

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Peters -

**Transkriptionsprofil wichtiger Regulatoren und Virulenzgene klinischer
Staphylococcus aureus-Isolate aus dem Respirationstrakt von
Mukoviszidose-Patienten**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der

Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Ulrich, Katharina Maria Elisabeth

aus Münster

2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Barbara Kahl
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Mellmann

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2013

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Peters
Referentin: Prof. Dr. med. Barbara Kahl
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Mellmann

Zusammenfassung

Transkriptionsprofil wichtiger Regulatoren und Virulenzgene klinischer *Staphylococcus aureus*-Isolate aus dem Respirationstrakt von Mukoviszidose-Patienten

Ulrich, Katharina

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression von 16 klinischen *S. aureus*-Isolaten aus dem Respirationstrakt von Mukoviszidose-Patienten untersucht. Die verwendeten Isolate stammten aus einer multizentrischen prospektiven Observationsstudie von Mukoviszidose-Patienten. Fokus der Untersuchung war das Transkriptionsprofil der Regulatoren *agr*, in Form von RNA III, *asp23* als *sigB*-abhängiges Transkript und *sae* sowie das Transkriptionsprofil der Virulenzgene *hla* und *spa*. Zum Vergleich wurden neben den Isolaten Laborstämme (SH 1000, RN 6390, 8325-4) und Mutanten (*agr*-, *sar*-, *agr*/*sar*-, *sigB*-) mitgeführt. Die phänotypische Analyse der Stämme erfolgte nach Anzucht auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar, wobei letztgenannter Unterschiede im Phänotyp, wie den Hämolysegrad und die Pigmentierung, noch besser erfasste. Die Isolate wurden je nach Ausmaß der Hämolyse in drei Gruppen zusammengefasst. Da die RNA-Isolierung von Agarplatten nicht üblich ist, wurde die RNA der Stämme zusätzlich noch aus BHI-Flüssigkulturen isoliert. Ziel war es, die relative Genexpression der Regulatoren und Virulenzgene mittels der RT-PCR zu bestimmen, um mögliche Rückschlüsse auf den Phänotyp ziehen zu können. Arbeiten, die eine Korrelation zwischen Phänotyp und erwarteter Genexpression herstellten, gab es bisher nicht.

Ergebnis der Untersuchung ist die große Variation der Genexpression zwischen den klinischen Isolaten untereinander aber auch im Vergleich zu den Mutanten und Laborstämmen. Der Phänotyp von 8325-4 entwickelte eine maximale Hämolyse und exprimierte wie erwartet *hla* in hohem Maße. Diese Hypothese ließ sich bei den klinischen Isolaten nicht belegen. Stark hämolysierende Phänotypen (S 568 I) wiesen teilweise auch eine geringere Hämolyse auf Schaedler-Agar auf. Allerdings folgte einer erfolgreichen Transkription von *sae* die ebenfalls erfolgreiche Expression von *hla* bei Isolaten der Gruppe III. Interessanterweise stellten sich zwei klinische Isolate (S 348 I, S 179 I) offenbar als *spa*-Mutanten heraus. Bei zwei weiteren klinischen Stämmen (S 1368 II und III) könnte es sich um natürliche *agr*-Mutanten handeln, da die RNA III-Expression auf den Agarplatten sehr gering war. Diese Erkenntnisse dienen als Anstoß für weitere Untersuchungen, die sich mit den Mutationen in klinischen *S. aureus*-Isolaten aus Mukoviszidose-Patienten befassen könnten.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe die eidesstattliche Erklärung ab, dass ich meine Dissertation über das

**Transkriptionsprofil wichtiger Regulatoren und Virulenzgene klinischer
Staphylococcus aureus-Isolate aus dem Respirationstrakt von
Mukoviszidose-Patienten**

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie des
Universitätsklinikums Münster

Unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. med. Barbara Kahl

1. selbstständig angefertigt,
2. weder in der gegenwärtigen, noch in der anderen Fassung als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt,
3. nur unter der Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
4. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen habe.

Hamburg, den 05.05.2013

Katharina Ulrich

1 Inhalt

1	Inhalt.....	6
2	Einleitung und Fragestellung.....	8
2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.2	Zystische Fibrose.....	9
2.3	Genexpression bei Bakterien.....	11
2.4	Expression der Virulenzgene und Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	11
2.4.1	Der <i>agr</i> -Regulator.....	13
2.4.2	Der <i>sar</i> -Regulator.....	14
2.4.3	Der <i>sae</i> -Regulator.....	15
2.4.4	Der <i>sigB</i> -Regulator.....	15
2.4.5	Die Hämolyse.....	16
2.4.6	Das Protein A.....	16
2.5	Bestimmung der Genexpression mittels Real-Time-PCR.....	17
2.6	Fragestellung und Ziel dieser Arbeit.....	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Materialien.....	20
3.1.1	Bakterielle Stämme.....	20
3.1.2	Chemikalien.....	21
3.1.3	Geräte.....	23
3.1.4	Software.....	23
3.2	Methoden.....	23
3.2.1	Bakterienanzucht auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar.....	23
3.2.2	Bakterienanzucht in Flüssigkulturen zur Ermittlung des Wachstumsverlaufes.....	24

3.2.3	RNA-Isolierung.....	25
3.2.4	Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA.....	26
3.2.5	cDNA-Transkription.....	26
3.2.6	Real Time-Polymerasekettenreaktion.....	27
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Wachstumsverhalten auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar.....	30
4.1.1	Häufigkeitsverteilung der Merkmale der klinischen Isolate.....	31
4.1.2	Das phänotypische Erscheinungsbild der Kolonien auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar.....	33
4.2	Der Wachstumsverlauf in den Flüssigkultur.....	35
4.3	Die Ergebnisse der Real Time-PCR.....	37
4.3.1	Das Transkriptionsprofil der Laborstämme und Mutanten.....	37
4.3.2	Das Transkriptionsprofil der klinischen Isolate.....	52
5	Diskussion.....	78
6	Literaturverzeichnis.....	85
7	Abbildungsverzeichnis.....	91
8	Tabellenverzeichnis.....	93
9	Abkürzungen.....	94
10	Anhang.....	95
11	Lebenslauf.....	96

2 Einleitung und Fragestellung

2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) gehört zur Familie der Staphylokokken (griech. staphylos = Traube). Staphylokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe, Katalase-positive, typischerweise in der Gramfärbung in Haufen gelagerte, ca. 0,5-1,7µm große Bakterien, die unbeweglich und nicht sporenbildend sind. Sie sind relativ hitzestabil und können noch nach längerer Zeit aus getrocknetem Material kultiviert werden.

Die Abgrenzung zu anderen Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS) geschieht bei *S. aureus* durch die Produktion des Enzyms Koagulase, das Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Beim Wachstum auf Blut-Agar neigt *S. aureus* zur Bildung von weißlich bis goldgelben, β-hämolisierenden Kolonien. Daher stammt auch der Name *S. aureus* (lat. aureus =golden).

S. aureus, ein opportunistischer Erreger, kolonisiert 20-50% der gesunden Normalbevölkerung dauerhaft oder vorübergehend. Am häufigsten sind die vorderen Nasenvorhöfe und der Perinealbereich besiedelt. Höher ist die Kolonisationshäufigkeit bei chronisch Kranken, wie insulinpflichtigen Diabetikern und Hämodialyse-Patienten. Zu einer hohen Morbidität und Mortalität führen vor allem die nosokomialen Infektionen (38), aber auch bei Gesunden kann eine *S. aureus*-Infektion schwere Verläufe aufweisen.

S. aureus kann oberflächliche Hautinfektionen wie Abszesse oder Impetigo verursachen. Eine Infektion mit *S. aureus* kann aber auch zu schweren invasiven Infektionen wie Arthritis, Osteomyelitis, Endokarditis oder Sepsis führen (38). Ein erhöhtes Risiko haben vor allem hospitalisierte Patienten nach invasiven Eingriffen, wie nach Anlage intravenöser Katheter oder chirurgischen Operationen, bei denen die nosokomialen Infektionen mit *S. aureus* eine wichtige Rolle spielen. Ein großes Problem bei der Behandlung von *S. aureus*-Infektionen ist das Auftreten von Methicillin-resistenten *S. aureus* Stämmen (MRSA), bei denen inzwischen schon

Resistenzen gegen das Reserveantibiotikum Vancomycin aufgetreten sind (25). Zunehmend treten so genannte „community-acquired“ MRSA-Infektionen auf, an denen vor allem gesunde Menschen erkranken, die nicht in einer medizinischen Einrichtung behandelt worden sind (59).

S. aureus exprimiert eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, die z.T. dazu führen, dass der Erreger der Immunabwehr des Menschen entgeht und die zur Zerstörung des Gewebes führen. Die Virulenzfaktoren werden eingeteilt in die Gruppe der Oberflächenproteine und in die der extrazellulären Proteine. Wichtige Virulenzfaktoren, die in der Zellwand verankert sind, sind das Protein A, das Fibronectin-bindende Protein und der Clumping-Faktor A. Viele *S. aureus*-Stämme produzieren zudem eine Polysaccharidkapsel (48). Ein Virulenzfaktor, der zunehmend bei CA-MRSA-Infektionen an Bedeutung gewinnt, ist das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL), das mit schweren Hautinfektionen und nekrotisierenden Pneumonien assoziiert ist. So wurden auch schon PVL-positive MRSA-Stämme aus der Lunge von CF-Patienten isoliert (16). Zu den extrazellulären Proteinen gehört eine große Gruppe von Exotoxinen, wie die zu den Superantigenen (SAGs) gehörenden Enterotoxine, SEs, SEIs und Toxic-Shock-Syndrome-Toxin-1 (TSST-1), die Exfoliativtoxine A und B und die Zytolysine, wie das PVL und die Hämolysine.

Typischerweise werden die verschiedenen Virulenzfaktoren von *S. aureus* in bestimmten Phasen des Wachstumszyklus exprimiert. So werden die Oberflächenproteine in der exponentiellen Phase und die sezernierten Proteine vor allem in der postexponentiellen und stationären Phase produziert (55).

2.2 Zystische Fibrose

Die zystische Fibrose (cystic fibrosis, CF, Synonym: Mukoviszidose) ist eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Es liegt eine Mutation eines Gens auf Chromosom 7 vor, das für den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) kodiert. Die häufigste Mutation (ca. 70%) beruht auf einer Deletion von drei Basenpaaren, die zum Fehlen von Phenylalanin (F) an Position 508 (ΔF_{508}) im CF-Genprodukt führt (13). Die Prävalenz liegt in den westlichen Ländern bei 1 von

3000 Lebendgeburten. Über 50% der Patienten mit CF sind homozygot für die Mutation ΔF_{508} (13), wobei die Schwere der Erkrankung stark variieren kann.

Typischerweise kommt es durch eine epitheliale Dysfunktion mit erhöhter Natriumabsorption und verminderter Chloridsekretion zur Funktionsstörung der exokrinen Drüsen. Ursächlich dafür ist das Fehlen der cAMP-aktivierten Chloridionen-Transportfunktion des CFTR-Proteins (15). Außerdem scheint CFTR als Inhibitor der epithelialen Natriumkanäle zu wirken. Das CFTR-Protein kommt in der apikalen Epithelmembran verschiedener Organe vor und führt dort bei gestörter Funktion zu einer erhöhten Viskosität der Sekrete.

Charakterisiert wird die zystische Fibrose klinisch durch verzögertes Wachstum, Steatorrhoe, Infektionen und Pankreasinsuffizienz.

Die Infektionen in der Lunge werden durch die hohe Viskosität des Bronchialsekrets, welches durch die erhöhte Natriumchloridkonzentration bedingt ist, begünstigt. Die gestörte mukoziliäre Clearance verhindert, dass der Schleim abgehustet werden kann und somit ein idealer Nährboden für bakterielle Keime entsteht. Folgen sind rezidivierende Bronchitiden aufgrund der chronischen Inflammation und Bronchiektasen, die zu Atelektasen führen. Typischerweise werden im Sputum von CF-Patienten *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* sowie gelegentlich *Escherichia coli* und *Klebsiellen* nachgewiesen. *S. aureus* und *Haemophilus influenzae* sind die Keime, die meist schon im frühen Kindesalter im Sputum nachgewiesen werden, wenn in der Lunge noch keine ausgeprägte strukturelle Schädigung vorliegt (51). Bei Jugendlichen und Erwachsenen ist *P. aeruginosa* der führende Keim im bronchopulmonalen System. *S. aureus* ist in der Lage für Monate bis Jahre in der Lunge der CF-Patienten trotz adäquater antibiotischer Therapie zu persistieren (31). Ein Mechanismus, um sich an die Langzeittherapie mit Antibiotika zu adaptieren, ist das Auftreten von „small colony variants“ (SCV), die noch resistenter gegen die gängigen bei CF eingesetzten Antibiotika sind als der normale Phänotyp von *S. aureus* (33).

Die chronische Beteiligung der Lunge führt zu weiteren Komplikationen, wie Pneumothorax, Hämoptysen und im fortgeschrittenen Stadium zur respiratorischen Insuffizienz und chronischem Cor pulmonale (15). Die Patienten fallen meist im frühen Kindesalter mit chronischer Rhinosinusitis und Nasenpolypen auf.

Die wesentlichen Säulen der Therapie sind die Förderung der Sekret-Clearance durch gezielte Physiotherapie, die Gabe von rekombinanter humaner DNAase und die rechtzeitige prolongierte antibiotische Therapie bei akut entzündlichen Schüben. Zur Aufrechterhaltung einer regelrechten Verdauung werden Pankreasenzyme substituiert. Wichtige Punkte in der antibiotischen Therapie im Zusammenhang von CF und *S. aureus* sind die primäre Prophylaxe, die Eradikation und die Behandlung von pulmonalen Exazerbationen.

Durch eine Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten in den letzten Jahren beträgt die Lebenserwartung heute bei diesen Patienten mehr als 30 Jahre (13).

2.3 Genexpression bei Bakterien

Gene liegen nicht verstreut auf der DNA, sondern sind meistens zu mehreren als regulierte Einheit zusammengefasst. Diese Einheiten werden als Operon bezeichnet.

Das zentrale Element der Signaltransduktion bei Bakterien bezieht sich auf ein Zwei-Komponenten-System. Dieses besteht gewöhnlich aus zwei Proteinen, die in einem einzelnen Operon kodiert werden. Bei einem der beiden Proteine handelt es sich um den *transmembrane sensor* und bei dem anderen um den Transkriptionsfaktor oder auch *response regulator* (52).

Alle Bakterien exprimieren ihre genetische Information in einem bestimmten Muster abhängig von der Wachstumsphase, relativ wenige sogar durchgehend während des gesamten Zellwachstums (konstitutiv).

2.4 Expression der Virulenzgene und Virulenzfaktoren von *S. aureus*

Eine Reihe verschiedener regulatorischer Gene sind für die Expression der Virulenzfaktoren von *S. aureus* verantwortlich.

Die Produktion der Virulenzfaktoren wird eng in Bezug auf die Zelldichte, Umgebungseinflüsse und zur Verfügung stehender Energie kontrolliert und findet nur bei entsprechendem Bedarf statt (45). Die Expression der Virulenzfaktoren bei *S. aureus* ist abhängig von der jeweiligen Wachstumsphase. Bei der Kultivierung eines

S. aureus Stammes im nährstoffreichen Flüssigmedium lässt sich das Wachstumsverhalten anhand einer logarithmisch aufgetragenen Kurve beschreiben. Es ergibt sich eine Unterteilung in drei Phasen: *lag*-, *log*- bzw. *exponentielle*, *post exponentielle* und die *stationäre Phase*. In der exponentiellen Phase werden die Oberflächenproteine synthetisiert, in der postexponentiellen vor allem die Toxine und Exoproteine.

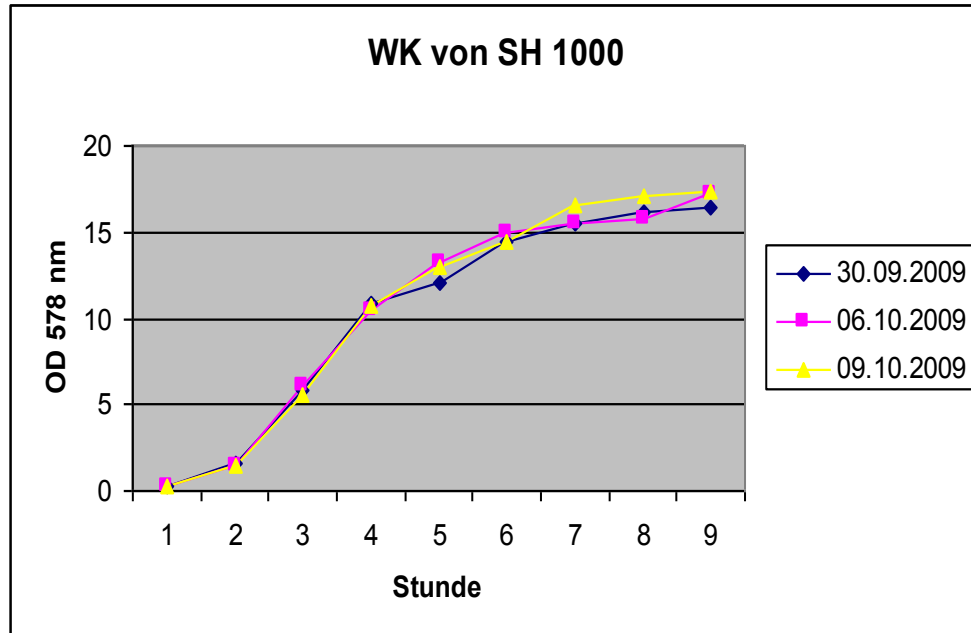


Abb. 1: Wachstumskurve des Laborstammes SH 1000 in BHI

Zu den unterschiedlichen Virulenzfaktoren gehören im Allgemeinen die Oberflächenproteine und die sezernierten Proteine. Ihre Produktion wird insbesondere über das *agr*-System reguliert, wobei die Oberflächenproteine durch *agr* inhibiert und die sezernierten Proteine aktiviert werden (44). Zu den sezernierten Proteinen gehören die Enterotoxine, Hämolysine (α , β , γ , δ), Hyaluronidase, Exfoliativtoxine (A und B), das Fibrinolysin, Leukozidin und das „toxic shock syndrome toxin“. Zu den Oberflächenproteinen gehören u.a. das Protein A, an das sich die Immunglobuline mit ihrem F_c-Fragment binden. Zu den extrazellulären Proteinen gehören u.a. das Pantone-Valentine-Leukozidin und das γ -Hämolysin, welche leukozytolytische Aktivität aufweisen.

2.4.1 Der *agr*-Regulator

agr (*accessory gene regulator*) ist ~3kb groß und besteht aus verschiedenen Transkriptionseinheiten, die von den Promotoren P2 und P3 gesteuert werden (45). Es handelt sich um einen zentralen Transkriptionsregulator von *S. aureus*, der die Expression von Genen, die für Virulenz-assoziierte Proteine kodieren, kontrolliert. *agr* wurde erstmals von Recsei et al. 1986 als globaler Regulator von *S. aureus* beschrieben und nimmt eine Schlüsselfunktion in der Kontrolle der Expression von Exoproteinen ein (54).

Das Regulator-Gen *agr* repräsentiert ein „quorum-sensing-System“, welches über die bakterielle Dichte von *S. aureus* reguliert wird. Dabei werden sogenannte autoinduzierende Peptide (AIP) sezerniert, die in Abhängigkeit von der bakteriellen Populationsdichte zur Aktivierung des Regulators führen. Es werden vier verschiedene *agr*-Gruppen I-IV synthetisiert. Die AIPs induzieren die Aktivierung des Zwei-Komponenten-System von *S. aureus* derselben *agr*-Gruppe, während die AIPs einer anderen *agr*-Gruppe den Regulator inhibieren. Das *agr*-Operon besteht aus den beiden Promotoren P2 und P3, die für die Produktion der Transkriptionseinheiten RNA II und RNA III verantwortlich sind (45). Das P3-Transkript RNA II besteht aus dem Operon *agrA*, *-B*, *-C* und *-D*, die alle für die Aktivierung des Promotors P2 und die folgende RNA III Transkription benötigt werden. RNA III ist das *agr*-Effektormolekül, das im Wesentlichen für die Kontrolle der Synthese von Oberflächenproteinen und extrazellulären Proteinen verantwortlich ist (44).

Die einzelnen vier *agr*-Gruppen werden mit verschiedenen *S. aureus*-bedingten Krankheiten assoziiert. So wird die *agr*-Gruppe III mit dem „toxic-shock-Syndrom“ in Verbindung gebracht (41) und die Gruppe IV korreliert mit dem „staphylococcal-scaled-Skin-Syndrom“ (29). Bei den aus CF-Patienten isolierten *S. aureus*-Isolaten konnte keine Korrelation zu einer bestimmten *agr*-Gruppe gefunden werden (32).

Bei RNA III handelt es sich um den *agr*-Effektor, der für das δ -Hämolysin Gen kodiert und für die *agr*-vermittelte Regulation verantwortlich ist (44). Es agiert wechselseitig, indem es die Transkription der meisten extrazellulären Proteine aktiviert und im Gegenzug viele Oberflächenproteine inhibiert. So werden *hla* und *spa* von RNA III reguliert, indem RNA III mit dem *hla* Transkript interagiert und dessen Translation erleichtert (40). Die Unterdrückung von *spa* geschieht nicht nur auf

Transkriptionsebene, sondern auch auf der RNA III-vermittelten Ebene der Translation und ebenso durch den Abbau der *spa*-mRNA mit Hilfe der RNase III (27).

Der *agr*-Lokus spielt eine wichtige Rolle bei der Virulenz von *S. aureus* im Tiermodell und daher wird schlussfolgernd vermutet, dass er ebenso eine Rolle bei humanen Infektionen spielt. Obwohl die meisten klinischen *S. aureus*-Isolate, die bei humanen Infektionen isoliert werden, *agr*⁺ sind, gibt es mehrere Berichte über die Isolation von *agr*-defekten Mutanten aus Materialien infizierter Patienten. Es ist bekannt, dass der *agr*-Lokus *in vitro* sehr labil ist.

Traber et al. beschäftigten sich mit Mutationen im *agr*-Lokus von klinischen *S. aureus*-Isolaten und kamen zu der Erkenntnis, dass die Mutationen im Verlauf der Infektion zustande gekommen waren (57).

Eine Studie von Goerke et al. kam zu dem Schluss, dass die Aktivität von *agr* bei einer Infektion mit *S. aureus* bei der zystischen Fibrose keine wesentliche Relevanz hat. Sie konnten zeigen, dass RNA III in den klinischen *S. aureus*-Isolaten nur gering exprimiert wurde, was für ein inaktives *agr in vivo* sprach (21).

2.4.2 Der *sar*-Regulator

Bei *sar* (*staphylococcal accessory regulator*) handelt es sich um einen Regulationsloкус, der das *agr*-Operon in dessen Funktion beeinflusst. Es ist aus drei verschiedenen sich überlappenden Transkripten *sarA*, *-B* und *-C* aufgebaut, die ihren Ursprung in den Promotoren P1, P2 und P3 nehmen. Die Arbeitsgruppe um Manna analysierte 1998 die Expression dieser Promotoren, um die Aktivierung des *sar*-Lokus zu untersuchen. Die maximale Expression wurde bei einer Verbindung der P₂-P₃-P₁-Promotoren beobachtet. Desweiteren wurde mit der Untersuchung der Expression bei einer *sigB*-Mutante gezeigt, dass P3 *sigB* abhängig ist (39). So kann *sigB* die Expression von *sarA* steigern während es gleichzeitig die Expression von *agr* reduziert (3). Die Expression der drei Transkripte variiert während des Wachstumszyklus, mit einem Maximum der Expression von *sarA* und *-B* in der frühen exponentiellen Phase und von *sarC* in der späten stationären Phase (2). *sarA* selbst ist in der Lage seine Produktion zu unterdrücken, indem es die Transkription von P1 und P3 limitiert (12).

Darüber hinaus ist *sar* notwendig für die *agr*-abhängige Regulation von RNA III (7). Ebenso hat *sar* einen Einfluss auf die Transkription der Exoproteine α - und β -Hämolysin (8).

2.4.3 Der *sae*-Regulator

Der Lokus *staphylococcal accessory gene (sae)* besteht aus einem Zwei-Komponenten-Signaltransduktionssystem, das für die Gene *saeR* (response regulator), *saeS* (Histidin Proteinkinase), *saeQ* (Membranprotein) und *saeP* (Lipoprotein) kodiert und das eine Schlüsselfunktion in der Genregulation der Exoproteine aufweist. Es beeinflusst deren Produktion während der Wachstumsphase und agiert auf der Transkriptionsebene. Gesteigert wird die Expression von α - und β -Hämolysinen (*hla*, *hly*), DNase und Koagulase (*coa*). In einigen Fällen scheint es sich synergistisch zu *agr* zu verhalten. Es findet aber keine Beeinflussung der Regulationsgene *agr*, *sarA* und σ^B statt, wobei diese Gene allerdings im Gegenzug die Transkription von *sae* beeinflussen (46). *sae* wird vor allem in der postexponentiellen Phase transkribiert (19).

2.4.4 Der *sigB*-Regulator

Das Operon für den alternativen Stress-Sigma-Faktor B (*sigB*) besteht aus vier Genen, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB*, dem ein σ^A -ähnlicher Promotor vorausgeht und das eine innere σ^B -ähnliche Promotorsequenz enthält (63). Der alternative Sigma Faktor σ^B spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Exoproteine und verhält sich generell antagonistisch zu *agr* und kontrolliert zumindest teilweise die Transkription des globalen Regulatorgens *sar* (14). Eine Inaktivierung des σ^B -Gens scheint im Vergleich zum Wildtyp (*RsbU*) zu einer gesteigerten Expression von *sae* zu führen (46).

Die Arbeitsgruppe um Gertz identifizierte 1999 das Alkalische-Schock-Protein *asp23*, dessen Gen vom alternativen Stress-Sigma Faktor σ^B transkribiert wird und damit einzig und allein von *sigB* abhängig ist. Dadurch wird *asp23* zu einem idealen Marker, um die Aktivität von *sigB* zu messen (18).

Phänotypisch zeigt eine $\Delta\sigma^B$ -Mutante eine verminderte Pigmentierung, eine beschleunigte Sedimentierung und eine höhere Sensitivität gegenüber Katalase in der stationären Phase (36).

2.4.5 Die Hämolsine

Bekannt sind vier Membran schädigende Hämolsine, die von jedem Stamm exprimiert werden können. Dazu gehören das α -, β -, γ - und das δ -Hämolsin bzw. -Toxin. Sie sind zytotoxisch und begünstigen die Invasion des Erregers ins Gewebe.

Das *hla*-Gen kodiert für das α -Hämolsin und ist eines der am besten untersuchten Virulenzfaktoren von *S. aureus*. Es wird in seiner Expression von den drei Loci *agr*, *sarA* und *sae* reguliert. Eine Mutation im *sae* Gen führt zu einer erheblich verminderten Expression von *hla* *in vivo* und *in vitro* während Mutationen in *agr* und *sarA* dagegen keine Konsequenz auf die *hla*-Expression *in vivo* aufwiesen (20).

Das α -Toxin bildet Poren in der Zellmembran der Zielzellen, vor allem der Erythrozyten, und führt dort zur osmotischen Lyse. Weiterhin stimuliert das α -Toxin die Apoptose von Lymphozyten (30). Viele Studien zeigen, dass α -Toxin die *S. aureus*-Infektion begünstigt und besonders bei durch *S. aureus*-induzierten Pneumonien ein wichtiger Virulenzfaktor ist (53). Denn eine *hla*-Mutante war im Mausmodell weniger virulent als der α -Toxin produzierende Elternstamm (62).

Das β -Hämolsin ist ebenfalls ein zytolytisches Toxin, welches in seiner Funktion wie eine Sphingomyelinase agiert (60). Aarestrup et al. fanden 1999 heraus, dass nur 11% von humanen Nasenabstrichen Gesunder und 13% von septischen Isolaten β -Hämolsin positiv waren; allerdings waren Isolate von Rindern mit Mastitis zu 72% positiv. Bei Versuchen *in vitro* wurde deutlich, dass das β -Hämolsin antagonistisch zum α -Toxin reagiert, indem das β -Hämolsin an der Membran der Erythrozyten bindet und damit die Fähigkeit des α -Toxins an dieser zu binden und zu multimerisieren inhibiert. Die Wirkung von β -Hämolsin auf Blut-Agar wird als „hot-cold-lysis“ bezeichnet, da sich die Hämolyse der Erythrozyten nach Inkubation unter Kälte deutlich klarer darstellt als unter normalen Bedingungen bei 37°C (28).

2.4.6 Das Protein A

Das „*staphylococcal*“ Protein A (*spa*) ist ein wichtiger Virulenzfaktor, der ebenfalls über *agr* reguliert wird. Er soll besonders bei *S. aureus*-induzierten Pneumonien als inflammatorischer Faktor eine Rolle spielen (22). Bei SpA handelt es sich um ein in der Zellwand von *S. aureus* verankertes Oberflächenprotein, das in über 90% der *S. aureus*-

Stämme vorkommt (61). Es gehört zur Gruppe der MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) (56). SpA bindet an die F_C-Region des IgG und verhindert dadurch die Antikörper-vermittelte Opsonierung und beeinträchtigt so die Phagozytose (17). Ebenso bindet es den von-Willebrand-Faktor, ein Serum-Glykoprotein, das die Plättchenaggregation induziert, und an TNFR1, einen Rezeptor des Tumor-Nekrose-Faktors α (22). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass SpA als Virulenzfaktor in Mausmodellen mit septischer Arthritis oder Pneumonien eine wichtige Rolle spielt (49). Außerdem wurden in PVL-positiven CA-MRSA-Isolaten eine verstärkte Produktion von SpA beobachtet (37).

Im Gegensatz zu den Exoproteinen wird *spa* kontinuierlich bis zur stationären Phase im Wachstumszyklus transkribiert. Man geht davon aus, dass *agr* und *sar* die *spa*-Produktion auf Transkriptionsebene regulieren, indem sie dessen Synthese unterdrücken (10). Somit führt eine Inaktivierung von *agr* zu einem Anstieg des *spa*-Transkripts. Sobald es aber zur Induktion des Effektorgens RNA III kommt, wird die Synthese von *spa* eingestellt (58).

2.5 Bestimmung der Genexpression mittels Real-Time-PCR

Das Verfahren der quantitativen Real-Time PCR wurde erstmals 1992 von Higuchi et al. beschrieben. Die Zugabe von Ethidiumbromid in den Reaktionsansatz ermöglichte die simultane Amplifikation der doppelsträngigen DNA-Sequenzen und die Detektion des Produkts durch den Anstieg der Fluoreszenz (24).

