

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der
Universität Tübingen**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Über die Induktion, Replikation und den Transfer
von Phage Φ 13 in *Staphylokokkus aureus***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Petra Grözinger

aus

Heidenheim a. d. Brenz

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. C. Wolz

2. Berichterstatter:

Professor Dr. B. Flehmig

**Für meine Eltern,
die mir dieses Studium ermöglichten.**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung.....	1
1.1. Epidemiologie und assoziierte Erkrankungen von <i>S. aureus</i>	1
1.2. <i>S. aureus</i> bei Patienten mit Cystischer Fibrose	2
1.3. Antibiotika und <i>S. aureus</i>	3
1.4. Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	4
1.5. Bakteriophagen	5
1.6. Einflüsse auf die Phageninduktion.....	9
1.7. Rolle der Phagen in der Virulenz von Bakterien.....	10
1.8. Phagen des <i>S. aureus</i>	11
1.9. Phagentransfer und Phagenresistenz.....	12
1.9.1. Inhibition der Adsorption	13
1.9.2. Blockierung der Phagen-Penetration	13
1.9.3. Restriktions-Modifikations-System (R/M-System)	14
1.9.4. Phagenausschluss-Enzyme (abortive Infektionssysteme, ABIs)	15
1.10. Ziele dieser Arbeit.....	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Chemikalien.....	17
2.2. Materialien.....	18
2.3. Geräte, Programme.....	18
2.4. Medien und Stammlösungen	18
2.5. Bakterienstämme und Phagen.....	19
2.6. Anzucht der Bakterienstämme.....	20
2.7. Einfrieren von Bakterien	20
2.8. Phageninduktion unter verschiedenen Bedingungen	20
2.8.1. Spontaninduktion der Prophagen Φ 13 und Φ 13kana.....	20
2.8.2. Antibiotika, Wachstumstemperatur und Anaerobiose als Induktoren.....	20
2.8.3. Sputum als Induktor	21
2.9. Quantitative PCR.....	22
2.9.1. DNA-Isolierung	22
2.9.2. Quantitative Real-time-PCR (LightCycler-PCR)	22
2.10. Bestimmung von Wachstumskurven.....	24
2.11. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) in Bakterienlösungen ..	24
2.12. Gewinnung von gewaschenen Pellets und Überstand aus Flüssigkulturen.	24
2.13. Mischkulturexperimente: Selektionsexperimente mit resistenz-markierten Phagen und <i>S. aureus</i> -Stämmen.....	25
2.13.1. In vitro.....	25
2.13.2. In vivo (Mausmodell).....	26
2.14. Gewinnung von Phagenlysaten und Phagentiterbestimmung	27
2.15. Lysogene.....	28
2.15.1. Gewinnung von Lysogenen.....	28
2.16. Nachweis von phagenkodierten Genen mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und Southern-Blot.....	28
2.16.1. Isolierung der chromosomaler DNA	28
2.16.2. Restriktionsverdau	29
3.16.3. Elektrophorese.....	30
3.16.4. Southern Analyse (Hybridisierung).....	30

3. Ergebnisse	32
3.1. Phageninduktion bei <i>S. aureus</i>	32
3.1.1. Spontaninduktion der Prophagen $\Phi 13$ und $\Phi 13_{\text{kana}}$ in den Stämmen CG1 (8325-4 $\Phi 13$) und CG6 (8325-4 $\Phi 13_{\text{kana}}$).....	32
3.1.2. Induktion von $\Phi 13$ durch verschiedene infektionsrelevante Stimuli.....	33
3.1.3. Induktion von Phage $\Phi 13$ durch Patientensputum.....	36
3.1.3.1. Wachstum von CG1 in Sputum.....	36
3.1.3.2. Sputum als Induktor für $\Phi 13$	37
3.2. Transfer von $\Phi 13$: Mischkulturexperimente.....	38
3.2.1. Charakterisierung der resistenzmarkierten Stämme.....	39
3.2.2. Mischkulturexperimente unter verschiedenen Bedingungen.....	41
3.2.2.1. Infektionsrelevante Stimuli.....	41
3.2.2.2. Beitrag freier Phagen aus dem Überstand zur Transferrate.....	42
3.2.2.3. Variation der Wachstumsphasen.....	44
3.2.2.4. Variation des Mischverhältnisses.....	45
3.2.2.5. Variation der Bakteriendichte.....	46
3.3. Mischkulturexperimente im Mausmodell.....	47
3.3.1. Wachstum von CG6 und CG7 im Mausmodell.....	47
3.3.2. Kokultivierung von CG6 mit CG7.....	48
3.3.2.1. Keimzahlen auf Blutplatten.....	49
3.3.2.2. Keimzahlen auf Selektivplatten.....	50
3.3.3. Berechnung der Phagentransferrate.....	51
3.4. Lysogenisierungsexperimente mit freien Phagen.....	53
3.4.1. Lysogenisierung verschiedener Stämme.....	53
3.4.2. Ermittlung der Lysogenisierungsrate.....	57
4. Diskussion	58
4.1. Induktion, Replikation und Transfer von <i>S. aureus</i> -Phage $\Phi 13$ unter verschiedenen infektionsrelevanten Bedingungen.....	58
4.1.1. Spontan.....	58
4.1.2. Antibiotika.....	60
4.1.3. Temperatur.....	61
4.1.4. Anaerobiose.....	62
4.1.5. Sputum.....	62
4.1.6. Beitrag freier Phagen aus dem Überstand zur Transferrate.....	63
4.1.7. Bakterielle Wachstumsbedingungen.....	63
4.1.8. Mischkulturexperimente: Methodendiskussion.....	64
4.1.9. <i>in vivo</i> : Mausmodell.....	65
4.2. Aufnahme von Bakteriophagen.....	68
4.4.1. Lysogenisierung von klinischen Isolaten.....	68
4.4.2. Lysogenisierung von <i>hly</i> -lysogenen Bakterien mit $\Phi 13_{\text{kana}}$	69
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis	73
7. Abkürzungen	84
8. Danksagung	86
9. Lebenslauf	87

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und assoziierte Erkrankungen von *S. aureus*

Staphylokokken sind runde, gram-positive, nicht-sporenbildende Bakterien aus der Familie der Micrococcacea. Sie sind als Besiedler der Haut und Schleimhäute des Nasen-Rachen-Raums weit verbreitet, allerdings als Infektionserreger nur bedingt pathogen [63]. Die größte humanpathogene und damit klinische Bedeutung kommt der koagulase-positiven Spezies *Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*) zu. *S. aureus* bildet auf künstlichen Nährböden goldgelblich glänzende Kolonien, daher stammt die Bezeichnung *aureus* (lat.: golden).

S. aureus ist ursächlich für verschiedenste akute und chronische Infektionen verantwortlich. Dazu zählen Lokalinfektionen, die oberflächlich-eitrig oder tief-invasiv verlaufen, Sepsis und toxinbedingte Syndrome. Zu den oberflächlich-eitrigen Infektionen, hervorgerufen durch *S. aureus*, gehören Erkrankungen der Haut, wie Abszesse, Furunkel, Karbunkel und Superinfektionen von anderen Hauterkrankungen, sowie der Hautanhangsorgane [13; 93]. Wundinfektionen, ausgelöst durch *S. aureus*, sind als postoperative Komplikation in der Chirurgie gefürchtet [26]. Tief-invasive Infektionen wie Empyeme, Osteomyelitiden, Pneumonien und Lungenabszesse gehören ebenfalls zum Krankheitsspektrum [63]. *S. aureus* gehört zudem zu den häufigsten Erregern, die eine Sepsis hervorrufen [7]. Eine *S. aureus*-Sepsis kann von den oben genannten primär extravasalen Herden ausgehen oder aber ihren Ursprung in intravasalen Herden nehmen. Dazu zählen intravenöse Katheter und kontaminiertes Injektionsbesteck bei i.v. Drogenabusus [35; 73]. Häufige Komplikation der *S. aureus*-Bakteriämie ist eine ulzerierende Endokarditis mit destruktiven Herzklappenveränderungen [63]. Im Anschluss an Infektionen mit Exfoliativtoxin-bildenden *S. aureus*-Stämmen kann sich bei Neugeborenen das schwere Staphylococcal-Scaled-Skin-Syndrom (SSSS) ausbilden. Die systemische Ausbreitung dieses Toxins führt zu einer blasigen Ablösung der gesamten Haut [52; 53]. Eine weitere schwerwiegende toxinbedingte Erkrankung ist das Toxic-Shock-Syndrom

(TSS), hervorgerufen durch TSST-1 bildende *S. aureus*-Stämme [47; 59]. Meist weniger gefährlich, jedoch umso häufiger, sind Nahrungsmittelvergiftungen: Enterotoxine in Nahrungsmitteln, von bestimmten *S. aureus*-Stämmen produziert, können zu akuter, meist selbstlimitierender Gastroenteritis führen [54]. Prädisponierend für *S. aureus*-Infektionen sind eine geschwächte Immunabwehr, wie sie bei Diabetes mellitus, Dialysepflichtigkeit oder medikamentöser Immunsuppression vorkommt, Verletzungen und Wunden, Fremdkörper oder bestimmte Infektionen, z.B. mit Influenza-A-Viren [63].

S. aureus-Infektionen sind zum einen exogen bedingt. Als exogene Infektionsquelle dienen hierbei kontaminierte Gegenstände und nicht-desinfizierte Hände sowie die aerogene Übertragung durch Tröpfchen beim Sprechen und Niesen über einer ungeschützten Wunde [55]. Zum anderen kann es sich bei *S. aureus*-Infektionen um endogene Infektionen, ausgehend vom Nasen-Rachen-Raum, handeln [11; 104]. In beiden Fällen kommt der Übertragung der Bakterien durch die Hände des Pflege- und ärztlichen Personals eine erhebliche Bedeutung zu. Laut Studie sind ca. 20 % der Bevölkerung ständige und 60 % intermittierende symptomlose Träger von *S. aureus* im vorderen Nasenraum [46].

1.2. *S. aureus* bei Patienten mit Cystischer Fibrose

Bei der autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankung Mukoviszidose (Cystische Fibrose, CF) kommt es aufgrund von Mutationen zu einem Defekt in cAMP-abhängigen Chloridkanälen. Dies führt zur Bildung von zähflüssigem Schleim in allen exokrinen Drüsen. Der zähe, schwer abhustbare Schleim im Bronchialsystem von CF-Patienten bietet einen optimalen Nährboden für die Kolonisation von *S. aureus* [67]. Rezidivierende und chronische Atemwegsinfektionen, ausgelöst durch *S. aureus* und andere Pathogene, wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa*, sind bei diesen Patienten eine sehr häufige Komplikation. Sie sind auch nach Einführung der antimikrobiellen Therapie die Hauptursache für die Morbidität und verkürzte Lebenserwartung von Patienten mit CF [36]. Bei Mukoviszidose-Patienten konnte nachgewiesen

werden, dass die *S. aureus*-Stämme in der Nase mit solchen im Sputum in der Regel identisch sind [32]. Außerdem wurde gezeigt, dass im eingedickten Schleim des Bronchialsystems von CF-Patienten anaerobe Bedingungen herrschen können. Diese begünstigen Infektionen mit *P. aeruginosa* [117].

1.3. Antibiotika und *S. aureus*

Besondere Aufmerksamkeit kommt dem Erreger deshalb zu, weil mittlerweile multiple Antibiotikaresistenzen bekannt sind. Über 80 % aller Stämme im Krankenhaus bilden Penicillinase und sind daher gegen Penicillin und die meisten seiner Derivate resistent. Seit 1962 sind methicillinresistente *S. aureus*-Stämme, so genannte MRSA-Stämme, bekannt, die gegen alle β -Laktamantibiotika resistent sind. Seither wurde eine dramatische Zunahme von Infektionen mit MRSA beobachtet [40; 81]. Waren MRSA-Infektionen lange ein nosokomiales Problem, so treten jetzt vermehrt MRSA-Fälle auch außerhalb der Krankenhäuser auf (sog. community acquired *S. aureus*, cMRSA) [76; 114]. Auch cMRSA stellen aufgrund ihres Potentials, sich unkontrolliert innerhalb von Haushalten auszubreiten, und ihrer Fähigkeit, schwerwiegende Haut- und Lungeninfektionen hervorzurufen, ein nicht zu unterschätzendes Problem dar [43]. Die Fähigkeit zur epidemischen Ausbreitung einiger MRSA-Stämme und ihre hohe Pathogenität lassen vermuten, dass sie spezielle, bis jetzt noch nicht bekannte Virulenzdeterminanten aufweisen [63].

