konzentration von 10^9 bis 10^4 gewählt und einmal für die Bestimmung von *gyrB* und einmal für *eap* verwendet. Eine Negativkontrolle, bei der nur HPLC H₂O + Master-Mix eingesetzt war, wurde immer mitgeführt. Die PCR erfolgte in 25 µl-Ansätzen, wobei jeweils Doppelansätze amplifiziert wurden. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

| Temperatur (°C) | Zeit (sec) | Wiederholungen |
|-----------------|------------|----------------|
| 95 | 600 | 1x |
| 95 | 15 | |
| 60 | 60 | |
| 95 | 15 | |
| 60 | 20 | |
| 95 | 15 | |

3.2.8.3 Auswertung

Die relative Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve. Es wurden Standards in den oben beschriebenen Konzentrationen eingesetzt.

Für jede Art der Quantifizierung wird eine Bezugsgröße benötigt, durch die sich Unterschiede zwischen den einzelnen Proben (z. B. schwankende RT-Effizienz) ausgleichen lassen. Zur Untersuchung der Genexpression wurde dazu eine endogene Kontrolle eingesetzt. Das sind Gene, die mit dem Zielgen co-exprimiert, aber unter den gegebenen Versuchsbedingungen selbst nicht transkriptionell reguliert werden. Es werden dazu sogenannte „house-keeping“-Gene verwendet. In dieser Arbeit wurde als endogene Kontrolle das für die Gyrase-Untereinheit B kodierende *gyrB* gewählt.

Der Schwellenwert wurde so gewählt, dass er die Amplifikationskurven der zu vergleichenden Proben in der exponentiellen Phase schnitt. Je höher die Ausgangskonzentration der Zielsequenz zu Beginn der PCR war, desto eher wurde der Schwellenwert erreicht, und desto niedriger war der CT-Wert.

Die Berechnung erfolgte in zwei Schritten:

Schritt 1

$$\frac{\text{Menge der Zielgen cDNA}}{\text{Menge der endogenen – Kontroll cDNA}}$$

Formel 1: Normalisierung der endogenen Kontrolle. Als endogene Kontrolle wurde *gyrB* verwendet, als Zielgen *eap*.

Schritt 2

$$\frac{\text{Probe}}{\text{Kalibrator}}$$

Formel 2: Normalisierung zur Kalibratorprobe. Als Kalibrator wurde eine Bakterien-suspension von *S. aureus* Newman ohne Antibiotikum verwendet.

3.2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung der Wachstumskurven wurde ein „Student's t-test“ verwendet. Die statistischen Auswertungen der Transkriptionsanalysen erfolgten mittels eines nicht parametrischen „Wilcoxon rank-sum“ Tests. Der Unterschied bezüglich der mittleren Abweichung (Hodges-Lehmann Schätzung) zwischen den Beobachtungsvariablen wurde berechnet und ein doppelseitiges 95% Konfidenzintervall abgeleitet.

4 Ergebnisse

4.1 Resistenztestungen

Um die minimale Hemmkonzentration und die minimale bakterizide Konzentration von 5 verschiedenen Antibiotika zu testen, wurden der zu untersuchende *S. aureus*-Stamm Newman und dessen isogene *eap*-Mutante AH12 mittels Mikrodilutionsmethode nach CLSI Standard mit unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen inkubiert. Die geringste Konzentration, bei der keine Trübung mehr zu erkennen war, wurde als die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt (3.2.2). Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der MHK/MBK-Bestimmung des untersuchten Stammpaares.

| | MHK ($\mu\text{g/ml}$) | | MBK ($\mu\text{g/ml}$) | |
|----------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| | Newman | Δeap | Newman | Δeap |
| Ciprofloxacin | 0,125 | 0,0625 | 0,25 | 0,25 |
| Daptomycin | 0,5 | 0,5 | 1 | 2 |
| Oxacillin | 0,125-0,25 | 0,0625 | 0,5-1 | 0,5 |
| Linezolid | 1 | 0,5 | >256 | >128 |
| Tigecyclin | 0,0625 -0,125 | 0,5 | >64 | >128 |

Tabelle 1: Ergebnisse der Resistenztestungen von *S. aureus* Newman und AH12 (Δeap) nach CLSI-Standard. Unterschiede zwischen Wild-Typ und Mutante > 4 sind rot markiert.

Es zeigte sich sowohl bei Ciprofloxacin, Linezolid und Oxacillin ein Unterschied von einer Verdünnungsstufe zwischen Wild-Typ und Mutante, während bei Daptomycin kein Unterschied in der MHK sichtbar wurde. Einzig Tigecyclin zeigte einen 4- bis 8fachen Unterschied bei der MHK, wobei der Wild-Typ sensibler auf das Antibiotikum reagierte. Dieser zeigte das sensibelste Ansprechen auf die

Antibiotika Ciprofloxacin und Tigecyclin, während die Δeap -Mutante AH12 am sensibelsten auf Ciprofloxacin und Oxacillin reagierte. Nach der MHK Bestimmung wurden jeweils 50 μ l der jeweiligen Ansätze auf Müller-Hinton-Platten ausplattiert und als Übernachtskultur bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde die geringste Konzentration, bei der keine bis vereinzelte Kolonien wuchsen, als die minimale bakterizide Konzentration (MBK) bestimmt. Dabei war der Maßstab die 99,9%-Reduktion des Bakterienwachstums. Bei der MBK zeigte sich bei beiden Stämmen ein maximaler Unterschied von einer Verdünnungsstufe. Bei beiden Stämmen hatten Ciprofloxacin und Oxacillin die stärkste abtötende Wirkung.

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass aufgrund der Mutation keine wesentlichen Unterschiede in der MHK/MBK, mit Ausnahme von Tigecyclin, von *S. aureus*-Newman und der *eap*-Mutante gezeigt werden konnten.

4.2 Newman Wachstumskurven und Zellzahlbestimmungen

Nach EUCAST-Referenzwerten zur Bestimmung der MHK ist der Stamm Newman auf alle getesteten Antibiotika sensibel.

Um die Wirkung der verschiedenen Antibiotika auf das Wachstum des Stammes Newman mit einer zweiten Methode zu testen, wurde das bakterielle Wachstum über einen Zeitraum von 8 Stunden in MHB verfolgt (Kapitel 3.2.3). Um den Einfluss der Antibiotika auf die Vitalität der Zellkultur zu untersuchen, wurden zusätzlich stündlich Zellzahlbestimmungen durchgeführt, die nur einmalig bestimmt wurden (Kapitel 3.2.4).

4.2.1 Kontrolle

In Abbildung 5 ist das Wachstum der Kontrolle dargestellt. Aufgrund des relativ hohen Startinokulums von einer OD_{600} von 0,1 (die für eine ausreichend hohe Zelldichte nach 3 Stunden Wachstum für eine erfolgreiche RNA-Isolation benötigt wurde) zeigte die Kontrolle in dem vergleichsweise nährstoffarmen Kulturmedium Müller Hinton (MHB) nicht den klassischen Wachstumsphasenverlauf mit lag-Phase, exponentieller Wachstumsphase, Übergangsphase und stationärer Phase. Stattdessen war unter den gewählten Bedingungen schon unmittelbar nach Inokulation des Mediums ein stetiger Anstieg der optischen Dichte bei 600 nm zu beobachten, der nach zwei Stunden kurz stagnierte, um ab der dritten Stunde bis zur siebten Stunde weiter stetig anzusteigen. Der hier beobachtete biphasische Verlauf ist vermutlich auf die Verstoffwechslung von Glukose im MHB zurückzuführen, die wahrscheinlich schon nach zweistündigem Wachstum aufgebraucht war.

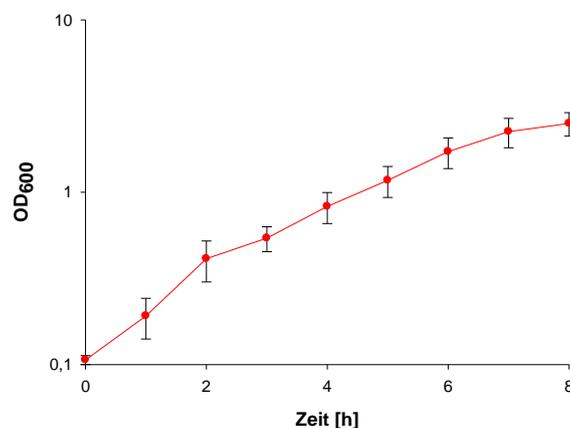


Abbildung 5: Wachstumskurve von *S.-aureus*-Newman in MHB. (n=20)

4.2.2 Bakteriostatische Antibiotika

Wachstumskurven und Zellzahlbestimmung sind in Abbildung 6 dargestellt.