Zur Normalisierung der experimentellen Fehler ist es notwendig, die Transkription der untersuchten Gene zur Transkription interner Referenzgene ins Verhältnis zu setzen. Diese Gene werden als Haushalts-Gene bezeichnet, da sie im Metabolismus der Bakterien konstitutiv und nicht-reguliert exprimiert werden und nicht durch äußere Einflüsse, Zelltyp oder Zellstadium beeinflusst werden. So werden zur Normalisierung sowohl ein als auch mehrere Haushalts-Gene verwendet, wobei die Verwendung mehrerer Haushalts-Gene zu exakteren Ergebnissen in der RT-PCR führt, besonders dann, wenn kleinere Änderungen in der Expression festgestellt werden sollen (47).

Die RT-PCR beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR. Der Unterschied zwischen beiden Methoden besteht darin, dass bei der qRT-PCR die Messung des

Amplifikats quantitativ in Echtzeit erfolgt. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende eines jeden PCR-Zyklus. Eine Möglichkeit, die Fluoreszenz zu messen, ist der Gebrauch von interkalierenden Farbstoffen, wie das SYBR Green I, das sich in die doppelsträngige DNA einlagert. Die Menge der gemessenen Fluoreszenz erhöht sich exponentiell mit jedem weiteren PCR-Zyklus und wird als relatives Maß für die amplifizierte Menge des Genfragmentes verwendet. Der Vorteil des SYBR Green I besteht darin, dass es hitzestabil, selektiv für dsDNA und hoch sensitiv ist (64).

Mit der RT-PCR gelingt es, die Transkription der interessierenden Gene zu messen. Dazu muss zur Bestimmung der Genexpression in einem ersten Schritt die RNA der Bakterien extrahiert werden. Als nächstes werden für die Amplifikation der cDNA zwei Oligonukelotid-Primer benötigt, die die cDNA an beiden Enden flankieren. Dann wird die cDNA durch reverse Transkription aus der ursprünglichen RNA synthetisiert. Die eigentliche Reaktion der RT-PCR besteht aus Denaturation, Annealing und Elongation (Abb. 2) und wird durch die Veränderung der Temperatur eingeleitet.

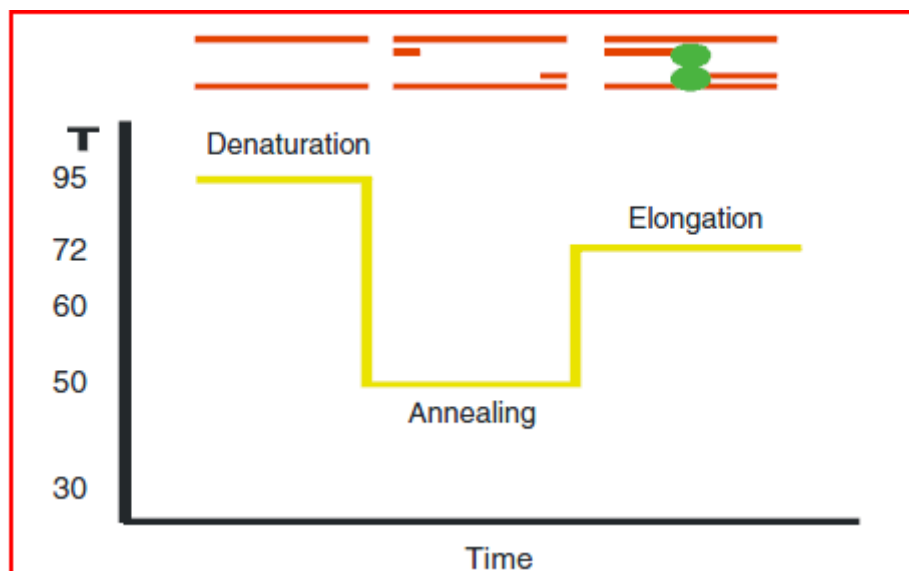


Abb. 2: RT-PCR Zyklus aus (34)

Zu Beginn des Zyklus wird eine hohe Temperatur von üblicherweise 95°C benötigt, um die beiden Stränge der cDNA auf zu trennen. Die Höhe der Schmelztemperatur und die Dauer des Schmelzvorganges sind abhängig von der Länge und der Sequenz des zu

amplifizierenden DNA-Abschnittes. Damit sich die Primer an die DNA anlagern können, wird die Temperatur gesenkt. Die Höhe dieser Temperatur hängt von den Primern ab. Am Ende des Zyklus wird die Temperatur auf 72°C gesetzt. Das ist das Optimum für die Amplifikation des DNA-Abschnittes (34).

Um die PCR-Produkte in Echtzeit messen zu können, lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff während der Amplifikation in die amplifizierte doppelsträngige DNA ein. Zu Beginn der Reaktion ist das Fluoreszenzsignal schwach und reflektiert dementsprechend nur eine kleine Menge an PCR-Produkt. Mit der Akkumulation des Produktes kommt es im Verlauf zu einem exponentiellen Anstieg des Signals. Zum Ende hin pendelt sich dies durch Sättigung auf dem Höhepunkt ein. Im Verlauf überschreitet das Signal eine Schwelle, deren Schnittpunkt als Ct-Wert bezeichnet wird. Der Ct-Wert gibt an, wie viele Zyklen benötigt werden, um diese Schwelle zu überschreiten.

2.6 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit baut auf eine über zwei Jahre laufende multizentrische Studie auf, in der aus 17 Mukoviszidose-Zentren Untersuchungsmaterial von 195 Patienten mikrobiologisch untersucht wird und die *S. aureus*-Isolate besonders charakterisiert werden, um durch Untersuchung verschiedener patienten- und pathogen-spezifischer Parameter eine Unterscheidung zwischen *S. aureus*-Kolonisation und -Infektion treffen zu können. Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um Nasen-, Rachenabstriche und Sputum. Vierteljährlich werden die Materialien von den Mukoviszidose-Patienten eingesandt und aus ihnen die *S. aureus*-Stämme isoliert.

In dieser Arbeit wurden *S. aureus*-Isolate, die auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar ein bestimmtes Wachstumsmuster zeigten, hinsichtlich ihrer Genexpression mittels Real-Time PCR untersucht. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob sich ein Zusammenhang zwischen dem Wachstum der *S. aureus*-Isolate in Bezug auf Hämolyseverhalten und Pigmentierung auf Columbia-Blut-Agar, bebrütet bei 37°C, und Schädler-Agar, bebrütet bei 37°C unter 5% CO₂, und dem Transkriptionsprofil dieser Isolate ein Bezug auf die Aktivität der Regulatoren *agr*, *sigB* und *sae* und der abhängigen Virulenzgene *hla* und *spa* herstellen lässt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Bakterielle Stämme

Die klinischen *S. aureus*-Isolate, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, stammen aus einer multizentrischen prospektiven Observationsstudie von Mukoviszidose-Patienten. Die Studie ist auf www.clinicaltrials.gov unter der Kennzeichnung NCT00669760 abrufbar.

Es wurden 23 *S. aureus*-Stämme hinsichtlich ihres phänotypischen Erscheinungsbildes auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar und ihrer Genexpression hin untersucht. Bei den 23 Stämmen handelt es sich dabei um drei Wildtyp-Laborstämme (Tabelle 1), vier isogene Deletions-Mutanten (Tabelle 2) und 16 klinische Isolate (Tabelle 3).

Tabelle 1: Laborstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
SH 1000	8325-4 <i>rsbU</i> ⁺	(26)
RN 6390	genetischer Hintergrund dem von 8325-4 sehr ähnlich; natürliche 11bp Deletion im <i>rsbU</i> Gen	(42,50)
8325-4	Wildtyp, Standard Laborstamm	(43,26)

Tabelle 2: Mutanten

Stamm	Beschreibung	Referenz
RN 6911 (RN 6390 Δagr)	von RN 6390 abstammend, in dem der <i>agr</i> Lokus durch das <i>tetM</i> -Gen ersetzt wurde	(44)
ALC 136 (RN 6390 Δsar)	isogenetische Mutante von RN6390 mit einer <i>sarA::ermC</i> Mutation	(10)
ALC 135 (RN 6390 Δagr/sar)	RN6390 mit <i>agr::tetM</i> und <i>sar::Tn917LTV1</i> Insertion	(9)
ALC 1001 (RN 6390 ΔsigB)	<i>sigB</i> -Mutante von RN6390 abstammend	(11)

Tabelle 3: klinische Isolate

Stamm	Referenz
S 179 I	aktuelle Studie
S 198 II	„
S 348 I	„
S 385 IV	„
S 376 I	„
S 501 II	„
S 516 I	„
S 568 I	„
S 592 II	„
S 605 I	„
S 66 I	„
S 1344	„
S 1365 I	„
S 1365 II	„
S 1368 II	„
S 1368 III	„

3.1.2 Chemikalien

- BBL™ Columbia-Blut-Agar

BD, USA

Pro Liter: pankreatisch abgebautes Casein 10g
 peptisch abgebautes Fleisch 5g
 Hefeextrakt 5g
 pankreatisch abgebautes Herzmuskelgewebe 3g
 Maisstärke 1g
 Natriumchlorid 5g
 Agar 13,5g
 5% steriles, defibriniertes Blut

- Schaedler-Agar

BD, USA

Pro Liter: pankreatisch abgebautes Casein 8,2g
 peptisch abgebautes Tiergewebe 2,5g
 papainisch abgebautes Sojamehl 1g
 Glucose 5,8g
 Hefeextrakt 5g
 Natriumchlorid 1,7g

- Dikaliumphosphat 0,8g
L-Cystin 0,4g
Hämin 0,01g
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 3g
Agar 13,5g
- Bacto™ Tryptische-Soja-Bouillon BD, USA
- Pro Liter: pankreatisch abgebautes Casein 17g
 papainisch abgebautes Soja 3g
 Dextrose 2,5g
 Natriumchlorid 5g
 Dikaliumphosphat 2,5g
- Brain-Heart-Infusion (Hirn-Herz-Bouillon) Merck, Darmstadt
- Pro Liter: Nährsubstrat (Hirn-, Herzextrakt u. Peptone) 27,5g
 D(+)-Glucose 2,0g
 Natriumchlorid 5,0g
 di-Natriumhydrogenphosphat 2,5g
- LiChrosolv® Wasser für die Chromatographie Merck, Darmstadt
- RNA Protect ® Qiagen, Hilden
- FastRNA® Pro Blue Kit MP Biomedicals, Eschwege
- RNApro™ Solution
 DEPC-H₂O
 Lysing B Matrix
- Quantitect® Reverse Transcription Kit Qiagen, Hilden
- gDNA Wipeout Buffer, 7x
 Quantiscript® Reverse Transcriptase
 Quantiscript RT Buffer, 5x
 RT Primer Mix
 RNase-Free Water
- iCycler iQ™ PCR Plates, 96 well Bio-Rad, USA
- iQ™ SYBR green Supermix Bio-Rad, USA
- qPCR EvaGreen® Mastermix (5x concentrated) Segenetic, Borken
- + Fluorescein 100x concentrated Segenetic, Borken

3.1.3 Geräte

- Fast Prep FP120 Cell Disrupter	Qbiogene, Frankreich
- Megafuge 1.OR	Heraeus Instruments, Osterode
- Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
- Photometer Ultrospec 1100pro	AmershamBiosciences, USA
- Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
- Biophotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
- iQ TM 5 Multicolor Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, USA
- iCycler	Bio-Rad, USA

3.1.4 Software

Bio-Rad iQ TM 5 Optical System Software, Version 2.1	Bio-Rad, USA
---	--------------

3.2 Methoden

3.2.1 Bakterienanzucht auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar

Der Columbia-Blut- und Schaedler-Agar wurden im 3-Ösen-Ausstrich mit *S. aureus* beimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37°C bebrütet, wobei der Columbia-Blut-Agar unter aeroben Bedingungen und der Schaedler-Agar unter 5%igem CO₂ bebrütet wurde.

Am darauffolgenden Tag wurde die Beschreibung des Phänotyps der *S. aureus*-Kolonien auf Blut- und Schaedler-Agar mit Hilfe eines standardisierten Beurteilungsbogens (Anhang) durchgeführt, der für die CF-Studie entwickelt wurde. Beurteilt wurden Hämolysegrad, β -Toxin, Pigmentierung und Größe der Kolonien, Wachstum und Konsistenz. Der Hämolysegrad wurde eingeteilt in die Stufen 0 bis 4, wobei „Null“ keine Hämolyse und „vier“ maximale Hämolyse bedeutete. Bei der Pigmentierung wurde zwischen weiß, grau und gelb unterschieden. Die Größe der Kolonien wurde von winzig über klein bis hin zu groß beschrieben. Beim Wachstum gab es die Unterteilung in normal, klein und winzig. Die Konsistenz der Kolonien war trocken, feucht oder schleimig.

Zur phänotypischen Charakterisierung wird normalerweise Blut-Agar verwendet. Das zusätzliche Bebrüten der Stämme auf Schaedler-Agar wurde genutzt, da auf Schaedler-Agar die Eigenschaften wie Hämolyseverhalten, Pigmentierung und Größe der Kolonien häufig noch besser zur Ausprägung kommen.

3.2.2 Bakterienanzucht in Flüssigkulturen zur Ermittlung des Wachstumsverlaufes

Für die Übernachtskultur (ÜNK) wurde in ein Reagenzröhrchen mit 5 ml BHI eine Bakterienkolonie von einer Blutagarplatte eingimpft. Die ÜNK wurde anschließend im Schüttelwasserbad bei 37°C mit 160 rpm (revolutions per minute) für ca. 16 Std über Nacht bebrütet. Anschließend wurde die Hauptkultur in einem 500 ml Schikanekolben mit 50 ml BHI aus der ÜNK mit einer Start-OD_{578nm} von 0,1 beimpft.

Im Schüttelinkubator fand die Anzucht bei 37°C und 160 rpm statt. Es wurde stündlich die optische Dichte OD_{578nm} mit dem Photometer bis zum Erreichen der stationären Phase gemessen, wobei der Messbereich der OD_{578nm} zwischen 0,05-0,3 liegen sollte. Bei einer OD_{578nm} > 0,3 wurde die Probe mit BHI 1:10 bzw. 1:100 verdünnt und erneut gemessen. Somit wurde der Verlauf der Wachstumskurve mit früher exponentieller, später exponentieller und stationärer Phase ermittelt (Abb. 3).

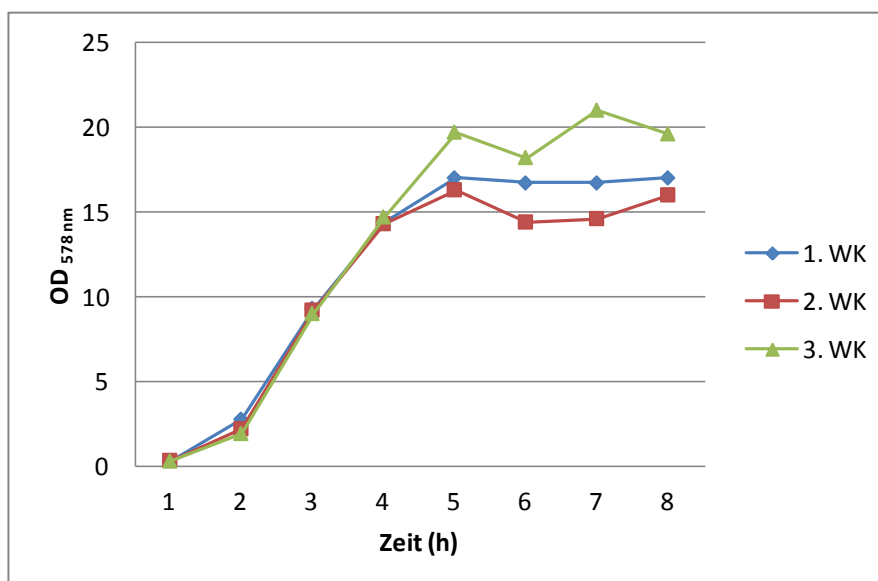


Abb. 3: Bestimmung des Wachstumskurvenverlaufes (WK) zu drei unterschiedlichen Zeiten des klinischen Isolates S 605 I

3.2.3 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung der *S. aureus*-Stämme erfolgte nach Anzucht dieser auf Blut- bzw. Schaedler-Agar und in dem Flüssigmedium Brain-Heart-Infusion (BHI) mit Hilfe des FastRNA® Pro Blue Kit von qBiogene.

3.2.3.1 RNA-Isolierung von Columbia-Blut- und Schaedler-Agar

Es wurde 500 µl RNA Protect in einem 2 ml biopur Eppendorf Zentrifugenröhrchen vorgelegt, anschließend der gesamte erste Ausstrich von der Agarplatte zugegeben und beides gründlich homogenisiert. Dann wurde die Probe für fünf Minuten bei 5000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach diesem Arbeitsschritt konnte das Pellet auch bei -20°C für einige Zeit eingefroren werden.

Die nächsten Arbeitsschritte durften nur mit speziellen Pipetten, gestopften Pipettenspitzen, Handschuhen und unter dem Abzug durchgeführt werden, um jegliche Verunreinigung durch Kontamination oder Partikel aus der Luft zu vermeiden.

Im nächsten Schritt wurde das Pellet in 1 ml RNAPro™ Solution durch gründliches Durchmischen im Vortex resuspendiert und in die Lysing B Matrix überführt. Diese wurde in das Homogenisationssystem FastPrep® gesetzt und für 40 s bei einer Aufschlussintensität von 6 gerüttelt, um die bakteriellen Zellen zu lysieren. Anschließend wurde die Probe bei 12000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 300 µl Chloroform hinzugefügt und 10 s im Vortex durchmischt. Nach weiteren 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde wieder bei 12000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die oberste RNA-enhaltende Phase wurde, ohne die Interphase zu zerstören, abpipettiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Hinzufügen von 500 µl absolutem Ethanol und fünfmaligem Invertieren folgte eine mindestens 30 minütige Lagerung bei -20°C. Anschließend wurde die Probe erneut bei 12000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das weiße Pellet am Rand des Zentrifugenröhrchens, welches die aufgereinigte RNA enthält, wurde mit 500 µl kaltem 75%igen Ethanol, hergestellt mit DEPC-H₂O, gewaschen und der Ethanol verworfen. Nach fünfminütigen Trocknen

bei Raumtemperatur wurde das Pellet in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Eine Lagerung der Probe war bei -80°C für längere Zeit möglich.

3.2.3.2 RNA-Isolierung aus der BHI-Flüssigkultur

Für die Isolierung der RNA aus der Flüssigkultur wurde der gleiche Ansatz des BHI-Mediums verwendet wie zur Ermittlung des Wachstumsverlaufes.

An den zuvor ermittelten Zeitpunkten für die frühe exponentielle, späte exponentielle und stationäre Phase wurden Proben entnommen. Zum Zeitpunkt der frühen exponentiellen Phase wurden 2 ml, zu den beiden anderen Zeitpunkten je 500 µl Kultur abpipettiert. Die Proben wurden im Zentrifugenröhrchen zu gleichen Teilen mit RNA Protect versetzt und anschließend im Vortex gründlich durchmischt. Sie wurden zum Inkubieren 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei 4000 rpm für 10 min bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -20°C zur Lagerung eingefroren oder es wurde die RNA-Isolierung (s.o.) direkt angeschlossen.

3.2.4 Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA im Verhältnis 1:100 mit HPLC-H₂O und für die Bestimmung der Reinheit ebenfalls im Verhältnis 1:100 mit 10 mM Tris HCL versetzt. Gemessen wurde nach Eichen der Leerprobe mit dem Eppendorf Photometer. Der Quotient aus A_{260nm}/A_{280nm} gab einen Hinweis auf die Reinheit der RNA. Er lag idealerweise zwischen einer OD von 1,8 und 2,0, da ein Wert unter 1,8 für eine Verunreinigung der Probe sprach und ein Wert von 2 eine optimale Aufreinigung widerspiegelte.

3.2.5 cDNA-Transkription

Zur Transkription der RNA in cDNA wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit von der Firma Qiagen verwendet.

Sämtliche Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das RNA-Template wurde auf Eis aufgetaut, ebenso die Reagenzien gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse

Transcriptase, Quantiscript RT Buffer und der RT Primer Mix. Das RNase-freie Wasser wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Folgender Reaktionsansatz wurde zur Elimination der genomischen DNA verwendet:

2 µl gDNA Wipeout Buffer 7x sowie eine nach Konzentrationsbestimmung berechnete Menge RNA wurden in ein 1,5 ml biopur Zentrifugenröhrchen gegeben und zuletzt wurde RNase freies Wasser auf einen Gesamtansatz von 24 µl ergänzt. Die Probe wurde 2 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde der Reverse-Transkriptions-Mastermix zur Probe hinzugefügt, bestehend aus 2 µl Quantiscript Reverse Transkriptase, 8 µl Quantiscript RT Buffer 5x und 2 µl RT Primer Mix. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 15 min bei 42°C und direkt anschließend für 3 min bei 95°C, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.6 Real Time-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um das Transkriptionsprofil mehrerer wichtiger regulatorischer Gene von *S. aureus* zu quantifizieren und mit dem phänotypischen Erscheinungsbild auf Columbia-Blut- und Schädler-Agar in Verbindung zu bringen. Dazu wurden aus Agar- und Flüssigkulturen RNA-Isolierungen vorgenommen, die anschließend in komplementäre DNA umgeschrieben wurden. Mit der cDNA wurde dann die RT-PCR durchgeführt.

Die Real-Time-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) leitet sich von der ursprünglichen PCR ab, bei der DNA-Abschnitte mit Hilfe von Primern amplifiziert werden. Der Unterschied in der RT-PCR liegt darin, dass bei der Amplifikation der DNA-Abschnitte ein Fluoreszenzfarbstoff in die DNA interkaliert, der proportional zur PCR Produktmenge ist(34). Damit lässt sich in Echtzeit das PCR-Produkt ermitteln. Die Zyklen, die benötigt werden, um das Produkt zu erhalten, gestatten einen Rückschluss auf die in der Probe vorhandene Menge der DNA.

Zur Normalisierung der RNA-Expression der Regulator-Gene dienen sogenannte Haushalts-Gene oder auch Referenz-Gene genannt. Bei ihnen handelt es sich um Gene, die konstitutiv und nicht reguliert exprimiert werden, deren Transkription somit

unabhängig vom Zellstadium, Zelltyp und äußeren Einflüssen ist. Als Referenzgen wurde *gyrB* eingesetzt (21).

Tabelle 4: Sequenzen der Referenzgene

Oligonukleotid	Forward	Reverse
<i>aro E</i>	5'- CTA TCC ACT TGC CAT CTT TTA T - 3'	5'- ATG GCT TTA ATA TCA CAA TCC C - 3'
<i>gmk</i>	5'- AAG GTG CAA AGC AAG TTA GAA - 3'	5'- CTT TAC GCG CTT CGT TAA TAC - 3'
<i>gyr B</i>	5' - TGG TTC AAT GGA TGG AGA TGG - 3'	5' - CAT ACG AGC CTT ATT CAC TTG G - 3'

Tabelle 5: Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Gene

Oligonukleotid	Forward	Reverse	Referenz
<i>hla</i>	5' - TTT CAC CAG ACT TCG CTA CAG - 3'	5' - CCA ATT TGT TGA AGT CCA ATG - 3'	(5)
<i>sae</i>	5' - CAA TTT ACG CCT TAA CTT TA - 3'	5' - TAG TCA TAT CCC CAA ACT T - 3'	diese Arbeit
<i>rna III</i>	5' - TGA ATT TGT TCA CTG TGT CG - 3'	5' - AGG AAG GAG TGA TTT CAA TG - 3'	(5)
<i>asp23</i>	5' - CAA GAA CAA AAT CAA GAG CCT CAA T - 3'	5' - CTT CAC GTG CAG TAC CA - 3'	(6)
<i>spa</i>	5' - GCA ACG TAA CGG CTT CAT TC - 3'	5' - CTT TCG GTG CTT GAG ATT CG - 3'	diese Arbeit

Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

11 µl HPLC-H₂O

12,5 µl SYBR Green Supermix

1 µl Primer Mix (enthielt forward und reverse)

0,5 µl cDNA

entsprachen insgesamt 25 µl Gesamtreaktionsansatz

Es wurde ein Mastermix mit H₂O, SYBR Green und Primer-Mix vorgelegt und anschließend die cDNA hinzugefügt.

Folgendes Temperaturprofil wurde für die Amplifikation der cDNA verwendet:

Initiale Denaturierung:	1 min bei 95°C
Annealing: 35x	0:10 min bei 95°C
	0:30 min bei 56°C
	0:30 min bei 72°C
Elongation: 81x	Anstieg der Temperatur von initial 55°C in 0,5°C Schritten alle 0:10 min bis auf 95°C

Die relative Expression der Transkripte wurde als Anstieg (n-Fold) in Bezug zu den Werten der Haushalts-Gene ausgedrückt(6).

4 Ergebnisse

4.1 Wachstumsverhalten auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar

Zunächst wurden die *S. aureus*-Kolonien phänotypisch charakterisiert. Bestimmt wurden die Pigmentierung, die Größe, das Hämolyseverhalten, der Nachweis von β -Toxin sowie die Konsistenz der Kolonien. Bei der Pigmentierung wurden weiße, gelbe und graue Kolonien unterschieden. Die Einteilung der Hämolyse reichte von 0 (keine Hämolyse) bis 4 (maximale Hämolyse). Die Konsistenz wurde definiert von trocken über feucht bis hin zu schleimig. Bei der Größe galt es winzige, kleine oder große Kolonien zu beschreiben.

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wurden die Isolate auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar überimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet, wobei der Schaedler-Agar unter 5%igem CO₂ inkubiert wurde. Ausschlaggebend für die Bebrütung auf Schaedler-Agar war, dass einige Merkmale der Kolonien, wie die Pigmentierung oder auch die Hämolyse durch α -Toxin und β -Toxin, deutlich stärker ausgeprägt waren als auf Blut-Agar. Einen Einfluss auf das veränderte Wachstum der Kolonien auf Schaedler-Agar wird auch die Bebrütung unter 5%igem CO₂ gehabt haben; im Gegensatz zur Bebrütung des Blut-Agars unter Raumluft.

Typischerweise wird *S. aureus* zur Analyse der Transkriptionsprofile in Flüssigkulturen angezchtet. Über die Untersuchung von *S. aureus* von Kulturplatten ist bisher wenig bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen das Transkriptionsprofil sämtlicher Stämme zusätzlich mit dem Flüssigmedium BHI ermittelt und zum anderen zur Korrelation wichtige Laborstämme (SH 1000; RN 6390; 8325-4) sowie deren Regulator-Mutanten (*agr*-; *sar*-; *agr*-/*sar*-; *sigB*-) untersucht.

4.1.1 Häufigkeitsverteilung der Merkmale der klinischen Isolate

Die isolierten *S. aureus* Stämme aus dem Respirationstrakt der CF-Patienten zeigten auf Blut-Agar in Hinblick auf die Farbe der Kolonien eine andere Häufigkeitsverteilung als auf Schaedler-Agar. Zum Zeitpunkt der Berechnung der Häufigkeit befanden sich 740 klinische Isolate in der Studie.

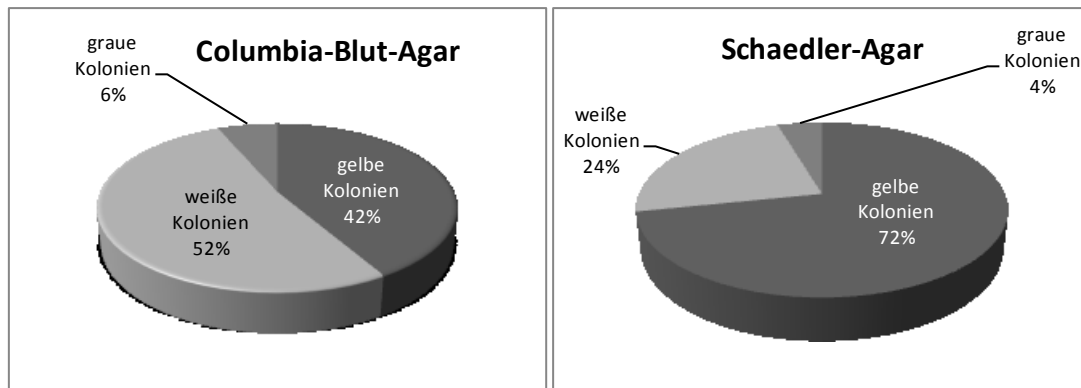


Abb. 4 Häufigkeitsverteilung der Pigmentierung der Kolonien auf Blut- und Schaedleragar

Auf Blut-Agar traten weiße Kolonien mit 52% etwas häufiger auf als gelbe Kolonien (46%). Auf Schaedler-Agar war das Verhältnis zugunsten der gelben Kolonien deutlich verschoben. Diese traten in 72% der Fälle auf, im Gegensatz zu den weißen Kolonien mit einem Anteil von nur 24%. Graue Kolonien traten auf beiden Nährböden nur zu einem sehr geringen Prozentsatz auf.

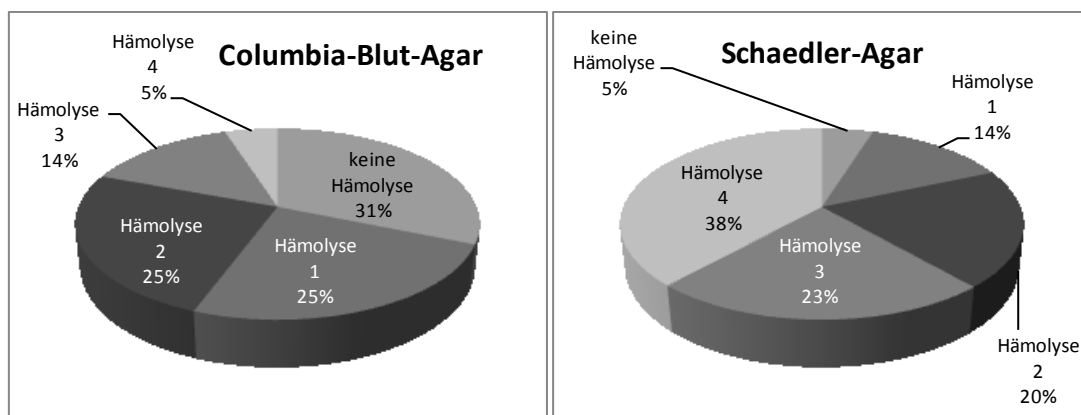


Abb. 5 Häufigkeitsverteilung der Hämolysestufe der Kolonien auf Blut- und Schaedler-Agar

Die Verteilung der Hämolyse zeigte auf Blut- und Schaedler-Agar große Unterschiede (Abb. 5). Auf Blut-Agar hatten die Kolonien ohne Hämolyse den größten Anteil mit 31%. Dagegen waren diese auf Schaedler-Agar nur mit 5% vertreten. Den größten Anteil hatten auf Schaedler-Agar diejenigen mit der Hämolysestufe 4 mit 38%. Den zweitgrößten Anteil mit 23% hatten hier die Kolonien mit Hämolysestufe 3. Auf Blutagar trat Hämolysestufe 1 und 2 mit jeweils 25% auf.