Auch gegen Nicht-Betalaktam-Antibiotika (z.B. Aminoglykoside, Gyrasehemmer, Makrolide) ist *S. aureus* zunehmend resistenter geworden und Parallelresistenzen treten vermehrt auf [48]. Gegen diese multiresistenten *S. aureus*-Stämme sind oft nur noch i.v.-Reserveantibiotika wie die Glykopeptide (z.B. Vancomycin) einsetzbar. Jedoch wurden auch schon Fälle von Vancomycinresistenz beobachtet, womit die Grenze der verfügbaren Präparate erreicht wäre [101].

Aus diesem Grund sind Überlegungen, Bakteriophagen als antimikrobielle Medikamente in der Behandlung von Infektionen einzusetzen, wieder aktuell.

Schon in den 30er-Jahren des letzten Jahrhunderts wurden Phagenpräparate eingesetzt. Nach Auftreten der Antibiotika rückte jedoch diese Form der Infektionsbehandlung in den Hintergrund [72]. Um Phagen als sicheres Medikament einsetzen zu können, ist es notwendig ein tieferes Verständnis über die Phagenbiologie und die Interaktion von Phagen mit ihren bakteriellen Wirten *in vivo* zu erlangen.

1.4. Virulenzfaktoren von *S. aureus*

S. aureus verfügt über eine Vielzahl von extrazellulären (Enzyme, Hämolsine, Toxine) und zellassoziierten Faktoren, die es ihm ermöglichen, den Wirt zu besiedeln und zu infizieren. Hier sollen nur für diese Arbeit wichtige Faktoren näher erwähnt werden.

Ein extrazellulärer Faktor des *S. aureus* ist das β -Hämolysin (Hlb, kodiert durch *hlyB*), auch Beta-Toxin genannt. Das Hlb ist eine Mg^{2+} -abhängige Sphingomyelinase (Phospholipase C), deren membranschädigende Aktivität vom Sphingomyelin Gehalt der jeweiligen Zellen abhängt. So sind Erythrozyten von Rindern und Schafen aufgrund des hohen Sphingomyelin Gehaltes in der Zellmembran gegenüber dem Hlb empfänglicher als menschliche Erythrozyten [75]. Auf Rinderblutagar bilden *S. aureus*-Stämme mit aktivem *hlyB* einen charakteristischen doppelten Hämolysehof, der erst bei niedrigeren Temperaturen deutlich zum Vorschein kommt (Abb. 1).

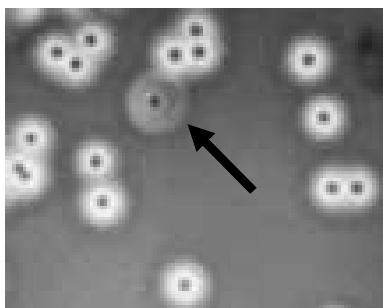


Abbildung 1:
HlyB-positive (Pfeil) und HlyB-negative *S. aureus* Kolonien auf einer Rinderblutplatte.

Die alleinige Wirkung des Hlb ist dabei nicht ausreichend, um eine Lyse der Zellen hervorzurufen. Ein weiterer destabilisierender Faktor, wie der Abfall der Temperatur unter 10°C, ist hierzu nötig (heiß- kalt Hämolyse) [100; 110]. Die Bedeutung von Hlb als Virulenzfaktor neben seiner hämolytischen Fähigkeiten ist noch weitgehend unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Hlb die Chemotaxis von menschlichen Monozyten inhibiert und zytotoxisch auf Leukozyten wirkt [68; 91; 105]. Auch konnte eine intrinsische Wirkung des Beta-Toxins nachgewiesen werden. Es aktiviert die Sphingolipid-Signalkaskade, was in der Apoptose der Zelle endet [38]. Auf Grund der weit verbreiteten Bakteriophageninsertion im *hlyB*-Gen durch Phagen, wie Φ 13 [17], exprimieren die Mehrheit (ca. 80 %) der menschlichen *S. aureus*-Isolate das Hlb jedoch nicht [39; 82; 103]. Viele der *hlyB*-inserterenden Phagen kodieren aber für weitere Virulenzfaktoren.

Ein solcher *hlyB*-phagenkodierter Virulenzfaktor ist die Staphylokinase (Sak, kodiert durch *sak*). Sie aktiviert indirekt Plasminogen durch Bildung eines Plasminogen-Staphylokinase-Komplexes [56]. Durch das entstehende Plasmin kommt es zur Fibrinolyse. Weitere Virulenzfaktoren, die auf *hlyB*-Phagen kodiert sind, sind Enterotoxine [18; 37], das Chemotaxis-inhibierendes Protein CHIPS (Gen *chp*) [23] und das kürzlich beschriebene Antiphagozytose-Protein SCIN (Gen *scn*) [90].

1.5. Bakteriophagen

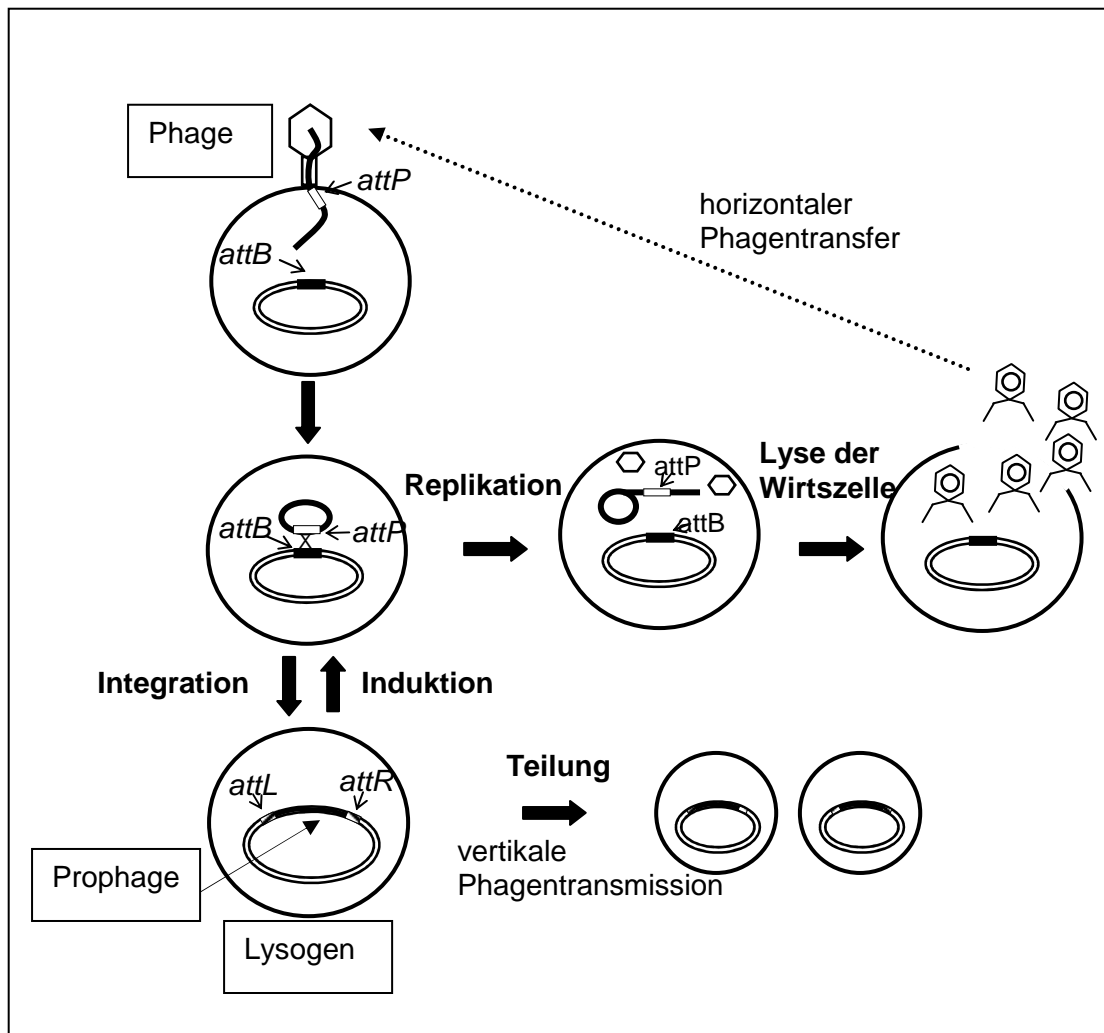
Bakteriophagen (Phagen) sind obligate Zellparasiten, deren Wirtszelle das Bakterium ist und die nur eine bestimmte Bakterienart befallen. Grundsätzlich bestehen *S. aureus*-Bakteriophagen aus einem Kopf, welcher die Nukleinsäure (Doppelstrang-DNA) enthält, einem Schwanz, Schwanzplatte und -fasern, die zur Adsorption an die Wirtszelle nötig sind (sog. T-Phagen). Der Phage heftet sich an die Zelloberfläche des Bakteriums (Adsorption) und injiziert die Nukleinsäure (Penetration).

1. EINLEITUNG

Man unterscheidet lytische von lysogenen (temperenten) Phagen. Lytische Phagen replizieren sich nach Injektion ins Bakterium sofort, werden transkribiert und translatiert, zu neuen Phagenpartikeln zusammengesetzt und unter Lyse der Zelle freigesetzt. In der ersten Phase der Phagenreplikation wird dabei die ringförmige Phagen-DNA nach dem Schema der bidirektionalen Replikation vervielfacht. Es entstehen ca. 50 Nachkommen-DNA-Ringe. In der zweiten Phase der Replikation wird weiter DNA nach dem Mechanismus des „rollenden Ringes“ (rolling circle) produziert [25]. Das Besondere an diesem Mechanismus ist die Produktion langer End-zu-End verknüpfter Moleküle, die oft bis zu acht einheitlich lange DNA-Moleküle umfassen. Man nennt diese langen DNA-Formen Concatemere. Die Bildung der Concatemere ist die Voraussetzung für den abschließenden Vorgang der Bildung der Phagennachkommen. Der leere Phagenvorkopf wird mit der DNA befüllt und eine Endonuklease schneidet die übrige concatemere Phagen-DNA ab.

Wird die injizierte DNA dagegen nicht sofort repliziert, sondern ins bakterielle Chromosom integriert (Phagenintegration oder -insertion), so spricht man von Lysogenität (siehe Abb. 2). Ein Phage im lysogenen Zustand wird Prophage genannt, das befallene Bakterium ist ein Lysogen. Die Phageninsertion geschieht durch homologe Rekombination über die so genannten *attP*-Stellen im Phagengenom bzw. *attB*-Stellen im Wirtsgenom (attachment-sites).

Bei Teilung der Bakterienzelle wird das Chromosom mit dem enthaltenen Prophagen repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Man spricht von vertikaler Phagentransmission. Tritt der Prophage wieder ins lytische Stadium ein (Induktion), so verlässt er das bakterielle Chromosom (Phagendeletion oder -exzision), die DNA wird repliziert und neue Phagen werden gebildet. Der Prophage kann spontan oder durch Induktion mit physikalischen oder chemischen Noxen in das vegetative Stadium zurückkehren. Die freigesetzten Phagen können wiederum andere Bakterienzellen infizieren (sog. horizontaler Phagentransfer). Diese beiden alternativen Infektionswege von temperenten Phagen wurden zuerst und im Detail am λ -Phagen des *Escherichia coli*-Bakteriums (*E. coli*) untersucht [25].

**Abbildung 2:**

Lebenszyklus eines lysogenen Phagen. Erläuterungen siehe Text.