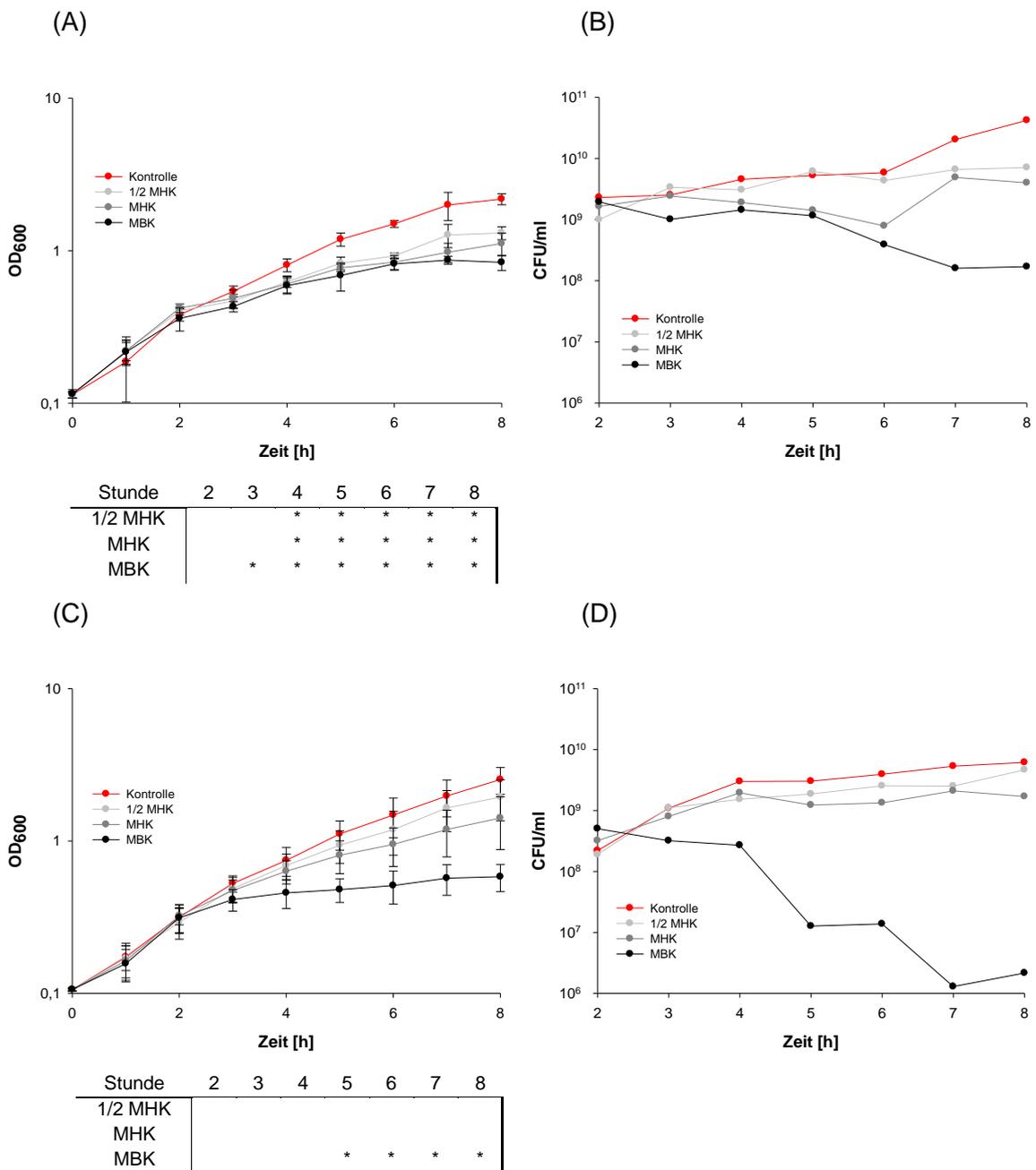


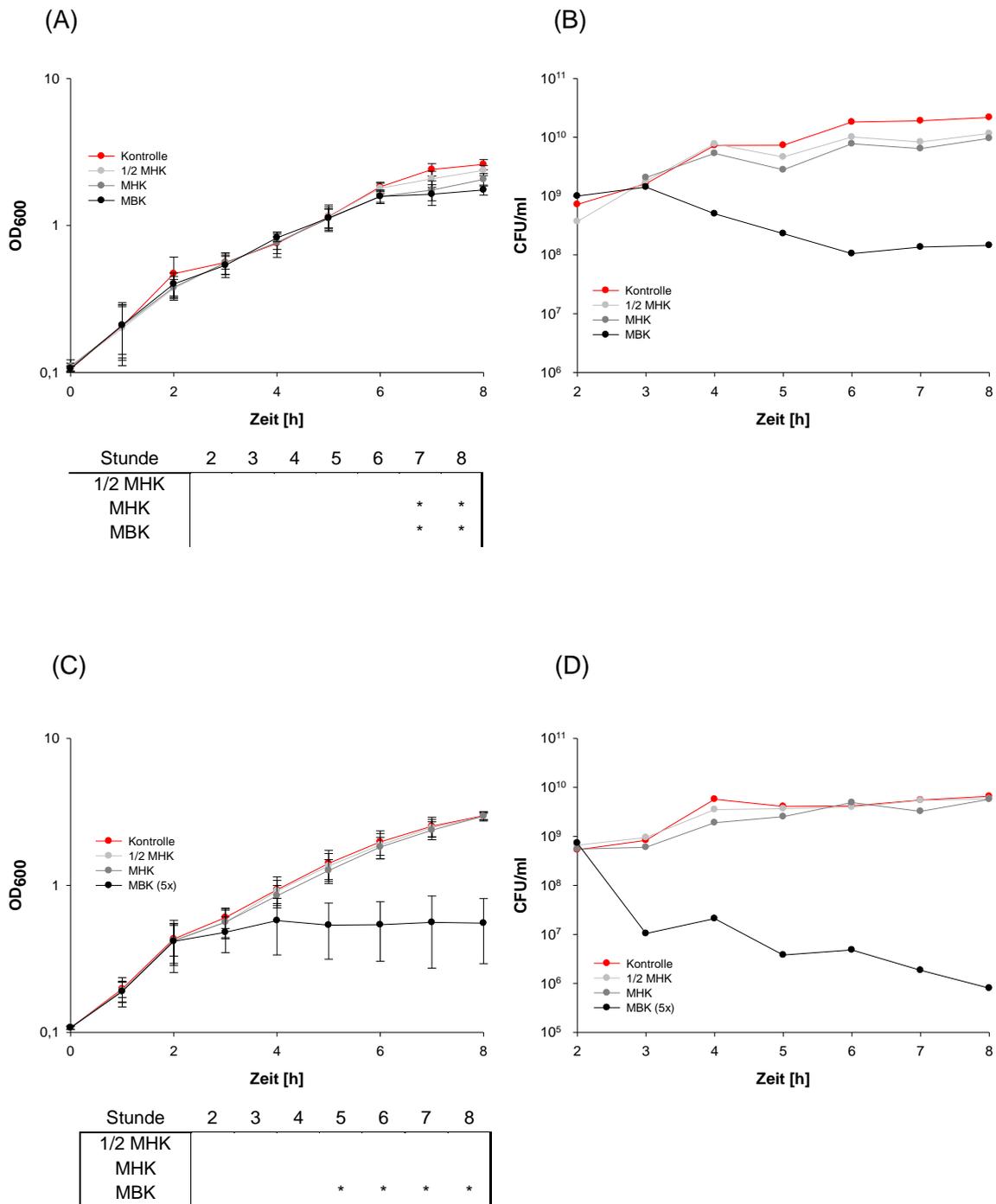
Abbildung 6 (A - D): Einfluss verschiedener Linezolid- und Tigecyclin-Konzentrationen auf das Wachstum von *S.-aureus*-Newman in MHB. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte inkl. Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe eines „Student’s t-test“ ermittelt. (A) Wachstumskurven von *S.-aureus*-Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 1 $\mu\text{g/ml}$ (1/2 MHK), 2 $\mu\text{g/ml}$ (MHK) und 256 $\mu\text{g/ml}$ (MBK) Linezolid. (B) Nach EUCAST-Referenzwerten zur Bestimmung der MHK ist der Stamm Newman auf alle getesteten Antibiotika sensibel. KBE-Bestimmung der Kulturen aus (A). (C) Wachstumskurven von *S.-aureus*-Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ (1/2 MHK), 0,125 $\mu\text{g/ml}$ (MHK) und 64 $\mu\text{g/ml}$ (MBK) Tigecyclin. (D) KBE-Bestimmung der Kulturen aus (C).

Die Wachstumskurven der Linezolid (6A) bzw. Tigecyclin (6B) behandelten Kulturen zeigten schon eine Stunde nach Zugabe der Antibiotika bei allen drei Antibiotikakonzentrationen ($1/2$ MHK, MHK und MBK) eine Abnahme im Wachstum. Bei Linezolid ist dabei mit allen getesteten Konzentrationen nach vier Stunden eine signifikante Hemmung des Bakterienwachstums zu erkennen, bei der bakteriziden Konzentration zeigte sich diese schon nach drei Stunden (Abbildung 6A). Für Tigecyclin dagegen war nur bei der bakteriziden Konzentration ein signifikanter Einfluss auf das Wachstum der Bakterien zu detektieren (Abbildung 6C). Da die Bestimmung der optischen Dichte nur eine Aussage auf das Wachstum der Kulturen, nicht aber auf die Viabilität der Zellen zulässt, wurde in einem zweiten Ansatz aus den Kulturen nach Zugabe der Antibiotika stündlich die koloniebildenden Einheiten (KBE) ermittelt (Abbildung 6B und D). Hier zeigte nur die mit der bakteriziden Konzentration an Tigecyclin behandelte Kultur eine massive Abnahme der Lebendzellzahl, die fünf Stunden nach Zugabe zu einer Reduktion von drei *log*-Stufen (99,9%) führte. Die niedrigeren Antibiotikakonzentrationen hingegen hatten, in Übereinstimmung mit den optischen Dichtebestimmungen, keinen klaren Effekt auf die Lebendzellzahl der Kultur. Bei Linezolid hingegen konnte bei keiner der getesteten Antibiotikakonzentrationen eine klare Abnahme der Viabilität der Kulturen um mehr als eine *log*-Stufe beobachtet werden (Abbildung 6D). Zwar wurden bei den MHK- und MBK Kulturen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle drei Stunden nach Antibiotikagabe deutlich geringere KBEs ermittelt. Allerdings variierten diese im Vergleich zum KBE-Wert vor Zugabe der Antibiotika (2 h) jedoch nur geringfügig (< 1 *log*-Stufe). Damit zeigte sich bei der bakteriziden Konzentration an Linezolid zwar ein sehr stark hemmender Effekt auf das Wachstum der Bakterien, nicht aber auf die Viabilität der Bakterien.

Beide bakteriostatischen Antibiotika zeigten in den per Mikrodilutionsmethode als bakterizid ermittelten Konzentrationen einen statistisch signifikanten Effekt auf das Wachstum, der aber nur bei Tigecyclin auch zu einer klaren Viabilitätsabnahme der Kultur führte.