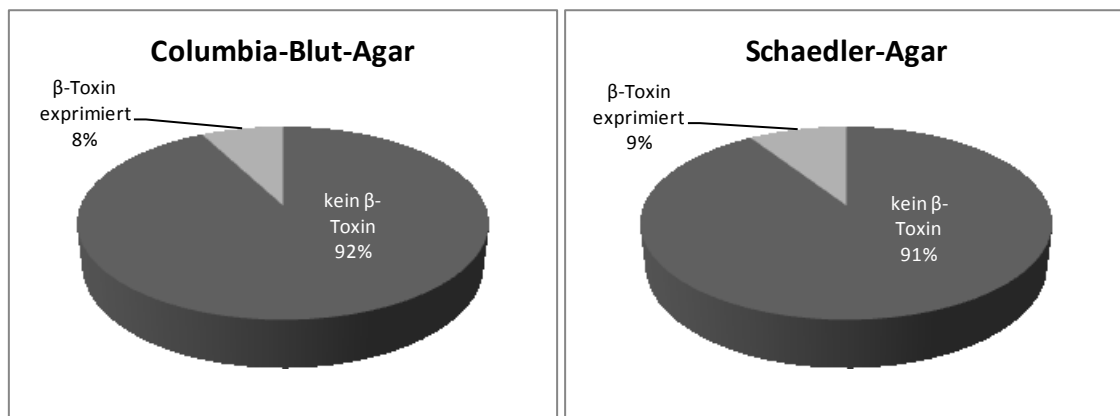


Abb. 6 Häufigkeitsverteilung der β -Toxin-Expression der klinischen Isolate

Auf beiden Medien, Blut- und Schaedler-Agar, lag der Anteil der Kolonien, die kein β -Toxin produzierten bei knapp über 90%.

4.1.2 Das phänotypische Erscheinungsbild der Kolonien auf Columbia-Blut- und Schaedler-Agar

Tabelle 6: Die Phänotypen der Laborstämme

Columbia-Blut-Agar	Stamm	SH 1000	RN 6390	8325-4
	Hämolyse	3	3	4
	β -Toxin	nein	ja	nein
	Pigmentierung	gelb	weiß	weiß
	Größe	groß	groß	groß
	Wachstum	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht
Schaedler-Agar	Hämolyse	4	4	4
	β -Toxin	ja	ja	nein
	Pigmentierung	gelb	weiß	weiß
	Größe	groß	groß	groß
	Wachstum	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht

Tabelle 7: Die Phänotypen der Mutanten

Columbia-Blut-Agar	Stamm	<i>agr-</i>	<i>sar-</i>	<i>agr-/sar-</i>	<i>sigB-</i>
	Hämolyse	0	2	0	2
	β -Toxin	nein	nein	nein	ja
	Pigmentierung	weiß	weiß	weiß	weiß
	Größe	klein	klein	klein	klein
	Wachstum	normal	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht	feucht
Schaedler-Agar	Hämolyse	0	4	0	4
	β -Toxin	nein	nein	nein	ja
	Pigmentierung	weiß	weiß	weiß	weiß
	Größe	klein	groß	klein	klein
	Wachstum	normal	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht	feucht

Die klinischen Stämme sind aus Nasen- und Rachenabstrichen sowie Sputumproben der CF-Patienten isoliert worden. Die klinischen Isolate wurden in drei Gruppen unterteilt.

Die **Gruppe I** enthielt Stämme, die auf Blut-Agar keine Hämolyse vorwiesen. Die **Gruppe II** bestand aus Isolaten die auf Blut-Agar eine geringe bis mittlere Hämolyse aufwiesen und auf Schaedler-Agar ebenfalls stark hämolysierten. In der **Gruppe III** wurden Isolate zusammengefasst, die sowohl auf Blut-Agar als auch auf Schaedler-Agar eine starke Hämolysezone ausbildeten.

Tabelle 8: Die Phänotypen der Gruppe I

Columbia-Blut-Agar	Stamm	S 198 II	S 348 I	S 385 IV	S 1368 II	S 1368 III
	Hämolyse	0	0	0	0	0
	β -Toxin	nein	nein	nein	nein	nein
	Pigmentierung	gelb	gelb	weiß	gelb	gelb
	Größe	groß	groß	groß	groß	groß
	Wachstum	normal	normal	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht	feucht	feucht
Schaedler-Agar	Hämolyse	0	1	2	3	3
	β -Toxin	nein	nein	nein	nein	nein
	Pigmentierung	gelb	gelb	gelb	gelb	weiß
	Größe	groß	groß	groß	groß	groß
	Wachstum	normal	normal	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht	feucht	feucht

Tabelle 9: Die Phänotypen der Gruppe II

Columbia-Blut-Agar	Stamm	S 66 I	S 179 I	S 516 I	S 592 II	S 376 I	S 501 II
	Hämolyse	1	1	2	2	3	3
	β -Toxin	nein	nein	nein	nein	nein	nein
	Pigmentierung	gelb	weiß	gelb	weiß	gelb	weiß
	Größe	groß	groß	groß	groß	groß	groß
	Wachstum	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht	feucht	feucht	feucht

Schaedler-Agar	Hämolyse	2	4	3	4	4	4
	β-Toxin	ja	nein	nein	nein	nein	ja
	Pigmentierung	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
	Größe	groß	groß	groß	groß	groß	groß
	Wachstum	normal	normal	normal	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht	feucht	feucht	feucht

Tabelle 10: Die Phänotypen der Gruppe III

Columbia-Blut-Agar	Stamm	S 1365 I	S 1365 II	S 605 I	S 1344	S 568 I
	Hämolyse	4	4	4	4	4
	β-Toxin	nein	nein	nein	nein	nein
	Pigmentierung	weiß	weiß	weiß	weiß	gelb
	Größe	groß	groß	groß	groß	groß
	Wachstum	normal	normal	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht	feucht	feucht

Schaedler-Agar	Hämolyse	4	4	4	4	4
	β-Toxin	nein	nein	ja	nein	nein
	Pigmentierung	weiß	gelb	gelb	weiß	gelb
	Größe	groß	groß	groß	groß	groß
	Wachstum	normal	normal	normal	normal	normal
	Konsistenz	feucht	feucht	feucht	feucht	feucht

4.2 Der Wachstumsverlauf in den Flüssigkultur

Alle Stämme wurden dreimal im Flüssigmedium BHI (Brain Heart Infusion) unter kontinuierlichem Schütteln bei 160 rpm angezchtet, um den Wachstumsverlauf zu ermitteln (Abb. 8). Für die Analyse der Genexpression wurden drei Zeitpunkte bestimmt: die frühe exponentielle, die späte exponentielle und die stationäre Phase.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde das Nährmedium TSB verwendet. Dies führte bei den Bakterien zu einem sehr verzögerten Anstieg beim Wachstum in der exponentiellen Phase, so dass das Erreichen der stationären Phase schwer zu ermitteln war. Zum

Vergleich wurden die gleichen Stämme im Flüssigmedium BHI angezchtet und zeigten dort einen fast idealen exponentiell logarithmischen Wachstumsverlauf, in dem die stationäre Phase meist nach acht bis neun Stunden erreicht war (Abb. 7).

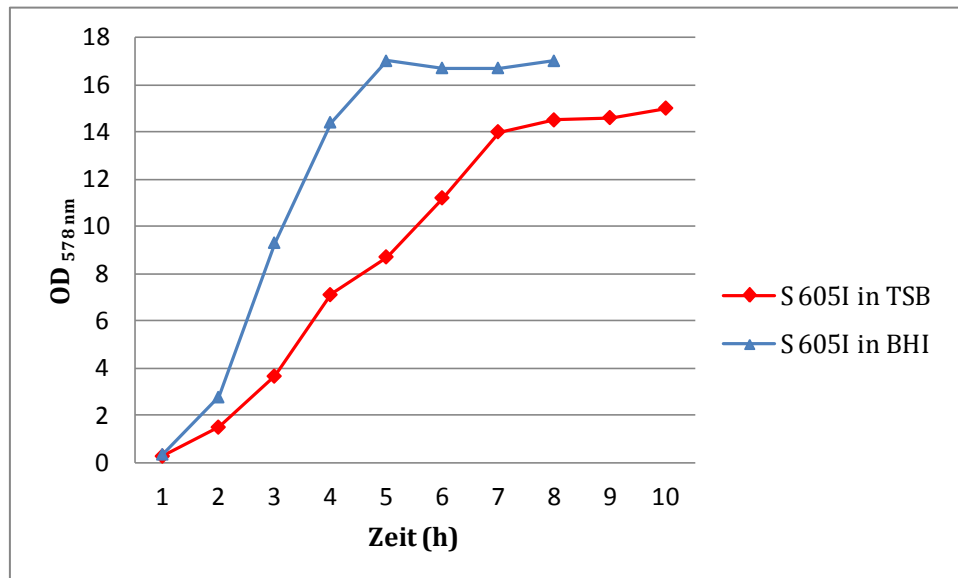


Abb. 7: Vergleich des Wachstumsverlaufs des klinischen Isolates S 605 I in BHI- und TSB-Flüssigmedium

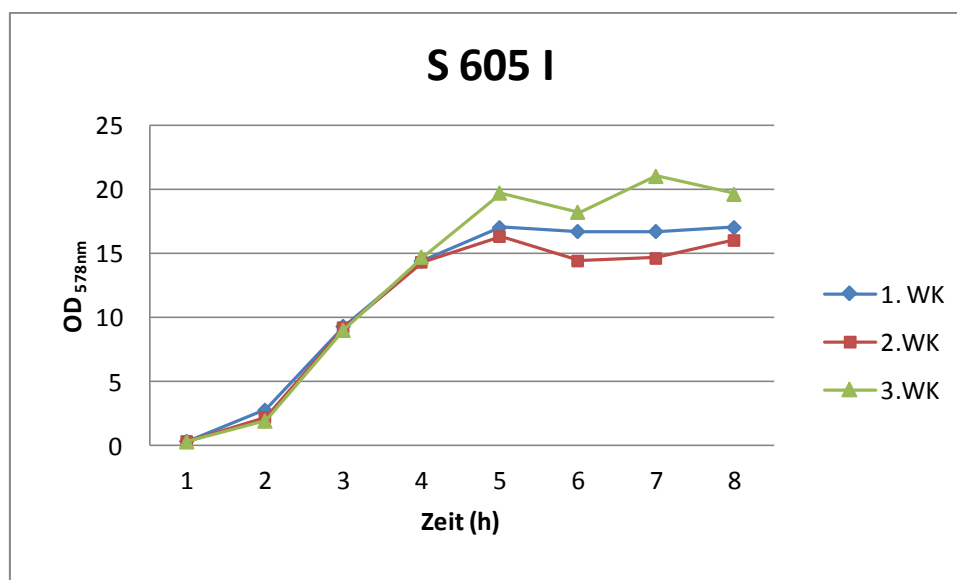


Abb. 8: Ermittlung des Wachstumsverlaufs zu drei verschiedenen Zeitpunkten (WK)

4.3 Die Ergebnisse der Real Time-PCR

Die RNA von den Kolonien der Blut- und Schaedler-Agarplatten und aus den Flüssigkulturen mit folgender cDNA-Transkription wurde in drei unabhängigen Läufen extrahiert. Die RT-PCR wurde mit jeder Probe doppelt durchgeführt. Zur Analyse der Ergebnisse konnten daher von jeder Probe sechs Werte herangezogen werden, um den Mittelwert und die Standardabweichung bestimmen zu können.

Es wurden die Transkription der Regulatoren *agr*, *sae* und *sigB* untersucht, sowie die der Virulenzgene *hla* und *spa*. Für die Bestimmung der *agr*-Transkription wurde RNA III und für die von *sigB* das *sigB*-abhängige Transkript *asp23* untersucht. Als Referenzgene wurden *aroE*, *gmk* und *gyrB* verwendet.

4.3.1 Das Transkriptionsprofil der Laborstämme und Mutanten

Um das Transkriptionsprofil der klinischen *S. aureus*-Isolate besser beurteilen und in Bezug zur Regulation bekannter Laborstämme setzen zu können, wurden die drei Laborstämme 8325-4, RN 6390 und SH 1000 sowie definierte Regulator-Mutanten mitgeführt und hinsichtlich ihres Transkriptionsprofils beim Wachstum sowohl auf Blut- und Schaedler-Agar als auch in der Flüssigkultur mit BHI untersucht.

4.3.1.1 Die Genexpression von 8325-4

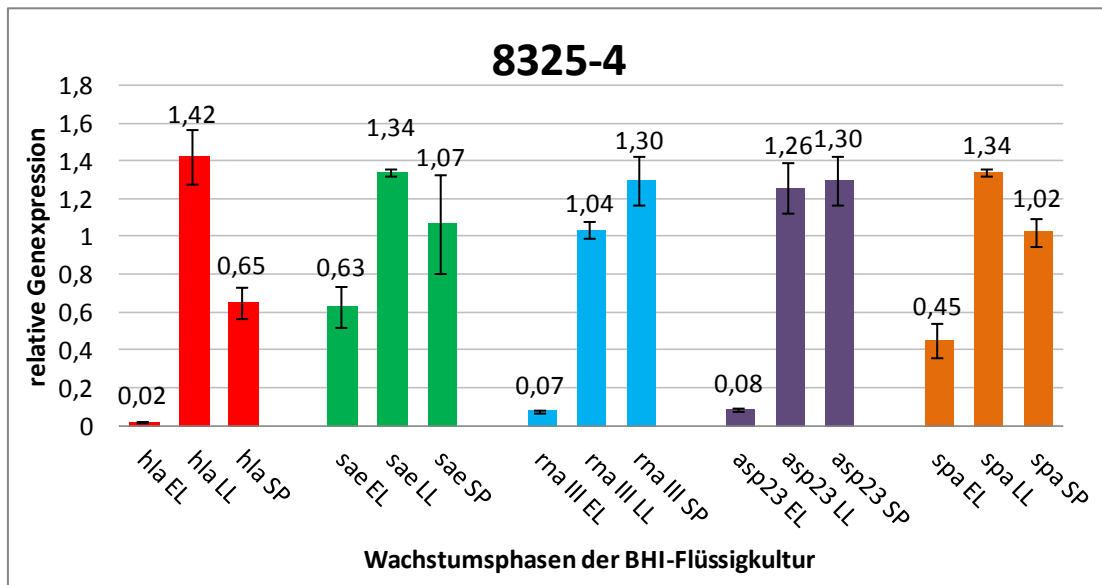


Abb. 9: Genexpression des Laborstamms 8325-4 in der Flüssigkultur

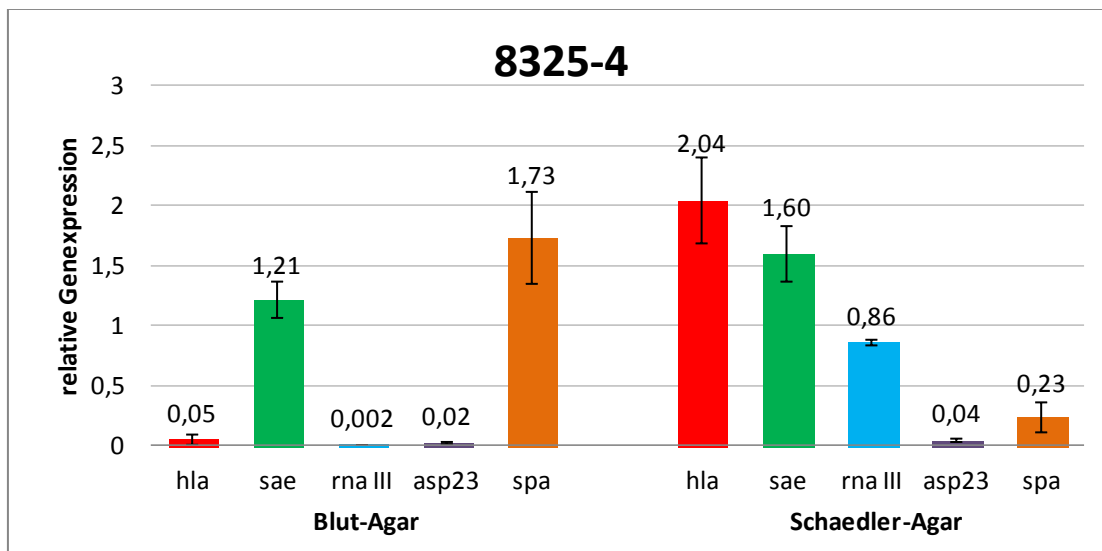


Abb. 10: Genexpression des Laborstamms 8325-4 auf den Agarkulturen

8325-4, ein Standardlaborstamm, der eine *sigB*-Mutation aufweist, exprimierte in der Flüssigkultur BHI die untersuchten Regulatoren und Virulenzgene wachstumsphasenabhängig unterschiedlich stark (Abb. 9). Vor allem in der späten exponentiellen und der stationären Phase steigerte sich die Expression stark im Verhältnis zur frühen

exponentiellen Phase. Der Regulator *sae* wurde zu allen drei Zeitpunkten erfolgreich exprimiert, wobei die stärkste Transkription wie erwartet in der späten exponentiellen Phase zu verzeichnen war. Das von *sigB* kontrollierte *asp23* wurde trotz der *sigB*-Defizienz insbesondere in der exponentiellen und stationären Phase erfolgreich transkribiert. RNA III steigerte seine Expression von der frühen exponentiellen bis zur stationären Phase stetig. Das Virulenzgen *hla* machte wie erwartet von der frühen zur späten exponentiellen Phase einen großen Sprung hinsichtlich der relativen Menge der Genexpression. In dieser Phase wurde das Maximum der Transkription erreicht. Unerwartet und anders als in der beschriebenen Literatur war der Abfall des *hla*-Transkripts in der stationären Phase. Das könnte möglicherweise auf das von uns benutzte BHI-Medium zurück zu führen sein. Ähnlich sah es bei *spa* aus, wo auch die maximale Expression des Gens in der späten exponentiellen Phase stattfand.

Auf Blut- und Schaedler-Agar entwickelte **8325-4** ein Hämolyseverhalten der Stufe 4, bildete weiß pigmentierte große Kolonien, zeigte ein normales Wachstum und eine feuchte Konsistenz (Abb. 10). Es wurde kein β -Toxin produziert. Im Vergleich zur Flüssigkultur war die relative Menge der Genexpression beim Regulator *sae* sowohl auf Blut- als auch auf Schaedler-Agar annähernd gleich hoch. Interessant war die fast nicht vorhandene Transkription von RNA III auf Blut-Agar, wobei es auf Schaedler-Agar auch wie oben erwähnt in der Flüssigkultur erfolgreich exprimiert wurde. Die Transkription von *asp23* fiel im Gegensatz zur Flüssigkultur auf Blut- und Schaedler-Agar deutlich geringer aus. Das Virulenzgen *hla* zeigte eine stark erhöhte Expression des Gens auf Schaedler-Agar im Vergleich zur Transkription auf Blut-Agar. Wie auch in der Flüssigkultur wurde *spa* auf beiden Agarplatten erfolgreich exprimiert. Allerdings war die Transkription auf Blut-Agar höher als auf Schaedler-Agar.

4.3.1.2 Die Genexpression von RN 6390

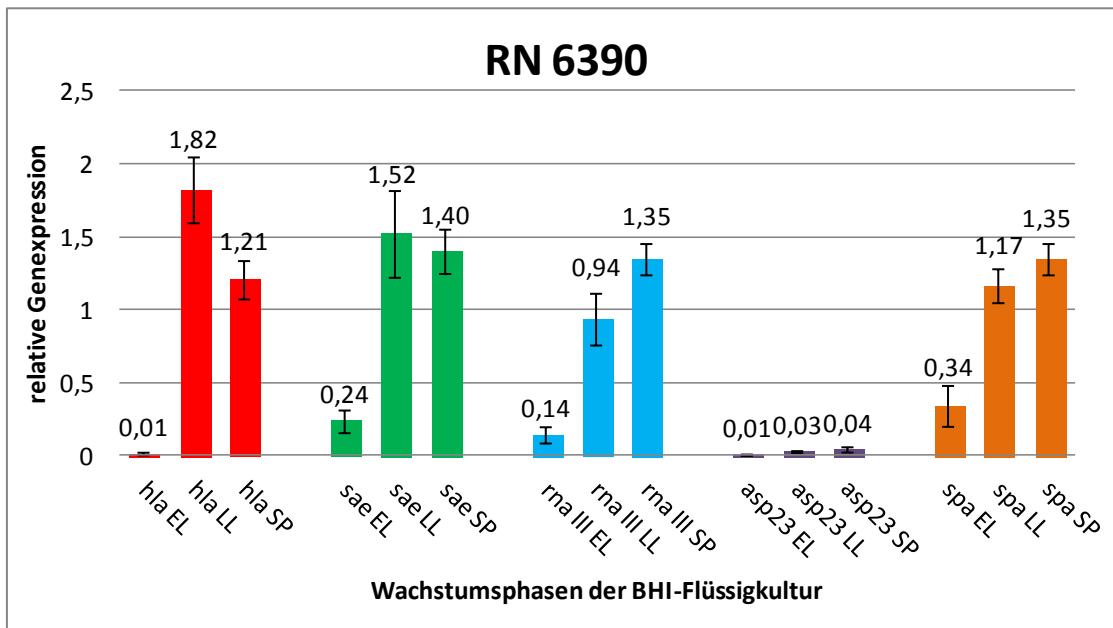


Abb. 11: Genexpression des Laborstamms RN 6390 in der Flüssigkultur

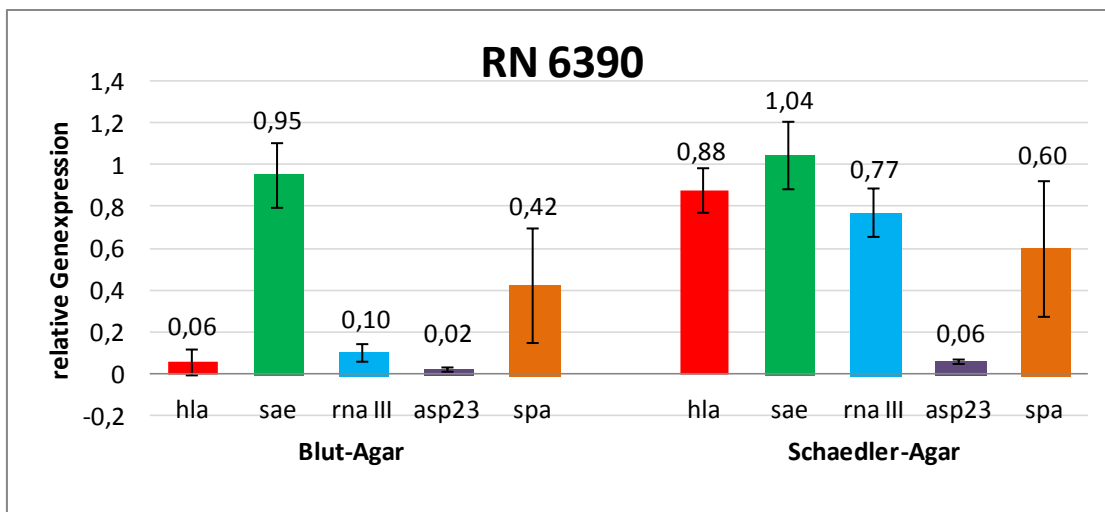


Abb. 12: Genexpression des Laborstamms RN6390 auf den Agarkulturen

RN 6390, ein Laborstamm, der einen ähnlichen genetischen Hintergrund hat wie der Laborstamm 8325-4, weist ebenso wie der Stamm 8325-4 eine *sigB*-Mutation auf. Dies führte zu der typischen weißen Farbe der Kolonien beim Wachstum auf Agar. In der BHI-Flüssigkultur wurden alle fünf untersuchten Regulatoren und Virulenzgene

erfolgreich exprimiert (Abb. 11). Der Regulator *sae* transkribierte die größte Menge an RNA in der späten exponentiellen Phase. Da eine Mutation im *sigB*-Gen vorliegt, konnte die Transkription von *asp23* in allen drei Phasen kaum nachgewiesen werden. Das Effektorgen RNA III steigerte seine Expression von der frühen exponentiellen bis zur stationären Phase, in der es sein Maximum erreichte. Wie auch schon vom Laborstamm 8325-4 wurde *hla* in der späten exponentiellen Phase am stärksten exprimiert. Das Virulenzgen *spa* wies die höchste Transkription in der stationären Phase auf.

Auf Blut- und Schaedler-Agar zeigte **RN 6390** ein starkes Hämolyseverhalten (Stufe 3), die Kolonien waren weiß pigmentiert, groß, hatten ein normales Wachstum und eine feuchte Konsistenz. Auf Blut- und Schädler-Agar wurde das β -Toxin exprimiert. Alle fünf Gene wurden auf beiden Agarmedien transkribiert (Abb. 12). Der Regulator *sae* zeigte sowohl auf Blut- als auch auf Schaedler-Agar eine ungefähr gleich hohe Genexpression wie zum Zeitpunkt der stationären Phase in der Flüssigkultur. Interessanterweise wurde *asp23* auf beiden Agarmedien genauso gering exprimiert wie in der Flüssigkultur. RNA III wurde auf Schaedler-Agar stärker exprimiert als auf Blut-Agar. Ebenso sah es bei den Virulenzgenen *hla* und *spa* aus, bei denen die Transkription auf Schaedler-Agar stärker ausfiel.

4.3.1.3 Die Genexpression von SH 1000

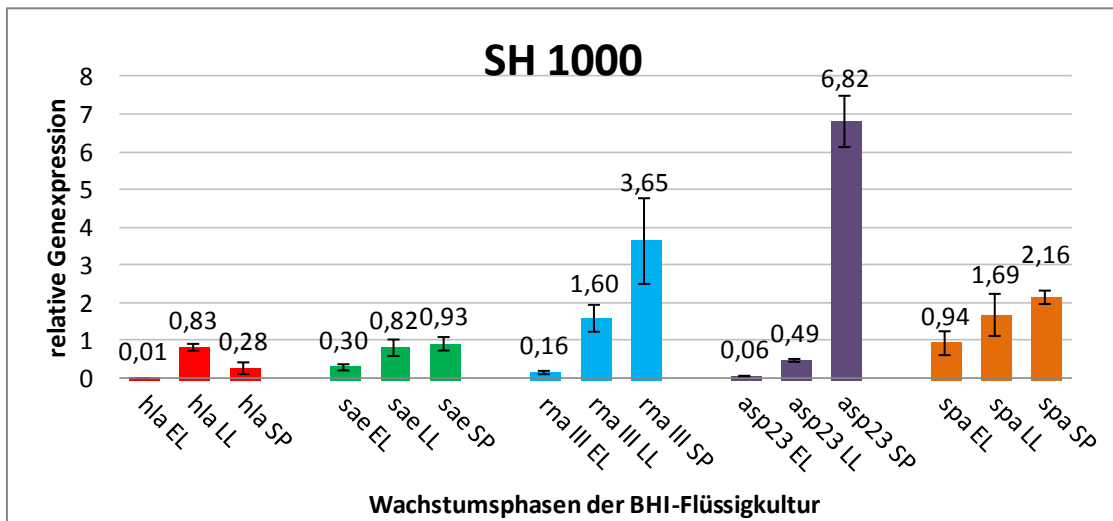


Abb. 13: Genexpression des Laborstamms SH 1000 in der Flüssigkultur

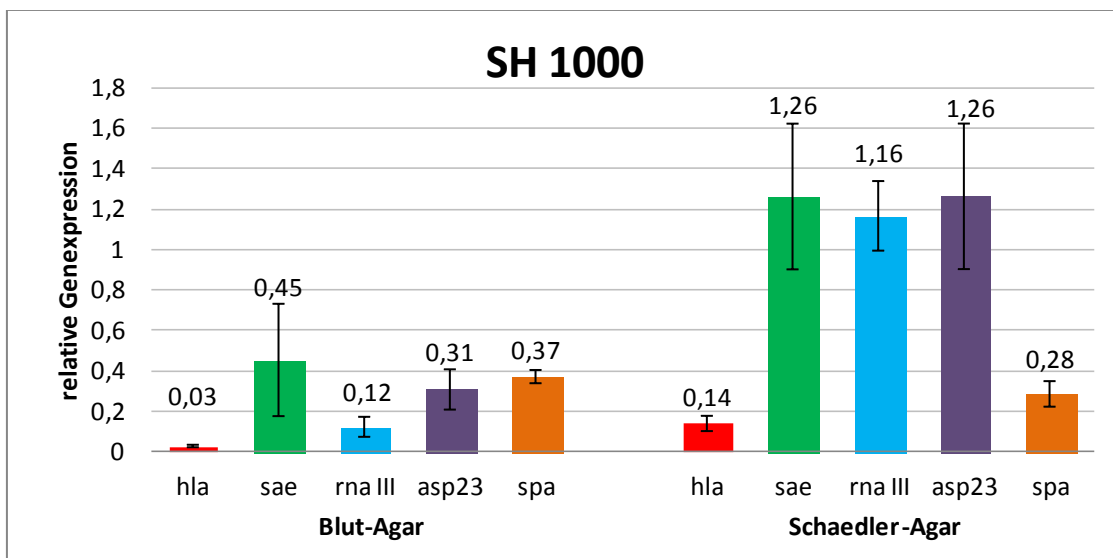
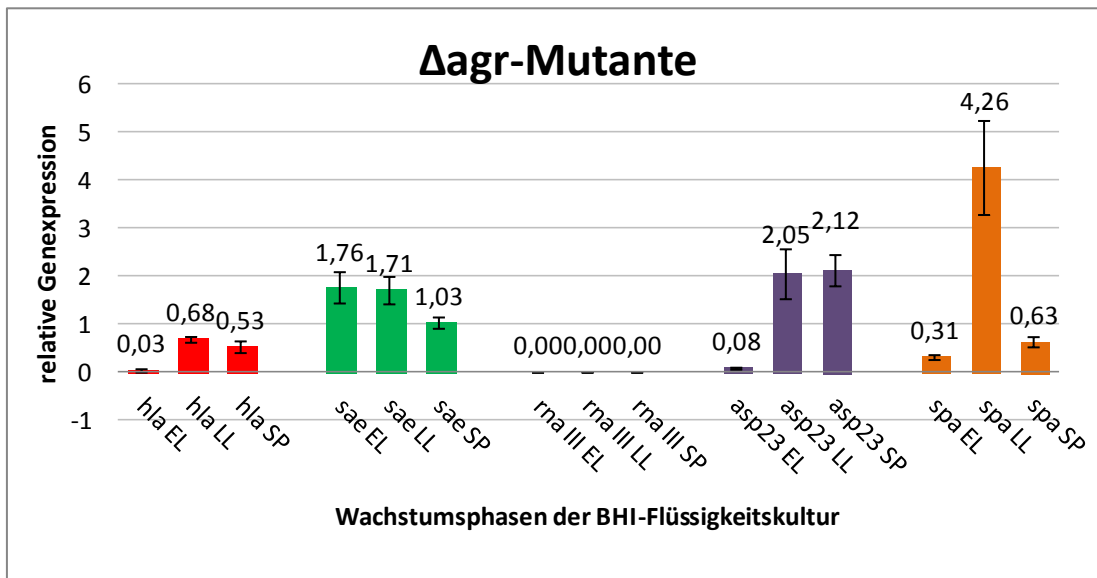
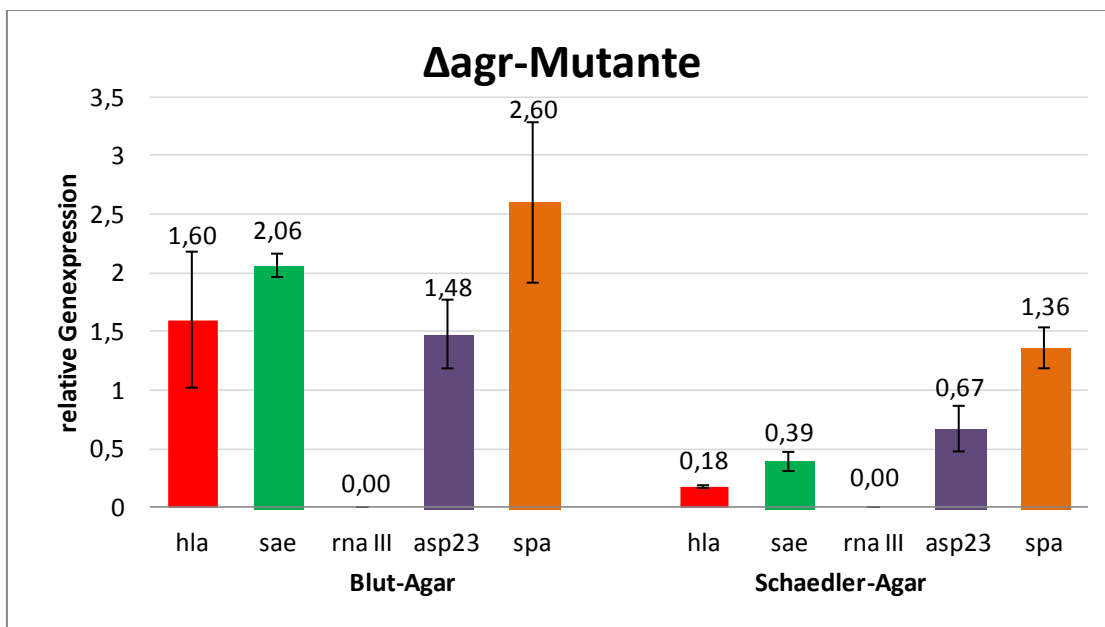


Abb. 14: Genexpression des Laborstamms SH 1000 auf den Agarkulturen

SH 1000, abstammend vom Laborstamm 8325-4 mit einer Komplementierung der Deletion im *sigB*-Gen ($rsbU^+$), zeigte ein ähnliches Transkriptionsverhalten in den drei Wachstumsphasen (Abb. 13) der einzelnen Regulatoren *sae*, RNAIII und *asp23* und des Virulenzgens *spa*. Die Transkription in der Flüssigkultur war in der frühen exponentiellen Phase gering und steigert sich bis zum Erreichen der stationären Phase. Wie zu erwarten, erhöhte sich die Expression von *asp23* von der späten exponentiellen

zur stationären Phase sehr stark, da es sich bei SH1000 um eine komplementierte *sigB*-Mutation handelt und folglich war die Transkription von *asp23* entsprechend hoch. Der *sae*-Regulator zeigte keine großen Schwankungen zwischen den drei Wachstumsphasen. Zwar war die Expression in der frühen exponentiellen Phase am geringsten, bis zur stationären Phase kam es jedoch nur zu einem geringen Anstieg in der Transkriptionsmenge. Bei RNA III, dem Effektorgen von *agr*, war die Expression in der frühen exponentiellen Phase am niedrigsten und erreichte ihr Maximum in der stationären Phase. Die erfolgreiche Expression von RNA III unterstrich auch die positive Transkription des Virulenzgens *hla*, da dessen Expression durch RNA III aktiviert wurde. *hla* erreichte sein Maximum in der späten exponentiellen Phase und wurde als einziges Transkript in der stationären Phase in geringerer Menge produziert. Obwohl *spa*, das für das Oberflächenprotein Protein A kodiert, normalerweise durch RNA III supprimiert wird, zeigte sich die maximale Transkription der *spa*-RNA in der stationären Phase.