Welchen Weg ein temperenter Phage nach Infektion einer Bakterienzelle einschlägt hängt von den Wachstumsbedingungen des Bakteriums ab. Sind die Wachstumsbedingungen schlecht, z.B. unter Nährstoffmangel, so wird der lysogene Infektionsweg bevorzugt [25; 115]. Ebenso spielt die Anzahl an infizierenden Phagen eine Rolle [25].

Viele Prophagen besitzen die Fähigkeit, den Phänotyp ihres Wirts zu verändern (konvertierende Phagen). Man spricht von positiver lysogener Konversion wenn der Phage nicht nur für Gene kodiert, die eine virale, sondern auch eine bakterielle Funktion ausüben, z.B. Antibiotikaresistenzgene oder Virulenzgene. Diese werden während des lysogenen Stadiums des Prophagen vom Bakterium exprimiert. Von negativer lysogener

Konversion spricht man hingegen, wenn durch die Phageninsertion in ein funktionelles bakterielles Virulenzgen dieses unterbrochen wird.

Im lysogenen Stadium wird die Expression von lytischen Genen durch ein virales Genprodukt, dem sog. Repressor, unterdrückt. Bei dem *E. coli*-Phagen λ handelt es sich um das Protein CI, oder Lambda-Repressor. CI blockiert den lytischen Weg und stabilisiert somit den lysogenen Zustand. Jeder lysogene Phage unterdrückt spezifisch nur die Expression der eigenen DNA, nicht der DNA von anderen Phagenarten, was das Wirtsbakterium gegen Superinfektionen mit demselben Phagen immun macht. DNA-schädigende Ereignisse oder Einflüsse, die eine Replikation der DNA hemmen und zur Bildung von ssDNA führen, bewirken eine zelluläre Antwort, die sog. SOS-Antwort [62], welche dazu dient, die DNA zu reparieren und die Replikation wiederherzustellen [19]. Das SOS-System beinhaltet die Proteine LexA und RecA. Während des normalen Zellwachstums hemmt LexA als Repressor ein Set von ca. 40 Genen (sog. SOS-Gene), während RecA erst durch Bindung an ssDNA aktiviert wird [111]. Das aktivierte RecA katalysiert die proteolytische Spaltung von LexA, welches auf diesem Wege inaktiviert wird und somit seine hemmende Wirkung auf die SOS-Gene verliert [60]. Der Phage λ hat sich dieses System seines Wirtes zu Nutze gemacht, um CI zu inaktivieren. Enthält die Zelle den λ -Prophagen, so wird dessen CI ebenfalls durch das aktivierte RecA gespalten und verliert seine Repressor-Funktion auf lytische Phagengene. Somit wird der Phage induziert. Die Spaltung des λ -Repressors CI geschieht dabei viel langsamer als die von LexA, was sicherstellt, dass die Prophageninduktion nur in Zellen geschieht, die die vorangegangene DNA-Schädigung wahrscheinlich nicht überleben werden [60].

Das als Zytostatikum eingesetzte Mitomycin wird wegen seiner starken DNA-schädigenden Wirkung und somit starkem induzierenden Effekt als klassisches Agens zur Prophageninduktion herangezogen. Die induzierende Wirkung von Mitomycin ist dabei konzentrationsabhängig [97].

Der Übergang vom lysogenen Stadium des Prophagen in das lytische geschieht in geringem Maße auch ohne induzierende Faktoren, die sog. spontane Induktion. Dies wird damit erklärt, dass auch ohne äußere Einflüsse in einer geringen Anzahl von Bakterien spontane DNA-Schäden auftreten, z.B. durch Oxidation von DNA-Basen [20] und damit eine RecA-Aktivierung stattfindet [61].

1.6. Einflüsse auf die Phageninduktion

Es zeigte sich für verschiedene Spezies, dass Phagen während der Infektion induziert werden können [106]. Dabei spielen exogene (z.B. Antibiotika) und endogene Faktoren eine Rolle:

In einer Studie mit Shigatoxin-produzierenden *E. coli* (STEC) konnte gezeigt werden, dass eine Ciprofloxacingabe bei Mäusen, infiziert mit STEC, zwar zu einer Reduktion der Bakterienzahl im Fäzes führt, jedoch auch zu einer erhöhten Konzentration von freiem Shigatoxin und damit zusammenhängend zu einer erhöhten Sterblichkeit der Mäuse. Dies ist auf eine vermehrte intrainestinale Induktion und Transfer des Shigatoxin-tragenden Phagen von einem *E. coli* zum andern zurückzuführen [120]. Für Mitomycin und die klinisch eingesetzten Antibiotika Ciprofloxacin und Trimethoprim konnte *in vitro* eine erhöhte Produktion von Shigatoxin nachgewiesen werden [44; 45; 77; 112; 118]. Patienten, die im Rahmen einer Krebserkrankung mit Mitomycin C behandelt wurden, erkrankten an HUS, einer schwerwiegenden Komplikation der STEC-Infektion, die auf eine hohe Toxinproduktion zurückzuführen ist [1; 112]. Als klinische Konsequenz sollte daher im Falle einer Infektion mit STEC auf die Therapie mit phageninduzierenden Antibiotika verzichtet werden [45; 120].

Neben diesen exogenen Induktoren konnten auch einige endogene Faktoren identifiziert werden, die während einer Infektion zur Induktion von Bakteriophagen führen. Dazu zählen von Leukozyten gebildete radikale Sauerstoffspezies (ROS) [106] und das von neutrophilen Granulozyten gebildete H₂O₂ [107].

Daneben wurde kürzlich ein löslicher phageninduzierender Faktor aus humanen pharyngealen Epithelzellen beschrieben, der bei Kokultur von *Streptokokkus pyrogenes* (*S. pyrogenes*) mit diesen Zellen zur Induktion eines DNase-kodierenden Phagen führt [9]. Von derselben Arbeitsgruppe konnte in einem Mausmodell für die Streptokokken-Besiedlung ein Transfer temperenter Phagen zwischen *S. pyrogenes*-Stämmen nachgewiesen werden [8].

1.7. Rolle der Phagen in der Virulenz von Bakterien

Die Anpassung eines Bakteriums an die Gegebenheiten im Wirt, der Übergang von symptomloser Trägerschaft zur krankmachenden Infektion und die unterschiedlichen umschriebenen Erkrankungen, hervorgerufen durch einzelne Stämme, erfordern genetische Variationen im Bakterium. Durch Microarray-Analysen [28] und Genomsequenzierungen [51] von *S. aureus*-Isolaten verschiedener Herkunft wurde gezeigt, dass die genetische Variationen zwischen verschiedenen Stämmen erheblich sind, wobei ca. 20 % des Genoms aus stammspezifischen Genbereichen besteht. Diese stammspezifischen Regionen kodieren u. a. auch für verschiedene Virulenz- und Resistenzdeterminanten und sind zum großen Teil auf potentiell mobilen Elementen (Transposons, Pathogenitätsinseln, Phagen) lokalisiert. Da *S. aureus* als nicht kompetent für die Transformation (Aufnahme freier DNA) angesehen wird, sind Phagen wahrscheinlich die primären Vektoren des horizontalen Gentransfers und somit als wesentlich für die innerartliche Diversifikation anzusehen.

Auf den Beitrag der Bakteriophagen zur Pathogenität ihrer bakteriellen Wirte wiesen schon 1927 Versuche an Streptokokken hin, als Frobisher und Brown zeigten, dass nicht-toxinbildende Streptokokken, die dem Überstand von toxinbildenden Streptokokken-Kulturen ausgesetzt waren, die Fähigkeit erlangten, das Scharlacht toxin zu produzieren [29]. Heute weiß man, dass der Überstand Bakteriophagen enthielt, die für das Scharlacht toxin kodierten, und dass hier der Vorgang der Transduktion, also des Transfers von genetischem

Material in eine Bakterienzelle durch Phageninfektion, beschrieben worden war [106]. Zu den bekanntesten phagenkodierte Toxinen gehören die Diphtherie-, Shiga- und Cholera-Toxine. Aber nicht nur Toxine, sondern auch andere Virulenzfaktoren, wie z.B. einige Regulationsfaktoren, die die Expression von bakteriell kodierten Genen steigern [98], Oberflächenproteine, welche die Adhäsion vermitteln, und Invasine sind phagenkodiert [99].

1.8. Phagen des *S. aureus*

Für *S. aureus* sind mehrere Phagen bekannt, jedoch gibt es noch wenig Wissen über deren Eigenschaften und Lebenszyklus.

Bakteriophagen eignen sich zur Typisierung von Bakterien. Hierbei werden Stämme aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber einem international verwendeten Phagenbasissatz, bestehend aus 23 Phagen, bestimmten Phagengruppen zugeordnet [84]. Heute treten jedoch molekulare Typisierungsmethoden in den Vordergrund. Die Phagen von *S. aureus* gehören vorwiegend zu den Siphoviridae, der serologischen Gruppen A, B und F und sind weit verbreitet. Die Genomgröße der *S. aureus*-Phagen beträgt ca. 45-60 kbp [74]. Für die Forschung auf dem Gebiet des *S. aureus* dient der Stamm 8325 mit drei temperenten Phagen und der phagenfreie Stamm 8325-4. Sowohl der Stamm als auch die Phagen sind sequenziert und analysiert [18; 37; 79; 82]. Der Stamm 8325 trägt die Phagen $\Phi 11$, $\Phi 12$ und den in dieser Arbeit verwendeten $\Phi 13$ [37].

Über die Bedeutung von Phagen für die Pathogenese von *S. aureus* ist erst wenig bekannt. Goerke et al. konnten zeigen, dass es während der chronischen Lungeninfektion bei Patienten mit CF im Vergleich zur Kolonisation der Nase Gesunder häufiger zu Genomveränderungen, vorwiegend aufgrund von Phagenmobilisierung, kommt [33]. Es gilt als gesichert, dass auch bei der Induktion von *S. aureus*-Phagen das SOS-System eine Rolle spielt [15]. In einer Arbeit fanden Goerke et al. heraus, dass beim Phagen $\Phi 13$ eine erhöhte Induktion mit einer vermehrten Transkription von *recA* einhergeht [31]. Einige Arbeiten deuten darauf hin,

dass wie bei dem *E. coli*-Phagen λ auch hier Antibiotika bei der Induktion eine Rolle spielen. Ciprofloxacin wirkt antibakteriell durch die Hemmung der DNA-Gyrase und einer damit verbundenen Blockierung der Replikationsgabel, was zu einer SOS-Antwort und nachfolgender Phageninduktion bei *S. aureus* führt [15; 31; 85]. Trimethoprim hemmt die Dihydrofolsäure-Reduktase und verhindert somit die Bildung der Base Thymin, wodurch ebenfalls die DNA-Replikation gestört wird. Auch Trimethoprim weist eine induzierende Wirkung auf *S. aureus*-Phagen auf [31]. Für β -Laktamantibiotika (Ampicillin und Penicillin, und das bei *S. aureus*-Infektionen eingesetzte Ceftriaxon und Cloxacillin) konnte ebenso gezeigt werden, dass diese die SOS-Antwort beeinflussen und die Phagenreplikation stimulieren [66].

Beispiele für die oben beschriebene positive Konversion sind bei *S. aureus* die Toxine Staphylokinase (Sak) [18], Enterotoxin A (Sea) [5] und das Exfoliativtoxin (Eta) [119]. Für die negative Konversion sind Phagen bekannt, deren Integrationsstellen (bacterial attachment sites, *attB*) in den Genen *geh* (Lipase) und *hly* (Beta-Hämolysin) liegen. Die in das *hly*-Gen integrierenden Phagen sind ungewöhnlich weit verbreitet und bei ca. 80 % aller humanen *S. aureus*-Stämme vorhanden. Ein Beispiel für einen negativ Hly-konvertierenden Phagen ist der in dieser Arbeit verwendete Phage Φ 13 [17]. Dieser Phage zeigt neben einer negativen Hly-Konversion auch eine positive Konversion für Sak [16], CHIPS [103] und SKIN.