4.2.3 Bakterizide Antibiotika

Die Ergebnisse der Testungen sind in den folgenden Diagrammen dargestellt:



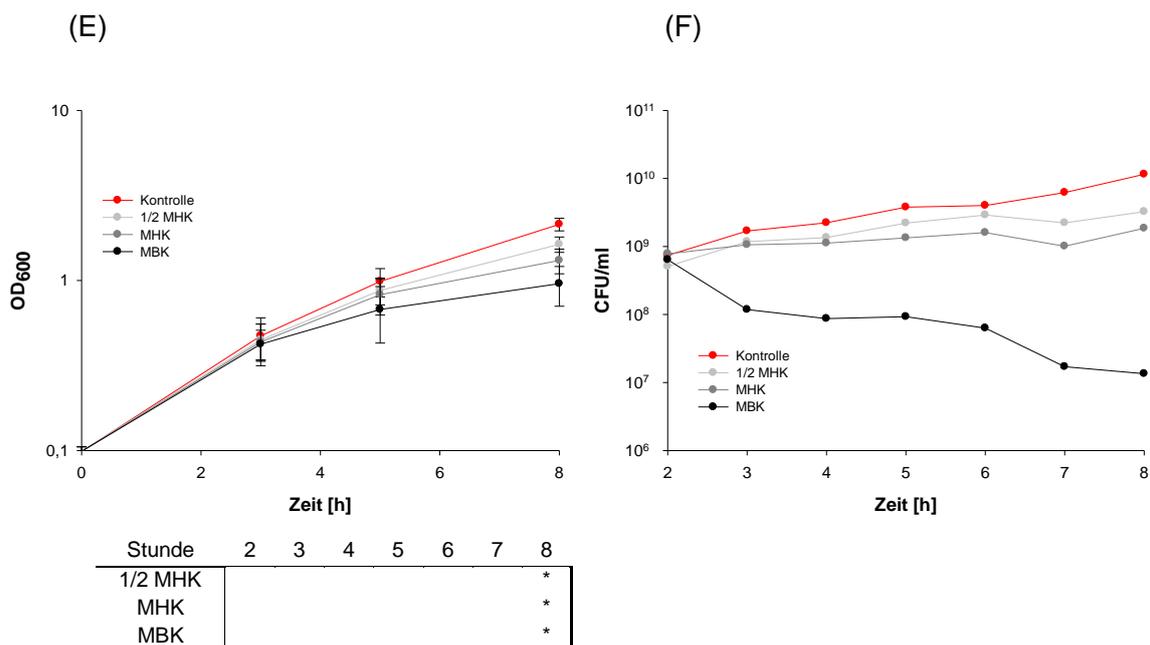


Abbildung 7 (A - F): Einfluss verschiedener Ciprofloxacin-, Daptomycin- und Oxacillin-Konzentrationen auf das Wachstum von *S. aureus* Newman in MHB. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte inkl. Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * = $p < 0,05$. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe eines „Student's t-test“ ermittelt. (A) Einfluss von Ciprofloxacin auf das Wachstum von *S. aureus* Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ (1/2 MHK), 0,125 $\mu\text{g/ml}$ (MHK) und 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (MBK). (B) KBE-Bestimmung der Kulturen aus (A). (C) Einfluss von Daptomycin auf das Wachstum von *S. aureus* Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (1/2 MHK), 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (MHK) und 5 $\mu\text{g/ml}$ (5xMBK). (D) KBE-Bestimmung der Kulturen aus (C). (E) Einfluss von Oxacillin auf das Wachstum von *S. aureus* Newman in Anwesenheit von 0 (Kontrolle), 0,125 $\mu\text{g/ml}$ (1/2 MHK), 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (MHK) und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (MBK). (F) KBE-Bestimmung der Kulturen aus (D).

Die Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an Ciprofloxacin führte, anders als bei Linezolid und Tigecyclin, erst vier Stunden nach Zugabe der Antibiotika bei der MHK und MBK zu signifikanten Veränderungen im Wachstum (Abbildung 7A). Wird hingegen der Verlauf der koloniebildenden Einheiten über die Zeit betrachtet, so ist hier schon eine Stunde nach Applikation des Antibiotikums bei der MBK ein klarer Abfall an lebenden Bakterien zu sehen, während bei den beiden MHK Testungen im Vergleich zum Wild-Typ so gut wie kein Abfall an lebenden Zellen in den Kulturen sichtbar wurde (Abbildung 7B). Allerdings muss auch hier betont werden, dass auch die bakterizide Konzentration an Ciprofloxacin zu keiner Reduktion der Viabilität der Zellkultur von $\geq 99,9\%$ führte.

Für Daptomycin (Abbildung 7C) konnten sowohl bei der subinhibitorischen ($1/2$ MHK) als auch bei der inhibitorischen Konzentration (MHK) weder beim Wachstum noch bei den Zellzahlbestimmungen nennenswerte Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle ermittelt werden. Einzig bei der fünffach bakteriziden Konzentration wurde ab 3 Stunden nach Antibiotikagabe bei der optischen Dichtemessung eine signifikante Reduktion des Wachstums beobachtet. In Einklang mit diesem Befund konnte hier bei der Viabilitätsbestimmung eine Abnahme an lebenden Zellen um mehr als 99,9% ermittelt werden (Abbildung 7D).

Oxacillin lässt bei den Wachstumskurven und Zellzahlbestimmungen den gleichen Trend wie die bakteriostatischen Antibiotika erkennen. Durch den Einfluss dieses Antibiotikums kommt es schon bei den subinhibitorischen Konzentrationen zu einer Verminderung des Wachstums, die nach 8 Stunden zu einem signifikanten Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und den Oxacillin-supplementierten Kulturen führte (Abbildung 7D). Bei der Zellzahlbestimmung hingegen zeigte sich, wie schon bei Linezolid beobachtet, nur bei der bakteriziden Konzentration eine klare Abnahme an lebenden Zellen in der Kultur, die aber, bezogen auf den KBE Wert zum Zeitpunkt der Zugabe, wieder zu einer Abtötung $< 99,9\%$ führte (Abbildung 7E).

Zusammenfassend ist bei diesen Testungen zu erkennen, dass die verschiedenen Konzentrationen der Antibiotika einen Einfluss auf das Wachstum von *S. aureus* Newman haben. Dabei zeigten sich Unterschiede in den subinhibitorischen, inhibitorischen und bakteriziden Konzentrationen. Bei der Zellzahlbestimmung war der Effekt der bakteriziden Konzentrationen bei allen getesteten Antibiotika mäßig bis gut zu erkennen.

4.3 *eap*-Transkriptionsanalysen

Um den Einfluss subinhibitorischer, inhibitorischer und bakterizider Konzentrationen der hier getesteten Antibiotikaklassen auf die Transkription von *eap* zu untersuchen, wurden Real-Time-PCRs durchgeführt (Kapitel 3.2.8.2).

4.3.1 Kontrolle

Da von *eap* bekannt ist, dass die Transkription dieses Gens sowohl wachstumsphasen- als auch vom Nährstoffangebot abhängig reguliert ist (Harraghy, 2005; Joost, 2009), wurde jeweils eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt, um zu ermitteln, wie sich die *eap*-Transkription unter den hier getesteten Wachstumsbedingungen ohne Antibiotikaeinfluss verhält. Als endogene Kontrolle für die Real-Time-PCR wurde dabei das „house-keeping“-Gen *gyrB* analysiert. Für die Ermittlung der in Abbildung 8 dargestellten Werte wurden die Kontrollmessungen aller Versuche verwendet (n=17). Auf der x-Achse sind die drei verschiedenen Abnahmezeitpunkte, auf der y-Achse ist die Transkription von *eap* in Relation zur endogenen Kontrolle aufgetragen. Abbildung 8 zeigt, dass *eap* im Stamm Newman, im Einklang mit der Literatur (Joost, 2009), wachstumsphasenabhängig exprimiert und bevorzugt in der späteren Wachstumsphase transkribiert wird.

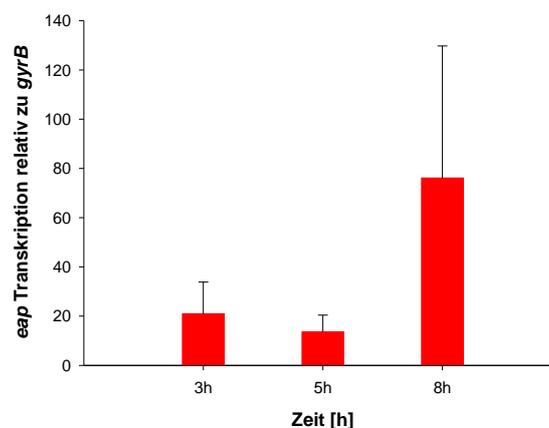


Abbildung 8: *eap*-Transkription in *S. aureus* Newman während des Wachstums in MHB. Auf der x-Achse sind die Untersuchungszeitpunkte eingetragen, auf der y-Achse die *eap*-Transkription relativ zu *gyrB*. Jede Messung wurde in Duplikation durchgeführt (n=34).

4.3.2 Bakteriostatische Antibiotika

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen der beiden bakteriostatischen Antibiotika.

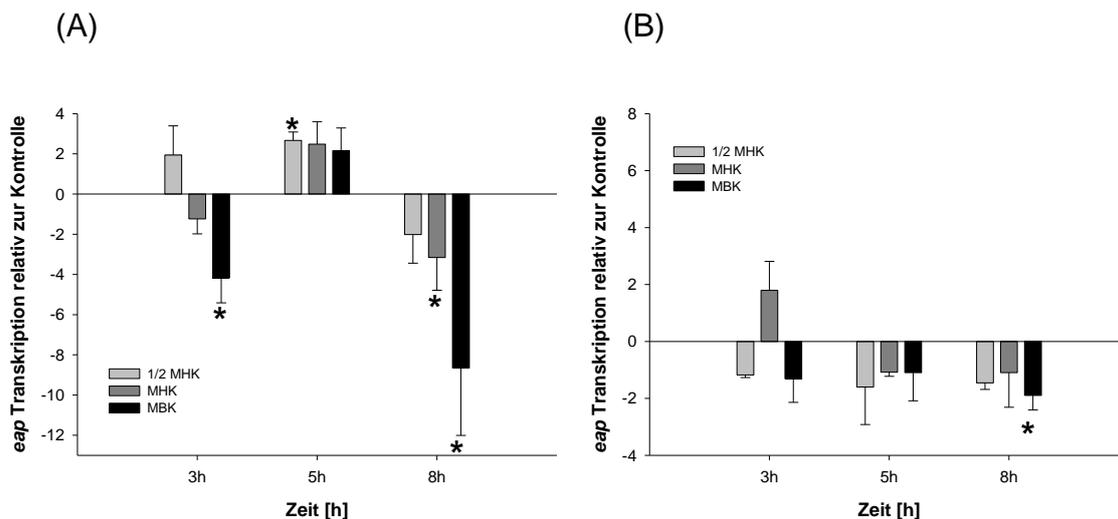


Abbildung 9: Einfluss von Linezolid und Tigecyclin auf die *eap*-Transkription relativ zur Kontrolle. Auf der x-Achse sind die Untersuchungszeitpunkte, auf der y-Achse ist die *eap*-Transkription relativ zur Kontrolle eingetragen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. * = $p < 0,05$. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe einer nicht parametrischen „Wilcoxon-rank-sum“-Statistik ermittelt. (A) Wirkung von Linezolid auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 1 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 2 $\mu\text{g/ml}$; MBK, 256 $\mu\text{g/ml}$). (B) Wirkung von Tigecyclin auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 0,0625 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 0,125 $\mu\text{g/ml}$; MBK, 64 $\mu\text{g/ml}$).