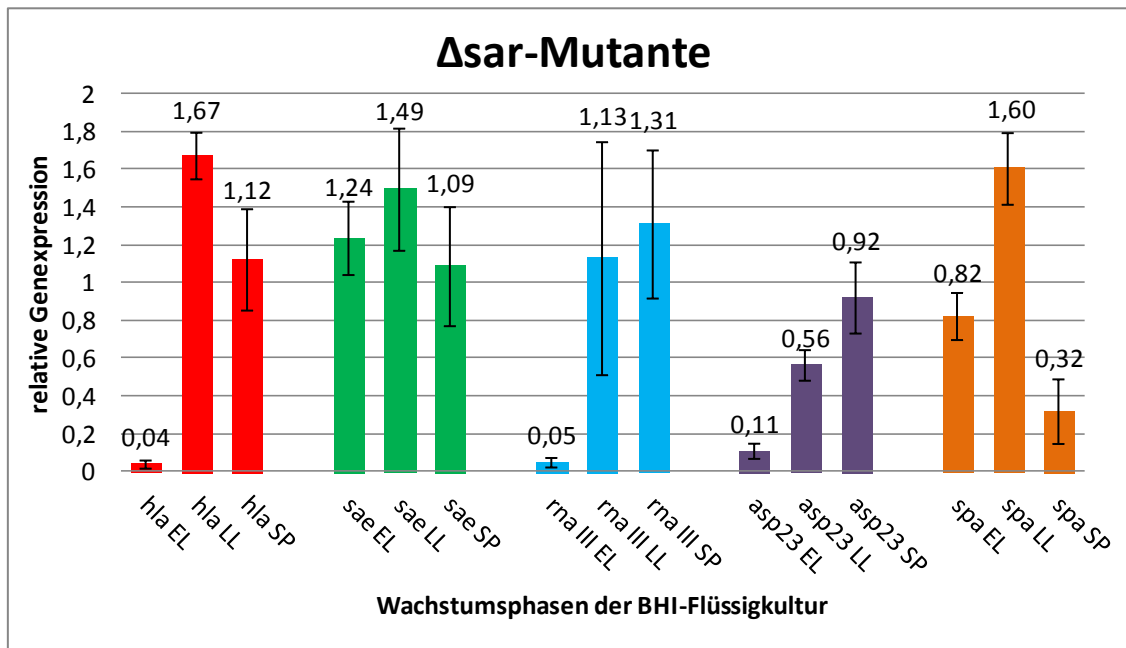
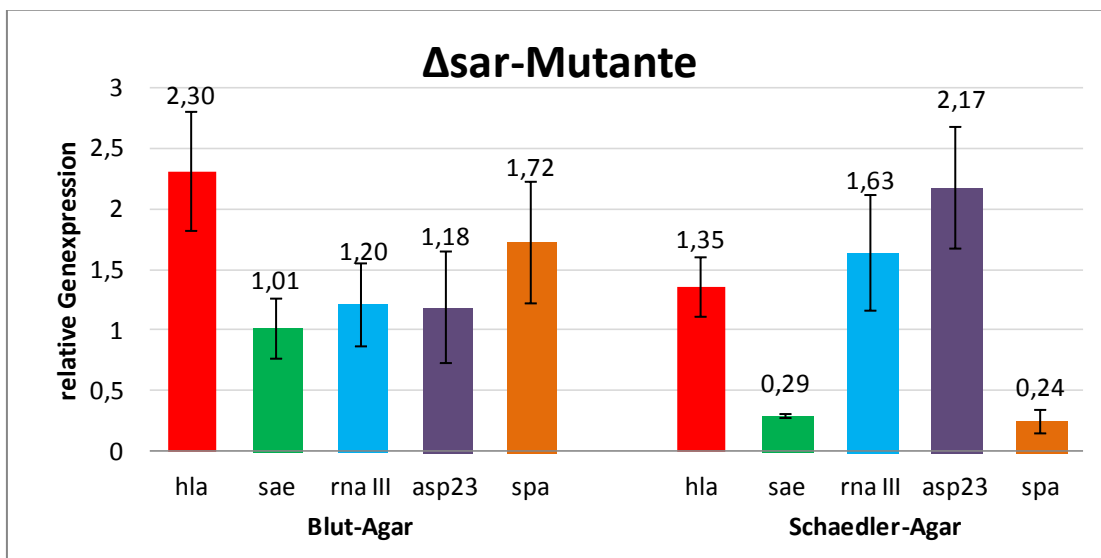
Die Hämolyse von **SH 1000** erreichte auf Schaedler-Agar Stufe 4 und war somit stärker als auf Blut-Agar. Die Pigmentierung war auf beiden Agarplatten goldgelb, die Kolonien wuchsen groß und hatten eine feuchte Konsistenz. Auf Schaedler-Agar konnte jedoch im Gegensatz zum Blut-Agar die Hämolyse durch das β -Toxin beobachtet werden. Abb. 14 zeigt das Transkriptionsprofil von SH 1000 nach Isolierung der RNA von Blut- und Schaedler-Agar. Auf den ersten Blick fiel auf, dass alle untersuchten Gene auf Schaedler-Agar stärker exprimiert wurden. Der Genregulator *sae* wurde auf Schaedler-Agar stärker exprimiert als auf Blut-Agar und in der Flüssigkultur. RNA III wies auf Schaedler-Agar eine höhere Expression als auf Blut-Agar auf. Die erfolgreiche *sigB*-Transkription spiegelte sich ebenso auf den beiden Agarplatten wie in der Flüssigkultur wieder, da *asp23* auf Blut- und Schaedler-Agar erfolgreich exprimiert wurde. Das Virulenzgen *hla* zeigte auf Blut- und Schaedler-Agar eine verminderte Transkription als in der Flüssigkultur. Das *spa*-Transkript fand sich auf Blut- und Schaedler-Agar in annähernd gleicher Menge.

4.3.1.4 Die Genexpression der Δagr -Mutante RN 6911Abb. 15: Genexpression der Δagr -Mutante in der FlüssigkulturAbb. 16: Genexpression der Δagr -Mutante auf den Agarkulturen

Bei der Δagr -Mutante RN 6911, abstammend von RN 6390, ist der *agr*-Lokus deletiert und durch das *tetM*-Gen ersetzt, was dazu führte, dass das Effektorgen RNA III nicht transkribiert wurde. Bekannt ist, dass die Oberflächenproteine in ihrer Expression als

Folge der *agr*-Mutation gesteigert und die der Exoproteine reduziert werden. Desweiteren besteht eine reduzierte Virulenz der Mutante. Alle übrigen vier untersuchten Gene wurden in allen Wachstumsphasen der Flüssigkultur erfolgreich exprimiert (Abb. 15). Bei *sae* wurde erwartet, dass dessen Transkription in einer Δ *agr*-Mutante erniedrigt ist. Hier wurde es in der frühen exponentiellen Phase am stärksten transkribiert mit sinkender Tendenz bis zur stationären Phase. *asp23*, das die Aktivität des *sigB*-Gens widerspiegelt, steigerte seine Transkriptionsmenge kontinuierlich bis zum Erreichen der stationären Phase. Dafür zeigten *hla* und *spa* als *agr*-abhängige Gene die stärkste Transkription in der späten exponentiellen Phase und wurden nur gering in der frühen exponentiellen und stationären Phase exprimiert.

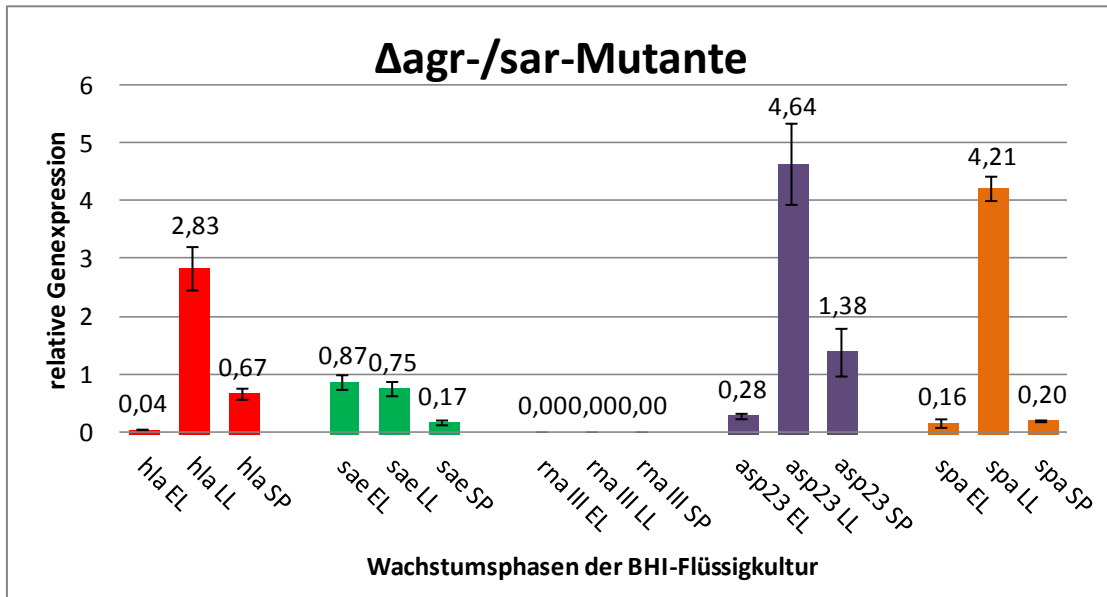
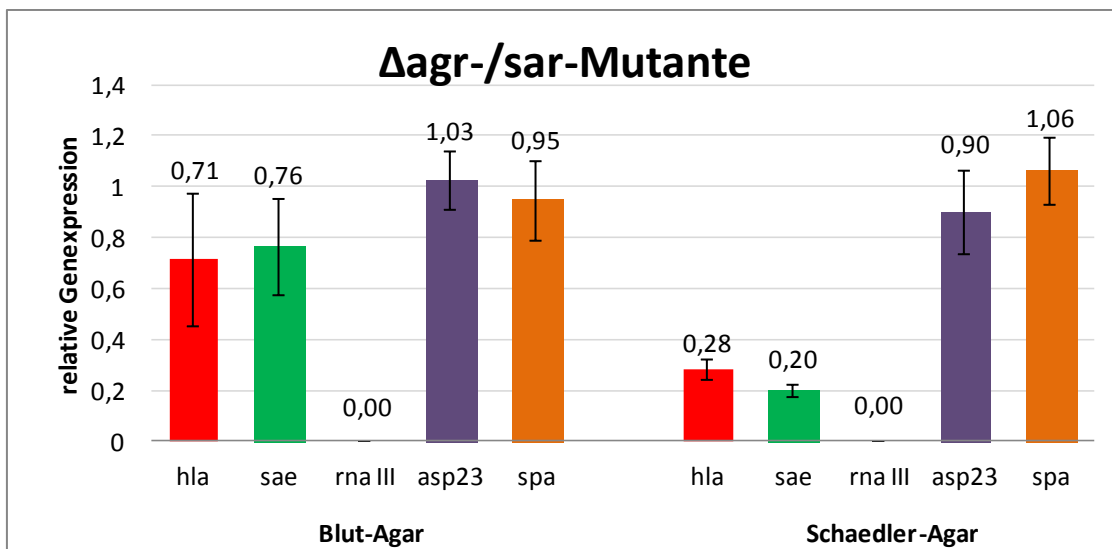
Die **Δ *agr*-Mutante RN 6911** entwickelte sowohl auf Blut- als auch auf Schädler-Agar keine Hämolyse, kein β -Toxin, hatte kleine weiß pigmentierte Kolonien, ein normales Wachstum und eine feuchte Konsistenz. Auch beim Wachstum auf Agar wurde RNA III aufgrund der Mutation im *agr*-Lokus wie erwartet nicht exprimiert (Abb. 16). Auffällig war hier, dass die Transkription der vier erfolgreich exprimierten Gene auf Blut-Agar stärker war als auf Schaedler-Agar. *sae* erreichte auf Blut-Agar eine ähnlich hohe Expression wie in der frühen exponentiellen Phase in der Flüssigkultur, wohingegen die Transkription auf Schaedler-Agar im Vergleich erheblich niedriger war. Das in der Flüssigkultur ebenfalls erfolgreich exprimierte *asp23* zeigte eine erfolgreiche Expression auf den Agarplatten, wobei die Transkription auf Blut-Agar ungefähr doppelt so stark war wie auf Schaedler-Agar. Auch die *agr*-abhängigen Virulenzgene *hla* und *spa* wurden auf Blut-Agar stärker exprimiert als auf Schaedler-Agar.

4.3.1.5 Die Genexpression der Δsar -Mutante ALC 136Abb. 17: Genexpression der Δsar -Mutante in der FlüssigkulturAbb. 18: Genexpression der Δsar -Mutante auf den Agarkulturen

Der globale Regulator *sar* kontrolliert die Produktion der Oberflächen- und extrazellulären Proteine. Bei der Δsar -Mutante ALC 136 ist das *sar*-Gen ausgeschaltet, das normalerweise die Expression von Virulenzgenen wie auch *hla* und *spa* beeinflusst,

allerdings nur indirekt. Es handelt sich um eine isogenetische Mutante von RN 6390 mit einer *sarA::ermC* Mutation. Daher wurden im folgenden Transkriptionsprofil alle fünf untersuchten Gene in den einzelnen Wachstumsphasen erfolgreich exprimiert (Abb. 17). *asp23* steigerte die Menge der relativen Genexpression stetig bis zum Erreichen der stationären Phase, in der es sein Maximum erreichte. Dagegen wurde der Regulator *sae* in der späten exponentiellen Phase am stärksten transkribiert, ebenso auch *spa* und *hla*. Der Regulator *agr*, dessen Transkriptionsmenge durch die Expression des Effektorgens RNA III gemessen wurde, erreichte das Maximum der relativen Genexpression erst mit dem Eintreten in die stationäre Phase. Der Sprung bezüglich der Transkriptionsmenge zwischen der frühen exponentiellen und der späten exponentiellen Phase war sehr hoch.

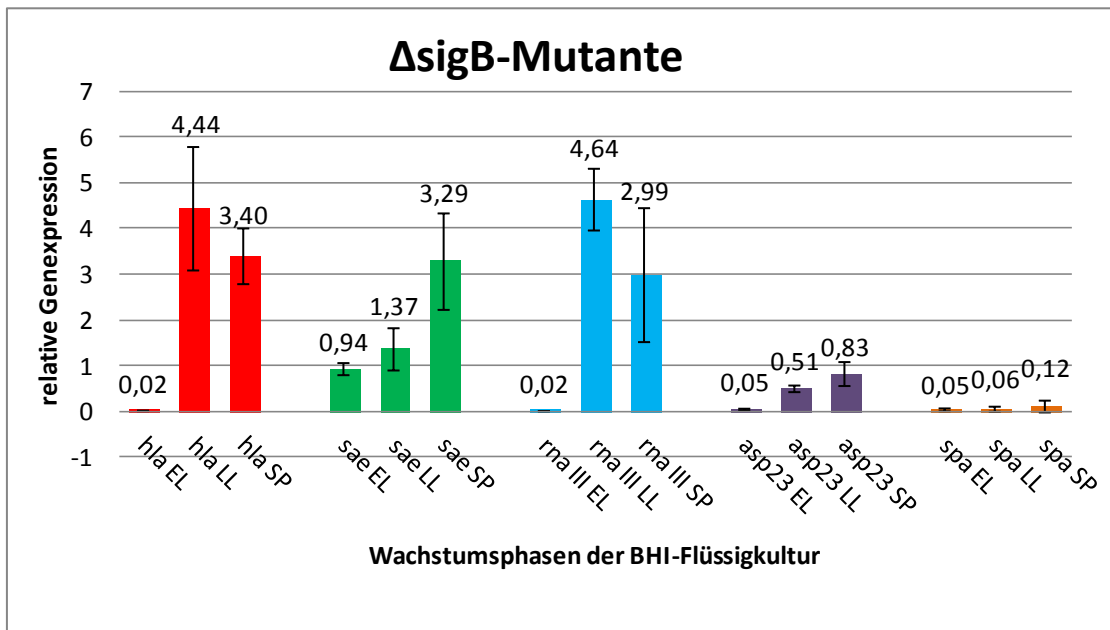
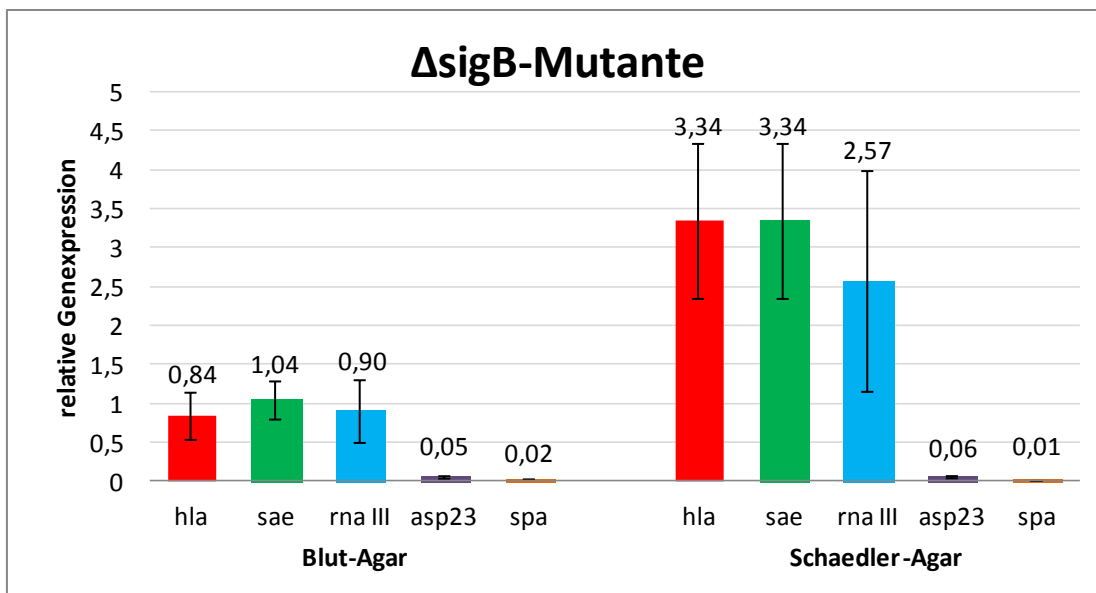
Die **Δ *sar*-Mutante** erreichte auf Blut-Agar Hämolysestufe 2 und auf Schaedler-Agar Hämolysestufe 4. Sie bildete kein β -Toxin, die Kolonien waren klein und weiß pigmentiert. Das Wachstum war normal und die Kolonien hatten eine feuchte Konsistenz. Die untersuchten fünf Gene wurden alle wie in der Flüssigkultur erfolgreich transkribiert (Abb. 18). Bei *sae* fiel auf, dass der Regulator auf Blut-Agar deutlich stärker exprimiert wurde als auf Schaedler-Agar. RNA III zeigte wie auch schon in der Flüssigkultur eine positive Transkription, die auf Schaedler-Agar etwa gleich stark ausgeprägt war wie auf Blut-Agar. Dagegen war *asp23* das einzige Virulenzgen, welches auf Schaedler-Agar eine höhere Expression als auf Blut-Agar aufwies. Interessanterweise wurden die beiden *agr*-abhängigen Virulenzgene *hla* und *spa* auf Blut-Agar stärker transkribiert.

4.3.1.6 Die Genexpression der $\Delta agr/sar$ -Doppelmutante ALC 135Abb. 19: Genexpression der $\Delta agr/sar$ -Mutante in der FlüssigkulturAbb. 20: Genexpression der $\Delta agr/sar$ -Mutante auf den Agarkulturen

Die $\Delta agr/sar$ -Doppelmutante ALC 135 exprimierte die untersuchten Gene nach einem ähnlichen Muster, wie die Δagr -Mutante (Abb. 19). Hier handelt es sich um eine Mutante von RN 6390 mit *agr::tetM* und *sar::Tn917LTV1* Insertion. RNA III wurde daher auch in der Doppelmutante nicht transkribiert. *sae* zeigte das gleiche

Transkriptionsmuster wie in der *agr*-Mutante. Bei *asp23* sah das Transkriptionsprofil in den drei Wachstumsphasen im Gegensatz zur *agr*-Mutante anders aus. Hier erreichte *asp23* sein Maximum schon in der späten exponentiellen Phase. Da *sar* die Expression von anderen Virulenzgenen nur indirekt beeinflusst, wurden diese auch in der Doppelmutante erfolgreich exprimiert. Die Expression von *hla* und *spa* war in der späten exponentiellen Phase am stärksten.

Auch der Phänotyp der Kolonien auf den Blut- und Schaedler-Agar ähnelte dem der *agr*-Mutante sehr. Sie wies ebenfalls auf beiden Agarplatten keine Hämolyse auf, kein β -Toxin und entwickelte kleine weiße Kolonien mit normalem Wachstum und feuchter Konsistenz. Ebenso ließ sich ein ähnliches Transkriptionsmuster zur *agr*-Mutante feststellen (Abb. 20). RNA III wurde nicht exprimiert, die Expression des Regulators *sae* war auf Blut-Agar erheblich stärker als auf Schaedler-Agar und *asp23* zeigte hier ein ebenso erfolgreiches Transkriptionsmuster, was schon in der Flüssigkultur zu erkennen war. Die Höhe der Expression war auf den beiden Agar-Platten ungefähr gleich stark. Auch die Transkription von *hla* ähnelte dem der *agr*-Mutante, da deren Expression von *hla* auf Blut-Agar wesentlich höher ausfiel. Dagegen steigerte *spa* in der Doppelmutante auf Schaedler-Agar seine Expression nicht mehr.

4.3.1.7 Die Genexpression der $\Delta sigB$ -Mutante ALC 1001Abb. 21: Genexpression der $\Delta sigB$ -Mutante in der FlüssigkulturAbb. 22: Genexpression der $\Delta sigB$ -Mutante auf den Agarkulturen

Bei der $\Delta sigB$ -Mutante ALC 1001, abstammend von dem Laborstamm RN 6390, war bekannt, dass durch die Inaktivierung von *sigB* die Expression des *sae*-Regulators gesteigert wird. So wurde *sae* auch hier zu allen drei Zeitpunkten in der Flüssigkultur

erfolgreich exprimiert (Abb. 21). Es fand eine kontinuierliche Steigerung von der frühen exponentiellen bis zur stationären Phase statt. Interessanterweise wurde *asp23* trotz der *sigB*-Defizienz wenn auch nur gering transkribiert. RNA III hatte das Maximum schon in der späten exponentiellen Phase erreicht. *spa* wurde im Gegensatz zu den anderen Mutanten in der *sigB*-Mutante nur ganz gering transkribiert und es war ein kaum merklicher Unterschied zwischen den einzelnen Wachstumsphasen erkennbar. Es bestand somit ein Unterschied zu RN 6390, bei dem *spa* erfolgreich in allen drei Wachstumsphasen mit Maximum in der stationären Phase exprimiert wurde. Wie erwartet wurde das Virulenzgen *hla* erfolgreich exprimiert und hatte sein Maximum in der Transkription während der späten exponentiellen Phase. Es bestätigte sich außerdem die höhere Expression von *hla* in der *sigB*-Mutante im Vergleich zu RN 6390. Weiterhin hat die *sigB*-Mutation einen Einfluss auf die Transkripte von *spa*, die in den Flüssigkeiten und auf Blut- und Schaedler-Agar zu erkennen ist.

Auf Blut- und Schaedler-Agar ähnelte der Phänotyp der ***sigB*-Mutante** sehr dem von RN 6390. Die Mutante entwickelte auf Blut-Agar eine geringere Hämolyse als auf Schaedler-Agar, bildete aber auf beiden ein β -Toxin. Die Kolonien waren klein, weiß pigmentiert und wuchsen normal mit feuchter Konsistenz. Der Virulenzregulator *sae* wies auf Schaedler-Agar ein stärkeres Transkriptionsprofil als auf Blut-Agar auf (Abb. 22). Ebenso verhielt es sich mit dem Effektorgen RNA III. *asp23* wurde auf beiden Agarplatten gering exprimiert. *spa* wurde wie schon in der Flüssigkultur sowohl auf Blut- als auch auf Schaedler-Agar wenig exprimiert. *hla* wurde in dieser Mutante auf beiden Agar-Medien erfolgreich exprimiert, jedoch wesentlich stärker auf Schaedler-Agar.

4.3.2 Das Transkriptionsprofil der klinischen Isolate

In der vorliegenden Arbeit wurden 16 klinische *S. aureus*-Isolate aus dem Respirationstrakt von Mukoviszidose-Patienten ausgewählt, um zu untersuchen, ob abhängig vom phänotypischen Erscheinungsbild auf Blut- und Schaedler-Agar, Rückschlüsse auf das Transkriptionsverhalten der Isolate zu ziehen sind.

Die RNA-Isolierung von den Agarplatten erfolgte nach Inkubation der Stämme über 16-24h bei 37°C. Der Blut-Agar wurde aerob und der Schaedler-Agar unter 5%igem CO₂ bebrütet. Durch die Verwendung von Columbia-Blut- und Schaedler-Agar ist eine bessere Charakterisierung und Vergleich der einzelnen Phänotypen von klinischen *S. aureus*-Isolaten untereinander möglich. Zumeist ist das Hämolyseverhalten auf Schaedler-Agar noch stärker ausgeprägt als auf Blut-Agar. Auch das Pigment der Kolonien ist häufig unterschiedlich. So haben die Kolonien auf Schaedler-Agar häufig eine gelblichere Pigmentierung als diejenigen auf Blut-Agar.

Desweiteren wurde ein Teil der klinischen *S. aureus*-Isolate in dem Flüssigmedium BHI bebrütet und deren Wachstumsverlauf ermittelt. So konnten die Zeitpunkte des Erreichens der frühen exponentiellen, der späten exponentiellen und der stationären Phase ermittelt werden. Anschließend wurde nach erfolgter RNA-Isolierung das Transkriptionsprofil der Gene mittels RT-PCR bestimmt. Es wurden die *S. aureus*-Regulatoren *agr*, *sigB* und *sae* sowie die Virulenzgene *hla* und *spa* untersucht.

Bekannt ist, dass die verschiedenen Virulenzfaktoren von *S. aureus* in bestimmten Phasen des Wachstumszyklus mehr oder weniger stark exprimiert werden. So werden die Oberflächenproteine vor allem in der exponentiellen Phase und die Exoproteine und -toxine eher in der postexponentiellen und stationären Phase transkribiert. Das in dieser Arbeit untersuchte Virulenzgen *spa* gehört zur Gruppe der Oberflächenproteine, somit wurde eine stärkere Expression in der exponentiellen Phase erwartet, während *hla* zur Gruppe der sezernierten Proteine gehört, sodass eine stärkere Expression in der stationären Phase erwartet wurde.

Die klinischen Isolate wurden zu drei Gruppen zusammengefasst, wobei die Einordnung entsprechend der Ausprägung der Hämolyse erfolgte.