1.9. Phagentransfer und Phagenresistenz

Phagen sind in der Lage nach Verlassen der Wirtszelle andere Bakterienzellen zu infizieren und somit genetisches Material zu verbreiten. Dieser Phagentransfer geschieht in einem so großen Umfang, dass Bakteriophagen möglicherweise als die wichtigste treibende Kraft in der zellulären Evolution angesehen werden müssen. Sie sind der hauptsächliche Vektor für den horizontalen Genaustausch in der Umwelt [27; 108]. Phagentransfer geschieht jedoch nicht ungehindert. Nicht alle Bakterien lassen sich von Phagen infizieren. Einige Bakterien sind auch in der Lage

Phagen abzuwehren. Vier grundsätzliche Mechanismen die zu einer Resistenz gegenüber Bakteriophagen führen sind bekannt.

1.9.1. Inhibition der Adsorption

Um Bakterienzellen infizieren zu können, müssen Phagen ihre Wirtszelle erkennen und daran binden (Adsorption). Dies ist ein spezifischer Vorgang. Proteine auf der Phagenoberfläche (Rezeptorbindungsproteine) binden spezifisch an Moleküle oder Rezeptoren auf der Oberfläche der jeweiligen Wirtszelle [57]. Bei gram-positiven Bakterien dienen Oberflächen-Polysaccharide als Phagenrezeptoren [102]. Für *S. aureus* wurden die Zellwandbestandteile Teichonsäure (WTA, wall teiconic acid) und Peptidoglycan als Bestandteile des Phagenrezeptors identifiziert [12]. Peschel et al. konnten zeigen, dass WTA-Mutanten von *S. aureus* gegenüber Phagen resistent werden (persönliche Mitteilung).

Der wirkungsvollste Mechanismus über den Bakterien verfügen, um Phagen abzuwehren, ist die Verhinderung der Adsorption von Phagen an der Bakterienwand. Dies geschieht durch Mutationen im Phagenrezeptor (Beispiel *E. coli*: [113], *S. aureus*: [94]) oder durch Produktion von Polysacchariden als Kapsel, welche verhindern, dass der Phage an seinen eigentlichen Rezeptor gelangt [21; 116].

Jedoch haben Bakteriophagen Strategien entwickelt, diese Barriere zu umgehen. Einige Phagen benutzen diese Polysaccharide als eigentliche Rezeptoren. Zudem ermöglichen virusgebundene Depolymerisationsenzyme es einigen Phagen, durch die Polysaccharidkapsel zu penetrieren [4].

1.9.2. Blockierung der Phagen-Penetration

Für Lactokokken-Phage Φ c2 konnte gezeigt werden, dass dieser zwar an seinen Rezeptor adsorbieren kann, jedoch die Penetration der Phagen-DNA durch die Bakterienzellwand blockiert wird [30]

1.9.3. Restriktions-Modifikations-System (R/M-System)

Ein weiterer Weg, mit dem Bakterien die Aufnahme von Fremd-DNA und somit auch die Aufnahme von Phagen kontrollieren, ist das Restriktions-Modifikations-System (R/M-System) [78]. Bakterien nehmen verhältnismäßig bereitwillig DNA auf. Die aufgenommene DNA bleibt intakt und kann ihre genetische Funktion ausüben, wenn sie von der gleichen Bakterienart stammt. Dagegen wird artfremde DNA bald nach dem Eindringen durch Enzyme (Restriktionsnukleasen) abgebaut und zerstört (Restriktion). Diese Enzyme erkennen kurze Nukleotidfolgen und schneiden die DNA an diesen Erkennungssequenzen oder an entfernt gelegenen zufälligen Stellen. Die arteigene DNA ist gegen den Abbau durch Restriktionsnukleasen durch eine Markierung geschützt (Modifikation). Diese Markierung besteht aus einer Methylierung von Nucleotiden in der jeweiligen Erkennungssequenz. Das Typ I R/M-System besteht aus einem Hauptenzym, einem Protein aus 3 Untereinheiten, kodiert durch die Gene *hsdS*, *hsdM* und *hsdR* (*hsd* steht für „host specificity for DNA“). Es ist ein multifunktionales Enzym. Es katalysiert sowohl die Restriktions- als auch die Modifikationsreaktion [6]. Waldron et al. beschrieben das SauI Typ I Restriktions-Modifikations-System bei *S. aureus* [109]. Dieses System blockiert die Aufnahme von Fremd-DNA in *S. aureus* und den horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen *S. aureus*-Stämmen.

Phagen haben aber auch hier eine Vielzahl an Strategien entwickelt, um diesem R/M-System zu entgehen (Antirestriktionsmechanismen). Dazu gehören Modifikation der Phagen-DNA durch phagenkodierte Modifikationsenzyme, eine niedrige Frequenz an Restriktionsstellen und die Produktion von Proteinen, die eine oder mehrere Komponenten des R/M-Systems beeinträchtigen [6, 50].

1.9.4. Phagenausschluss-Enzyme (abortive Infektionssysteme, ABIs)

Viele parasitische DNA-Elemente, zu denen auch die Prophagen zählen, synthetisieren Proteine, die die Wirtszelle töten, nachdem sie mit einem anderen Phagen infiziert wurde. Sie blockieren somit die Vermehrung und Verbreitung der infizierenden Phagen auf weitere Bakterienzellen und ermöglichen somit das Überleben der Bakterienpopulation und damit ihr eigenes Fortbestehen [96]. Das bekannteste dieser Phagenausschluss-Systeme ist das Rex-System beim λ -Phagen von *E. coli*. Man nimmt an, dass das phagenkodierte Protein RexA durch einen DNA-Protein-Komplex aktiviert wird, der entsteht, nachdem ein anderer Phage die Zelle infiziert hat. Das aktivierte RexA aktiviert seinerseits das RexB-Protein. Beim RexB-Protein handelt es sich wahrscheinlich um einen Kationenkanal, durch dessen Aktivierung es zur Aufhebung des Membranpotentials kommt und somit zum Untergang der Zelle [96]. Diese abortiven Infektionssysteme sind weit verbreitet. Z.B. wurden für das Bakterium *Lactococcus lactis* 20 solcher Systeme identifiziert [14].

Diese vier grundsätzlichen Mechanismen der Phagenresistenz wurden im Detail an Laktokokken und *E. coli* untersucht. Zu Phagenresistenzmechanismen bei *S. aureus* ist jedoch wenig bekannt. Es wird angenommen, dass es keine phagenspezifischen Rezeptoren gibt, da offensichtlich alle Phagen an alle *S. aureus*-Stämme adsorbieren [79; 83; 84]. Die Phagenresistenz wird daher wahrscheinlich durch eine bisher wenig verstandene Phagenimmunität lysogener Stämme und/oder durch stammspezifische Restriktions-Modifikationssysteme vermittelt.

1.10. Ziele dieser Arbeit

Mit der Entdeckung, dass viele Virulenzfaktoren phagenkodiert sind, wurden Bakteriophagen intensiv auf ihren Lebenszyklus und Faktoren, die diesen Zyklus beeinflussen, hin untersucht. Vor allem über den Lebenszyklus des lysogenen *E. coli*-Phagen λ und der Faktoren, welche diesen beeinflussen, ist viel bekannt. *S. aureus*-Phagen wurden dahingegen jedoch wenig erforscht. Ziel dieser Arbeit war es, einzelne Stadien im Lebenszyklus des lysogenen *S. aureus*-Phagen $\Phi 13$ unter verschiedenen infektionsrelevanten Bedingungen zu untersuchen.

Dabei sollte die Frequenz der *induzierten* und der extra-chromosomal replizierten Phagen unter diesen Bedingungen mit einer Real-Time-PCR-Strategie bestimmt werden. Zudem sollte untersucht werden welchen Einfluss diese Bedingungen auf den *Transfer* von $\Phi 13$ zwischen zwei verschiedenen *S. aureus*-Stämmen haben. Neben diesen *in vitro*-Versuchen sollte der Phagentransfer auch im Mausmodell untersucht werden. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war es, den Phagen $\Phi 13$ auf seine Fähigkeit hin zu untersuchen, verschiedene *S. aureus*-Stämme zu lysogenisieren.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Agarose, Low melting point	Biozym, Hess. Oldendorf
Anhydrotetracyclin hydrochlorid (AHT)	IBA, Göttingen
Brij 58	Serva, Heidelberg
BSA	Roche, Mannheim
Ciprofloxacin	Ciprobay 100, Bayer AG
Digoxigenin labeling and detection kit	Roche, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Lab lemco powder	Oxoid, Unipath LTD, Hampshire
Laurylsarcosin	Sigma, München
Mitomycin C	Sigma, Osterode
Trimethoprim (TMP)	Invitrogen, Karlsruhe
TBE	Invitrogen, Karlsruhe
TSB	Oxoid, Wesel
SuRE/Cu Buffer A	Roche, Mannheim
LightCycler SYBR-DNA-Kit	Roche, Mannheim
LightCycler DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim

Enzyme

Lysostaphin	Ambi products LLC, NY, USA
Proteinase K	Sigma, München
<i>Sma</i> I	Roche, Mannheim

Molekulargewichtstandard

Col	<i>S.aureus</i> - Stamm Col
-----	-----------------------------

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2. Materialien

Anaerokult ^R A	Merck, Darmstadt
Gußkammern	Biorad, München
Nylonmembran	Roche, Mannheim
Silica Beads, 0,1mm	BioSpec, USA
Sterilfilter 0,45 µm	Sartorius, Göttingen
QIAshredder Mini Column	Qiagen, Hilden
24-Well-Platte (TC-Platte-24-Well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
96-Well-Platte (Micro-Platte)	Greiner Bio-one, Frickenhausen

2.3. Geräte, Programme

PCR-LightCycler-Gerät	Roche, Mannheim
Photometer	Milton Roy, USA
Photometer	Pharmacia LKB ultrospec III
Zentrifuge	Sigma, 3K30, Osterode
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Shaker Fast Prep	Savant, Bio101
WINCAM 2.0	Cybertech, Berlin

2.4. Medien und Stammlösungen

TSA	15 g Agar auf 1 l TSB
TSB	30 g TSB für 1 l
1 x TE (pH 7,4)	10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)
CaCl ₂ -TSA-Platten	100 mM CaCl ₂ auf 500 ml TSA
Lysepuffer (PFGE)	50 ml Tris, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5 % Brij 58, 0,2 % Na-Desoxycholat, 0,5 % Lauroylsarcosin, mit dest. H ₂ O auffüllen, pH 7,6, autoklavieren
Proteolysepuffer	0,25 M EDTA, 20 mM EGTA, 1 % Laurylsarcosin pH 9,0
1 x PBS	7 mM Na ₂ HPO ₂ , 130 mM NaCl, pH 7,4

Phagenpuffer	1 mM MgSO ₂ , 4 mM CaCl ₂ , 50 mM Tris (pH 7,8), 5,9 g/l NaCl, 1 g/l Gelatine autoklavieren
NB2- CaCl ₂ -Platten	Lab-lemco-powder 10 g/l, Peptone 10 g/l, NaCl 5 g/l mit dest. H ₂ O auf 975 ml 100 mM CaCl ₂ , pH 7,5 hinzugeben.
Einfriermedium	TSB und Glycerin im Verhältnis 3:1
Phagentopagar	3 g casamino acid, 3 g Hefeextract, 5,9 g NaCl, 7,5 g Agar auf 1 l + Na-Citrat
TSA-Top-Agar (Softagar)	7,5 g Agar, 30 g TSB auf 1 l
Waschlösung	10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl pH 7,5

2.5. Bakterienstämme und Phagen

Tabelle 1

Verwendete *S. aureus*-Stämme und Phagen

	Stamm		Herkunft [Literaturstelle]	Hlb
	RN4220		[22]	+
Hlb-	8325-4 ¹		[80]	+
phagen-	8325-4Δgeh::pCL84(tet ^r)	CG7	C. Goerke	+
freie	S64c ²		[34]	+
Stämme	S90, S158, CFS555, K106B, 19sa, 40a, 47a		[33] ³	+
	8325-4Φ13	CG1	[31]	-
Hlb-	8325-4Φ13end::aphA3 ⁴	CG6	C. Goerke	-
Lysogene	8325-4Δgeh::pCL84- Φ13end::aphA3 ⁵	CG19	diese Arbeit	-
	S64		[34] ³	-
Phagen	Φ13			
	Φ13sak::aphA3 (Φ13kana)		C. Goerke	

¹ phagenfreies Derivat von Stamm RN1 (8325)

² phagenfreies Derivat von *S. aureus*-Patientenstamm S64

³ Stämme isoliert aus CF-Patientensputen

⁴ *aphA3*: Kanamycinresistenzgen

⁵ Φ13kana-Lysogen des Stamms CG7

2.6. Anzucht der Bakterienstämme

Die gefrorenen Reinkulturen wurden auf MH-Blutplatten ausgestrichen, bei 37 °C bebrütet und im Kühlschrank aufbewahrt. Für die Übernachtskultur (ÜN-Kultur) wurden einige Kolonien gepickt, in 5 ml TSB-Medium gelöst und bei 37 °C unter Schütteln (220 upm) bebrütet. Soweit nicht anders angegeben, wurden 10 ml TSB-Medium mit einer solchen *S. aureus*-ÜN-Kultur zu einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und 2 h (frühe exponentielle Wachstumsphase) unter Schütteln (220 upm) bei 37 °C angezogen.