Bei den Linezolidversuchen zeigte sich schon eine Stunde nach Antibiotikagabe eine statistisch signifikante Reduktion der *eap* Transkription bei der bakteriziden Konzentration (Abbildung 9A). Interessanterweise konnte eine solche Reduktion 3 Stunden nach Antibiotikagabe (Zeitpunkt 5 h) nicht beobachtet werden. Hier zeigte sich bei allen drei Antibiotikakonzentrationen eine leichte Hochregulation der Transkription gegenüber der Kontrolle, die aber nur für die subinhibitorische Konzentration zu einem signifikanten Unterschied führte. Fünf Stunden nach Applikation (Zeitpunkt 8 h) wurde dann bei allen Konzentrationen eine Inhibierung der Transkription beobachtet, die sowohl für die MHK als auch die MBK signifikant

war. Dabei wurde *eap* von der subinhibitorischen Konzentration um das doppelte supprimiert, die inhibitorische Konzentration zeigte eine Reprimierung um den Faktor Drei bis Vier, während die bakterizide Konzentration eine starke Supprimierung um das Acht- bis Zehnfache aufwies.

Die Tigecyclinzugabe führte mit Ausnahme des 8-Stundenwertes bei der MBK im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu keinem der Zeitpunkte zu einer signifikanten Veränderung der *eap*-Transkription (Abbildung 9B). Zwar zeigte sich bei den meisten Messungen nach Antibiotikagabe eine tendenzielle Reduktion der *eap*-Transkription, die aber einzig bei der höchsten eingesetzten Dosis 5 Stunden nach Applikation zu einer signifikanten Abnahme an *eap*-Transkripten um den Faktor 2 führte.

4.3.3 Bakterizide Antibiotika

Die Testung der bakterizid wirkenden Antibiotika Ciprofloxacin, Daptomycin und Oxacillin auf die *eap*-Transkription führte zu den in Abbildung 10 dargestellten Resultaten:

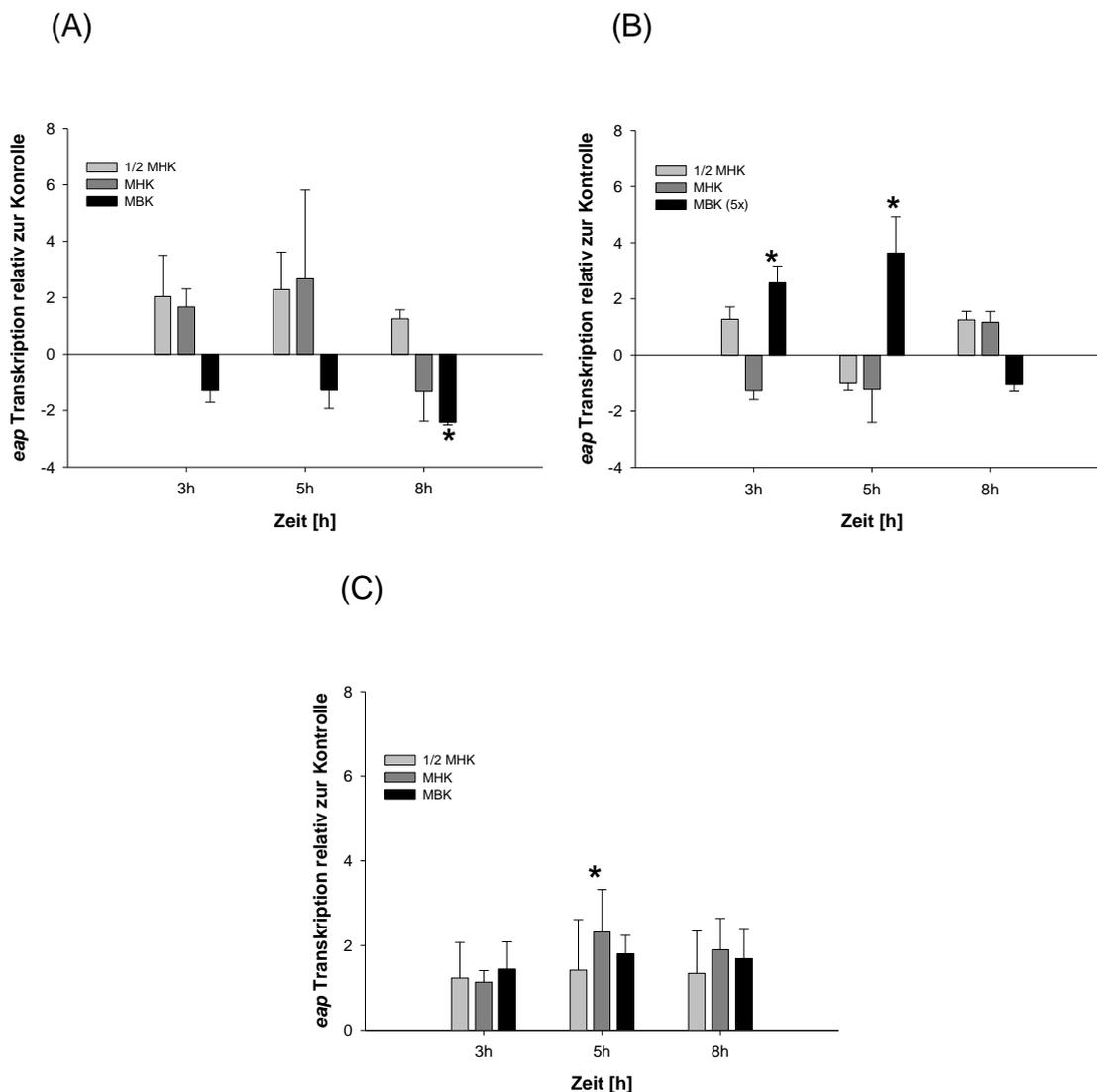


Abbildung 10: Einfluss von Ciprofloxacin, Daptomycin und Oxacillin auf die *eap*-Transkription relativ zur Kontrolle. Auf der x-Achse sind die Untersuchungszeitpunkte, auf der y-Achse ist die *eap*-Transkription relativ zur Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. * = $p < 0,05$. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe einer nicht parametrischen „Wilcoxon-rank-sum“-Statistik ermittelt. (A) Wirkung von Ciprofloxacin auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 0,0625 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 0,125 $\mu\text{g/ml}$; MBK, 0,25 $\mu\text{g/ml}$). (B) Wirkung von Daptomycin auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 0,25 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 0,5 $\mu\text{g/ml}$; MBK (5x) 32 $\mu\text{g/ml}$). (C) Wirkung von Oxacillin auf die *eap*-Transkription (1/2 MHK, 0,125 $\mu\text{g/ml}$; MHK, 0,25 $\mu\text{g/ml}$; MBK, 0,5 $\mu\text{g/ml}$).

Sowohl für Ciprofloxacin als auch für Oxacillin zeigte sich nach Zugabe der verschiedenen Antibiotikakonzentrationen mehrheitlich kein markanter Effekt auf die *eap* Transkription (Abbildung 10A, C). Bei dem Gyrasehemmer Ciprofloxacin konnte einzig bei der MBK zum Zeitpunkt 8 h eine signifikante Reduktion beobachtet werden, während die Zugabe von Oxacillin nur in der Höhe der MHK drei Stunden nach Zugabe zu einer signifikanten, zwei- bis dreifachen Erhöhung der Transkription führte. Bei Daptomycin hingegen führte die fünffache MBK sowohl eine Stunde als auch drei Stunden nach Zugabe des Antibiotikums zu einer signifikanten Hochregulation der *eap* Transkription um den Faktor Drei bis Vier (Abbildung 10B). Allerdings war dieser Effekt zum Zeitpunkt 8 h nicht mehr detektierbar. Hier konnte, ähnlich wie bei den subinhibitorischen und inhibitorischen Konzentrationen zu allen analysierten Zeitpunkten, nur kleine Schwankungen in der *eap* Transkription (< 2) beobachtet werden.

Zusammenfassend ist bei diesen Testungen zu erkennen, dass die verschiedenen Antibiotikaklassen einen unterschiedlichen Effekt auf die *eap*-Transkription haben. Während Tigecyclin, Oxacillin und Ciprofloxacin so gut wie keinen signifikanten Einfluss auf die *eap*-Transkription ausüben, führt Linezolid in seiner bakteriziden Konzentrationen, insbesondere in der späten Wachstumsphase, zu einer markanten Herunterregulierung dieses Gens, während Daptomycin, nach der Applikation hoher Dosen dieser antimikrobiellen Substanz, zu einer transienten Erhöhung der Transkriptspiegel dieses für *S. aureus* wichtigen Virulenzfaktors führen.

5 Diskussion

S. aureus ist zurzeit einer der wichtigsten Erreger nosokomialer Infektionen, der häufig zu rezidivierenden Infektionen führt, selbst wenn die Patienten mit Antibiotika behandelt wurden, die sich in in vitro Testungen als effektiv gegenüber diesen Erregern erwiesen. Das Bakterium produziert zahlreiche Pathogenitätsfaktoren, die bei der Ausbildung von krankhaften Prozessen für das Bakterium von großer Bedeutung sind. So ist etwa von dem extrazellulären Adhäsionsprotein Eap bekannt, dass es die Internalisierungsfähigkeit von *S. aureus* in eukaryonte Zellen fördert (Kreikemeyer 2002; Hagggar, 2003). Auf der anderen Seite ist ebenfalls durch eine Reihe von Studien belegt, dass Antibiotika einen Einfluss auf die Expression von Virulenzfaktoren und diese regulierende Faktoren in *S. aureus* ausüben können (Doss 1993, Gemell 1995, Biosgano 1997, Ohlsen, 1998; Bernado, 2004; Smith 2010; Song, 2012, Pichereau, 2012). So wurde z. B. von Ohlsen und Kollegen im Jahr 1998 eine Studie durchgeführt, in der sie den Effekt von subinhibitorischen Konzentrationen von 31 verschiedenen Antibiotika auf die Genexpression des für das Alpha-Toxin kodierenden *hla* Gens, einem der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. aureus*, in verschiedenen MSSA- und MRSA-Isolaten untersuchten (Ohlsen, 1998). Die Autoren fanden zum Teil gravierende Effekte der Antibiotika auf die *hla*-Transkription.