Die **Gruppe I** der klinischen Isolate, die auf Blut-Agar keine Hämolyse entwickelten, zeigten in der Flüssigkultur ein sehr unterschiedliches Verhalten in der Transkription der einzelnen Gene in den verschiedenen Phasen des Wachstumsverlaufes.

Die fünf *S. aureus*-Isolate S 198 II, S 348 I, S 385 IV, S 1368 II und S 1368 III entwickelten auf Blut-Agar keine Hämolyse, auf Schaedler-Agar zeigten sie eine Hämolysezone von Stufe 0 bis 3. Abb. 23 zeigt S 1368 II ohne Hämolyse auf Blut-Agar und Hämolysestufe 3 auf Schaedler-Agar.

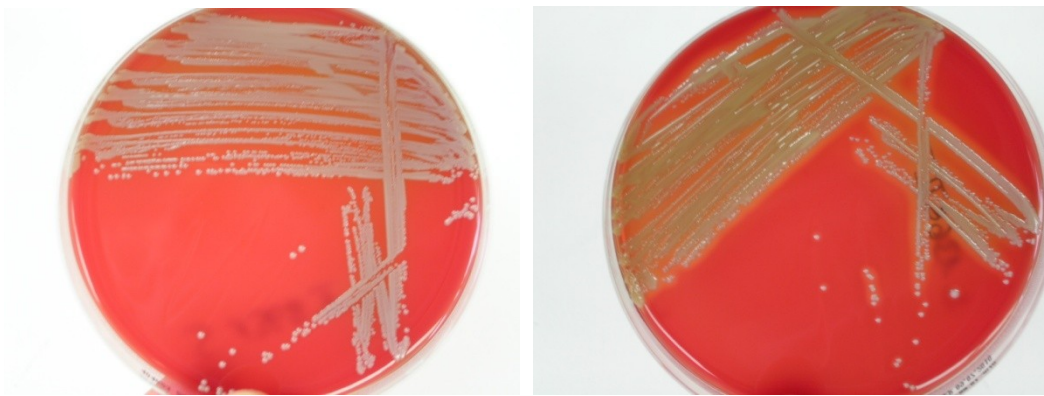


Abb. 23: Isolat S 1368 II mit Hämolyse 0 auf Blut-Agar (li) und mit Hämolyse 3 auf Schaedler-Agar (re)

Die Pigmentierung der Kolonien war bei drei Isolaten auf Blut- und Schaedler-Agar gelb, bei einem Isolat auf Blut-Agar weiß und auf Schaedler-Agar gelb und das fünfte Isolat entwickelte ein gelbes Pigment auf Blut-Agar und ein weißes auf Schaedler-Agar (Tabelle 8, s.S. 34).

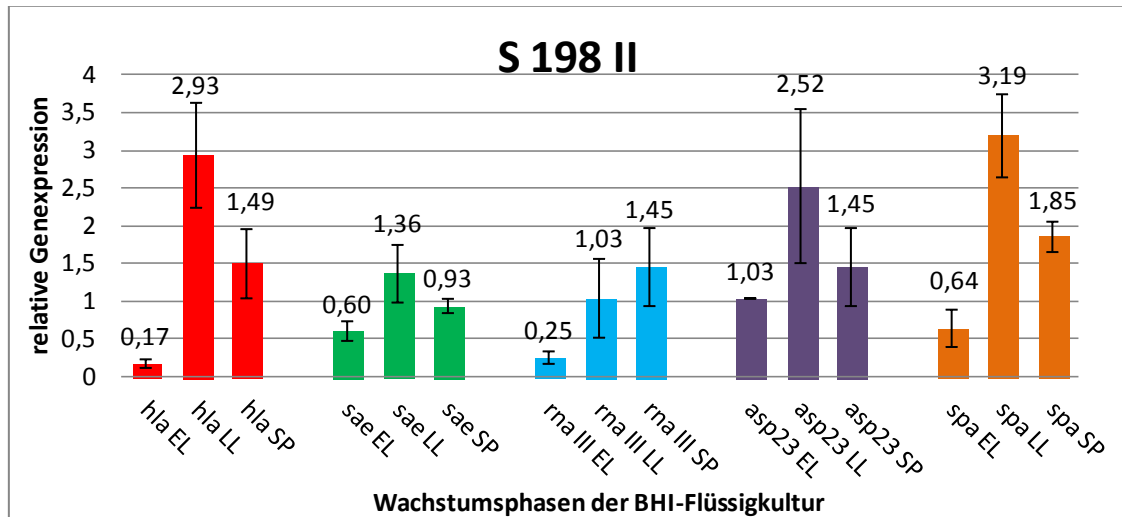


Abb. 24: Genexpression von S 198 II in der Flüssigkultur

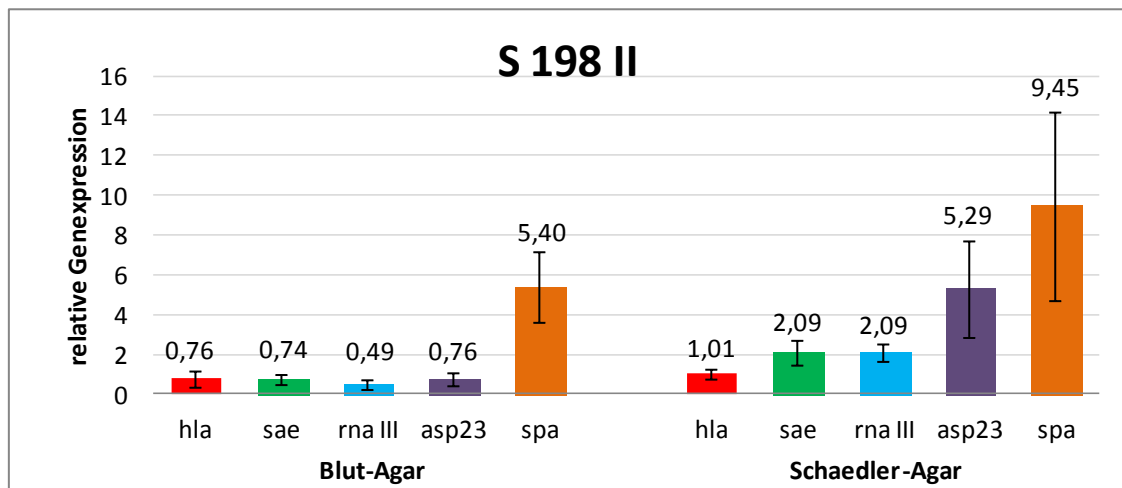


Abb. 25: Genexpression von S 198 II auf den Agarkulturen

Bei **S 198 II** wurden die fünf untersuchten Gene in allen drei Wachstumsphasen erfolgreich exprimiert (Abb. 24). *hla*, *sae*, *asp23* und *spa* wurden hier in der postexponentiellen Phase am stärksten exprimiert. Nur bei RNA III steigerte sich die Expression bis hin zur stationären Phase, was ebenso bei den drei untersuchten Laborstämmen (SH 1000, RN 6350, 8325-4) zu beobachten war.

Auffällig war die geringe Expression aller untersuchten Gene auf Blut-Agar bis auf *spa*, das ein sehr hohes Transkript aufwies und sich auf Schaedler-Agar noch steigerte (Abb. 25). Weiterhin wies auch *asp23* eine deutlichere Steigerung der Expression auf Schaedler-Agar auf. RNA III vervierfachte seine relative Expressionsmenge auf

Schaedler-Agar und *sae* steigerte sich um zwei Drittel. Nur *hla* zeigte auf beiden Agarmedien ein annähernd gleich hohes Transkript.

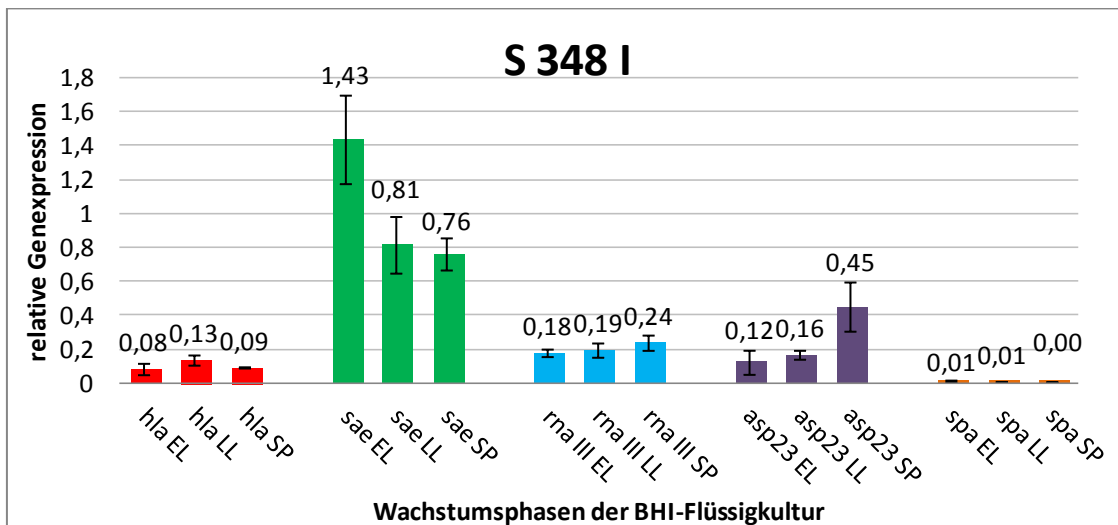


Abb. 26: Genexpression von S 348 I in der Flüssigkultur

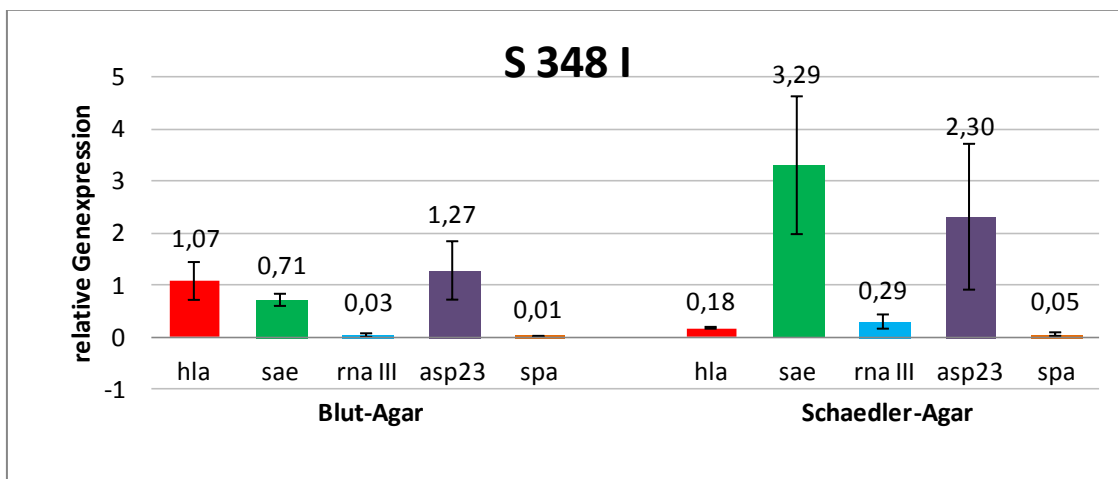


Abb. 27: Genexpression von S 348 I auf den Agarkulturen

S 348 I zeigte trotz ähnlichem Phänotyp zu S 198 II ein nicht vergleichbares Transkriptionsverhalten in der Flüssigkultur. Interessanterweise lag bei keinem der fünf Gene das Maximum in der postexponentiellen Phase (Abb. 26). Nur bei *asp23* kam es zu einem stetigen Anstieg bei der Expressionsmenge bis hin zur stationäre Phase. *sae* dagegen hatte sein Expressionsmaximum bereits in der frühen exponentiellen Phase, was so nur bei der Doppelmutante *agr-/sar-* zu beobachten war. Trotz der niedrigen

RNA III-Expression tendierte die Expression von *spa* in allen drei Phasen gegen Null, so dass es sich möglicherweise um eine *spa*-Mutante handeln könnte.

Auf Blut- und Schaedler-Agar fiel bei *sae*, RNA III und *asp23* eine stärkere Expression auf Schaedler-Agar auf (Abb. 27). Bei *hla* dagegen war die Expression auf Schaedler-Agar deutlich geringer als auf Blut-Agar. *spa* wurde wie schon in der Flüssigkultur fast nicht exprimiert.

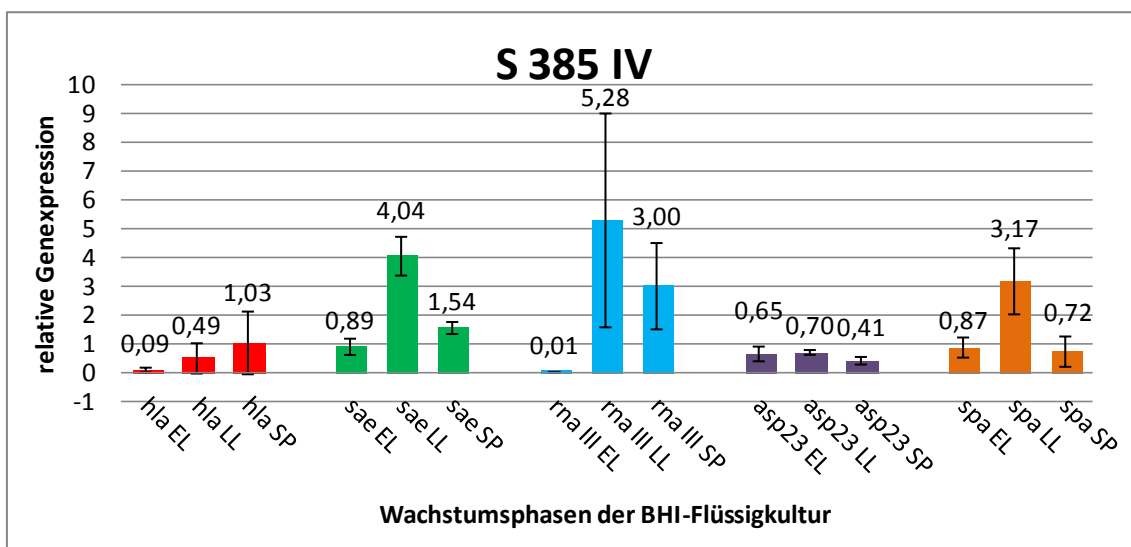


Abb. 28: Genexpression von S 385 IV in der Flüssigkultur

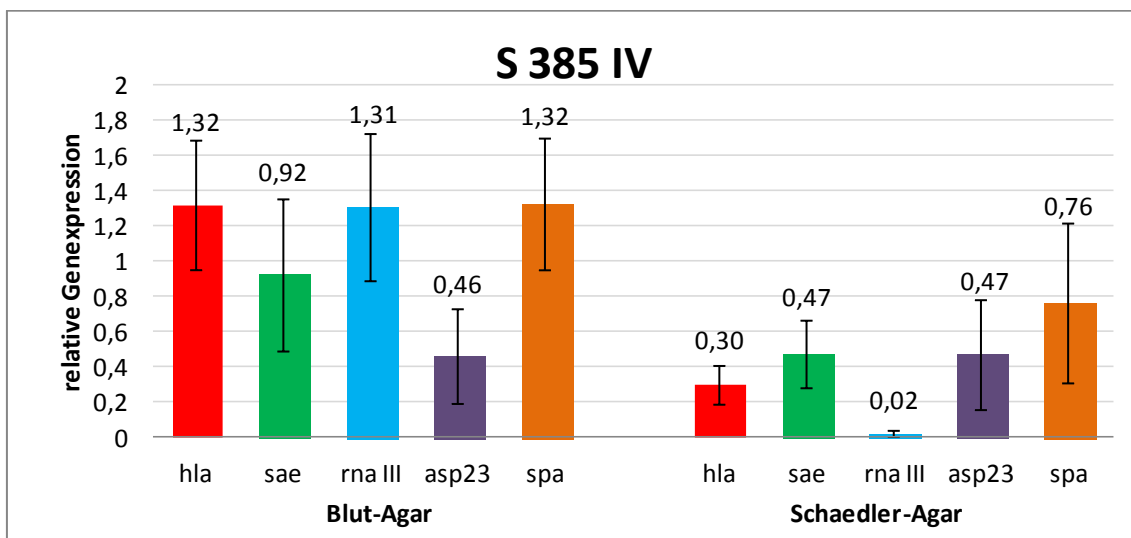


Abb. 29: Genexpression von S 385 IV auf den Agarkulturen

Bei **S 385 IV** wurden sowohl in der Flüssigkultur als auch auf dem Agarmedium sämtliche Gene und Regulatoren erfolgreich transkribiert (Abb. 28 u. Abb. 29). In der Flüssigkultur erreichte wie erwartet *hla* in der stationären Phase und *spa* in der postexponentiellen Phase sein Maximum. Auch *sae* und RNA III wurden in der postexponentiellen Phase am stärksten exprimiert. Dagegen war das Transkript von *asp23* in allen drei Phasen etwa gleich gering ausgeprägt.

Auf Blut-Agar fiel bei fast allen Genen und Regulatoren eine deutlich stärkere Expression auf als auf Schaedler-Agar. Nur *asp23* wurde auf beiden Medien gleich stark exprimiert. Ein ähnliches Transkriptionsmuster sah man bei der *agr*-Mutante von RN6390. Jedoch wurde in dem klinischen Isolat S 385 IV RNA III auf Blut-Agar in hohem Maße exprimiert.

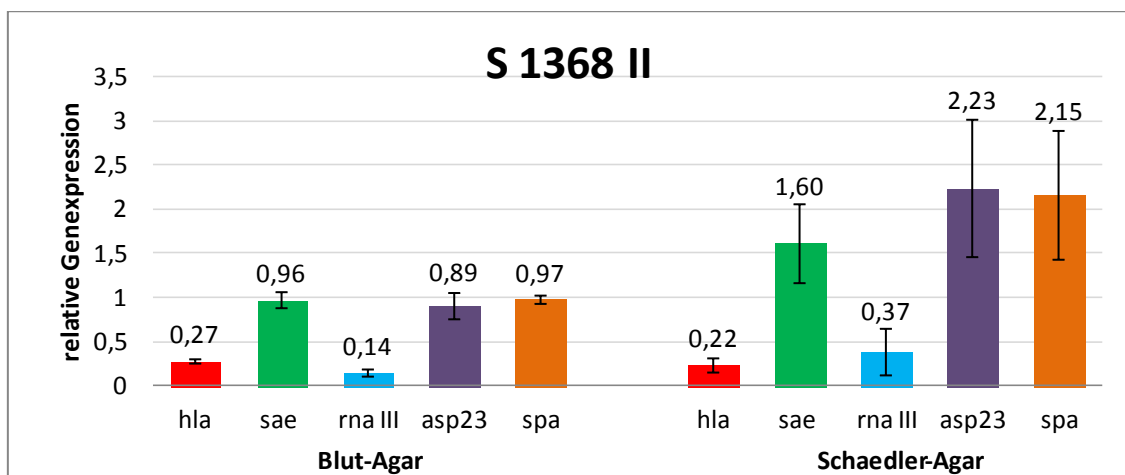


Abb. 30: Genexpression von S 1368 II auf den Agarkulturen

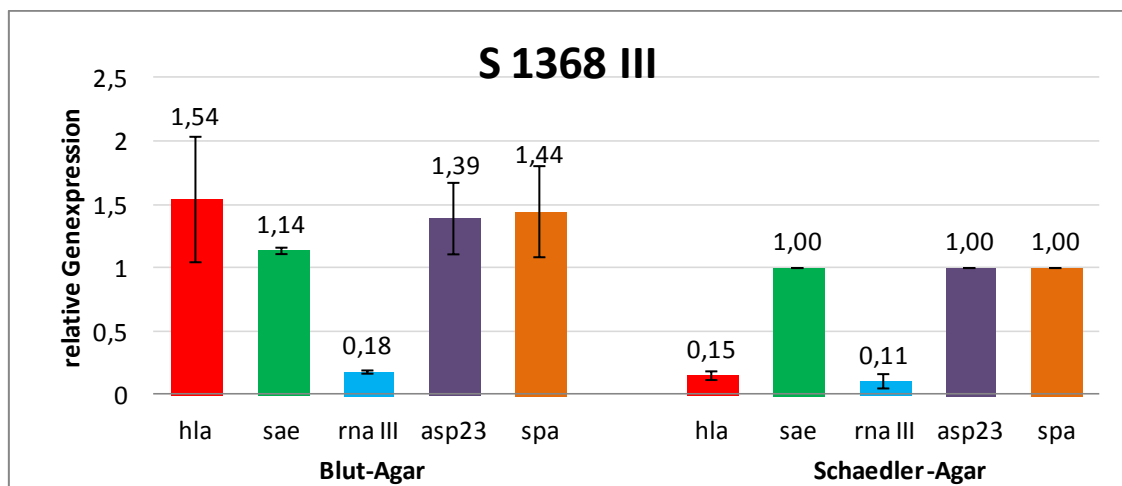


Abb. 31: Genexpression von S 1368 III auf den Agarkulturen

Ergänzt wurde diese Gruppe um die Stämme **S 1368 II** und **S 1368 III**, die aus derselben klinischen Probe eines Patienten isoliert wurden. Auffallend war hier, dass beide Isolate auf Blut-Agar gelbe Kolonien entwickelten, S 1368 III im Gegensatz zu S 1368 II allerdings auf Schaedler-Agar weiße Kolonien produzierte. Es wurden alle Gene und Regulatoren erfolgreich exprimiert. Es fiel aber auf, dass sich auf Schaedler-Agar bei S 1368 III eine schwächere Expression aller Gene im Vergleich zur Transkription auf Blut-Agar zeigte.

Zusammenfassend lässt sich für die **Gruppe I** sagen, dass sich die Transkriptionsprofile der untersuchten Regulatoren und Virulenzgene im Vergleich der Stämme miteinander sehr unterschiedlich darstellten. Der globale Regulator *sae* wurde bei allen fünf Isolaten erfolgreich exprimiert. Es bestand ein Unterschied in der Höhe der Expression zwischen Blut- und Schaedler-Agar, wobei die Transkription auf Schaedler-Agar bei drei Isolaten (S 198 II, S 348 I, S 1368 II) stärker war. Auch das Effektorgen RNAlII transkribierte auf Schaedler-Agar eine größere Menge RNA bei diesen drei Isolaten. Der *sigB*-abhängigen Virulenzfaktor *asp23* wurde bei den Isolaten, die auf beiden Agarplatten gelbe Kolonien produzierten, auf Schaedler-Agar in höherem Maße exprimiert. Interessant war, dass die Expression von *asp23* bei S 1368 III, das auf Blut-Agar gelbe und auf Schaedler-Agar weiße Kolonien entwickelte, entsprechend auch auf Blut-Agar eine stärkere Transkription aufwies. Der Virulenzfaktor *hla* wurde bei allen 3 Isolaten auf Blut-Agar im Gegensatz zu Schaedler-Agar deutlich stärker exprimiert. Auch die Transkription des *agr*-abhängigen Faktors *spa* zeigte gewisse Unterschiede auf. So war die *spa*-Transkription von S 1368 II wie schon bei *asp23* auf Blut-Agar höher. Bei S 198 II und S 1368 II war die Expression auf Schaedler-Agar stärker. Die anderen beiden Isolate exprimierten *spa* auf Blut-Agar in stärkerem Maße, wobei die im Vergleich zu den anderen Isolaten sehr geringe Expression von *spa* bei S 348 I auffiel.

Es lässt sich bei allen Isolaten kein Zusammenhang zwischen den Transkripten von *hla* und dem Grad der Hämolyse auf Blut- und Schaedler-Agar darstellen. Obwohl alle Isolate auf Blut-Agar ohne Hämolyse wuchsen, konnte bei allen Isolaten eine Expression für *hla* auf Blut-Agar aufgezeigt werden.

Beim Isolat S 198 II fiel eine sehr starke Expression von *spa*, sowohl auf Blut- als auch auf Schaedler-Agar auf. Ebenfalls wies *asp23* eine sehr hohe Transkription auf. Bei S

348 I handelte es sich möglicherweise um eine RNA-Mutation mit kombinierter *spa*-Mutation. Bei S 385 IV fiel eine ungewöhnliche Regulation auf, da die Transkripte auf Blut- höher als auf Schaedler-Agar waren. Weiterhin zeigte sich ein starkes *sae*-Transkript in BHI. Bei den Isolaten S 1368 II und III könnte es sich um natürliche *agr*-Mutanten handeln, da die Expression von RNA III sowohl auf Blut- als auch auf Schaedler-Agar sehr gering war.

Zu der **Gruppe II** gehörten die klinischen Isolate S 66 I, S 179 I, S 516 I, S 592 II, S 376 I und S 501 II, die auf Blut- und Schaedler-Agar eine mäßige bis starke Hämolysezone entwickelten.

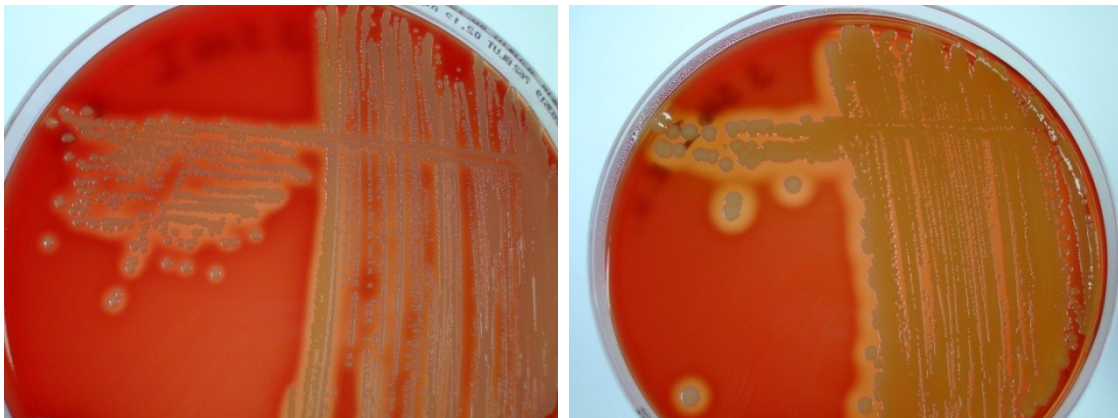


Abb. 32: Isolat S 516 I mit Hämolysestufe 2 auf Blut-Agar (li) und Hämolysestufe 3 auf Schaedler-Agar (re)

Die Pigmentierung von 3 Isolaten war auf Blut- und Schaedler-Agar gelb (S 66 I, S 516 I, S 376 I) und bei den übrigen drei jeweils auf Blut-Agar weiß und auf Schaedler-Agar gelb (S 179 I, S 592 II, S 501 II) (Tabelle 9, s.S. 34).

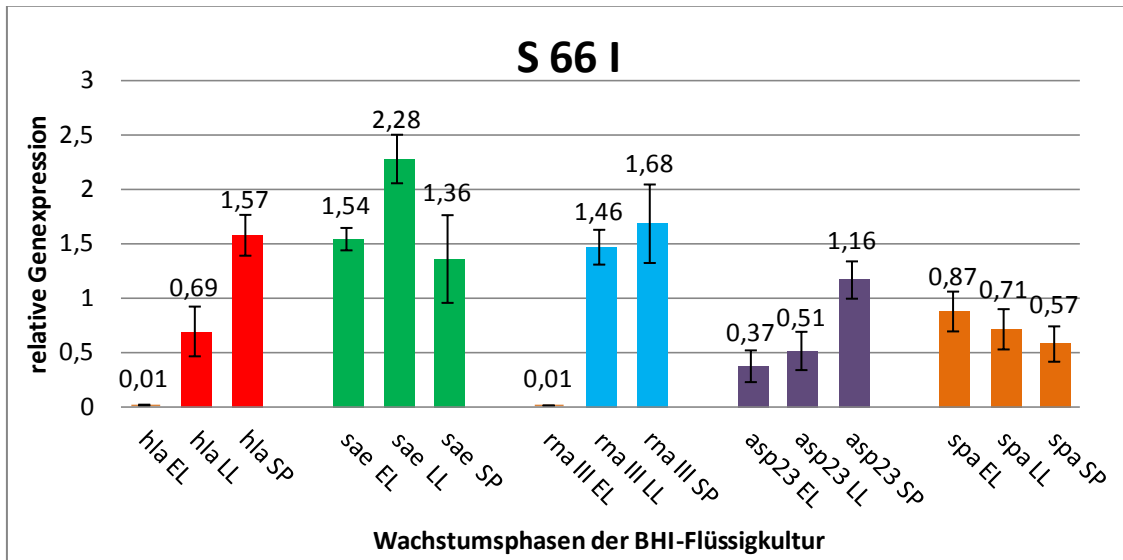


Abb. 33: Genexpression von S 66 I in der Flüssigkultur

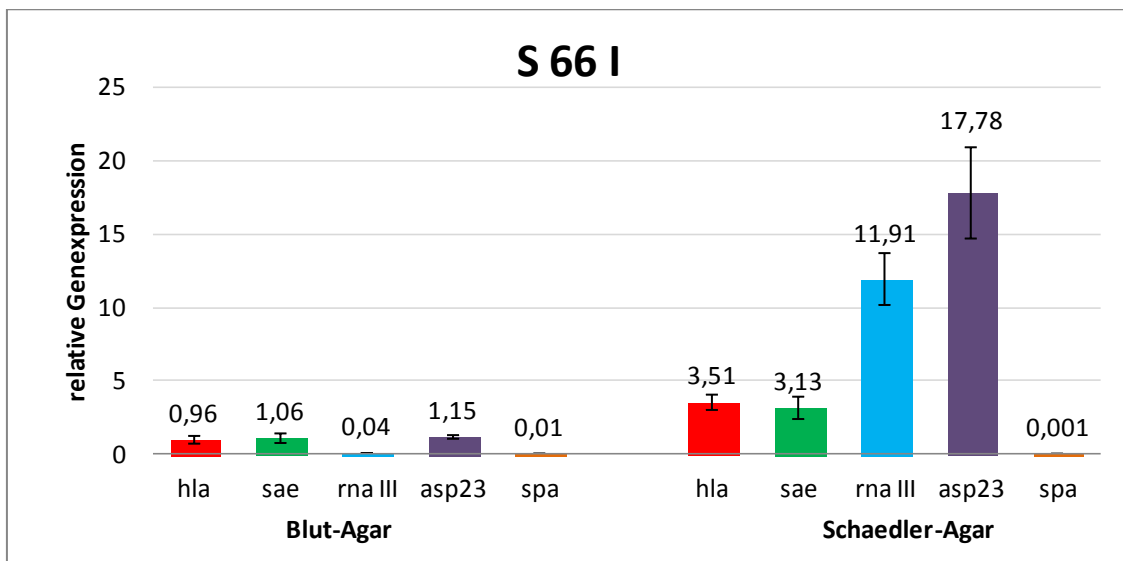


Abb. 34: Genexpression von S 66 I auf den Agarkulturen

S 66 I transkribierte sowohl im Flüssigmedium BHI als auch auf den Agar-Nährböden die Gene und Regulatoren erfolgreich (Abb. 33 u. Abb. 34). *hla* wurde in der Flüssigkultur in der stationären Phase am stärksten exprimiert, was bei keiner der untersuchten Mutanten und Laborstämme der Fall gewesen war. RNA III steigerte seine Expression bis hin zur stationären Phase, wie es auch bei den Laborstämmen gezeigt werden konnte. Unerwartet sah man bei *spa* ein Transkriptionsverhalten mit der höchsten Transkriptionsmenge in der frühen exponentiellen Phase, dass weder bei den Mutanten noch bei den Laborstämmen zu beobachten war. Dagegen fiel auf, dass *spa*

auf Blut- und Schaedleragar kein relevantes Transkript exprimierte. *sae* erreichte sein Maximum in der späten exponentiellen Phase und *asp23* erst in der stationären Phase, wie es schon bei der Δsar -Mutante zu beobachten war. *hla* und *sae* wurden dafür im Vergleich zur Expression auf Blut-Agar auf Schaedler-Agar doppelt so stark und RNA III und *asp23* sogar mehr als 10fach so stark exprimiert.