2.7. Einfrieren von Bakterien

Von einer Platte wurden einige Kolonien in 1 ml Glycerin-TSB-Gemisch (1 Teil Glycerin, 3 Teile TSB-Medium) verrührt und bei -70 °C tiefgefroren.

2.8. Phageninduktion unter verschiedenen Bedingungen

2.8.1. Spontaninduktion der Prophagen Φ 13 und Φ 13kana

Die beiden lysogenen Stämme CG1 (8325-4 Φ 13) und CG6 (8325-4 Φ 13kana) wurden wie unter 2.6. beschrieben angezogen. Aus der ÜN-Kultur und aus der 2 h, 4 h und 6 h Wachstumsphase wurde jeweils 1 ml bei 10 000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -20 °C eingefroren.

2.8.2. Antibiotika, Wachstumstemperatur und Anaerobiose als Induktoren

Um die Auswirkung verschiedener infektionsrelevanter Stimuli auf die Phageninduktion zu untersuchen, wurde der lysogene *S. aureus*-Stamm CG1 (8325-4 Φ 13) wie unter 2.6. beschrieben angezogen. Je 1 ml davon wurde in einer 24-Well-Platte mit Mitomycin (0,3 µg/ml), Ciprofloxacin (0,25 µg/ml) und Trimethoprim (0,125 µg/ml) versetzt und bei 37 °C für 4 h inkubiert. Weitere Proben wurden ohne Antibiotikumzusatz bei 42 °C inkubiert (4 h), bzw. unter anaeroben Bedingungen (5 h) im Anaerobiertopf (Anaerokult^R A).

Als Kontrolle diente eine Probe ohne Antibiotikumzusatz, 37 °C Inkubationstemperatur, aerobes Milieu.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Proben in Eppendorfcups bei 10 000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -20 °C eingefroren.

2.8.3. Sputum als Induktor

Es wurden gesammelte Sputen (Trachealsekret) von verschiedenen CF-Patienten aufgetaut. Da die Proben zum Teil sehr zähflüssig waren, wurden sie zur Verflüssigung in QIAshredder Mini Columns bei 18 000 g für 2 min zentrifugiert und anschließend gemischt. Das Sputumgemisch wurde dünn auf Petrischalen ausgegossen und unter der UV-Lampe für 30 min unter gelegentlichem Umrühren sterilisiert. Das sterilisierte Sputumgemisch wurde dann mit TSB-Medium verdünnt und im Kühlschrank gelagert.

Zunächst wurde überprüft, ob die verwendeten Bakterienstämme in mit Sputum versetztem Medium wachsen würden. Die wie in 2.6. beschrieben angezogene Stämme CG1 (lysogener Stamm) und 8325-4 (Kontrollstamm) wurden dazu nach 2-stündiger Inkubationszeit mit sterilisiertem Sputumgemisch versetzt, so dass eine 10%ige Sputumlösung entstand. Kontrollproben blieben sputumfrei. Die Proben wurden bei 37 °C unter Schütteln (220 upm) bebrütet. In regelmäßigen Abständen wurde die OD₆₀₀ gemessen.

Um nun den Einfluss von Sputum auf die Induktion von $\Phi 13$ im Stamm CG1 zu prüfen, wurde CG1 wie unter 2.6. beschrieben angezogen. Zu dieser CG1-Flüssigkultur wurde sterilisiertes Sputum hinzugefügt, so dass eine 10%ige Sputumlösung entstand. Nach 4-stündiger Bebrütung wurde aus dem Bakterien-Sputum-Gemisch und der Kontrolle (CG1-Lösung ohne Sputum) je 1 ml entnommen und bei 10 000 rpm für 3 min zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -20 °C eingefroren.

2.9. Quantitative PCR

2.9.1. DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA um eine LightCycler-PCR durchzuführen, wurden die zu untersuchenden Bakterien-Pellets aufgetaut, in je 1 ml 1xTE-Puffer resuspendiert und in mit Silika-Glaskügelchen befüllte Screwcaps pipettiert. Diese wurden dann 2 x 20 sec bei 6500 rpm geschüttelt, anschließend für 2 min in kochendem Wasserbad erhitzt und auf Eis abgekühlt. Der Überstand wurde bei -20 °C eingefroren.

2.9.2. Quantitative Real-time-PCR (LightCycler-PCR)

Die zu untersuchenden Proben wurden aufgetaut und mit nucleasefreiem Wasser verdünnt (1:100). Dabei wurde von jeder Probe Doppelwerte bestimmt.

Tabelle 2

Reagenzien für den LightCycler-PCR-Mastermix, Gesamtmenge 10 µl

Reagenz	Menge
nucleasefreies Wasser	4,4 µl
MgCl ₂	1,6 µl
Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl
SYBR-Mix	1 µl
DNA-Template (= Probe 1:100 verdünnt)	1 µl

Tabelle 3
Primer für die LightCycler-PCR

Primer	Primer Sequenz
circle for	5' TTTTATTTATATGGGGTATTATTGA 3'
circle rev	5' GTGTATTCTCATTGTTAGAAAGAAAA 3'
gyr 547L	5' AGTCTTGTGACAATGCGTTTA 3'
gyr 297	5' TTAGTGTGGGAAATTGTCGATAAT 3'
hIb 258	5' ATTAGTTGGTGCACCTTACTG 3'
hIb N315	5' CCGAGTACAGGTGTTTGGTA 3'

Für die SYBR-Green-DNA-PCR wurde ein Programm verwendet, das folgendem Temperaturschema folgte: Denaturierung bei 95 °C für 30 Sekunden, dann 45 Zyklen mit 95 °C für 1 Sekunde, 55 °C für 10 Sekunden und 72 °C für 15 Sekunden. Die Analyse der Schmelzkurve erfolgte zwischen 45 °C und 96 °C und einem anschließenden Kühlungsschritt auf 40 °C. Die Gensequenzen *circle* (*attP*), *gyr* und *hIb* (*attB*) wurden damit quantitativ bestimmt. Als Standards dienten durch PCR hergestellte Amplifikate, die photometrisch quantifiziert und in logarithmischen Verdünnungsreihen verdünnt wurden. So konnte die absolute Kopienzahl in der Probe bestimmt werden.

Zur Auswertung wurden folgende Parameter berechnet:

Die Rate an extrachromosomaler Phagen-DNA im Verhältnis zur Gesamtmenge an Wirts-DNA in einer Probe (Kopien *attP* / Kopie *gyr*), die durchschnittliche Anzahl an replizierten Phagengenomen pro induzierter Zelle (Kopien *attP* / Kopie *attB*), und die Prophagen-Induktions-Rate, also die Menge an Prophagen, die in einer Probe induziert wurden, im Verhältnis zur Gesamtmenge an induzierbaren Prophagen (Kopien *attB* / Kopie *gyr*).

2.10. Bestimmung von Wachstumskurven

Die zu untersuchenden Bakterienstämme wurden über Nacht angezogen, 15 ml TSB-Medium zu einer OD_{600} von 0,05 angeimpft und unter Schütteln (220 upm) bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die OD_{600} bestimmt.

2.11. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) in Bakterienlösungen

Hierfür wurden 10 µl der zu untersuchenden Bakterienflüssigkultur in 10er-Schritten mit PBS verdünnt (Mikrotiterplatte). Davon wurden aus jeder Verdünnungsstufe 10 µl auf MH-Blut- bzw. TSA-Selektivplatten getropft und bei 37 °C für 18 - 24 Stunden bebrütet. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der Kolonien pro Tropfen und Umrechnung auf KBE/ml (Lebendkeimzahlbestimmung).

2.12. Gewinnung von gewaschenen Pellets und Überstand aus Flüssigkulturen

Je 2 ml der Bakterienlösung wurden bei 10 000 rpm für 3 min zentrifugiert. Vom Überstand wurde 1 ml entnommen und sterilfiltriert (0,45 µm). Die Pellets wurden in 2 ml PBS resuspendiert und wiederum zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet nochmals in 2 ml PBS resuspendiert. Diese gewaschene Bakterienlösung wurde dann weiterverwendet.

2.13. Mischkulturexperimente: Selektionsexperimente mit resistenzmarkierten Phagen und *S. aureus*-Stämmen

2.13.1. In vitro

Zur Untersuchung des Einflusses infektionsrelevanter Stimuli auf den Transfer von $\Phi 13$ wurden der Donorstamm und der Rezipientenstamm kokultiviert: Der lysogene, Kanamycin-resistenzmarkierte Stamm CG6 (Donor) und der Tetracyclin-resistenzmarkierte Stamm CG7 (Rezipient) wurden wie unter 2.6. beschrieben angezogen. Nach 2 h Inkubation wurde jeweils die OD_{600} bestimmt und Donor und Rezipient, soweit nicht anders angegeben, mit Hilfe der OD_{600} -Werte im Verhältnis 1:5 in einer 24-Well-Platte gemischt und mit TSB-Medium auf 1 ml aufgefüllt. Zu jeder Probe wurde das Tetracyclinanalogon AHT in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/l}$ zugegeben. Dies diente der Induktion der Tetracyclinresistenzkassette im Donor (CG7).

Zu den einzelnen Proben wurde, soweit nicht anders angegeben, Mitomycin in subinhibitorischer Konzentration (0,3 $\mu\text{g/ml}$), Ciprofloxacin (0,125 $\mu\text{g/ml}$ = $\frac{1}{2}$ MIC) oder Trimethoprim (0,125 μg = $\frac{1}{2}$ MIC) hinzugefügt und bei 37 °C für 2 h und 4 h inkubiert. Andere Proben wurden ohne Antibiotikumzugabe bei 42 °C ebenfalls für 2 bzw. 4 h inkubiert. Zur Bestimmung des Einflusses eines anaerobischen Wachstumsmilieus auf den Phagentransfer wurden Proben für 5 h im Anaerobiertopf inkubiert (Anaerokult^R A).

Die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) in den einzelnen Proben wurde wie unter 2.11. beschrieben bestimmt. Dazu wurden MH-Blutplatten und Selektivplatten verwendet: soweit nicht anders angegeben, TSA-Kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) und TSA-Tetracyclin (5 $\mu\text{g/ml}$). Die Mobilisierung und Aufnahme der Phagen (Phagentransfer) wurde jeweils durch Selektion auf TSA-Kanamycin-Tetracyclin-Platten (50 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$) getestet: Der primär tetracyclinresistente Rezipient erhält durch Aufnahme des $\Phi 13_{\text{kana}}$ -Phagen aus dem Donor eine zusätzliche Kanamycinresistenz und lässt sich somit auf der Doppelselektivplatte anzüchten.

Berechnung der Phagentransferrate: KBE auf Kanamycin-Tetracyclin/ KBE auf Tetracyclin. Aus den Doppelwerten und den Werten mehrerer Versuche

oder Versuchsansätze wurden der Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Die so erhaltenen Lysogene wurden gepickt, auf MH-Blut ausgestrichen und auf Hlb-Konversion hin untersucht. Das Hlb zeigt sich auf der Blutplatte als ein diffuser Hämolysehof. Dieser wird unter Inkubation bei 5 °C klar und scharf abgrenzbar.