Es war jedoch bisher nicht im Detail bekannt, ob und wie Antibiotika die Expression von *eap* zu beeinflussen vermögen. Daher war es eines der wesentlichen Ziele dieser Dissertation zu untersuchen, ob für die Behandlung von durch *S. aureus* (inkl. MRSA und VRSA) hervorgerufene Infektionen, die aktuell im Klinikalltag gebräuchlichen Antibiotika die Expression dieses Virulenzfaktors modulieren und dadurch möglicherweise die Internalisierungsfähigkeit dieses Pathogens beeinflussen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher sowohl die zu den Reserveantibiotika zählenden Agenzien Daptomycin und Tigecyclin als neue Staphylokokken-wirksame Antibiotika ausgewählt, die noch nicht lange im klinischen Einsatz sind, als auch die Antibiotika Ciprofloxacin, Linezolid (gilt ebenfalls als

Reserveantibiotikum für die Therapie von durch MRSA und VRSA verursachte Infektionen) sowie Oxacillin, die schon lange ihren Platz in der Standardtherapie von Staphylokokkeninfektionen gefunden haben.

In der von Ohlsen und Kollegen durchgeführten Studie wurde unter anderem auch der Effekt von Oxacillin und Ciprofloxacin, die auch im Rahmen dieser Dissertation analysiert wurden, auf die *hla*-Expression hin untersucht (Ohlsen, 1998). In ihrer Studie fanden Ohlsen *et al*, dass minimale Hemmkonzentrationen des β -Laktam-Antibiotikums Oxacillin zu einer starken Induktion der *hla*-Expression führten, Fluorchinolone, wie Ciprofloxacin eine schwache Stimulation der Transkription bewirkten, die Glycopeptid-Antibiotika Teicoplanin und Vancomycin keine Wirkung auf die *hla*-Transkription zeigten, das Makrolid Erythromycin sowie Aminoglykoside, wie Gentamicin und Kanamycin die *hla*-Transkription leicht reduzierten, während das zu den Lincosamid-Antibiotika gehörende Clindamycin zu einer fast vollständigen Hemmung der *hla*-Expression führte. Da sowohl die Expression von *hla* als auch von *eap* maßgeblich über die globalen Regulatoren RNAIII, SarA und SaeRS gesteuert wird (Cheung, 1996; Giraud, 1996, 1997; Harraghy, 2005), war zu vermuten, dass diese beiden Antibiotika einen vergleichbaren Effekt auf *hla* wie auf *eap* haben könnten. In Einklang mit dieser Hypothese und den Befunden von Ohlsen und Kollegen (Ohlsen 1998) konnte auch in der hier vorliegenden Arbeit für Oxacillin sowohl bei der subinhibitorischen, inhibitorischen als auch bei der bakteriziden Antibiotikakonzentration eine leichte Erhöhung der *eap*-Transkriptmengen zu allen drei Zeitpunkten beobachtet werden (Abbildung 10C). Diese Änderungen waren statistisch jedoch nicht signifikant und sind daher nur als Trend zu werten. Ebenso konnte für Ciprofloxacin beobachtet werden, dass sowohl die Zugabe von subinhibitorischen (1/2 MHK) als auch von inhibitorischen Konzentrationen (MHK) dieses Antibiotikums nach drei und fünf Stunden zu einer leichten, wenn auch statistisch wieder nicht signifikanten, Hochregulation der Transkription von *eap* führten (Abbildung 10A). Bei Verwendung der im Mikrodilutionstest bakteriziden Konzentrationen dieses Antibiotikums hingegen zeigte sich eine leichte Inhibierung der Expression, die jedoch ebenfalls statistisch nicht signifikant war.

Die Transkriptionsanalysen der mit Ciprofloxacin behandelten Kulturen gestalteten sich zudem als schwierig, da sich große Unterschiede in den einzelnen Messungen zeigten, die sich in den hohen Standardabweichungen widerspiegeln. Ein Grund hierfür könnte sein, dass in dieser Arbeit das „housekeeping gene“ *gyrB* als interne Kontrolle gewählt wurde, Ciprofloxacin aber ein Gyrasehemmer ist und daher möglicherweise Einfluss auf die Regulierung dieses Gens hat. Nach Beurteilung der Ct-Werte der einzelnen Messungen konnten jedoch zwischen den unbehandelten Proben und den Ciprofloxacin-behandelten Proben keine relevanten Unterschiede gesehen werden. Zudem wurde für *S. aureus* und *Streptococcus pneumoniae* bereits gezeigt, dass subinhibitorische bzw. bakterizide Konzentrationen an Ciprofloxacin in diesen Mikroorganismen keinen markanten Einfluss auf die *gyrB* Transkription ausüben (Marrer, 2006; Rasigade, 2011), so dass diese Hypothese als Ursache für die beobachteten starken Schwankungen weitestgehend ausgeschlossen werden konnte.

Grampositive Bakterien entwickeln eine immer höhere Resistenzrate gegenüber den derzeit verfügbaren Antibiotika, und so bekommen Reserveantibiotika wie Linezolid eine immer größere Bedeutung in der Therapie dieser Erkrankungen. Aus diesem Grund wurde Linezolid für diese Arbeit ausgewählt. Die Ergebnisse werden im Folgenden genauer diskutiert:

Bereits 2004 wurde von Bernado und Kollegen der Effekt von subinhibitorischen Konzentrationen an Linezolid auf die Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* untersucht (Bernado, 2004). Als Teststamm wurde in ihrer Studie das Methicillin-sensitive *S.-aureus*-Isolat ATCC 29213 verwendet. Ihre Untersuchungen zeigten, dass Linezolid in einem dosisabhängigen Verhalten die Sekretion von spezifischen Virulenzfaktoren, unter anderem von Hla, reduziert. In Übereinstimmung mit dieser Studie lässt sich auch in der hier vorliegenden Arbeit erkennen, dass Linezolid dosisabhängig Einfluss auf die Expression von *eap* nimmt. So führten bakterizid wirkende Konzentrationen an Linezolid (256 mg/l) schon eine Stunde nach Zugabe des Antibiotikums zu einer signifikanten, vierfach reduzierten *eap*-Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 9A). Hatte das

Antibiotikum zudem länger Zeit seine Wirkung zu entfalten (8 h), so reduzierte sich die *eap*-Transkriptmenge um Faktor Acht bis Zehn. Die Applikation der inhibitorischen Konzentration dieses Oxazolidinons hingegen zeigte einen signifikant positiven, wenn auch nur transienten Einfluss auf die *eap*-Expression. Dies bestätigt erneut, dass die richtige Dosierung eines Antibiotikums für die Therapie von großer Bedeutung ist. Linezolid ist zu 100% bioverfügbar und der maximale Plasmaspiegel liegt nach 1 bis 2 Stunden oberhalb der Hemmkonzentration der wichtigsten grampositiven Erreger. Bei i.-v.-Injektion ist dieser Effekt schon nach 30 Minuten zu erreichen. Staphylokokken können dabei mit einer MHK von 4 mg/l erfolgreich behandelt werden (Fachinformation Zyvoxid, 2007). Wiewohl das Antibiotikum gut im Zytosol eukaryonter Zellen akkumuliert, ist seine intrazelluläre Wirksamkeit strittig. Zwar konnte in einer Studie von Cornelia Wilhelm gezeigt werden, dass Linezolid eine gute Wirksamkeit gegen intrazellulär in Granulozyten vorliegende *S. aureus* zeigt (Wilhelm, 2004). Von Düwelhenke und Kollegen wiederum wurde beobachtet, dass das Antibiotikum in Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen so gut wie nicht aktiv ist, obwohl es gut in diesen Zelltypen intrazellulär akkumulierte (Düwelhenke, 2006). Da hohe Konzentrationen an Linezolid in der hier vorliegenden Arbeit zu einer Herunterregulierung der *eap*-Transkription führten, darf angenommen werden, dass dies eine schlechtere Internalisierung der Bakterien in die verschiedenen Wirtszelltypen des erkrankten Patienten bewirken sollte und damit zu einer verminderten Rezidivrate führen könnte. Allerdings ist fraglich, ob solch hohe Steady-State-Spiegel, wie sie hier bei der MBK getestet wurden, auch im Patienten erreichbar sind. Nach oraler Gabe dieses Antibiotikums gemäß Standardbehandlungsschema (2x600 mg täglich) wurden nach Herstellerangaben Linezolidkonzentrationen im Plasma zwischen 6 und 21 mg/l ermittelt (Fachinformation Zyvoxid, 2007). Zudem muss noch berücksichtigt werden, dass diese Antibiotikaspiegel in anderen Körperflüssigkeiten stark variieren können. So wurde in der Epithelien auskleidenden Flüssigkeit bzw. in Alveolarzellen der Lunge im Vergleich zum Plasma unter Steady-State-Bedingungen Verteilungsverhältnisse von 4,5:1 bzw. 0,15:1 beobachtet (Fachinformation Zyvoxid, 2007). Damit wäre es aus unserer Sicht sehr spannend, in zukünftigen

Untersuchungen den Effekt von im Patienten erreichbarer Steady-State Level an Linezolid auf die *eap*-Transkription und Internalisierungsfähigkeit von *S. aureus* in humane Zellen zu untersuchen.

Ebenso wie für Linezolid gilt auch für das von den Tetracyclinen abgeleitete Glycylcyclin-Antibiotikum Tigecyclin, dass dieses sich vergleichsweise noch jung auf dem Markt befindliche Antibiotikum zukünftig sehr wahrscheinlich noch an therapeutischer Bedeutung gewinnen wird.

In einer kürzlich von Smith *et al.* (2010) vorgelegten Studie über den Effekt von Tigecyclin auf das Transkriptom von *S. aureus* wurde unter anderem eine Hochregulierung von *sae*, welches auch für die Regulierung von Eap zuständig ist, beobachtet. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nur bei der bakterizid wirkenden Konzentration an Tigecyclin sechs Stunden nach Applikation eine signifikante, wenn auch nur schwache Reprimierung der *eap*-Transkription ermittelt (Abbildung 9B), während alle anderen getesteten Konzentrationen keinen klaren Einfluss auf die *eap*-Expression ausübten. Dies lässt vermuten, dass Tigecyclin, ungeachtet seines Effektes auf die *sae*-Transkription, keinen starken Effekt auf die Eap-Regulierung ausübt und damit sehr wahrscheinlich auch keinen Einfluss auf die Internalisierung von *S. aureus* in humane Wirtszellen hat.