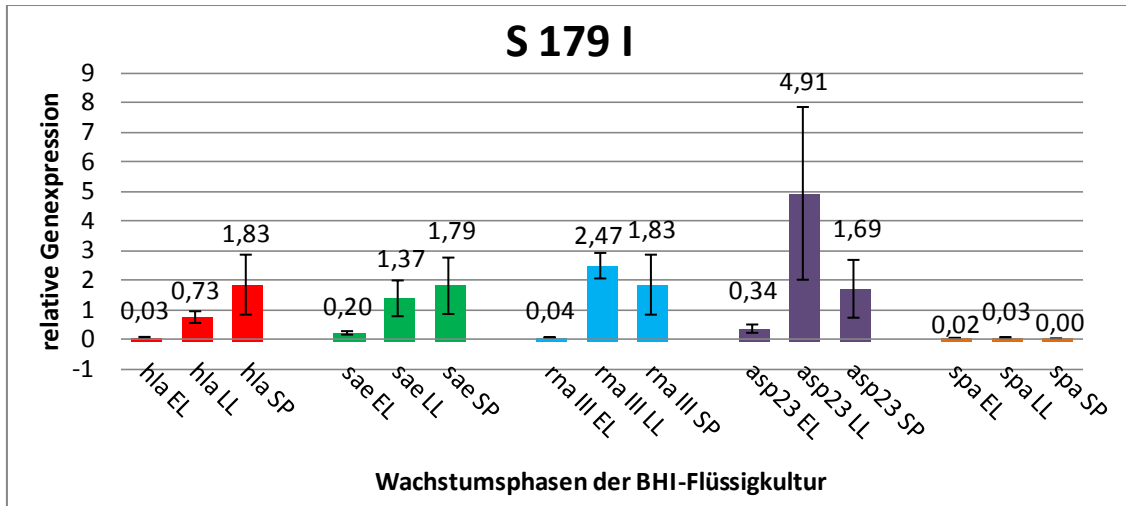


Abb. 35: Genexpression von S 179 I in der Flüssigkultur

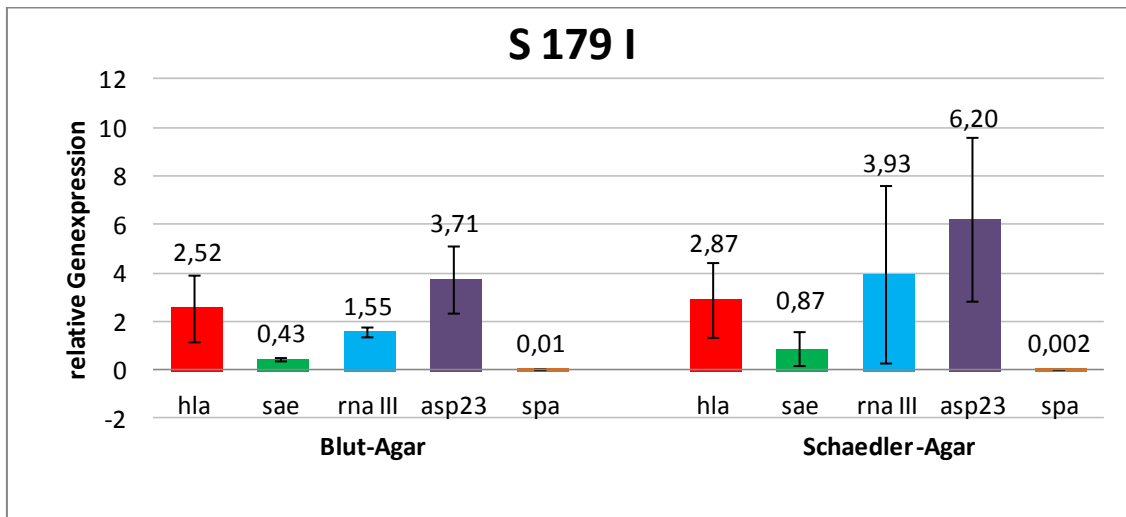


Abb. 36: Genexpression von S 179 I auf den Agarkulturen

S 179 I transkribierte *hla*, *sae*, RNA III und *asp23* erfolgreich. Wie schon bei S 348 I aus Gruppe I konnte *spa* weder beim Wachstum des Stammes in der Flüssigkultur noch in den Kolonien nachgewiesen werden. *hla* und *sae* erreichen ihr Maximum in der stationären Phase, während RNA III und *asp23* ihr Maximum bereits in der

postexponentiellen Phase erreichten. Auf Blut- und Schaedler-Agar wurde *hla* gleich stark transkribiert. Bei *sae*, RNAIII und *asp23* steigerte sich die Expression auf Schaedler-Agar auf das Doppelte.

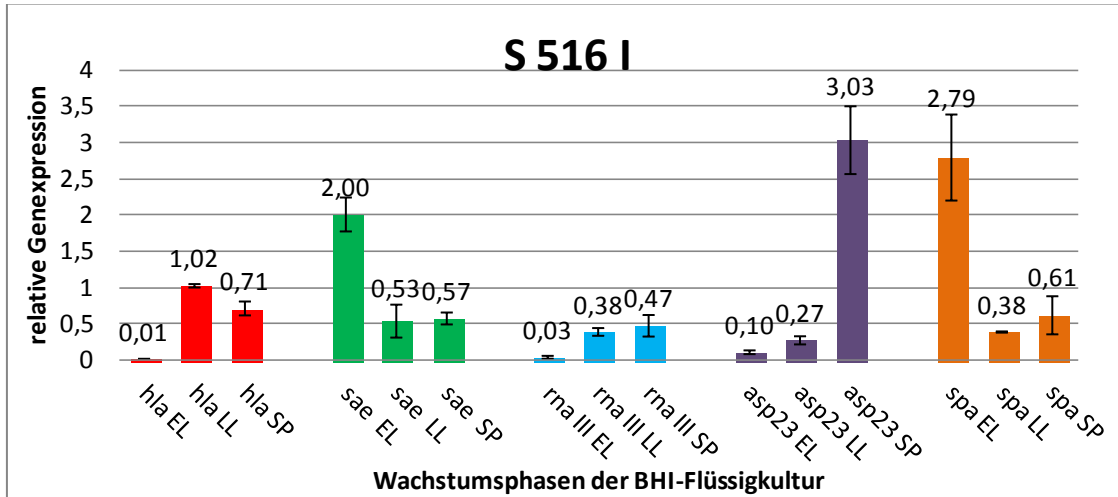


Abb. 37: Genexpression von S 516 I in der Flüssigkultur

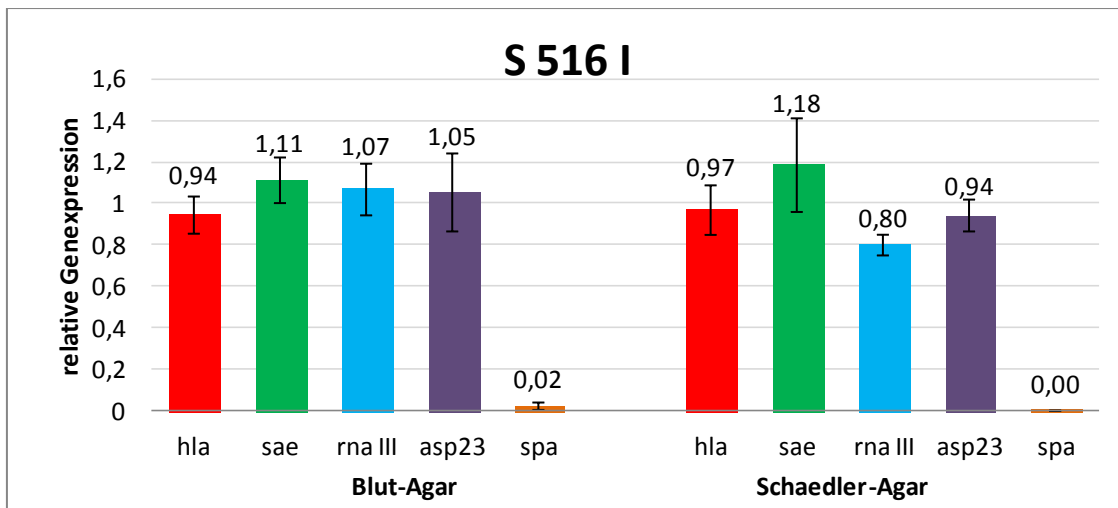


Abb. 38: Genexpression von S 516 I auf den Agarkulturen

In der BHI-Flüssigkultur werden alle Gene und Regulatoren von S 516 I erfolgreich exprimiert (Abb. 37). *sae* und *spa* erreichten ihr Maximum bereits in der frühen exponentiellen Phase. Dies war bei keiner der Mutanten oder Laborstämmen zu beobachten. Wie schon bei den Laborstämmen wurde RNA III in der postexponentiellen Phase am stärksten transkribiert. *asp23* zeigte die höchste Transkriptionsrate in der stationären Phase, *hla* dagegen bereits in der postexponentiellen Phase. Obwohl *spa* von

S 516 I beim Wachstum in der Flüssigkultur exprimiert wurde, konnte es auf Blut- und Schaedler-Agar nicht nachgewiesen werden (Abb. 38). Die übrigen Gene und Regulatoren (*hla*, *sae*, *asp23*) wurden auf beiden Agar-Medien etwa gleich stark produziert, wobei RNA III auf Schaedler-Agar etwas geringer exprimiert worden war.

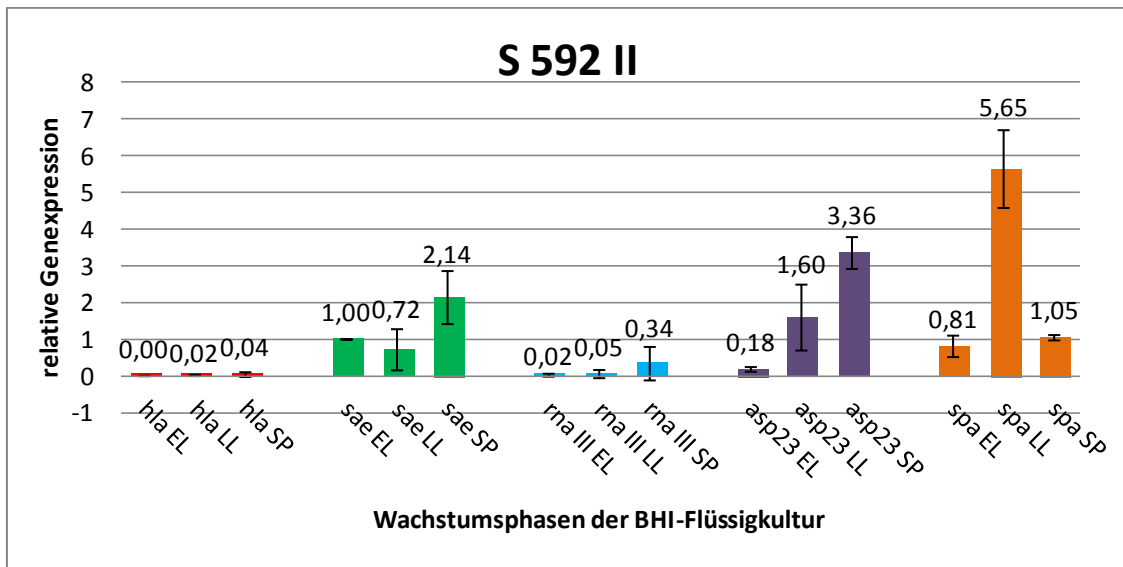


Abb. 39: Genexpression von S 592 II in der Flüssigkultur

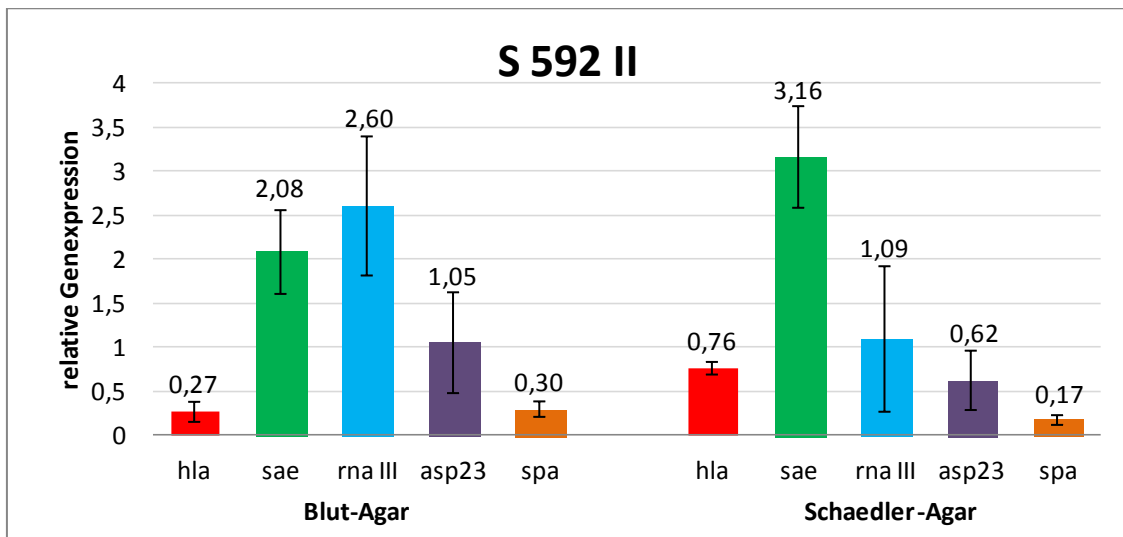


Abb. 40: Genexpression von S 592 II auf den Agarkulturen

Auffällig war bei S 592 II, dass *hla* im Flüssigmedium nicht exprimiert worden war, wohingegen es erfolgreich auf dem festen Nährmedium exprimiert wurde (Abb. 39 u. Abb. 40); auf Schaedler-Agar etwa doppelt so stark wie auf Blut-Agar. *spa* wurde wie

erwartet in der postexponentiellen Phase am stärksten exprimiert. *sae*, RNA III und *asp23* erreichten ihr Maximum erst in der stationären Phase. Es fiel auf, dass neben *hla* nur noch *sae* auf Schaedler-Agar stärker transkribiert wurde. RNA III, *asp23* und *spa* zeigten jedoch bei diesem Stamm eine stärkere Expression auf Blut-Agar.

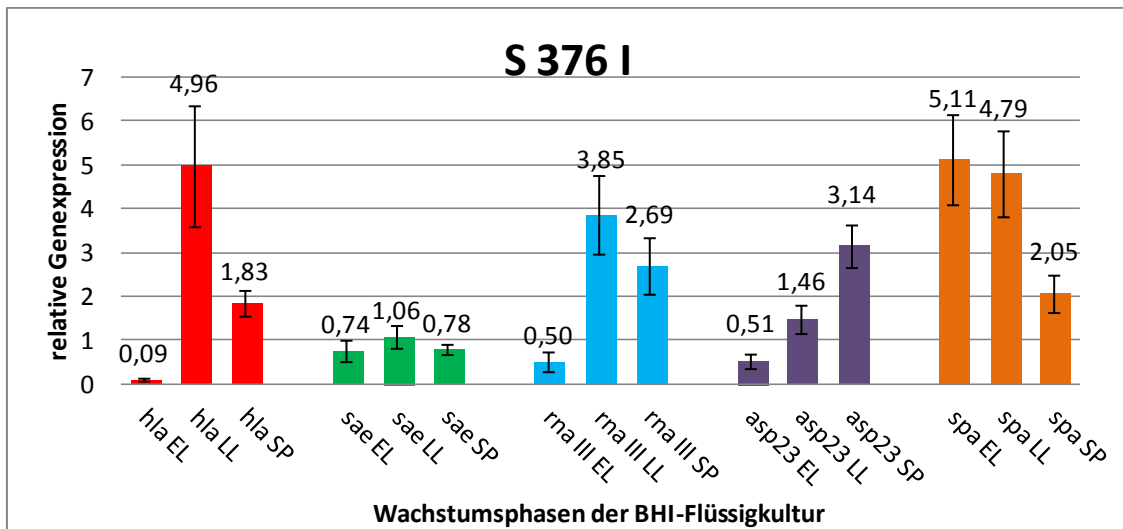


Abb. 41: Genexpression von S 376 I in der Flüssigkultur

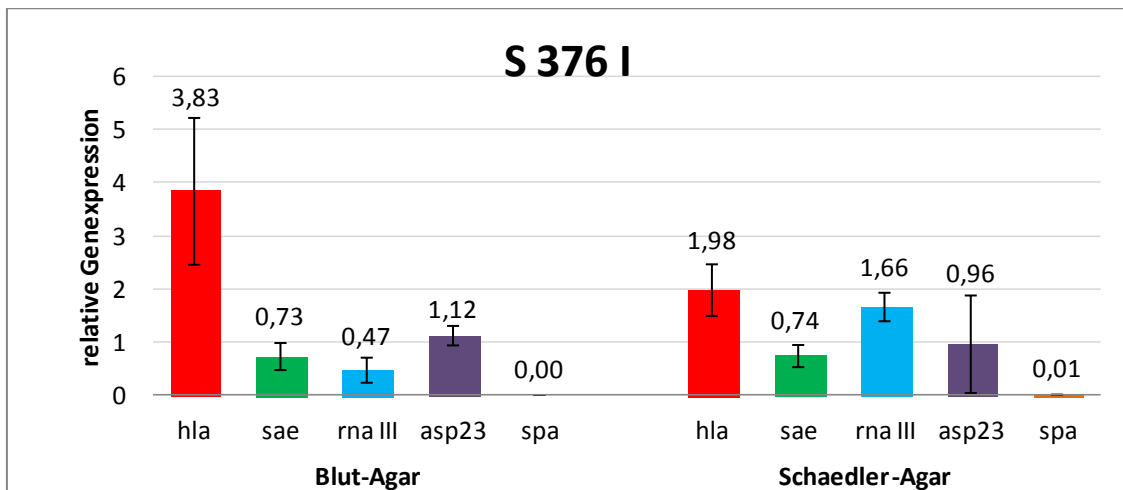


Abb. 42: Genexpression von S 376 I auf den Agarkulturen

S 376 I transkribierte im Flüssigmedium sämtliche fünf Gene und Regulatoren erfolgreich (Abb. 41). Sowohl *hla*, *sae* als auch RNA III erreichten ihr Maximum in der postexponentiellen Phase. Dagegen steigerte *asp23* sein Maximum bis zur stationären Phase. *spa* exprimierte in der frühen exponentiellen Phase am stärksten. Bei *sae* und *asp23* war zwischen Blut-Agar und Schaedler-Agar kein Unterschied in der Höhe der

Expression erkennbar. *hla* wurde auf Blut-Agar stärker und RNA III schwächer exprimiert. *spa* ließ sich im Gegensatz zur Anzucht in der Flüssigkultur auf Blut- und Schaedler-Agar nicht nachweisen (Abb. 42).

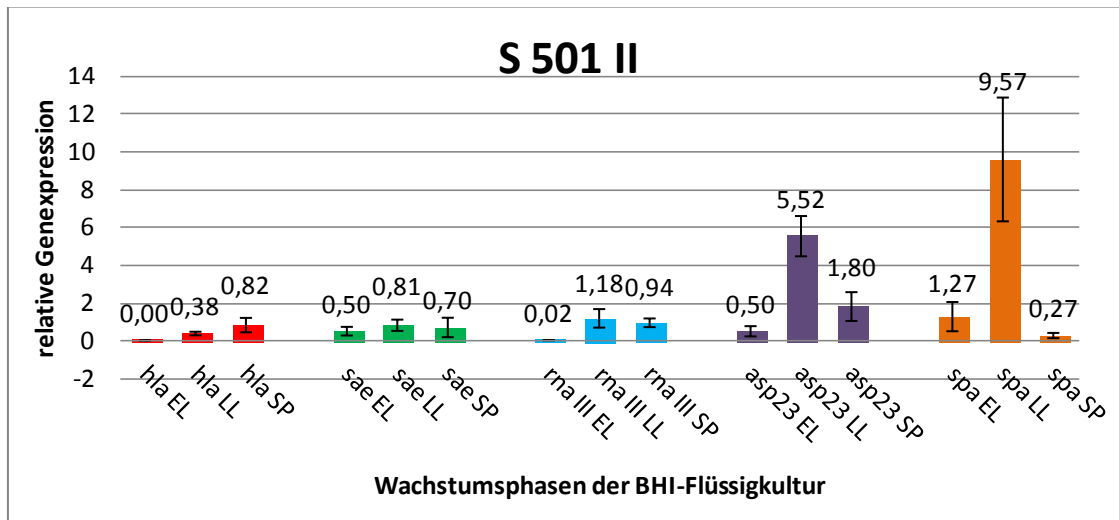


Abb. 43: Genexpression von S 501 II in der Flüssigkultur

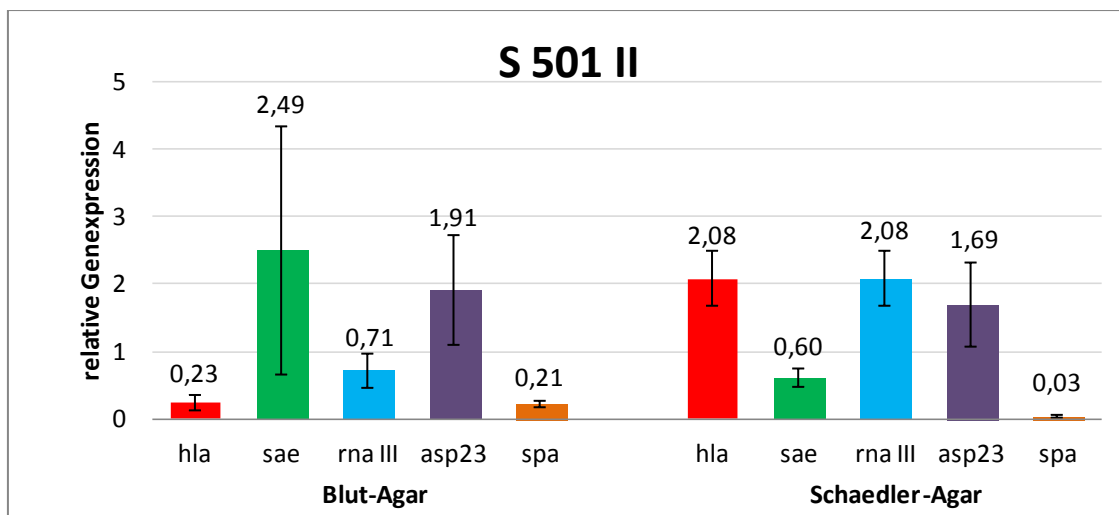


Abb. 44: Genexpression von S 501 II auf den Agarkulturen

Der Stamm S 501 II zeigte eine erfolgreiche Expression der untersuchten Gene und Regulatoren im Flüssigmedium BHI (Abb. 43). Die größte Menge an *hla*-RNA wurde in der stationären Phase transkribiert. Bei *sae*, RNA III, *asp23* und *spa* war das Maximum bereits in der postexponentiellen Phase erreicht.

Auf Schaedler-Agar wurde *hla* fast 10fach so stark transkribiert wie auf Blut-Agar

Abb. 44). Eine höhere Transkription auf Blut-Agar ließ sich bei *sae*, *asp23* und *spa* nachweisen. Dagegen war die Expression von RNA III auf Schaedler-Agar am stärksten.

In der **Gruppe II** wurden in der Flüssigkultur von fast allen Stämmen die untersuchten Regulatoren und Virulenzgene exprimiert. Es fiel auf, dass *hla* des Stamms S 592 II in BHI kein relevantes Transkript bildete, jedoch war *hla* auf Blut- und Schaedler-Agar nachweisbar. Bei dem Isolat S 179 I scheint es sich möglicherweise um eine *spa*-Mutante zu handeln, da in keinem der Medien ein *spa*-Transkript nachgewiesen wurde. Auch in den Kolonien, die auf Blut- und Schaedler-Agar wuchsen, konnte bei drei Stämmen (S 66 I, S 516 I, S 376 I) kein relevantes *spa*-Transkript nachgewiesen werden. Allerdings gelang eine erfolgreiche Expression in den Flüssigkulturen dieser Isolate, so dass bei der Untersuchung der Kolonien möglicherweise die *spa*-RNA bereits schon abgebaut worden war. Die übrigen vier Gene bzw. Regulatoren dieser drei Isolate wurden dafür auf beiden Agarmedien erfolgreich exprimiert. S 66 I zeigte im Vergleich zu den anderen fünf Isolaten das schwächste Hämolyseverhalten (Blut-Agar Stufe 1, Schaedler-Agar Stufe 2). Dafür waren hier die Unterschiede in der relativen Expressionsmenge von Blut- zu Schaedler-Agar am größten (Abb. 34). Bei den Stämmen, die auf beiden Kulturplatten einen hohen Hämolysegrad erreichten, wie S 376 I und S 501 II, zeigte sich eine Steigerung des Transkripts auf Schaedler-Agar nur beim Regulator RNA III. *hla* wurde sogar auf Schaedler-Agar weniger stark exprimiert und bei *sae* und *asp23* waren keine relevanten Veränderungen in der Expressionsmenge nachweisbar (Abb. 42).

Der **Gruppe III** wurden aufgrund ihrer phänotypischen Gemeinsamkeit die Isolate S 605 I, S 568 I, S 1344, S 1365 I und S 1365 II zugeordnet, da sie sowohl auf Blut- als auch auf Schaedler-Agar die stärkste Hämolyse entwickelten.



Abb. 45: Isolat S 1365 I mit Hämolysestufe 4 auf Blut -(li) und Schaedler-Agar (re)

Zwei Isolate (S 1365 I, S 1344) wiesen sowohl auf Blut- als auch auf Schaedler-Agar eine weiße Pigmentierung auf. S 568 I war auf beiden Agarplatten gelb pigmentiert und die restlichen zwei Isolate (S 1365 II, S 605 I) zeigten eher eine weiße Pigmentierung auf Blut-Agar und ein gelbes Pigment auf Schaedler-Agar (Tabelle 10, s.S. 35).

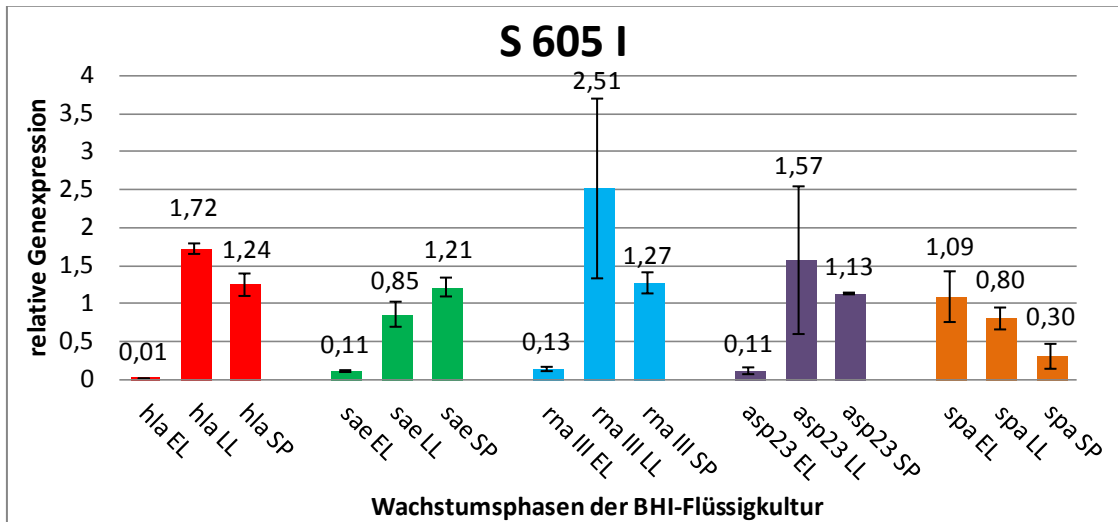


Abb. 46: Genexpression von S 605 I in der Flüssigkultur

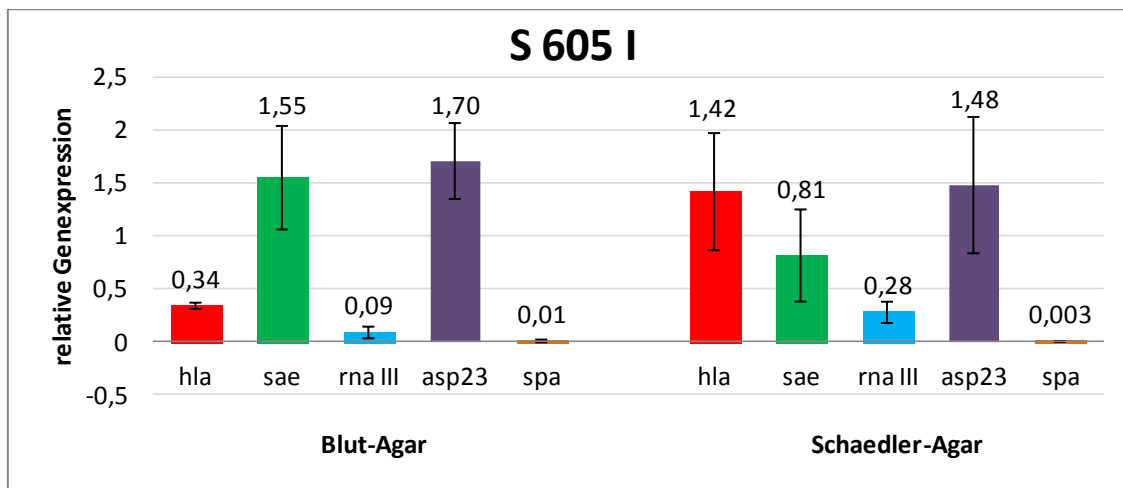


Abb. 47: Genexpression von S 605 I auf den Agarkulturen

S 605 I transkribierte die untersuchten Gene und Regulatoren beim Wachstum im Flüssigmedium erfolgreich (Abb. 46). Sowohl *hla*, RNA III als auch *asp23* hatten das Maximum der Transkription in der postexponentiellen Phase erreicht. Bei *sae* steigerte sich die Expression hin bis zur stationäre Phase und bei *spa* war das Maximum bereits in der frühen exponentiellen Phase erreicht.