2.13.2. In vivo (Mausmodell)

Mit einem Fremdkörperinfektionsmodell (Tissue-Cage-Modell) sollte untersucht werden, in wie weit ein Phagentransfer zwischen dem Donorstamm CG6 und dem Rezipientenstamm CG7 auch *in vivo* möglich ist. Dazu wurde Mäusen (C 57 BL/6-Mäuse, 10-12 Wochen alt) sterile, perforierte Teflonhohlzylinder subkutan implantiert. Nach Abheilung konnten dann die Bakterienlösungen injiziert werden (Inokulum insgesamt: 1×10^5 KBE/Maus aus der frühexponentiellen Wachstumsphase). Donor und Rezipient wurden im Verhältnis 1:1, 5:1 und 1:5 gemischt. Als Kontrolle wurden einige Mäuse nur mit dem Donor, einige Mäuse nur mit dem Rezipienten inokuliert.

Die Exsudatflüssigkeit wurde zu mehreren Zeitpunkten (Tag 2 und Tag 8 nach Infektion) punktiert und tiefgefroren (-70 °C).

Zur Ermittlung des *in vivo* stattgefundenen Phagentransfers wurden die Exsudate aufgetaut, je 50 µl entnommen, in einer Mikrotiterplatte mit AHT versetzt (Konzentration 200 µg/l) und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, in einer Verdünnungsreihe verdünnt und auf die Selektivplatten TSA-Kanamycin (50 µg/ml), TSA-Tetracyclin (3 µg/ml) und TSA-Kanamycin-Tetracyclin (50 µg/ml, 3 µg/ml) je doppelt aufgetropft. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die KBE bestimmt und die Phagentransferrate ermittelt.

2.14. Gewinnung von Phagenlysaten und Phagentiterbestimmung

Freie Φ 13-Phagen sollten auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, unterschiedliche *S. aureus*-Stämme zu lysogenisieren.

Zur Gewinnung von Phagenlysaten wurden lysogene Stämme, wie unter 2.6. beschrieben, bis zu einer OD_{600} von 0,8 (frühexponentielle Phase) bebrütet. Dann wurde Mitomycin in einer Konzentration von 1 mg/ml (20 μ l aus 0,5 mg/ml Stammlösung auf 10 ml) zugegeben und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Je 2 ml wurden zentrifugiert (3 min, 10 000 rpm), sterilfiltriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Um den Phagentiter in den Lysaten zu erhöhen wurde eine Anreicherung der Phagen durchgeführt: Einige Kolonien des *S. aureus*-Stamms RN4220 wurden in 500 μ l Phagenpuffer eingerieben, mit 500 μ l Phagenlysat und 4 ml TSA-Top-Agar (Softagar) gemischt und zügig auf vorbereiteter TSA- $CaCl_2$ -Platten ausgegossen. Die Platten wurden bei 37 °C bebrütet und nach ca. 6 h geerntet. Dazu wurden 4 ml TSB-Medium auf die Platten pipettiert und die Softagarschicht vorsichtig abgekratzt. Das so gewonnene Material wurde im Wasserbad (50 °C) für ca. 10 min erhitzt und bei 50 00 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstände wurden sterilfiltriert und im Kühlschrank gelagert.

Zur Bestimmung des Phagentiters in diesen Phagenlysaten wurde ein Phagentropfassay angewandt: Der *S. aureus*-Stamm RN4220 wurde wie unter 2.6. beschrieben bis zu einer OD_{600} von 0,8 angezogen. Je 4 ml des in der Mikrowelle aufgeschmolzenen, in einem 50 °C heißen Wasserbad abgekühlten Phagentopagar wurden mit 50 μ l Bakterienlösung versetzt und auf eine NB2- $CaCl_2$ -Platte gegossen. Das zu untersuchende Lysat wurde in 10er Schritten mit sterilfiltriertem Phagenpuffer verdünnt und aus jeder Verdünnungsstufe wurden 10 μ l auf die vorbereiteten Platten getropft. Die Platten brüteten dann über Nacht bei 37 °C und die entstandenen Plaques im Bakterienrasen wurden ausgezählt.

2.15. Lysogene

2.15.1. Gewinnung von Lysogenen

S. aureus-Stämme wurden, wie unter 2.6. beschrieben, für 2 h angezogen. Dann wurde in 24-Well-Platten zu je 1 ml Bakteriensuspension 50 µl Phagenlysat des Stammes CG6 (enthält Φ 13kana-Phagen) gegeben und diese für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden verdünnt und auf MH-Blut und auf TSA-Kanamycin-Platten doppelt aufgetropft (siehe dazu 2.11.). Bei den auf Kanamycin wachsenden Kolonien handelt es sich um neu entstandene lysogene *S. aureus*-Stämme, da hier zusammen mit dem Φ 13-Phagen auch die Kanamycin-Resistenzkassette ins Bakteriengenom integriert wurde. Teilt man die Anzahl der auf Kanamycin-Platten gewachsenen Kolonien durch die auf Blut gewachsenen, so lässt sich die Rate der Phagenaufnahme (Lysogenisierungsrate) berechnen.

Die so erhaltenen Lysogene wurden gepickt und auf MH-Blut gestrichen und somit auf Hlb-Konversion hin untersucht (siehe dazu 2.13.1.).

2.16. Nachweis von phagenkodierten Genen mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und Southern-Blot

Einige dieser lysogenen Kolonien wurden mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und Southern-Analyse auf das neu erworbene Φ 13-kodierte Gen *sak* bzw. die phagenkodierte Kanamycinkassette (*aphA3*) hin überprüft. Diese Versuche wurden von Simone Esser durchgeführt.

2.16.1. Isolierung der chromosomaler DNA

Für die Isolierung der chromosomalen DNA wurden 5 ml TSB mit den zu untersuchenden Kolonien angeimpft und als ÜN-Kultur bei 37 °C bebrütet. Nach 16 Stunden wurden die Bakterien geerntet. Hierfür wurde die Menge aus der ÜN-Kultur entnommen, die einer $OD_{600} = 0,5$ entspricht. Diese wurde bei 10 000 upm für 3 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml Waschlösung gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das

Pellet in 100 µl Waschlösung resuspendiert und auf 55 °C erwärmt. Nachdem auch 100 µl 2 % low melting point Agarose (in TE, pH 8,0) auf 55 °C erwärmt wurde, wurde beides miteinander vermischt und in vorgefertigte Gußkammern zum Aushärten pipettiert. Die erhärteten Agaroseblöckchen wurden in 1 ml Lysepuffer (6 mM Tris - HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5 % Brij 58, 0,2 % Na-Desoxycholat, 0,5 % Laurylsarcosin pH 7,6) plus 5 µl Lysostaphin (10 mg/ml) überführt und zum Inkubieren unter leichtem Schütteln in einen Kühlschrank (4 °C) gelegt. Nach 12 Stunden wurde der Lysepuffer durch 1 ml Proteolysepuffer (0,25 M EDTA, 20 mM EGTA, 1 % Laurylsarcosin pH 9,0) plus 50 µl Proteinase K (10 mg/ml) ersetzt und über Nacht in einem 50 °C heißen Wasserbad inkubiert mit zwischenzeitlichem Pufferwechsel. Zum Abschluss wurden die Blöckchen fünfmal für mindestens 2 Stunden mit 1 ml TE, pH 8,0 bei 4 °C unter Schütteln gewaschen. Die Proben wurden dann entweder direkt im Restriktionsverdau weiter bearbeitet oder aber in 0,5 M EDTA bei 4 °C aufbewahrt. Zum Entfernen des EDTA wurden die Blöckchen mit TE gewaschen.

2.16.2. Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden 1 bzw. 0,5 x 0,2 cm große Fragmente aus dem Agaroseblöckchen geschnitten und mit 200 µl eines Restriktionsansatzes versetzt.

Restriktionsansatz mit *Sma*I (200 µl)

Probe	100 µl
BSA (20 mg/ml)	1 µl
SuRE/Cut Buffer A	20 µl
Nucleasefreies H ₂ O	78 µl
<i>Sma</i> I (10 U/µl)	1 µl

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Restriktionsendonuklease *Sma*I erkennt die folgende DNA-Sequenz: ...CCC↓GGG.... Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht wurde der Verdau mit 500 µl TE gestoppt. Die Proben konnten nun entweder bei 4 °C maximal einen Tag aufbewahrt oder direkt zur Elektrophorese eingesetzt werden.

3.16.3. Elektrophorese

Die Elektrophorese (PFGE) erfolgte in einem 1 % Agarosegel (Seakam GTG in 0,5xTBE) mit 0,5xTBE als Laufpuffer. Als Molekulargewichtsstandard wurden in die äußersten Taschen jeweils Col (*Sma*I verdaute DNA des sequenzierten *S. aureus*-Stamms Col) eingesetzt. Danach erfolgte die Auftrennung der DNA bei 200 V mit Pulszeiten von 1 bis 45 Sekunden für 24 Stunden bei 12 °C. Im Anschluss wurde das Gel in 0,5xTBE mit 0,5 g/ml Ethidiumbromid für 30 Minuten gefärbt und auf einem Transilluminator mit einer Videokamera aufgenommen und digitalisiert.

3.16.4. Southern Analyse (Hybridisierung)

Die doppelsträngige DNA auf dem PFGE-Gel wurde zunächst für 15 min mit 0,25 M HCl depurinisiert, dann für 2 x 15 min in Denaturierungspuffer (3 mol/l NaCl, 0,4 mol/l NaOH) geschwenkt. Das Gel wurde dann mittels Kapillar-Blot in Denaturierungspuffer während 24 h auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Es folgte eine Vorhybridisierung für 30 min bei 42 °C mit dem Hybridisierungspuffer „ULTRAhyb“. Zur anschließenden Hybridisierung wurde die Membran mit *sak*- und *kana*-spezifischen Sonden (1:2000 verdünnt in „ULTRAhyb“, in kochendem Wasser denaturiert) über Nacht bei 42 °C inkubiert. Die Membran wurde dann für 2 x 5 min mit 2 x SSC/0,1% SDS und 2 x 15 min mit 0,2 x SSC/0,1% SDS inkubiert (jeweils bei 42 °C). Es folgte ein Waschgang mit Washing Buffer für 1 min und Inkubation für 30 min mit Blocking solution (Blocking verdünnt mit Maleinsäure Puffer). Zur Detektion der Sonden wurde die Membran mit Digoxigenin-Antikörpern

(1:10 000 verdünnt mit Blocking/Maleinsäure-Lösung) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 2 x 15 min mit Washing Buffer gewaschen und für 2 min mit Detektionspuffer inkubiert. Das Chemolumineszenzsubstrat (CSPD in Detektionspuffer 1:100 verdünnt) wurde zugegeben und die Membran für ca. 30 min auf dem Detektionsfilm bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Film entwickelt. Die Reagenzien stammten aus dem Digoxigenin labeling and detection kit (Roche).

3. Ergebnisse

3.1. Phageninduktion bei *S. aureus*

Der Übergang der *S. aureus*-Prophagen aus dem lysogenen Zustand in die lytische Form (Induktion) sollte quantitativ untersucht werden und Bedingungen, unter welchen dieser Übergang vermehrt stattfindet, identifiziert werden.

Dazu wurden mit der Methode der Real-Time-PCR die Gensequenzen *circle*, *hly* und *gyr* quantifiziert. Die Menge an neu formierten *attP*-Stellen (Gen *circle*) in der Probe repräsentierte die Anzahl an extrachromosomaler Phagen-DNA (replizierte Phagen Genome) nach erfolgter Induktion der Prophagen. Die Menge an wiederhergestellter *attB*-Stellen (Gen *hly*) entsprach der Menge an induzierten Bakterienzellen in der Probe. Zusätzlich wurde in der Probe das Gen *gyr* als chromosomales Referenzgen quantitativ bestimmt (siehe Schaubild Abb. 2). Aus diesen 3 Messgrößen konnten dann folgende Parameter berechnet werden: die Rate an extrachromosomaler Phagen-DNA im Verhältnis zur Gesamtmenge an Wirts-DNA in einer Probe (Kopien *attP* / Kopie *gyr*), durchschnittliche Anzahl an replizierten Phagen Genomen pro induzierter Zelle (Kopien *attP* / Kopie *attB*), was indirekt der „Burst-size“ entspricht, und die Prophagen-Induktionsrate, die Menge an Prophagen also, die in einer Probe induziert wurden, im Verhältnis zur Gesamtmenge an induzierbaren Prophagen (Kopien *attB* / Kopie *gyr*).