Bei dem Lipopeptid Daptomycin, dem letzten der in dieser Arbeit untersuchten Reserveantibiotika, das ebenfalls vergleichsweise jung auf dem Markt ist (Markteinführung 2006), konnte bei hohen, bakterizid wirkenden Antibiotikakonzentrationen (32 mg/l) eine transiente, aber signifikante Hochregulation der *eap*-Transkription beobachtet werden, während subinhibitorische und inhibitorische Konzentrationen keine signifikanten Veränderungen in der *eap*-Expression hervorriefen (Abbildung 10B). Bereits 2008 wurden von Muthaiyan *et al.* (2008) zum besseren Verständnis des Wirkungsmechanismus dieses Lipopeptids Transkriptions-Analysen mit Daptomycin behandelten *S.-aureus*-Kulturen durchgeführt. Sie fanden, dass

Daptomycin, ähnlich wie die zellwandaktiven Antibiotika Oxacillin und Vancomycin, das so genannte Zellwandstress-Stimulon (Utaida et al, 2003; Wilkinson, 2005) induziert. Muthaiyan und Kollegen beobachteten zudem, dass subinhibitorische und inhibitorische Konzentrationen des Antibiotikums keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien hatten, während bakterizid wirkende Konzentrationen (5 und $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) den gleichen hemmenden Effekt auf das Wachstum von *S. aureus* ausübten, wie in der hier vorgelegten Studie gezeigt (Abb. 7C). Anders als in der hier vorgelegten Studie detektierten Muthaiyan et al aber auch bei hohen Daptomycin Konzentrationen in ihren Transkriptomanalysen keinen klaren Effekt auf die *eap*-Transkription. Der Unterschied hierfür mag zum einen in den unterschiedlichen Stämmen liegen, die in diesen beiden Studien zum Einsatz kamen (Muthaiyan et al verwendeten in ihrer Studie das *S.-aureus*-Isolat ATCC 29213, während hier der *S.-aureus*-Stamm Newman zum Einsatz kam), kann aber auch an den Zeitpunkten der Probennahme liegen, da Muthaiyan und Kollegen den Effekt von Daptomycin auf das Transkriptom von *S. aureus* schon 15 min nach Antibiotikagabe ermittelten, während hier erst 1 bzw. 3 und 6 Stunden nach Antibiotikagabe deren Einfluss auf die *eap*-Transkription ermittelt wurde. Letztere Befunde lassen vermuten, dass hohe Daptomycinkonzentrationen eine vermehrte Internalisierung von *S. aureus* in eukaryonte Zellen induzieren könnten, die zu einer vermehrten Rezidivrate und damit einen negativen Effekt auf die Therapie haben könnten.

In der hier vorgelegten Studie wurde der *S.-aureus*-Stamm Newman verwendet, da dieser Stamm eine besonders hohe *eap*-Expression zeigt (Joost, 2009). Im Laufe dieser Arbeit wurde jedoch bekannt, dass der Stamm Newman eine Punktmutation in der Sensor-Histidinkinase SaeS besitzt, die zu einer gesteigerten *Eap*-Expression führt (Schäfer, 2009). Da Schäfer und Kollegen in ihrer Arbeit jedoch auch zeigten, dass der Stamm Newman aufgrund dieser Mutation anders als andere *S.-aureus*-Isolate auf verschiedene Stress-Signale reagiert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hier mit dem Stamm Newman gemachten Beobachtungen in anderen *S.-aureus*-Isolaten anders ausfallen könnten. Jüngste

Untersuchungen zum Einfluss von Salizylsäure auf die Expression von *eap* (Alvarez, 2011) zeigten jedoch auch, dass der Stamm Newman auf diese unter anderem auch antimikrobiell wirkende Substanz nicht anders reagierte, als andere *S.-aureus*-Isolate mit einem *saeS*-Wildtyp-Allel, so dass auch nicht ausgeschlossen werden kann, dass die hier gemachten Beobachtungen auch für andere *S.-aureus*-Isolate zutreffen. Alvarez et. al. (2011) zeigten in ihrer Studie, dass Salizylsäure die Expression von Eap steigert.

Um auch den Einfluss von Eap auf die antimikrobielle Wirksamkeit der hier getesteten Antibiotika zu untersuchen, wurden zudem Resistenztestungen mit dem *S.-aureus*-Stamm Newman, der eine hohe *eap*-Expression aufweist, sowie mit einer isogenen *eap*-Mutante (AH12) durchgeführt. Hierfür wurde die Mikrodilutionsmethode nach CLSI gewählt, da mit dieser Methode eine standardisierte Testung möglich ist. Es zeigte sich bei fast allen getesteten Antibiotika kein markanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Eap mit den hier getesteten Antibiotika wahrscheinlich nicht direkt zu interagieren vermag um so die Aktivität dieser antimikrobiellen Substanzen zu beeinflussen (Tabelle 1). Einzig für Tigecyclin, welches beim Wild-Typ eine vier- bis achtfach stärkere Aktivität bei der MHK zeigte, ist eine Interaktion zwischen Eap und dem Tetrazyklinderivat nicht völlig auszuschliessen. Da aber der Eap-positive Wild-Typ eine höhere Empfindlichkeit gegenüber diesem Glycylcyclin aufweist, kann zumindest ausgeschlossen werden, dass Eap einen negativen Einfluss auf die Wirkung dieses Antibiotikums auszuüben vermag.

Abschließend zeigt diese Arbeit neue Erkenntnisse über den Einfluss von Antibiotika auf ein extrazelluläres Protein, welches wichtig für die Virulenz ist und liefert einen weiteren Teil zum besseren Verständnis dieses komplexen Erregers. Es werden dadurch neue Untersuchungen unterstützt, die für die Therapie von Staphylokokken-Infektionen bedeutend sind.

Ausblick

Die durchgeführten Untersuchungen geben einen Rahmen für weitere Studien um den Einfluss von Antibiotika auf spezielle Virulenzfaktoren zu untersuchen. Da bei dieser Arbeit nur ein Bakterienstamm getestet wurde, wäre es interessant zu sehen, wie sich klinische Isolate auf die Wirkung verschiedener Antibiotika verhalten, um eine Aussage über die Virulenz treffen zu können. Es könnte daraufhin untersucht werden, warum einige Stämme schlechter auf bestimmte Antibiotikatherapien ansprechen als andere. Da Eap wichtig für die Internalisierung von *S. aureus* ist, könnten diese mit den getesteten Antibiotika in Zellkultur untersucht werden, um einen weiteren Einblick in ihre Wirkungsweise zu erhalten.

6 Literaturverzeichnis

- Adem, P.V.**, Montgomery, C.P., Husain, A.N., Koogler, T.K., Arangelovich, V., Humilier, M., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S. (2005). *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-Friderichsen syndrome in children. *New England Journal of Medicine* 22; 353 (12): 1245 - 1251
- Alvarez, L.P.**, Barbagelata, M.S, Cheung, A.L, Sordelli, D.O, Buzzola, F.R (2011). Salicylic acid enhances *Staphylococcus aureus* extracellular adhesin protein expression. *Microbes and Infektion* 13 (12 - 13): 1073 - 80
- Athanasopoulos, A.N.**, Economopoulou, M., Orlova, V.V., Sobke, A., Schneider, D., Weber, H., Augustin, G.H., Eming, S.A., Schubert, U., Linn, T., Nawroth, P.P., Hussain, M., Hammes, H.P., Herrmann, M., Preissner, K.T., 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
- Barber, M.** (1963). Methicillin-resistant Staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 308 - 311
- Bernardo, K.**, Pakulat, N., Flier, S., Schnaith, A., Utermöhlen, O., Krut, O., Müller, S. and Krönke, M. (2004). Subinhibitory Concentrations of Linezolid Reduce *Staphylococcus aureus* Virulence Factor Expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56: 546 – 555
- Bisognano, C.**, Vaudaux, P.E., Lewy, D.P. and Hooper, D.C. (1997). Increased expression of fibronectin binding proteins by fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 906 – 913
- 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. *Journal of Bacteriology* 186 (13): 4985 - 4999
- Blickwede, M.**, Goethe, R., Wolz, C., Valentin-Weigand, P., Schwarz, S. (2005). Molecular basis of florfenicol-induced increase in adherence of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 315 – 323
- Bokarewa, MI**, Jin, T., Tarkowski, A. (2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (4): 504 - 509
- Boyce, J.M.** (2007). Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. *Journal of Hospital Infection* 65 (2): 50 – 54

- Bur, S.**, Preissner K.T., Herrmann, M., Bischoff, M. (2013). The *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein promotes bacterial internalization by keratinocytes independent of fibronectin-binding proteins. *Journal of Investigative Dermatology* 133(8): 2004-2012
- Chang, S.**, Sievert, D.M, Hageman, J.C, Boulton, M.L., Tenover, F.C., Downes, F.P., Shah, S., Rudrik, J.T., Pupp, G.R., Brown, W.J., Cardo, D. and Fridkin, S.K. (2003). Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *New England Journal of Medicine* 348 (14): 1342 - 7
- Chavakis, T.**, Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J.I., Hermann, M., Preissner, K.T. (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nature Medicine* 8: 687 - 693
- Chavakis, T.**, Wiechmann, K., Preissner, K.T. and Hermann, M. (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial secretable expanded repertoire adhesive molecules (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thrombosis and Haemostasis* 94 (2): 278 - 285
- Cheung, A. L.**, Ying, P. (1994). Regulation of alpha- and beta-hemolysins by the *sar* locus of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 176 (3):580 - 585.
- Cheung, A. L.**, Manna, A.C. (2005). Role of distal *sarA* promoters in *SarA* expression in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 73 (7): 4391 - 4394
- Cheung, A. L.**, Nishina, K., Manna, A.C. (2008). *SarA* of *Staphylococcus aureus* binds to the *sarA* promoter to regulate gene expression. *Journal of Bacteriology* 190 (6): 2239 - 2243
- Clements, M. O.**, Foster, S.J. (1999). Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiologie* 7(11): 458 - 462
- Cramton, S.E.**, Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity* 67(10): 5427 - 5433
- De Kievit, T.R.** and Iglewski, B.H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity* 68(9): 4839 - 4849
- Deurenberg, R.**, Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A.W., Bruggeman, C.A. and Stobberingh, E.E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 13 (3): 222 - 235
- Doss, S.A.**, Tillotson, G.S. and Amyes, S.G. (1993). Effect of subinhibitory