Beim Wachstum der Kolonien auf Blut- und Schaedler-Agar fiel wie schon bei einigen zuvor beschriebenen Stämmen eine äußerst geringe Expression von *spa* auf. *hla* und RNA III wurden auf Schaedler-Agar mindestens doppelt so stark transkribiert (Abb. 47). Dagegen sah man bei *sae* und *asp23* eine geringere Expression auf Schaedler-Agar im Vergleich zu Blut-Agar.

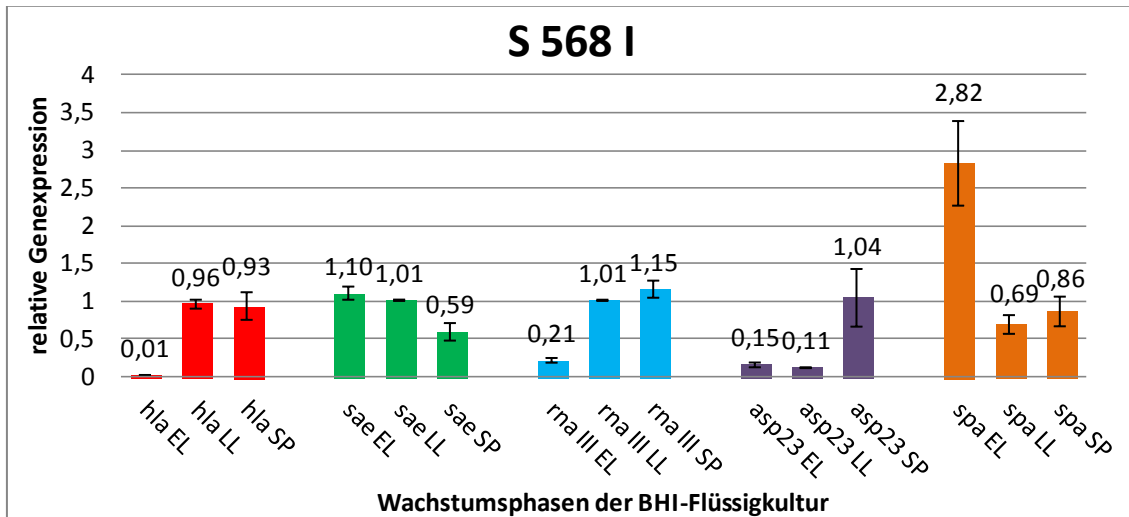


Abb. 48: Genexpression von S 568 I in der Flüssigkultur

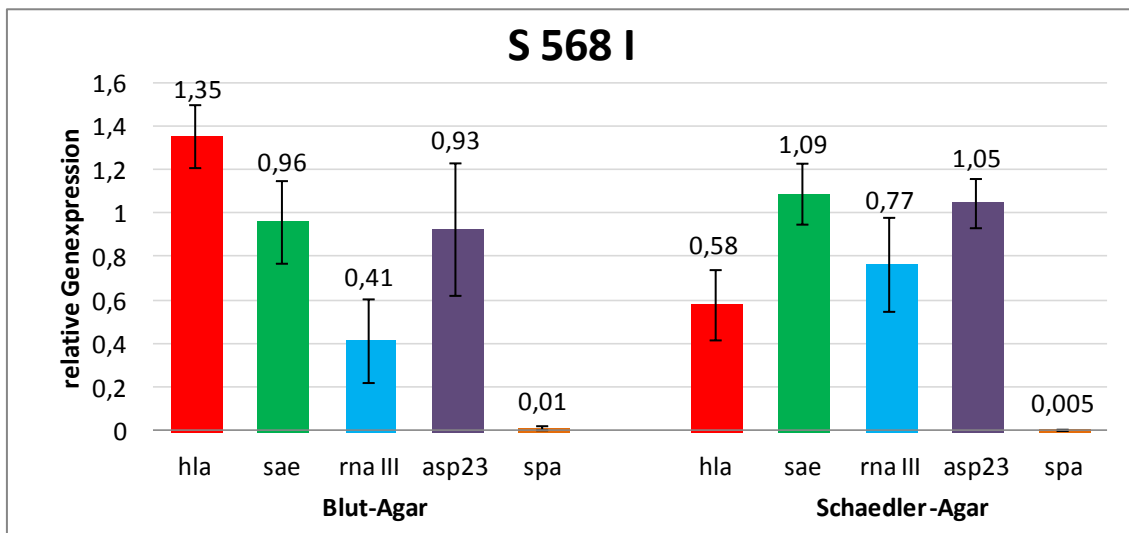


Abb. 49: Genexpression von S 568 I auf den Agarkulturen

S 568 I exprimiert in der Flüssigkultur die untersuchten Gene und Regulatoren erfolgreich. Hier fiel auf, dass *hla* sein Maximum bereits in der postexponentiellen Phase erlangte und in der stationären Phase gleich viel RNA-Transkript produzierte (Abb. 48). Bei *sae* und *spa* zeigte sich die höchste Expression bereits in der frühen exponentiellen Phase. RNA III und *asp23* dagegen steigerten ihre Expression bis hin zur stationären Phase.

Trotz der hohen Hämolysestufe wurde *hla* auf Schaedler-Agar in geringerem Maße exprimiert als auf Blut-Agar. Eine höhere Transkriptionsmenge auf Schaedler-Agar sah man bei diesem Stamm nur bei RNA III (Abb. 49). *sae* und *asp23* produzierten etwa

eine gleiche Menge an RNA-Transkript auf beiden Agar-Medien. *spa* wurde weder auf Blut- noch auf Schaedler-Agar erfolgreich exprimiert, trotz der Expression im Flüssigmedium BHI.

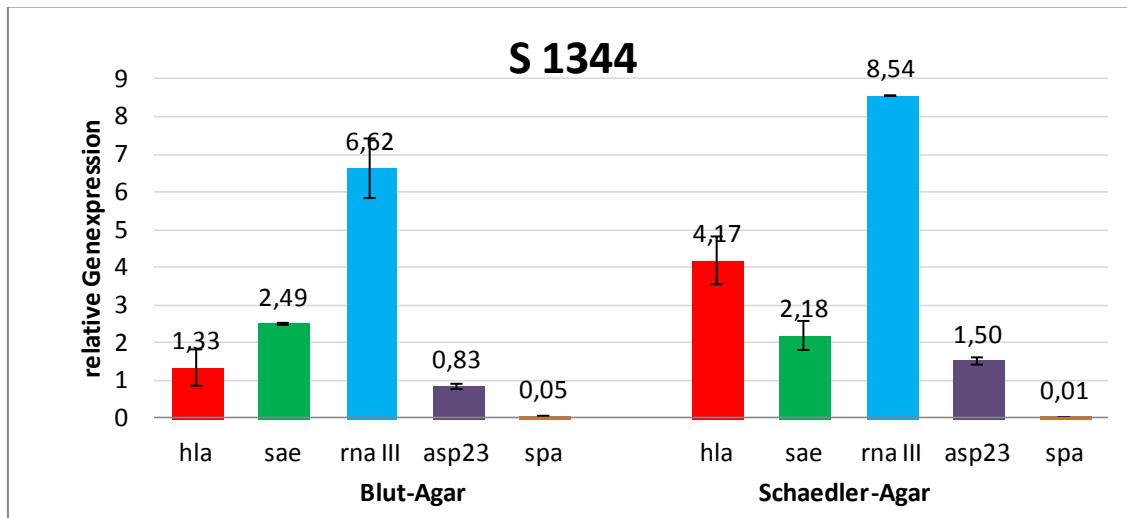


Abb. 50: Genexpression von S 1344 auf den Agarkulturen

Ergänzend wurde **S 1344** untersucht, allerdings nur auf Blut- und Schaedler-Agar, da dieses Isolat, wie nur selten beobachtet, auf beiden Agar-Medien weiße Kolonien ausbildete. *hla* steigerte seine Expression auf Schaedler-Agar noch um mehr als das Doppelte. Bei *sae* war die Transkription gleich hoch ausgefallen. Die Expression von *asp23* verdoppelte sich fast auf Schaedler-Agar. RNA III zeigte in beiden Agarmedien eine erfolgreiche Transkription, wobei diejenige auf Schaedler-Agar noch stärker ausgeprägt war. Die Expression von *spa* war dagegen auf beiden Agar-Medien fast nicht nachweisbar.

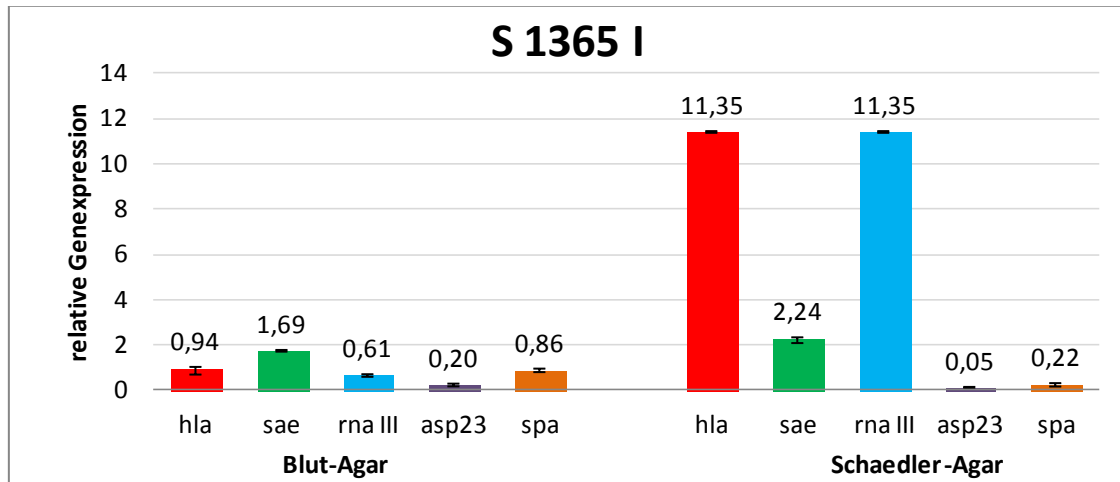


Abb. 51: Genexpression von S 1365 I auf den Agarkulturen

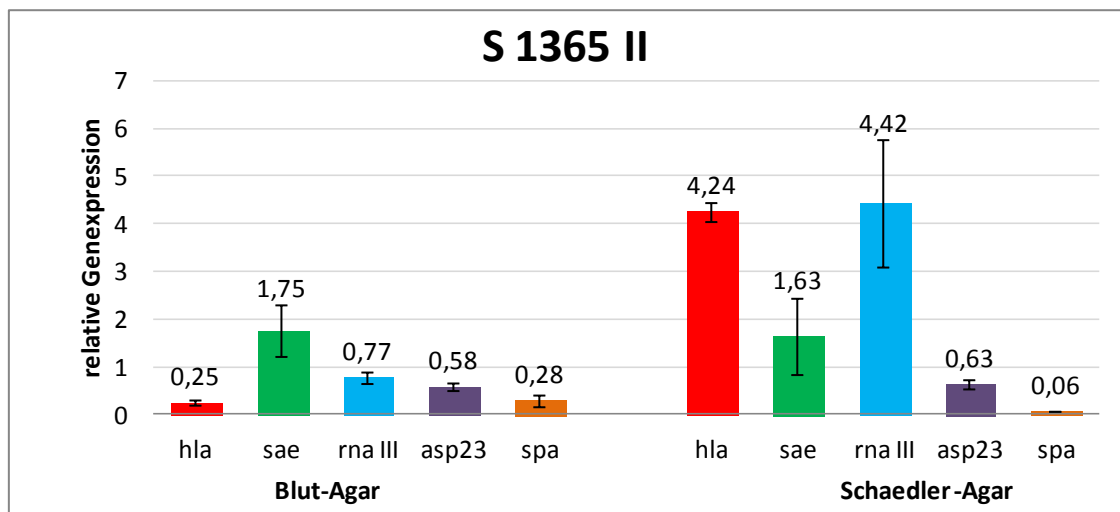


Abb. 52: Genexpression von S 1365 II auf den Agarkulturen

Die beiden **Stämme S 1365 I** und **II** wurden hinsichtlich ihres Transkriptionsverhaltens nur auf Blut- und Schaedler-Agar untersucht, da sie zwar aus derselben klinischen Probe eines Patienten isoliert wurden, jedoch auf Blut- und Schaedler-Agar einen unterschiedlichen Phänotyp ausbildeten. S 1365 I bildete auf beiden Medien weiße Kolonien aus und S 1365 II die häufigere Variante: auf Blut-Agar weiße Kolonien und auf Schaedler-Agar gelbe Kolonien. Bei beiden Stämmen zeigte sich eine mehr als zehnfach so ausgeprägte Transkription von *hla* auf Schaedler-Agar. Auch bei RNA III sah man eine deutliche Steigerung in der Expressionsrate auf Schaedler-Agar. Dagegen wurde bei *sae* kein relevanter Unterschied in der Menge der Transkription nachgewiesen. Bei S 1365 I war die Expression auf Schaedler-Agar etwas stärker,

jedoch sah man bei S 1365 II keinen großen Unterschied. *spa* zeigte bei beiden Stämmen eine relevante Reduktion in der Transkriptionsmenge.

Die **Gruppe III** fasst diejenigen Isolate zusammen, die auf Blut- und Schaedler-Agar die größte Hämolysezone (Stufe 4) entwickelten. Wie schon in der Gruppe II, fiel bei zwei Isolaten (S 605 I und S 568 I) auf, dass ein *spa*-Transkript in den Kolonien auf den Agarmedien nicht nachgewiesen werden konnte, trotz einer erfolgreichen Expression von *spa* in der Flüssigkultur. Der Regulator RNA III wurde in allen fünf Stämmen in den Kolonien auf Schaedler-Agar stärker exprimiert als auf Blut-Agar. Bei S 1365 I war die Transkription um mehr als das 10fache gesteigert. *asp23* zeigte nur bei S 1344 einen relevanten Unterschied, in dem es seine Expression auf Schaedler-Agar fast verdoppelte. Die übrigen Isolate wiesen keinen relevanten Unterschied in ihrer Transkriptionsmenge von *asp23* im Agarmedium auf. S 568 I entwickelte als einziges Isolat der Gruppe auf beiden Agarmedien gelbe Kolonien. Die Expression von *hla* war auch nur bei diesem Isolat auf Blut-Agar stärker als auf Schaedler-Agar. Alle anderen Isolate wiesen auf Blut-Agar eine geringere Expression von *hla* auf und produzierten auf Blut-Agar weiße Kolonien. Außerdem ließ sich die Verbindung zwischen *sae* und *hla* darstellen. Es ist bekannt, dass *sae* die Expression der α - und β -Hämolysine steigert. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Gruppe wieder. Einer erfolgreichen Transkription von *sae* folgte die ebenfalls erfolgreiche Expression von *hla* im entsprechenden Medium.

4.3.2.1 Die relative Expression der klinischen Isolate bei dem Wachstum auf Blut- und Schaedler-Agar im Vergleich

Es wurde die relative Expression der mRNA beim Wachstum der Isolate auf Blut- und Schädler-Agar untersucht.

Die Expression des Virulenzgens *hla*, welches vom *agr* Locus reguliert wird und für das α -Toxin kodiert, zeigte bei den 16 klinischen *S. aureus*-Isolaten z. T. Unterschiede in der relativen Transkriptionsmenge. 7 Isolate hatten auf Schaedler-Agar eine stärkere Transkription als auf Blut-Agar, 5 Isolate eine geringere Expression auf Schaedler-Agar. Bei den restlichen 4 Isolaten konnte keine Änderung in der Expression dargestellt werden.

Das Virulenzgen *spa*, das ebenfalls vom *agr*-Locus reguliert wird, kodiert für das Protein A. 3 Isolate zeigten auf Blut-Agar eine geringere Transkription als auf Schaedler-Agar und bei 12 Isolaten verhielt es sich umgekehrt. Bei einem Isolat konnte keine veränderte Transkription festgestellt werden.

Auffällig war, dass RNA III als Effektorgen von *agr* bei 12 Isolaten auf Schaedler-Agar stärker exprimiert wurde als auf Blut-Agar. Bei 3 Isolaten verhielt es sich umgekehrt. Ein Stamm zeigte eine gleich starke Expression auf beiden Agarmedien.

asp23 kodiert für das Alkalische-Schock-Protein und steht unter der Kontrolle des alternativen Stress-Sigma-Faktors σ^B . 6 Isolate exprimierten *asp23* auf Schaedler-Agar stärker als auf Blut-Agar. Eine höhere Transkription auf Blut-Agar zeigte sich dagegen bei 5 Isolaten. In weiteren 5 Isolaten konnte keine vermehrte Expression nachgewiesen werden.

Der Genlocus *sae*, bestehend aus den zwei Komponenten *saeR* und *saeS*, kodiert für viele Exoproteine. Mit 7 Isolaten war bei fast der Hälfte der Isolate die Transkription auf Schaedler-Agar höher als auf Blut-Agar. 4 Isolate wiesen eine höhere Expression auf Blut-Agar auf. Die übrigen 5 Isolate zeigten keinen relevanten Unterschied in der Expression im Vergleich von Blut- auf Schaedler-Agar.

4.3.2.2 Zusammenfassung der Ergebnisse von Blut- und Schaedler-Agar

Isolat	Hämolyse B/Sch	Pigment B/Sch	β -Toxin B/Sch	<i>hla</i>	<i>sae</i>	RNAIII	<i>asp23</i>	<i>spa</i>
RN 6390	3/4	w/w	j/j	10	0	10	2	0
8325-4	4/4	w/w	n/n	10	0	10	2	0
SH 1000	3/4	g/g	n/j	10	2	10	2	0
<i>agr</i> -	0/0	w/w	n/n	-	-	ne	-	-
<i>sar</i> -	2/4	w/w	n/n	-	-	0	2	-
<i>agr</i> -/ <i>sar</i> -	0/0	w/w	n/n	-	-	ne	0	0
<i>sigB</i> -	2/4	w/w	j/j	2	2	2	0	0

Isolat	Hämolyse B/Sch	Pigment B/Sch	β -Toxin B/Sch	<i>hla</i>	<i>sae</i>	RNAIII	<i>asp23</i>	<i>spa</i>
S 198 II	0/0	g/g	n/n	0	2	2	2-10	2
S 348 I	0/1	g/g	n/n	-	2	10	2	0
S 385 IV	0/2	w/g	n/n	-	-	-	0	-
S 1368 II	0/3	g/g	n/n	0	0-2	2	10	2
S 1368 III	0/3	g/w	n/n	-	0	0	-	-
S 66 I	1/2	g/g	n/n	2	2	10	10	-
S 179 I	1/4	w/g	n/n	0	2	2	2	-
S 516 I	2/3	g/g	n/n	0	0	-	0	0
S 592 II	2/3	w/g	n/n	2	0-2	-	-	-
S 376 I	3/4	g/g	n/n	-	0	2	0	0
S 501 II	3/4	w/g	n/n	10	-	2	-	-
S 1365 I	4/4	w/w	n/n	10	0-2	10	-	-
S 1365 II	4/4	w/g	n/n	10	0	2	0	-
S 605 I	4/4	w/g	n/n	2	-	2	-	-
S 1344	4/4	w/w	n/n	2	-	0-2	2	-
S 568 I	4/4	g/g	n/n	-	0	2	0	-

Tabelle 11: Legende: w: weiß, g: gelb, n: nein, j: ja. 2: Änderung mindest. doppelt so hoch; 10: Änderung fast 10fach so hoch; - : geringere Transkription; 0: keine Änderung; ne: nicht exprimiert

Tabelle 11 gibt eine vergleichende Übersicht über die Expression der einzelnen Virulenzgene und Regulatoren auf Blut- und Schaedler-Agar. „2“ bedeutet, dass die relative Menge des jeweiligen Transkripts auf Schaedler-Agar mindestens doppelt so hoch war als auf Blut-Agar. Die „10“ steht für ein fast 10fach so hohes Transkript auf Schaedler-Agar. Das Minus besagt, dass die Expression auf Schaedler-Agar geringer war als auf Blut-Agar. Ergänzend dazu sind das Ausmaß der Hämolyse auf Blut- und Schaedler-Agar, die Ausbildung von β -Toxin sowie die Pigmentierung aller Stämme mit aufgelistet.

4.3.2.3 Die Veränderung des Hämolyse-Verhaltens verglichen mit der Veränderung der Transkription von RNAIII auf Blut- und Schaedler-Agar

Da RNA III *hla* positiv reguliert und *hla* für die Hämolyse verantwortlich ist, wird davon ausgegangen, dass bei einer gesteigerten Expression von RNAIII auch das Hämolyseverhalten auf Blutagar stärker ausgeprägt sein sollte.

Die Einteilung der Hämolyse fand nach einem vorgefertigten Beschreibungsbogen (Anhang) statt und wurde mit 0 (keine Hämolyse) bis 4 (maximale Hämolyse) beschrieben. Dabei kam es vor, dass der Unterschied in der Hämolyse im Vergleich der Kolonien von Blut- und Schaedler-Agar nur eine oder auch mehrere Stufen betrug. Möglich war auch eine sehr starke Hämolysezone auf Schaedler-Agar und gar keine oder nur geringste Hämolyse auf Blut-Agar.



Abb. 53: S 179 I mit Hämolysegrad 1 auf Blut-Agar (li) und Hämolysegrad 4 auf Schaedler-Agar (re)

Bei 12 Isolaten zeigte sich eine Steigerung der RNA III-Transkription auf Schaedler-Agar. Dies trat bei 3 von 5 Isolaten ohne Hämolyse auf Blut-Agar, bei 4 von 6 Isolaten mit geringer bis mäßiger Hämolyse auf Blut-Agar und bei 5 von 5 Isolaten mit starker Hämolyse auf Blut-Agar auf.

4.3.2.4 Die Unterschiede in der Pigmentierung der Kolonien auf Blut- und Schaedler-Agar verglichen mit der jeweiligen *asp23*-Expression

In früheren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass ein Zusammenhang zwischen der phänotypischen Pigmentierung und der Expression des Stress-Sigma-Faktors σ^B besteht. Ein Produkt des σ^B -Faktors, das eine Aussage über die Aktivität von σ^B erlaubt, ist das *asp23*. Wenn das σ^B -Gen in einem *S. aureus* Stamm nicht transkribiert wird, sind die Kolonien des Phänotyps weiß. Bei vorhandener Transkription des σ^B -Gens können die Kolonien eine gelb-goldene Färbung annehmen. Es stellt sich somit die Frage, ob sich bei einer Veränderung der Pigmentierung der Kolonien von Blut- nach Schaedler-Agar auch die Expression des σ^B , gemessen durch *asp23*, entsprechend verändert.

Zum Vergleich wurde von einer $\Delta sigB$ -Mutante das Transkriptionsprofil des Wachstums auf Blut- und Schaedler-Agar ermittelt. Die Kolonien hatten eine weiße Farbe, was auf eine verminderte *sigB*-Transkription schließen lässt. In der RT-PCR war das Transkript *asp23* sowohl von Blut- als auch von Schaedler-Agar nahezu Null.

Bei den klinischen Isolaten zeigte sich häufig eine Pigmentierung von weißen Kolonien auf Blut- und gelben Kolonien auf Schaedler-Agar. Dies Verhalten trat bei 6 der 16 untersuchten klinischen Isolate auf. Von diesen wies lediglich 1 Isolat (S179 I) auf Schaedler-Agar die vermutete höhere Expression von *asp23* auf. 4 Isolate zeigten ein annähernd gleich hohes Transkript auf beiden Agarmedien. Ein Transkript (S 592 II) zeigte sogar auf Blutagar die höhere Expression von *asp23*.

Ebenfalls häufig zu beobachten war das Auftreten von Isolaten mit Kolonien einer gelb-goldenen Farbe. So wuchsen 7 von 16 Isolaten mit gelbem Pigment auf beiden Agarmedien. Auch hier war eine Differenz zwischen der relativen Menge von *asp23* auf Blut- und Schaedler-Agar zu beobachten. 4 Isolate zeigten eine doppelt bis zehnfach erhöhte Expression von *asp23* auf Schaedler-Agar. 3 Isolate exprimierten *asp23* auf beiden Agarmedien gleich stark.

Seltener ist das Auftreten von weißen Kolonien sowohl auf Blut- als auch auf Schaedler-Agar, was nur bei 2 der untersuchten klinischen Isolate der Fall war. Beide Isolate transkribierten auf beiden Agarmedien eine geringe Menge an *asp23*.

5 Diskussion

Die zystische Fibrose ist in der westlichen Bevölkerung die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung, die durch eine Mutation im CFTR-Gen zustande kommt. Einer der wichtigsten therapeutischen Ansätze ist die Behandlung rezidivierender bronchopulmonaler Infekte, die leider auch heute noch einen lebenslimitierenden Faktor bei CF-Patienten darstellen. Einer der bedeutsamsten Erreger dieser Infektionen ist *S. aureus*. Die Identifizierung der Erreger findet in erster Linie in der mikrobiologischen Diagnostik durch die Kultivierung des Erregermaterials aus Nasen-, Rachenabstrichen oder Sputum statt. Üblicherweise wird Selektivagar verwendet, der andere Erreger im Wachstum inhibiert, und das Wachstum von *S. aureus* fördert. Für die Identifizierung von *S. aureus* wird gewöhnlich Columbia-Blut-Agar und Mannitol-Salz-Agar verwendet.

Zur phänotypischen Analyse der *S. aureus* Isolate aus dem Respirationstrakt von CF-Patienten wurden die klinischen Proben auf verschiedene Agarplatten ausgestrichen und das Wachstum der Kolonien nach Bebrütung über Nacht charakterisiert. Üblich ist dabei die Verwendung von Columbia-Blut-Agar. In der CF-Studie, die die Grundlage für die vorliegende Arbeit bildete, wurden die *S. aureus*-Isolate zusätzlich auf Schaedler-Agar ausgestrichen und unter 5% CO₂ bebrütet. Denn es wurde beobachtet, dass Unterschiede im Phänotyp der einzelnen Isolate meist auf Schaedler-Agar noch besser zu erfassen sind, da sich die Pigmentierung der Kolonien und das Hämolyseverhalten noch besser ausprägen. Bei Schaedler-Agar handelt es sich um einen nicht-selektiven Nährboden, der üblicherweise zur Kultivierung von anaeroben Bakterien eingesetzt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte klinische Isolate aus der CF-Studie und ausgewählte Laborstämme und Mutanten auf Blut- und Schaedler-Agar bebrütet, deren Phänotyp beschrieben und anschließend eine RNA-Isolierung für die Untersuchung der Transkription vorgenommen. Ziel war es, das Transkriptionsprofil verschiedener Virulenzgene und -regulatoren dieser Stämme auf Blut- und Schaedler-Agar mit dem Verfahren der RT-PCR vergleichen zu können. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob es möglich sei, vom phänotypischen Erscheinungsbild der Kolonien auf Agarmedien, Columbia-Blut- und Schaedler-Agar, auf das Transkriptionsprofil

wichtiger Virulenzregulatoren und -gene von *S. aureus* schließen zu können. Es wurden die globalen Regulatoren *sae*, *agr* durch die Ermittlung von RNAIII und *sigB* durch die Bestimmung von *asp23*, sowie die Virulenzgene *hla* und *spa* untersucht. Da es nicht üblich ist, RNA-Isolierung von Agarplatten durchzuführen, wurden die untersuchten Stämme zusätzlich noch in einer BHI-Flüssigkultur angezüchtet und aus diesen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstumsverlaufes RNA-Isolierungen durchgeführt. Zu drei voneinander unabhängigen Zeitpunkten wurden die Wachstumsphasen eines jeden Stammes ermittelt: frühe exponentielle, späte exponentielle und stationäre Phase. BHI wurde als Flüssigmedium gewählt, da sich hier nach ca. 8 Stunden der typische exponentielle Wachstumsverlauf entwickelte. Zum Vergleich wurde zu Beginn auch das Flüssigmedium TSB verwendet, in dem sich allerdings kein klarer exponentieller Wachstumsverlauf abzeichnete, so dass die einzelnen Wachstumsphasen nicht eindeutig abzugrenzen waren. Daher wurde TSB als Flüssigmedium wieder verworfen.

Jeder *S. aureus*-Stamm wurde dreimal auf Blut- und Schaedler-Agar bzw. in der Flüssigkultur angezüchtet, um zu drei unabhängigen Zeitpunkten die RNA isolieren zu können. Von jedem RNA-Isolat wurde eine Doppelbestimmung in der RT-PCR durchgeführt.

Unterschiede im genetischen Hintergrund der einzelnen *S. aureus*-Stämme können zu einem völlig unterschiedlichen Transkriptionsprofil bei der Genexpression führen. Die klinischen Isolate befanden sich längere Zeit (Einschlusskriterium war eine Persistenz von mindestens sechs Monaten) im Respirationstrakt der CF-Patienten. Bei rezidivierenden Infektionen mit entsprechender klinischer Symptomatik aufgrund der Abwehrschwäche ist es notwendig, diese Patienten wiederholt mit Antibiotika zu behandeln. Die Erreger entwickeln zunehmend Resistenzen und Veränderungen im Erbgut, um der Immunantwort des Wirts und der Wirkung der Antibiotika zu entgehen. So kommt es zu einer veränderten Transkription der Regulatoren und Virulenzgene von *S. aureus*. Longitudinalstudien haben bereits gezeigt, dass Stämme, die denselben genetischen Hintergrund haben, wiederholt aus dem Respirationstrakt von CF-Patienten isoliert wurden und somit chronische Infektionen durch einen einzelnen Stamm verursacht werden können (4). Vor allem bei chronischen Infektionen ist *S. aureus* einem starken Selektionsdruck unterworfen, der durch die Therapie mit Antibiotika, durch die Immunantwort des Wirts aber auch durch Co-Infektionen mit anderen

Mikroorganismen verursacht wird (23). So lässt sich möglicherweise die durchaus sehr unterschiedliche Expression der in dieser Arbeit untersuchten Gene erklären, auch wenn diese Isolate ein ähnliches phänotypisches Erscheinungsbild aufwiesen. In dieser Arbeit wurden Isolate in Gruppen zusammengefasst, die aus dem Respirationstrakt von verschiedenen Patienten isoliert worden waren. Hier haben sich vermutlich sehr unterschiedliche adaptive Vorgänge abgespielt, die somit auch zu einer unterschiedlich starken Expression der Virulenzgene und Regulatoren führen konnten. Ein interessanter Aspekt für weitere Untersuchungen wäre es, die Expression der Virulenzgene von Isolaten eines einzelnen Patienten zu vergleichen, um die Hypothese zu prüfen, ob die Isolate möglicherweise einen ähnlichen genetischen Hintergrund vorzuweisen haben.