3.1.1. Spontaninduktion der Prophagen Φ 13 und Φ 13kana in den Stämmen CG1 (8325-4 Φ 13) und CG6 (8325-4 Φ 13kana)

Zunächst sollte die spontane Induktion, also die Induktion der Prophagen Φ 13 und Φ 13kana ohne besondere Stimuli, getestet werden. Hierbei konnte im mutagenisierten Stamm CG6 (8525-4 Φ 13kana) eine höhere spontane Induktion des Prophagen (z.B. 0,98 Kopien *attP* / Kopie *gyr* bei 2 h) beobachtet werden als im Stamm CG1 (0,2 Kopien *attP* / Kopie *gyr* bei 2 h)

(Abb. 3). Deshalb wurden weitere Experimente zum Einfluss externer Stimuli auf die Induktionsrate mit dem Stamm CG1 durchgeführt.

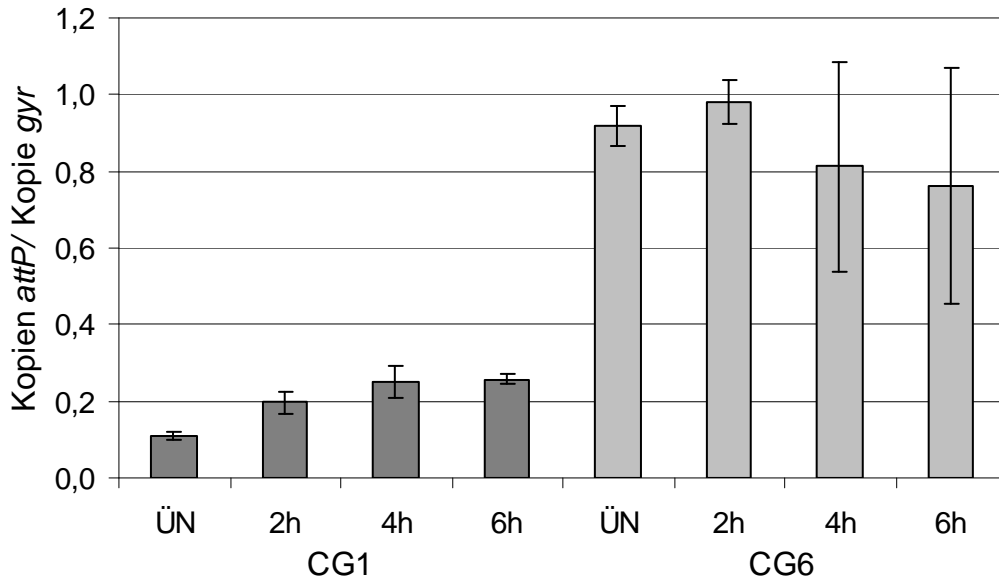


Abbildung 3:

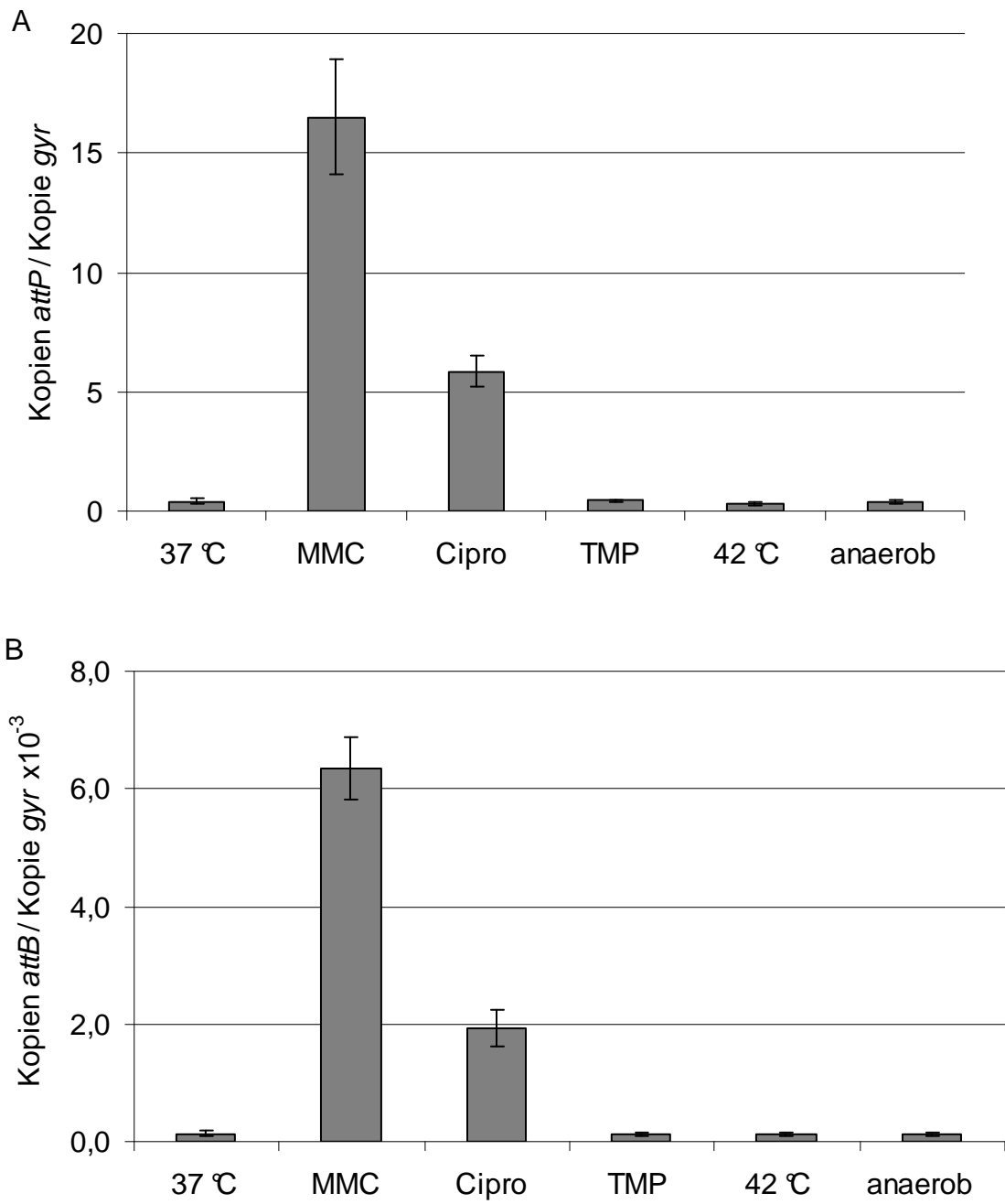
Rate an extrachromosomaler Phagen-DNA (*attP*) im Verhältnis zur Gesamtmenge an Wirts-DNA (*gyr*) in einer Probe. Die Lysogene CG1 (8325-4 Φ 13) und CG6 (8325-4 Φ 13kana) wurden aus verschiedenen Wachstumsphasen (ÜN, 2 h, 4 h und 6 h) entnommen. Werte aus 2 separaten DNA-Isolierungen wurden herangezogen um die Mittelwerte zu berechnen (+/- Standardabweichung).

3.1.2. Induktion von Φ 13 durch verschiedene infektionsrelevante Stimuli

Es sollte untersucht werden durch welche Stimuli, die während Infektionen vorhanden sind, der Prophage Φ 13 im Stamm CG1, vermehrt induziert wird und in das lytische Stadium eingeht. Als solche Stimuli wurden die Antibiotika Ciprofloxacin und Trimethoprim, eine erhöhte Inkubationstemperatur (42 °C) und Inkubation unter anaerobischen Bedingungen gewählt. Als Positivkontrolle diente die Inkubation mit Mitomycin, als Negativkontrolle die Inkubation bei 37 °C ohne Antibiotikumzugabe.

Hierzu wurde der lysogene Stamm CG1 (8325-4 Φ 13) für 4 Stunden unter diesen verschiedenen Bedingungen angezogen. Die DNA wurde isoliert, die 3 Gensequenzen *circle*, *gyr* und *h1b*, wie oben beschrieben, quantifiziert und die Parameter berechnet.

3. ERGEBNISSE



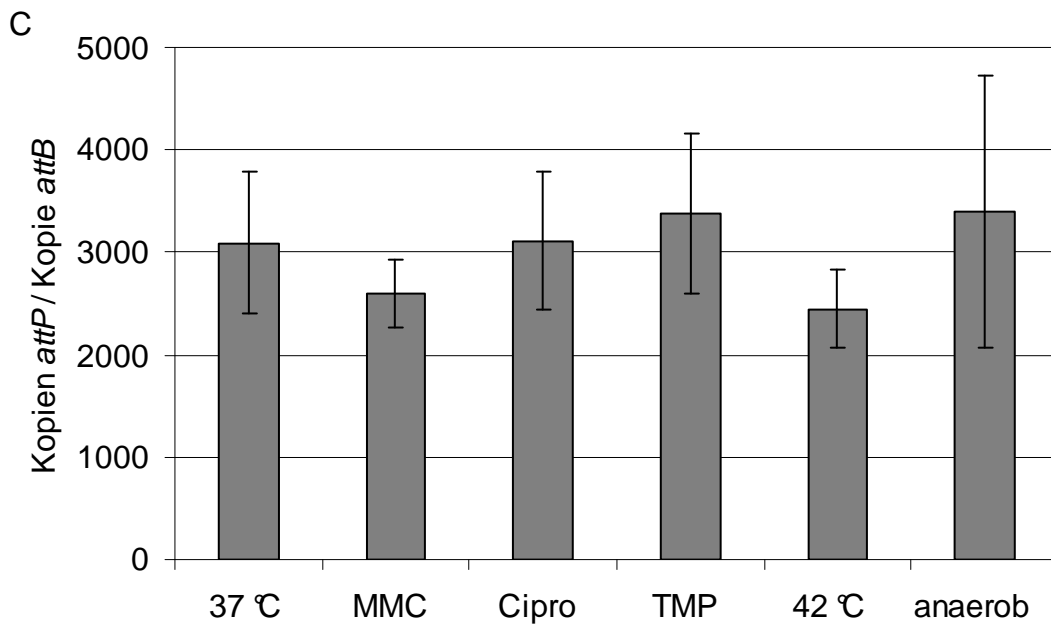


Abbildung 4:

Rate an extrachromosomaler Phagen-DNA (*attP*) im Verhältnis zur Gesamtmenge an Wirts-DNA (*gyr*) in einer Probe (A), Prophagen-Induktionsrate (B) und replizierte Phagengenome (*attP*) pro induzierter Zelle (*attB*) (C). Der lysogene Stamm CG1 (8325-4Φ13) wurde bei 37 °C bzw. 42 °C inkubiert, mit Mitomycin (MMC) 0,3 µg/ml, Ciprofloxacin (Cipro) 0,25 µg/ml (1 MIC) oder Trimethoprim (TMP) 0,125 µg/ml (1/2 MIC) versetzt oder unter anaeroben Bedingungen jeweils für 4 h inkubiert. Werte aus 2 separaten DNA-Isolierungen wurden zur Berechnung der Mittelwerte herangezogen (+/- Standardabweichung).

Mitomycin und Ciprofloxacin, beide in Konzentrationen, die der MIC entsprechen, zeigten einen induzierenden Effekt auf den Prophagen Φ13 (16,5 Kopien *attP* / Kopie *gyr* bei Mitomycin, 5,9 Kopien *attP* / Kopie *gyr* bei Ciprofloxacin, im Vergleich zu 0,42 Kopien *attP* / Kopie *gyr* in der Kontrolle (37 °C)) (Abb. 4A). Bei dem Antibiotikum Trimethoprim (1/2 MIC) war kein Effekt zu erkennen (0,42 Kopien *attP* / Kopie *gyr*), ebenso bei einer erhöhten Inkubationstemperatur (0,32 Kopien *attP* / Kopie *gyr*) oder anaerobem Wachstumsmilieu (0,37 Kopien *attP* / Kopie *gyr*).