- concentrations of antibiotics on the virulence of *Staphylococcus aureus*. Journal of Applied Bacteriology 75(2): 123 – 128
- Dunman, P.M.**, Murphy, E., Haney, S., & 7 others (2001). Transcription profiling based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. Journal of Bacteriology 183(24): 7341 - 7353
- Duthie, E.S.**, and Lorenz, L.L. (1952). Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity. Journal of General Microbiology 6: 95 - 107
- Düwelhenke, N.**, Krut, O., Krönke, M., Eysel, P. (2006). Intrazelluläre Persistenz von Staphylokokken in primären humanen Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks. Joint German Congress of Orthopaedics and Trauma Surgery. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.en>)
- Dziewanowska, K.**, Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R., Bohach, G.A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infection and Immunity 67: 4673 - 4678
- Fachinformation Pfitzer** (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels / SPC) für Zyvoxid, 2007
- Ferguson, J.D.**; Azzaro, G., Gambina, M. and Licitra, G. (2007). Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. Journal of Dairy Science 90: 5798 - 5813
- Flock, M.**, Flock, J.I. (2001). Rebinding of extracellular adherence protein *Eap* to *Staphylococcus aureus* can occur through a surface-bound neutral phosphatase. Journal of Bacteriology 183: 3999 - 4003
- Fisher, R.F.**, Goodpasture, H.C., Peterie, J.D. and Voth, D.W. (1981). Toxic shock syndrome in menstruating women. Annals of Internal Medicine 94:156 - 163
- Foster, T.J.** (2005). Immune evasion by staphylococci. Nature Reviews Microbiology 3: 948 - 958
- Foster, T.J.** and Höök, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology 6: 484 - 488
- Fournier, B.**, Klier, A., Rapoport, G. (2001). The two-component system *ArlS-ArlR* is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology 41(1): 247 - 61
- Geisbrecht, B.V.**, Hamaoka, B.Y., Perman, B., Zemla, A., Leahy, D.J. (2005). The Crystal Structures of EAP Domains from *Staphylococcus aureus* Reveal an Unexpected Homology to Bacterial Superantigens. Journal of Biological Chemistry 17: 17243 - 17250

- Gemmell, C.G.** (1995). Antibiotics and the expression of staphylococcal virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 36: 283 - 291
- Gemmell, C.G.**, Ford C.W. (2002). Virulence factor expression by Grampositive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50: 665 - 672
- Ghebremedhin, B**, Layer, F.; König, W. and König, B. (2008). Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* Spezies based on different partial *gap*, 16s RNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA* and *tuf* gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 1019 - 1025
- Ghuysen, J.M.** and Strominger, J.L. (1963). Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. I. Preparation of fragments by enzymatic hydrolysis. *Biochemistry* 2: 1110 - 1119
- Ghuysen, J.M.** (1991). Serine β -laktamases and penicillin-binding proteins. *Annual review of microbiology* 45: 37 - 67
- Giachino, P.**, Engelmann, S., Bischoff, M. (2001). σ^B activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriologie* 183: 1843 - 1852.
- Gillet, Y.**, Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piemont, Y., Brousse, N., Floret, D., Etienne, J. (2002). Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 359(9308): 753 - 759
- Ginsburg, I.** (2002). The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 110: 753 - 70
- Giraud, A.T.**, Rampone, H., Calzolari, A., Nagel, R. (1996). Phenotypic characterization and virulence of a *sae- agr-* mutant of *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 120 - 123.
- Giraud, A.T.**, Cheung, A. L., Nagel, R. (1997). The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Archives of Microbiology* 168: 53 - 58.
- Giraud, A.T.**, Calzolari, A., Cataldi, A.A. et al. (1999). The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 177: 15 - 22
- Haggar, A.**, Hussain, M., Loennies, H., Hermann, M., Norrby-Teglund, A., Flock, J.I. (2003). Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 71: 2310 - 2317

- Haggar, A.**, Ehrnfelt, C., Holgersson, J., Flock, J.I. (2004). The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* inhibits neutrophil binding to endothelial cells. *Infection and Immunity* 72: 6164 - 6167
- Haggar, A.**, Shannon, O., Norrby-Teglund, A., Flock, J.I. (2005). Dual effects of extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* on peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Infection Diseases* 192: 210 - 217
- Halle, E.**, Majcher-Peszynska, J., Drewelow, B. (2002). Linzolid: Das erste Antibiotikum aus der Klasse der Oxazolidinone. *Chemotherapie Journal* 11: 1 - 11
- Harraghy, N.**, Hussain, M., Haggar, A., Chavakis, T., Sinha, B., Hermann, M., Flock, J.I. (2003). The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* Protein Eap. *Microbiology* 149: 2701 - 2707
- Harraghy, N.**, Kormanec, J., Wolz, C., Homerova, D., Goerke, C., Ohlsen, K., Qazi, S., Hill, P., Herrmann, M. (2005). *sae* is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology* 151:1789 - 1800.
- Harraghy, N.**, Seiler, S., Jacobs, K., Hanning, M., Menger, M.D., Hermann, M. (2006). Advances in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. *International Journal of Artificial Organs* 29: 368 - 378
- Hartman, B.** and Tomasz, A. (1981). Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 19: 726 - 735
- Hawkey, P.M.** (2008). Pre-clinical experience with daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62 (3): iii7 - iii14
- Herberts, S.**, Barry, P., Novick, R.P. (2001). Subinhibitory Clindamycin Differentially Inhibits Transcription of Exoprotein Genes in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 69: 2996 - 3003
- Herrmann, M.**, von Müller, L. (2009). Leitlinien für den Gebrauch von antimikrobiellen Substanzen.
- Kipp, F.**, Friedrich, A.W., Becker, K., von Eiff, C. (2004). Bedrohliche Zunahme Methicillin-resistenter *Staphylococcus-aureus*-Stämme. *Deutsches Ärzteblatt* 101 (28-29): 2044 - 2045
- Holmberg, S.D.** and Blake, P.A. (1984). Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *The Journal of the American Medical Association* 251: 487 - 489
- Hussain, M.**, Haggar, A., Heilmann, C., Peters, G., Flock, J.I., Herman, M. (2002).

Insertional Inactivation of *eap* in *Staphylococcus aureus* Strain Newman Confers Reduced Staphylococcal Binding to Fibroblasts. *Infection and Immunity* 70: 2933 - 2940

- Hussain, M.**, von Eiff, C., Sinha, B., Joost, I., Hermann, M., Pters, G., Becker, K. (2008). *eap* Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 46(2): 470 - 476
- Joost, I.**, Blass, D., Burian, M., Goerke, C., Wolz, C., von Müller, L., Becker, K., Preissner, K., Herrmann, M., Bischoff, M. (2009). Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. *Journal of Infection Diseases* 199: 1471 - 1478
- Kolms, H.J.** (2007) Hospital infection: sources and routes of infection. *Ugeskrift for Læger* 169: 4138 - 4142
- Karow, T.** (2009). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 17. Auflage
- Kreikemeyer, B.**, Mcdevitt, D., Podbielski, A. (2002). The role of the *Map* protein in *Staphylococcus aureus* matrix protein and eukaryotic cell adherence. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 283 - 295
- 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., Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375: 1225 - 1240
- Kuroda, H.**, Kuroda, M., Cui, L., Hiramatsu, K. (2007). Subinhibitory concentrations of β -lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the *SaeRS* two-component system. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 268: 98 - 105
- Ladhani, S.**, Robbie, S., Garratt, R.C., Chapple, D.S., Joannou, C.L., Evans, R.W. (2001). Development and evaluation of detection systems for staphylococcal exfoliative toxin A responsible for scalded-skin syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (6): 2050 - 2054
- Lee, L.Y.**, Miyamoto, Y.J., McIntyre, B.W., Hook, M., McCrea, K.W., Mcdevitt, D., Brown, E.L. (2002). The *Staphylococcus aureus* *Map* protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses. *Journal of Clinical Investigation* 110: 1461 - 1471

- 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. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 37: 248 - 250
- Liang, X.**, Yu, C., Sun, J., Liu, H., Landwehr, C., Holmes, D., Ji, Y. (2006). Inactivation of a two-component signal transduction system, *SaeRS*, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 74: 4655 - 4665
- Lindsay, J.A.**, Foster, S.J. (1999). Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. *Molecular and General Genetics* 262: 323 - 331
- Lowy, F.D.** (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* 339: 520 - 532
- Mack, D.**, Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H. and Laufs, R. (1996). The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1.6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal of Bacteriology* 178: 175 – 183
- Mainiero, M.**, Goerke, C., Geiger, T., Gonser, C., Herbert, S., Wolz, C. (2010). Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system *saeRS*. *Journal of Bacteriology* 192(3): 613 - 623
- Mandell, G.L.**, Coleman, J. (2000). Activities of antimicrobial agents against intracellular *Pneumococci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 2561 - 2563
- Manfredi, R.**, Sabbatani, S. (2010). Novel pharmaceutical molecules against emerging resistant gram-positive cocci. *Brazilian Journal of Infection Diseases* 14 (1): 96 - 108
- Marrer, E.**, Satoh, A. T., Johnson, M. M., Piddock, L. J., Page, M. G. (2006). Global transcriptome analysis of the responses of a fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutant and its parent to ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50: 269 - 278.
- Monday, S.R.** and Bohach, G.A. (2001). Genes encoding staphylococcal enterotoxins G and I are linked and separated by DNA related to other staphylococcal enterotoxins. *Journal of Natural Toxins* 10 (1): 1 - 8
- Mortin, L.I.**, Yu, D., Li, T., Van Praagh, A., Zhang, X., Bao, J. (2003). Efficacy of Daptomycin in a fibrin clot model of endocarditis in rats using a bioluminescent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Poster presented at the 103rd American society of Microbiology, Washington, DC,