Zu unterschiedlichen Ergebnissen führen auch minimale Unterschiede in den Wachstumsbedingungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Expression der Virulenzgene und -regulatoren beim Wachstum auf festem Medium wie Blut- und Schaedler-Agar und in dem Flüssigmedium BHI sehr unterschiedlich sind. Bei allen klinischen Isolaten unterschied sich das Transkriptionsprofil zwischen Flüssigmedium, Blut-Agar und Schaedler-Agar. So wurde auch *asp23* des Laborstamms 8325-4 zwar in der Flüssigkultur in allen drei Wachstumsphasen erfolgreich exprimiert, dagegen konnte dafür *asp23* auf den Agarplatten nicht suffizient nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich bei RN6390, da dieser Stamm eine *sigB*-Mutation aufweist, wie erwartet, eine nicht erfolgreiche Expression von *asp23* in allen drei Medien. Zum Vergleich war jedoch bei den vier Mutanten Δagr , Δsar , $\Delta agr/sar$ und $\Delta sigB$ eine ähnlich erfolgreiche Expression zwischen dem festem Agar-Medium und dem Flüssigmedium zu erkennen. Bei den klinischen Isolaten fiel vor allem bei den Isolaten aus der Gruppe II mit S 66 I, S 516 I und S 376 I und aus der Gruppe III mit S 605 I und S 568 I auf, dass diese zwar *spa* in der Flüssigkultur erfolgreich exprimierten, dass ein *spa*-Transkript allerdings auf den Agarmedien nicht erfolgreich nachzuweisen war. Möglicherweise spielte hier die Dauer der Inkubationszeit eine Rolle, so dass die längere Inkubation von 24 h bei den Agarplatten zu einer Instabilität der RNA von *spa* geführt haben könnte.

Wichtig war es, die Transkription der Regulatoren und Gene zusätzlich in der Flüssigkultur zu untersuchen, da hier die einzelnen Wachstumsphasen (prä-, postexponentielle und stationäre Phase) genau ermittelt werden konnten. Auf den Agarmedien wurden dagegen nur die Produkte der Gene und Regulatoren

nachgewiesen, die nach 24 Stunden Inkubation noch stabil waren. Mögliche instabile Produkte, die zu diesem Zeitpunkt schon abgebaut wurden, konnten so nicht mehr erfasst werden. Dass die Regulatoren und Virulenzgene jedoch erfolgreich exprimiert wurden, ließ sich somit durch die zusätzliche Anzucht der Isolate in den Flüssigkulturen bestätigen.

Viele Untersuchungen zur Genregulation und Expression von Virulenzfaktoren basieren auf Studien mit bekannten *S. aureus*-Laborstämmen, wie dem Stamm 8325-4.

Durch die Wahl von BHI als Flüssigmedium zeigten die Laborstämme teilweise schon ein unterschiedliches Verhalten als bisher in der Literatur beschrieben. Zum Beispiel lag das Maximum der Expression von *hla* bei 8325-4 in der späten exponentiellen Phase. Auch zeigte dieser Stamm eine Expression von *sigB*, die eigentlich nicht vorhanden sein sollte, da es sich um eine Deletion in *RsbU* handelt. RN 6390 zeigte ebenfalls ein frühes Maximum von *hla* in der späten exponentiellen Phase. Hingegen weist dieser Stamm tatsächlich die *sigB*-Deletion auf, was auch durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden konnte.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Untersuchung ist, dass eine große Variation in der Genexpression der klinischen *S. aureus*-Stämme untereinander, aber auch im Vergleich zu den Laborstämmen und Mutanten herrscht.

Desweiteren ist die initial phänotypische Charakterisierung der Kolonien auf den Agar-Platten in gewisser Weise der subjektiven Betrachtungsweise des einzelnen Untersuchers unterworfen. So können Kolonien, die nicht eindeutig in ihrer Farbe zu beschreiben sind, von einem Untersucher anders interpretiert werden als von einem anderen. Dadurch ist es z. B. schwer, definitiv zwischen weißen und gelben Kolonien zu trennen. Die in dieser Arbeit erfolgte Zusammenfassung der klinischen Isolate in Gruppen nach dem Hämolyseverhalten konnte auf diesem Hintergrund auch nicht rein objektiv erfolgen. Es ergab sich daher in der Gruppe II mit Isolaten mit gering bis mäßiger Hämolyse auf Blut-Agar die ungenaueste Einteilung. Hierdurch lassen sich möglicherweise die wenigen Gemeinsamkeiten im Transkriptionsverhalten erklären. Nur bei *spa* zeigte sich bei vier von sechs Isolaten eine geringere Expression des Transkripts auf Schaedler-Agar. Alle anderen vier Virulenzgene und -regulatoren waren bei den einzelnen Isolaten dieser Gruppe nicht miteinander zu korrelieren. Ein weiterer Ansatz wäre somit, die Isolate zum einen von mehreren unabhängigen Untersuchern

hinsichtlich der Pigmentierung der Kolonien beurteilen zu lassen. Zum anderen wäre für weitere Folgearbeiten eine strikte Trennung zwischen Isolaten mit und ohne Hämolysezone sinnvoller. Dadurch wäre eine ungenaue Beurteilung der phänotypischen Beschreibung der Kolonien vermeidbar.

Eine weitere wichtige Hypothese der Untersuchung war es, festzustellen, ob eine Korrelation zwischen dem Hämolyseverhalten und der Expression von *hla* darzustellen ist. Hierzu können vor allem die Ergebnisse der Gruppe III herangezogen werden, da in dieser Gruppe das Hämolyseverhalten am stärksten ausgeprägt war. Sowohl auf Blut- als auch auf Schaedler-Agar wurde die Stufe 4 des Hämolysegrads erreicht. Unsere Vermutung ließ sich jedoch nicht belegen. Ein Isolat (S 568 I) wies sogar eine reduzierte Expression von *hla* auf Schaedler-Agar auf, was nicht vermutet worden war. Interessanterweise konnte bei dem Laborstamm 8325-4, der auf beiden Agarmedien die maximale Hämolyse erreichte, eine sehr hohe Expression von *hla* dokumentiert werden. Dieses Ergebnis lässt sich eventuell damit begründen, dass die klinischen Isolate durch adaptive Vorgänge im Wirt Veränderungen auf RNA-Ebene durchgemacht haben, die dadurch zu nicht vergleichbaren Ergebnissen mit den Laborstämmen führen.

Interessanterweise stellten sich bei der Untersuchung 2 klinische Isolate (S 348 I, S 179 I) offenbar als *spa*-Mutanten heraus. Keines der beiden Isolate exprimierte *spa* in den einzelnen Wachstumsphasen der Flüssigkultur suffizient. Auch auf Blut- und Schaedler-Agar wurde *spa* nicht transkribiert. Im Rahmen der Studie konnte in einer anderen Untersuchung der *spa*-Typ bei beiden Isolaten ermittelt werden. Für S 179 I war dies t015, für S348 I t2845. Damit kann die Mutation zwar nicht im dem Bereich der Primer-Bindungsstelle für die *spa*-Typisierung, aber möglicherweise an anderer Stelle im Gen, erfolgt sein. In einer früheren Arbeit (1) konnte bereits 2009 gezeigt werden, dass klinische *S. aureus*-Stämme, bei denen eine *spa*-Typisierung nicht gelingt, häufig *spa*-Mutanten sind. Bei der Sequenzierung zeigten sich vor allem Deletionen in den IgG-bindenden Domänen. Allerdings konnte auch nachgewiesen werden, dass Stämme mit Deletionen in mehreren Abschnitten in der RT-PCR sehr hohe Transkriptionen von *spa* aufwiesen. Dies ist in der Weise interessant, da *spa* als wichtiger Virulenzfaktor gilt, und somit *spa*-Mutanten in *S. aureus*-Isolaten nachgewiesen werden, die zu Infektionen bei CF-Patienten geführt haben. Andererseits muss gerade bei diesen im Allgemeinen abwehrgeschwächten Patienten, der Stamm gar nicht so virulent sein, um klinisch

relevante Infektionen zu verursachen. Es wäre somit ein weiterer interessanter Ansatz, die klinischen Isolate aus dem Respirationstrakt von CF-Patienten hinsichtlich möglicher Mutationen in den Virulenzgenen zu untersuchen. Bei den Isolaten der Gruppe I, ausgenommen die *spa*-Mutante S 348 I, fielen relativ hohe *spa*-Transkripte im Vergleich zu den anderen Gruppen auf.

Bei zwei klinischen Isolaten (S 1368 II und III), die zum gleichen Zeitpunkt aus dem Respirationstrakt desselben Patienten isoliert worden waren, fiel eine ganz geringe Expression von RNA III auf. Hierbei könnte es sich um natürliche *agr*-Mutanten handeln. Ein interessantes Ergebnis, so dass man in weiteren Untersuchungen der Frage nachgehen könnte, was ursächlich für die Mutation gewesen ist.

Die Transkription von *asp23* wird durch den Regulator *sigB* beeinflusst (35). Da bei einer hohen Aktivität von *sigB* auf eine verstärkte Pigmentierung der Kolonien geschlossen werden kann, kann dies indirekt über *asp23* hergeleitet werden. Somit bildete die *sigB*-Mutante in dieser Untersuchung auch nur weiße Kolonien. Eine Transkription von *asp23* fand erwartungsgemäß nicht statt. Bei den klinischen Isolaten fand sich bei allen Isolaten, die auf beiden Agarmedien gelbe Kolonien entwickelten, eine erfolgreiche Expression von *asp23*. Allerdings wies auch der Stamm S 1344, der nur weiße Kolonien bildete, eine erfolgreiche Expression von *asp23* auf. Interessanterweise zeigte sich jedoch bei den klinischen Isolaten S 1365 I und II ein sehr ähnliches Bild in der relativen Menge der Genexpression, obwohl diese in ihrer Pigmentierung unterschiedlich waren. Denn S 1365 I zeigte auf Schaedler-Agar die seltene weiße Pigmentierung, die nur zu 24 % in der Studie beobachtet worden war. Passend dazu wurde *asp23*, als *sigB*-abhängiges Transkript, nicht erfolgreich exprimiert. Dafür zeigte S 1365 II die mit 72 % häufigeren gelben Kolonien auf Schaedler-Agar und wie erwartet, eine Expression von *asp23*.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass es nicht oder nur bedingt möglich ist, von der phänotypischen Erscheinung der klinischen Isolate auf das Transkriptionsprofil wichtiger Regulatoren und Virulenzgene von *S. aureus* zu schließen. Da bisher keine Untersuchungen zum Transkriptionsprofil der Erreger auf Agarplatten vorlagen, war ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit, dass es möglich ist, RNA der Bakterien von Agarplatten nachzuweisen, dass es Unterschiede zum Transkriptionsverhalten der Erreger auf den verschiedenen Agarplatten (Blut- und

Schaedler-Agar) unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (normale Bedingungen und CO₂) gibt und dass sich das Transskriptionsverhalten auf Agarplatten zu dem in Flüssigkulturen unterscheidet. Interessant waren auch die Ergebnisse des Transskriptionsverhaltens wichtiger Laborstämme und deren Mutanten, mit denen die klinischen Stämme verglichen wurden. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Auswahl der klinischen Isolate einige interessante klinische Mutanten gefunden (*spa*-Mutanten, *agr*-Mutanten).

Die Arbeit dient somit als Anstoß für weitere Experimente und Fragestellungen: Wie unterscheidet sich das Transkriptionsverhalten von Isolaten eines einzelnen Patienten? Treten hier möglicherweise ähnliche Mutationen auf? Inwieweit und wie häufig treten Mutationen in den Genen von diesen klinischen Stämmen auf, die die adaptiven Vorgänge der *S. aureus*-Stämme im Wirt erklären könnten? Treten diese Mutationen erst bei chronischer Infektion mit langer Persistenz im Wirt oder möglicherweise auch schon nach kurzer Zeit bei akuten Infektexazerbationen auf?

6 Literaturverzeichnis

- (1) Baum C, Haslinger-Löffler B, Westh H, Boye K, Peters G, Neumann C, et al. (2009) Non-spa-typeable clinical *Staphylococcus aureus* strains are naturally occurring protein A mutants. *J.Clin.Microbiol.* 47 (11): 3624-3629.
- (2) Bayer M, Heinrichs J, Cheung A (1996) The molecular architecture of the sar locus in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 178 (15): 4563-4570.
- (3) Bischoff M, Entenza JM, Giachino P (2001) Influence of a Functional sigB Operon on the Global Regulators sar and agr in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 183 (17): 5171-5179
- (4) Branger C, Gardye C, Lambert-Zechovsky N (1996) Persistence of *Staphylococcus aureus* strains among cystic fibrosis patients over extended periods of time. *Journal of Medical Microbiology* 45 (4): 294-301.
- (5) Chatterjee I, Kriegeskorte A, Fischer A, Deiwick S, Theimann N, Proctor RA, et al. (2008) In vivo mutations of thymidylate synthase (encoded by thyA) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 190 (3): 834-842.
- (6) Chatterjee I, Becker P, Grundmeier M, Bischoff M, Somerville GA, Peters G, et al. (2005) *Staphylococcus aureus* ClpC Is Required for Stress Resistance, Aconitase Activity, Growth Recovery, and Death. *J.Bacteriol.* 187 (13): 4488-4496.
- (7) Cheung AL, Projan SJ (1994) Cloning and sequencing of sarA of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of agr. *J.Bacteriol.* 176 (13): 4168-4172.
- (8) Cheung AL, Ying P (1994) Regulation of alpha- and beta-hemolysins by the sar locus of *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 176 (3): 580-585.
- (9) Cheung AL, Eberhardt KJ, Chung E, Yeaman MR, Sullam PM, Ramos M, et al. (1994) Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis. *J.Clin.Invest.* 94 (5): 1815-1822.
- (10) Cheung A, Eberhardt K, Heinrichs J (1997) Regulation of protein A synthesis by the sar and agr loci of *Staphylococcus aureus*. *Infect.Immun.* 65 (6): 2243-2249.
- (11) Cheung AL, Chien Y, Bayer AS (1999) Hyperproduction of Alpha-Hemolysin in a sigB Mutant Is Associated with Elevated SarA Expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect.Immun.* 67 (3): 1331-1337.
- (12) Cheung AL, Nishina K, Manna AC (2008) SarA of *Staphylococcus aureus* Binds to the sarA Promoter To Regulate Gene Expression. *J.Bacteriol.* 190 (6): 2239-2243.

- (13) Davis PB (2006) Cystic Fibrosis Since 1938. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 173 (5): 475-482.
- (14) Deora R, Tseng T, Misra TK (1997) Alternative transcription factor sigmaSB of *Staphylococcus aureus*: characterization and role in transcription of the global regulatory locus *sar*. *J.Bacteriol.* 179 (20): 6355-6359.
- (15) Köhnlein, T, Welte T (2008) Mukoviszidose. In: *Harrisons Innere Medizin*. Dietel M, Suttrop N, Zeitz M [Hrsg] ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin, Bd. 2, 17. Aufl.: 2009-2013.
- (16) Elizur A, Orscheln RC, Ferkol TW, Atkinson JJ, Dunne WM,Jr, Buller RS, et al. (2007) Panton-Valentine Leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lung infection in patients with cystic fibrosis. *Chest* 131 (6): 1718-1725.
- (17) Foster TJ (2005) Immune evasion by staphylococci. *Nat.Rev.Microbiol.* 3 (12): 948-958.
- (18) Gertz S, Engelmann S, Schmid R, Ohlsen K, Hacker J, Hecker M (1999) Regulation of sigmaB-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol.Gen.Genet.* 261 (3): 558-566.
- (19) Giraudo AT, Mansilla C, Chan A, Raspanti C, Nagel R (2003) Studies on the expression of regulatory locus *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Curr.Microbiol.* 46 (4): 246-250.
- (20) Goerke C, Fluckiger U, Steinhuber A, Zimmerli W, Wolz C (2001) Impact of the regulatory loci *agr*, *sarA* and *sae* of *Staphylococcus aureus* on the induction of alpha-toxin during device-related infection resolved by direct quantitative transcript analysis. *Mol.Microbiol.* 40 (6): 1439-1447.
- (21) Goerke C, Campana S, Bayer MG, Doring G, Botzenhart K, Wolz C (2000) Direct Quantitative Transcript Analysis of the *agr* Regulon of *Staphylococcus aureus* during Human Infection in Comparison to the Expression Profile In Vitro. *Infect.Immun.* 68 (3): 1304-1311.
- (22) Gomez MI, Lee A, Reddy B, Muir A, Soong G, Pitt A, et al. (2004) *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat.Med.* 10 (8): 842-848.
- (23) Harrison F (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 153 (4): 917-923.
- (24) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N.Y)* 10 (4): 413-417.
- (25) Hiramatsu K (2001) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect.Dis.* 1 (3): 147-155.

- (26) Horsburgh MJ, Aish JL, White IJ, Shaw L, Lithgow JK, Foster SJ (2002) σ B Modulates Virulence Determinant Expression and Stress Resistance: Characterization of a Functional *rsbU* Strain Derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J.Bacteriol.* 184 (19): 5457-5467.
- (27) Huntzinger E, Boisset S, Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, Namane A, et al. (2005) *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J.* 24 (4): 824-835.
- (28) Huseby M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, et al. (2007) Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 189 (23): 8719-8726.
- (29) Jarraud S, Lyon GJ, Figueiredo AM, Gerard L, Vandenesch F, Etienne J, et al. (2000) Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 182 (22): 6517-6522.
- (30) Jonas D, Walev I, Berger T, Liebetrau M, Palmer M, Bhakdi S (1994) Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect.Immun.* 62 (4): 1304-1312.
- (31) Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, et al. (1998) Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J.Infect.Dis.* 177 (4): 1023-1029.
- (32) Kahl BC, Becker K, Friedrich AW, Clasen J, Sinha B, Von Eiff C, et al. (2003) *agr*-dependent bacterial interference has no impact on long-term colonization of *Staphylococcus aureus* during persistent airway infection of cystic fibrosis patients. *J.Clin.Microbiol.* 41 (11): 5199-5201.
- (33) Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, et al. (2003) Population Dynamics of Persistent *Staphylococcus aureus* Isolated from the Airways of Cystic Fibrosis Patients during a 6-Year Prospective Study. *J.Clin.Microbiol.* 41 (9): 4424-4427.
- (34) Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol.Aspects Med.* 27 (2-3): 95-125.
- (35) Kullik II, Giachino P (1997) The alternative sigma factor σ B in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. *Arch.Microbiol.* 167 (2/3): 151-159.
- (36) Kullik I, Giachino P, Fuchs T (1998) Deletion of the Alternative Sigma Factor σ B in *Staphylococcus aureus* Reveals Its Function as a Global Regulator of Virulence Genes. *J.Bacteriol.* 180 (18): 4814-4820.

- (37) Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et al. (2007) Staphylococcus aureus Panton-Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. *Science* 315 (5815): 1130-1133.
- (38) Lowy FD (1998) Staphylococcus aureus infections. *N.Engl.J.Med.* 339 (8): 520-532.
- (39) Manna AC, Bayer MG, Cheung AL (1998) Transcriptional Analysis of Different Promoters in the sar Locus in Staphylococcus aureus. *J.Bacteriol.* 180 (15): 3828-3836.
- (40) Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S (1995) Activation of alpha-toxin translation in Staphylococcus aureus by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *EMBO J.* 14 (18): 4569-4577.
- (41) Musser JM, Schlievert PM, Chow AW, Ewan P, Kreiswirth BN, Rosdahl VT, et al. (1990) A single clone of Staphylococcus aureus causes the majority of cases of toxic shock syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87 (1): 225-229.
- (42) Novick RP (1990) The Staphylococcus as a molecular genetic system. In: R.P. Novick (Hrsg) *Molecular biology of the staphylococci*. VCH Publishers, New York, New York, S. 1-40.
- (43) Novick R (1967) Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in Staphylococcus aureus. *Virology* 33 (1): 155-166.
- (44) Novick RP, Ross HF, Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh S (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12 (10): 3967-3975.
- (45) Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol.Microbiol.* 48 (6): 1429-1449.
- (46) Novick RP, Jiang D (2003) The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. *Microbiology* 149 (Pt 10): 2709-2717.
- (47) Ohl F, Jung M, Xu C, Stephan C, Rabien A, Burkhardt M, et al. (2005) Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? *J.Mol.Med.* 83 (12): 1014-1024.
- (48) O'Riordan K, Lee JC (2004) Staphylococcus aureus capsular polysaccharides. *Clin.Microbiol.Rev.* 17 (1): 218-234.
- (49) Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Josefsson E (2002) Protein A is a virulence factor in Staphylococcus aureus arthritis and septic death. *Microb.Pathog.* 33 (5): 239-249.

(50) Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P (1988) Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 170 (9): 4365-4372.

(51) Pletz MW, Sauer-Heilborn A, Kohnlein T, Seidler U, Lamprecht G (2010) Cystic fibrosis in adults. *Internist (Berl)* 51 Suppl 1: 277-288.

(52) Projan SJ, Novick RP The molecular Basis of Pathogenicity. In: The molecular Basis of Pathogenicity. The Staphylococci in Human Disease. Wiley-Blackwell, S. 55-81.

(53) Ragle BE, Bubeck Wardenburg J (2009) Anti-Alpha-Hemolysin Monoclonal Antibodies Mediate Protection against *Staphylococcus aureus* Pneumonia. *Infect.Immun.* 77 (7): 2712-2718.

(54) Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by *agr*. *Mol.Gen.Genet.* 202 (1): 58-61.

(55) Schlievert PM, Strandberg KL, Lin YC, Peterson ML, Leung DY (2010) Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 125 (1): 39-49.

(56) Smeltzer MS, Lee CY, Harik N, Hart ME (2009) Molecular Basis of Pathogenicity. In: K. B. Crossley, K. K. Jefferson, G. L. Archer (Hrsg) *Staphylococci in Human Disease*. Wiley-Blackwell, 2. Aufl., S. 65-109.

(57) Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsin B, et al. (2008) *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* 154 (8): 2265-2274.

(58) Vandenesch F, Kornblum J, Novick RP (1991) A temporal signal, independent of *agr*, is required for *hla* but not *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* 173 (20): 6313-6320.

(59) Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. (2003) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg.Infect.Dis.* 9 (8): 978-984.

(60) Wadstrom T, Mollby R (1971) Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*. VII. Studies on -haemolysin. *Biochim.Biophys.Acta* 242 (1): 308-320.

(61) Waldvogel FA (1985) *Staphylococcus aureus*. In: *Staphylococcus aureus*. Principles and practice of infectious diseases. John Wiley & Sons, New York, 5. Aufl., S. 1097-1116.

(62) Wardenburg JB, Patel RJ, Schneewind O (2007) Surface Proteins and Exotoxins Are Required for the Pathogenesis of Staphylococcus aureus Pneumonia. *Infect.Immun.* 75 (2): 1040-1044.

(63) Wu S, de Lencastre H, Tomasz A (1996) Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of Staphylococcus aureus RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J.Bacteriol.* 178 (20): 6036-6042.

(64) Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucl.Acids Res.* 32 (12): e103.

7 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Wachstumskurve des Laborstammes SH 1000 in BHI	12
Abb. 2: RT-PCR Zyklus aus (34)	18
Abb. 3: Bestimmung des Wachstumskurvenverlaufes (WK) zu drei unterschiedlichen Zeiten des klinischen Isolates S 605 I	24
Abb. 4 Häufigkeitsverteilung der Pigmentierung der Kolonien auf Blut- und Schaedleragar.....	31
Abb. 5 Häufigkeitsverteilung der Hämolysestufe der Kolonien auf Blut- und Schaedler- Agar	31
Abb. 6 Häufigkeitsverteilung der β -Toxin-Expression der klinischen Isolate	32
Abb. 7: Vergleich des Wachstumsverlaufs des klinischen Isolates S 605 I in BHI- und TSB- Flüssigmedium.....	36
Abb. 8: Ermittlung des Wachstumsverlaufs zu drei verschiedenen Zeitpunkten (WK)..	36
Abb. 9: Genexpression des Laborstamms 8325-4 in der Flüssigkultur.....	38
Abb. 10: Genexpression des Laborstamms 8325-4 auf den Agarkulturen.....	38
Abb. 11: Genexpression des Laborstamms RN 6390 in der Flüssigkultur	40
Abb. 12: Genexpression des Laborstamms RN6390 auf den Agarkulturen.....	40
Abb. 13: Genexpression des Laborstamms SH 1000 in der Flüssigkultur	42
Abb. 14: Genexpression des Laborstamms SH 1000 auf den Agarkulturen.....	42
Abb. 15: Genexpression der Δagr -Mutante in der Flüssigkultur	44
Abb. 16: Genexpression der Δagr -Mutante auf den Agarkulturen	44
Abb. 17: Genexpression der Δsar -Mutante in der Flüssigkultur	46
Abb. 18: Genexpression der Δsar -Mutante auf den Agarkulturen	46
Abb. 19: Genexpression der Δagr -/ sar -Mutante in der Flüssigkultur	48
Abb. 20: Genexpression der Δagr -/ sar -Mutante auf den Agarkulturen	48
Abb. 21: Genexpression der $\Delta sigB$ -Mutante in der Flüssigkultur	50
Abb. 22: Genexpression der $\Delta sigB$ -Mutante auf den Agarkulturen	50
Abb. 23: Isolat S 1368 II mit Hämolyse 0 auf Blut-Agar (li) und mit Hämolyse 3 auf Schaedler-Agar (re)	53
Abb. 24: Genexpression von S 198 II in der Flüssigkultur	54
Abb. 25: Genexpression von S 198 II auf den Agarkulturen	54
Abb. 26: Genexpression von S 348 I in der Flüssigkultur	55

Abb. 27: Genexpression von S 348 I auf den Agarkulturen.....	55
Abb. 28: Genexpression von S 385 IV in der Flüssigkultur	56
Abb. 29: Genexpression von S 385 IV auf den Agarkulturen.....	56
Abb. 30: Genexpression von S 1368 II auf den Agarkulturen	57
Abb. 31: Genexpression von S 1368 III auf den Agarkulturen	57
Abb. 32: Isolat S 516 I mit Hämolysestufe 2 auf Blut-Agar (li) und Hämolysestufe 3 auf Schaedler-Agar (re)	59
Abb. 33: Genexpression von S 66 I in der Flüssigkultur	60
Abb. 34: Genexpression von S 66 I auf den Agarkulturen.....	60
Abb. 35: Genexpression von S 179 I in der Flüssigkultur	61
Abb. 36: Genexpression von S 179 I auf den Agarkulturen.....	61
Abb. 37: Genexpression von S 516 I in der Flüssigkultur	62
Abb. 38: Genexpression von S 516 I auf den Agarkulturen.....	62
Abb. 39: Genexpression von S 592 II in der Flüssigkultur	63
Abb. 40: Genexpression von S 592 II auf den Agarkulturen	63
Abb. 41: Genexpression von S 376 I in der Flüssigkultur	64
Abb. 42: Genexpression von S 376 I auf den Agarkulturen.....	64
Abb. 43: Genexpression von S 501 II in der Flüssigkultur	65
Abb. 44: Genexpression von S 501 II auf den Agarkulturen	65
Abb. 45: Isolat S 1365 I mit Hämolysestufe 4 auf Blut -(li) und Schaedler-Agar (re) ...	67
Abb. 46: Genexpression von S 605 I in der Flüssigkultur	68
Abb. 47: Genexpression von S 605 I auf den Agarkulturen.....	68
Abb. 48: Genexpression von S 568 I in der Flüssigkultur	69
Abb. 49: Genexpression von S 568 I auf den Agarkulturen.....	69
Abb. 50: Genexpression von S 1344 auf den Agarkulturen	70
Abb. 51: Genexpression von S 1365 I auf den Agarkulturen	71
Abb. 52: Genexpression von S 1365 II auf den Agarkulturen	71
Abb. 53: S 179 I mit Hämolysegrad 1 auf Blut-Agar (li) und Hämolysegrad 4 auf Schaedler-Agar (re)	75

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborstämme	20
Tabelle 2: Mutanten.....	20
Tabelle 3: klinische Isolate	21
Tabelle 4: Sequenzen der Referenzgene.....	28
Tabelle 5: Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Gene	28
Tabelle 6: Die Phänotypen der Laborstämme	33
Tabelle 7: Die Phänotypen der Mutanten	33
Tabelle 8: Die Phänotypen der Gruppe I	34
Tabelle 9: Die Phänotypen der Gruppe II.....	34
Tabelle 10: Die Phänotypen der Gruppe III	35
Tabelle 11: Legende: w: weiß, g: gelb. n: nein, j: ja. 2: Änderung mindest. doppelt so hoch; 10: Änderung fast 10fach so hoch; - : geringere Transkription; 0: keine Änderung; ne: nicht exprimiert.....	74

9 Abkürzungen

BHI	Brain heart infusion
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	Cystische Fibrose
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dsDNA	Doppelstrang DNA
EL	early log phase
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
kb	Kilobase
li	links
LL	late log phase
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
re	rechts
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Real-Time PCR
s	Sekunde
SP	stationary phase
TSB	Tryptic soy broth
WK	Wachstumskurve

10 Anhang

Beurteilungsbogen der Studie NCT00669760 zur phänotypischen Beschreibung der Isolate:

Staphylococcus aureus - Kolonisation oder Infektion		Projekt-Nr.: S 05/07	
Zentrums-Nr.: <input type="text"/>	Pat.-Nr.: <input type="text"/>	Datum: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	
		<small>Tag</small>	<small>Monat</small>
			<small>Jahr</small>

Charakteristik *Staph. aureus* Keim

Ambulanzbesuch:

Probenmaterial: Nasenabstrich Rachenabstrich Sputum nasale Lavage

Labornummer: S- *S. aureus* Morphotyp

Morphologie

	Blut Agar	Schaedler Agar
Hämolyse	<input type="text"/> (0-4)	<input type="text"/> (0-4)
β-Toxin	<input type="radio"/> ja <input type="radio"/> nein	<input type="radio"/> ja <input type="radio"/> nein
Pigmentierung	<input type="radio"/> weiß <input type="radio"/> grau <input type="radio"/> gelb <input type="radio"/> glasig	<input type="radio"/> weiß <input type="radio"/> grau <input type="radio"/> gelb
Größe	<input type="radio"/> winzig < 1 mm <input type="radio"/> klein 1 mm <input type="radio"/> groß > 1 mm	<input type="radio"/> winzig < 1 mm <input type="radio"/> klein 1 mm <input type="radio"/> groß > 1 mm
	<input type="radio"/> SCV <input type="radio"/> normal	<input type="radio"/> SCV <input type="radio"/> normal
	<input type="radio"/> Spiegeleiförmig	<input type="radio"/> Spiegeleiförmig
Konsistenz	<input type="radio"/> trocken <input type="radio"/> feucht <input type="radio"/> schleimig	<input type="radio"/> trocken <input type="radio"/> feucht <input type="radio"/> schleimig

Ergebnisse der Resistenztestung — Dokumentation Empfindlichkeit: ja/nein

PSSA ja nein Aminoglykoside ja nein
MSSA ja nein Gyrasehemmer ja nein
MLSB ja nein TMP/SMX ja nein
MRSA ja nein

Biochemische Differenzierung

Katalase positiv negativ
Röhrchen Koagulase positiv negativ
Pastorex positiv negativ
Vitek ja
PCR ja

Kryobox-Nr.: -

11 Lebenslauf