USA

- Mazmanian, S.K.**, Liu, G., Ton-That, H. and Schneewind, O. (1999). *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285: 760 - 763
- Muthaiyan, A.**, Silverman, J.A., Jayaswal, R.K., Wilkinson, B.J. (2008). Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (3): 980 - 990
- Noble, W.C.**, Virani, Z. and Cree, R.G. (1992). Cotransfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 72: 195 - 198
- Novartis Pharma GmbH**, Rote-Hand-Brief: Wichtige Sicherheitsinformation zum Zusammenhang von Daptomycin (Cubicin®) und eosinophiler Pneumonie vom 21.01.2011
- Novick, R.P.** (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology* 48 (6): 1429 - 1449
- Ogston, A.** (1883). Micrococcus poisoning. *Journal of Anatomy and Physiology* 17: 24 - 58
- Ohlsen, K.**, Ziebuhr, W., Koller, K.P., Hell, W., Wichelhaus, T.A., Hacker, J. (1998). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on a-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 2817 - 2823
- Palma, M.**, Haggar, A., Flock, J. (1999). Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *Journal of Bacteriology* 181 (9): 2840 - 45
- Pfizer Pharma GmbH**, Rote-Hand-Brief zur Einschränkung aller Anwendungsgebiete von Tygacil® (Tigecyclin) aufgrund erhöhter Mortalität in klinischen Studien vom 17.03.2011
- Pichereau, S.**, Pantrangi, M., Couet, W., Badiou, C., Lina, G., Shukla, S.K., Rose, W.E. (2012). Simulated antibiotic exposures in an in vitro hollow-fiber infection model influence toxin gene expression and production in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain MW2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (1): 140 - 7
- Rachid, S.**, Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W. (2000). Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular

Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44 (12): 3357 – 3363

- Rasigade, J.P.**, Moulay, A., Lhoste, Y., Tristan, A., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., Laurent, F., Dumitrescu, O. (2011). Impact of sub-inhibitory antibiotics on fibronectin-mediated host cell adhesion and invasion by *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiology 11: 263
- RKI** (1999). Empfehlung zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten *Staphylococcus-aureus*-Stämmen (MRSA) in Krankenhäusern und anderen medizinischen Einrichtungen. Mitteilung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention am RKI. Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz; 42: 954–958
- Roosjakkers, S.H.**, Van Wamel, W.J., Ruyken, M., van Kessel, K.P. and van Strijp, J.A. (2005). Anti-opsonic properties of staphylokinase. Microbes and Infections 7: 476 - 484
- Rosenbach, F.J.** (1884). Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des Menschen
- Rote Liste** (2008). Fachinformation-Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SPC, Tygacil
- Schäfer, D.**, Lam, T., Geiger, T., Mainiero, M., Engelmann, S., Hussain, M., Bosserhoff, A., Frosch, M., Bischoff, M., Wolz, C., Reidl, J., Sinha, B. (2009). A point mutation in the sensor histidine kinase SaeS of *Staphylococcus aureus* strain Newman alters the Response to biocide exposure. Journal of Bacteriology 191 (23): 7306 – 7314
- Schramm, G.E.**, Johnson, J.A., Doherty, J.A., Micek, S.T., Kollef, M.H. (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sterile-site infection: The importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Critical Care Medicine 34(8): 2269 - 2274
- Schlievert, P.M.**, Kelly, J.A. (1984). Clindamycin-induced suppression of toxic shock syndrome-associated exotoxin production. Journal of Infection Diseases 149: 471
- Shibl, A.M.** (1987). Influence of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence of staphylococci. Review Infection Diseases 9: 704 - 712
- Sievert, D.M.**, Rudrik, J.T., Patel, J.B., McDonald, L.C., Wilkins, M.J., Hageman, J.C. (2008). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. Clinical Infectious Diseases 46 (5): 668 - 674
- Silverman, J.A.**, Perlmutter, N.G., Shapiro, H.M. (2003). Correlation of Daptomycin Bactericidal Activity and Membrane Depolarization in

- Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47 (8): 2538 – 2544
- Smith, I.M.**, Vickers, A.B. (1960). Natural history of 338 treated and untreated patients with staphylococcal septicaemia (1936 - 1955). Lancet 1: 1318-1322
- Smith, K.**, Gould, K.A., Ramage, G., Gemmell, C.G., Hinds, J., Lang, S. (2010). Influence of Tigecycline on Expression of Virulence Factors in Biofilm-Associated Cells of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapie 54 (1): 380 – 387
- Sobke, A.C.**, Athanasopoulos, A.N., Selimovic, D., Orlova, V., Hassan, M., Chavakis, T., Schubert, U., Hussain, M., Thiel, G., Preissner, K.T., Herrmann, M. (2006). The extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* abrogates angiogenic responses of endothelial cells by blocking Ras activation. The Federation of American Societies For Experimental Biology Journal 20: 2621 - 2623
- Song, Y.**, Lunde, C.S., Benton, B.M., Wilkinson, B.J. (2012). Further Insights into the Mode of Action of the Lipoglycopeptide Telavancin through Global Gene Expression Studies. Antimicrobial Agents and Chemotherapie 56(6):3157 - 3164
- Steinhuber, A.**, Goerke, C., Bayer, M.G., Doring, G., Wolz, C. (2003). Molecular architecture of the regulatory locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. Journal of Bacteriology 185(21): 6278 - 6286
- Tholema, N.**, Fuchs, T., Löffler, B., Kreis, C., Raschke, M. (2008). Untersuchungen zur intrazellulären Wirksamkeit von Daptomycin und Tigecyclin im Osteoblasten-Infektionsmodell. German Medical Science GMS Publishing House; 2008. DocEF 16 - 1223
- Tiwari, J.G** and Tiwari, H.K. (2007). Staphylococcal zoonosis on dairy farms in Assam and Meghalaya. Indian Journal of Public Health 51(2): 97-100
- Trautmann, M.** (2004). Pharmakodynamik von Linezolid. Chemotherapie Journal 13 (5): 218
- Utaiida, S.**, Dunman, P. M., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., Singh, V. K., Jayaswal, R. K., Wilkinson, B. J. (2003) Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. Microbiology 149: 2719 - 2732
- Vandenesch, F.**, Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N. (2003). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying panton-valentine leukocidin genes:

worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases* 9 (8): 978 - 984

- Vuong, C.**, Keller, D., Peschel, A., Otto, M. (2002). Binding of the Map protein of *Staphylococcus aureus* Newman to the cell wall is dependent on the D-alanylation of teichonic acids. In 10th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections, p.43. Tsukuba, Japan ISSSI 102-Abstract 01
- Weigel, L.M.**, Clewell, D.B., Gill, S.R., et al (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302: 1569 - 1571
- Wiedemann, B.** (2008). Wirksamkeit von Daptomycin bei grampositiven Erregern. *Chemotherapie Journal* 17: 2-9
- Wilhelm, C.** (2004). In-vitro-Wirksamkeit von Moxifloxacin und Linezolid gegen *Staphylococcus aureus*-, *Streptococcus pneumoniae*- und *Enterococcus spp.*-Isolate in Abhängigkeit vom Testmedium und der Keimlokalisation. Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Wettenberg, URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2005/1954/>
- Wilkinson, B.J.**, Muthaiyan, A., Jayaswal, R.K. (2005). The cell wall stressstimulon of *Staphylococcus aureus* and other gram-positive bacteria. *Current Medical Chemistry - Anti-Infective Agents* 4 (3): 259–276
- Xie, C.**, Alcaide, P., Geisbrecht, B.V., Schneider, D., Herrmann, M., Preissner, K.T., Luscinskas, F.W., Chavakis, T. (2006). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Experimental Medicine* 203: 985 - 994
- Yarwood, J.**, Schlievert, P. (2003). Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. *Journal of Clinical Investigation* 112 (11): 1620-1625

7 Danksagung

Meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann danke ich zuerst und ganz besonders für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien, das Erörtern von Problemen und die immer schnellen, wirksamen Hilfestellungen. Mein besonderer Dank gilt Professor Herrmann aber auch für die Zeit und Aufmerksamkeit, die ich im Rahmen der mikrobiologischen und infektologischen Anteile meiner Ausbildung während der letzten Jahre von ihm erhalten habe, was mein Interesse an diesem Bereich der Medizin stetig hat wachsen lassen..

PD Dr. sc. nat. ETH Markus Bischoff war während der gesamten Dauer der Erstellung der unmittelbare Betreuer dieser Arbeit; daher danke ich ihm für die Unterstützung in dieser Zeit.

Besonders danken möchte ich dem gesamten Team der Forschung des Institutes für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, den MTAs Karin Hilgert und Martina Birke und meinen Mitdoktoranden. Vor allem Torsten Hartmann, der mir bei vielen kleinen und großen Fragestellungen immer wieder geholfen hat, danke ich für die wertvollen Ratschläge, Hilfestellungen, sehr lustigen Pausenzeiten und die Unterstützung bei allem, was ich zu bewältigen hatte. Ich habe mich in diesem Team sehr wohl und aufgehoben gefühlt. Es war eine schöne Zeit mit euch.

Meiner Mutter und meinen Großeltern möchte ich für das Ermöglichen meines Medizinstudiums danken und für die Unterstützung und Hilfe, die sie im Laufe meines gesamten Werdegangs aufgebracht haben. Vielen Dank für alles.

Danke Tim.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|---------------|------------|
| Name: | Gensler |
| Vorname: | Mira |
| Geburtsdatum: | 08.07.1981 |
| Geburtsort: | Dachau |

Beruflicher Werdegang

| | |
|-------------------|--|
| seit 10/2013 | Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie, Notfall,-Intensivmedizin und Schmerztherapie am St. Katharinen-Hospital/Frechen |
| 04/2013 - 09/2013 | Assistenzärztin in der Klinik für Kardiologie, Angiologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin des Krankenhauses Düren |
| 04/2012 - 03/2013 | Assistenzärztin in der Klinik für Hämatologie und Internistische Onkologie des Krankenhauses Düren |
| 09/2002 - 09/2005 | MTLA Ausbildung (Universitätsklinikum Göttingen) |

Hochschulstudium

| | |
|-------------------------|--|
| 10/2005 - 12/2011 | Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes (Homburg/Saar) |
| 23.10.2010 - 24.07.2011 | Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Homburg/Saar (Wahlfach Psychiatrie) |
| 17.09.2007 | 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Universität des Saarlandes |

Auslandsaufenthalt

07/2001 - 12/2001 Praktikum in England (Firma Whatman)

Schulbildung

1987 - 1989 Grundschule Büdingen (Hessen)
1989 - 1991 Grundschule Bebra (Hessen)
1991 - 1993 Förderstufe (Brüder–Grimm Schule)
1993 - 1997 Gesamtschule (Brüder–Grimm Schule)
1997 - 2001 gymnasiale Oberstufe (Jakob–Grimm Schule
Rotenburg/a.d.Fulda)