Der induzierende Effekt von Mitomycin und Ciprofloxacin wurde auch in der Induktionsrate deutlich (Abb. 4B). Unter Mitomycinzugabe kam es zu einer Induktionsrate von $6,3 \times 10^{-3}$, unter Ciprofloxacin bei $1,9 \times 10^{-3}$. Unter Trimethoprim (1/2 MIC), 42 °C Inkubationstemperatur und anaerobischem Milieu ließen sich ähnliche Induktionsraten wie in der Kontrolle (37 °C)

beobachten ($0,1 \times 10^{-3}$). Die Anzahl an replizierten Phagen pro induzierter Zelle (was indirekt die „Burst-size“ wiedergibt) war bei allen Bedingungen in etwa gleich und lag bei ca. 3000. (Abb. 4C).

3.1.3. Induktion von Phage $\Phi 13$ durch Patientensputum

3.1.3.1. Wachstum von CG1 in Sputum

Bevor eine induzierende Wirkung von Patientensputum auf $\Phi 13$ untersucht werden konnte, musste bestimmt werden, ob der lysogene Stamm CG1 in 10%igem Sputum wachsen kann. Dazu wurde ein Sputumpool aus mehreren CF-Patientensputen hergestellt und UV-sterilisiert. Den Bakterien-suspensionen von CG1 und 8325-4 (phagenloser Referenzstamm) wurde nach 2-stündiger Inkubation dieses Sputum zugegeben und für weitere 6 Stunden inkubiert. Die OD_{600} wurde zu bestimmten Zeiten bestimmt. Wie in Abb. 5 zu sehen, wuchs sowohl der phagenlose Stamm 8325-4 (von OD_{600} 2,77 auf 5,0), als auch der lysogene Stamm CG1 (von OD_{600} 3,2 auf 6,9) in 10%igem Sputum an.

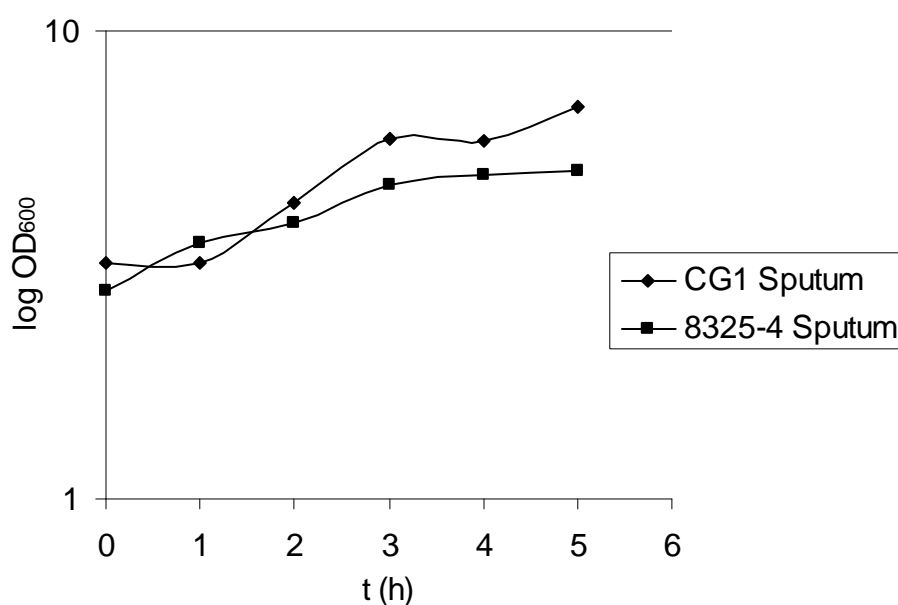


Abbildung 5:

Wachstumskurve (OD_{600}) der *S. aureus*-Stämme CG1 und 8325-4 in 10%igem Sputum-TSB-Gemisch. Zeitpunkt 0: Zugabe des Sputums.

3.1.3.2. Sputum als Induktor für $\Phi 13$

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob im vorhandenen Patientensputum Faktoren enthalten sind, die in der Lage sind die Induktion von $\Phi 13$ im Wirt CG1 zu beeinflussen. Eine CG1-Bakteriensuspension wurde hierfür mit 10%igem Sputum inkubiert, die DNA isoliert und die oben genannten Gensequenzen mit Hilfe der Real-Time-PCR quantifiziert (Abb. 6). Das verwendete Sputum zeigte hierbei keinen induzierenden Effekt auf den Prophagen $\Phi 13$ (0,19 Kopien *attP* / Kopie *gyr* im Vergleich zu 0,2 Kopien *attP* / Kopie *gyr* in der Kontrolle (37 °C)).

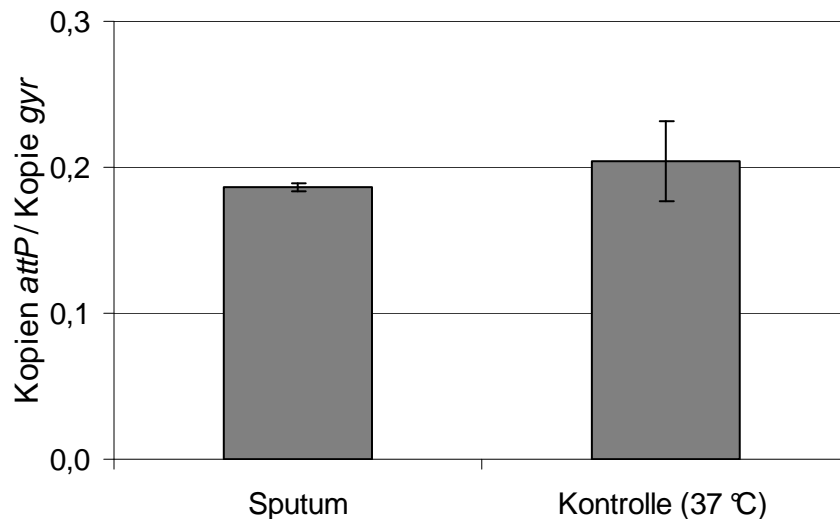


Abbildung 6:

Rate an extrachromosomaler Phagen-DNA (*attP*) im Verhältnis zur Gesamtmenge an Wirts-DNA (*gyr*) in einer Probe. Der lysogene Stamm CG1 (8325-4 $\Phi 13$) wurde bei 37 °C unter Zugabe von 10%igem Sputum für 4 h inkubiert, die Kontrolle blieb sputumfrei. Werte aus 2 separaten DNA-Isolierungen wurden zur Berechnung der Mittelwerte herangezogen (+/- Standardabweichung).

Zusammenfassend zeigten die Induktionsversuche, dass sich $\Phi 13$ durch Mitomycin und Ciprofloxacin vermehrt induzieren ließ. Trimethoprim in einer subinhibitorischen Konzentration, 42 °C Inkubations temperatur, anaerobe Wachstumsverhältnisse und Sputum hingegen wirkten nicht induzierend. Drückt man die Menge an wiederhergestelltem *hIb* (*attB*) in Prozent der Gesamtmenge an Wirtsgenomen (*gyr*) aus, so erhält man für 37 °C eine

3. ERGEBNISSE

Induktionsrate von 0,01 %, d.h. 0,01 % der Lysogene in der Probe wurden induziert. Diese Zahl stellt die spontane Induktionsrate dar. Unter Mitomycinzugabe steigerte sich diese Rate auf ca. 0,6 %, unter Ciprofloxacin ließen sich 0,2 % der Prophagen induzieren. Die Induktionsraten für die anderen Bedingungen entsprachen in etwa der spontanen Induktionsrate.

3.2. Transfer von Φ 13: Mischkulturexperimente

Es wurde untersucht in wie weit die induzierten und freigesetzten neuen Bakteriophagen erneut Bakterien infizierten und welchen Einfluss infektionsrelevante Stimuli auf diesen Transfer von Phagen haben. Dazu wurden die beiden Stämme CG6 und CG7 kokultiviert. Der mutagenisierte, tetracyclinresistente Rezipientenstamm CG7 (8325-4tet) erhielt durch Aufnahme des Φ 13kana-Phagens aus dem Donorstamm CG6 (8325-4 Φ 13kana) eine zusätzliche Kanamycinresistenz und ließ sich somit auf einer Doppelselektivplatte anzüchten (Abb. 7).

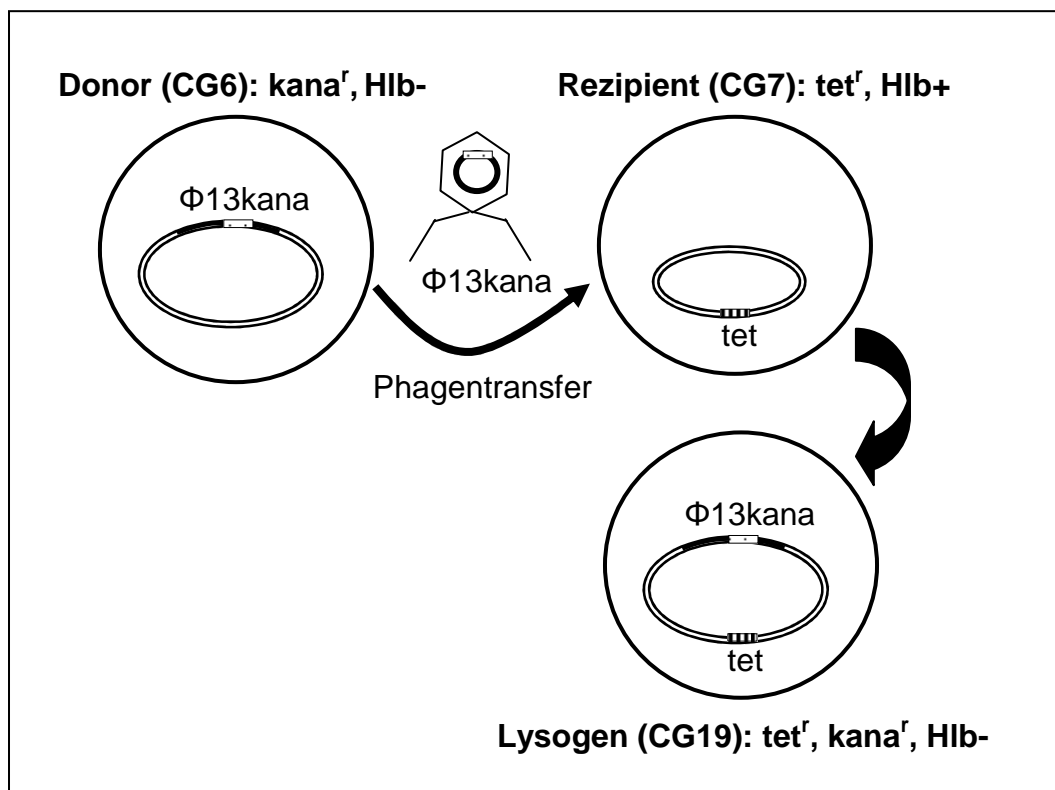


Abbildung 7:

Phagentransfer: Prinzip der Mischkulturexperimente. Erläuterungen siehe Text.

3.2.1. Charakterisierung der resistenzmarkierten Stämme

Zunächst sollten die beiden antibiotikummarkierten Stämme im Vergleich zum Wildtyp charakterisiert werden. Die mutagenisierten *S. aureus*-Stämme CG6 (8325-4 Φ 13kana) und CG7 (8325-4tet) wurden auf ihr Wachstumsverhalten in Kulturmedium hin untersucht. Als Vergleichsstamm diente der lysogene Stamm CG1 (8325-4 Φ 13).

Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied im Wachstum der mutagenisierten Stämme CG6 und CG7 im Vergleich zum Ausgangsstamm CG1 (Abb. 8). Die 3 Stämme wuchsen innerhalb von ca. 8 Stunden von einer OD₆₀₀ 0,05 auf 4,3 (CG1), 3,7 (CG6) und 4,5 (CG7).

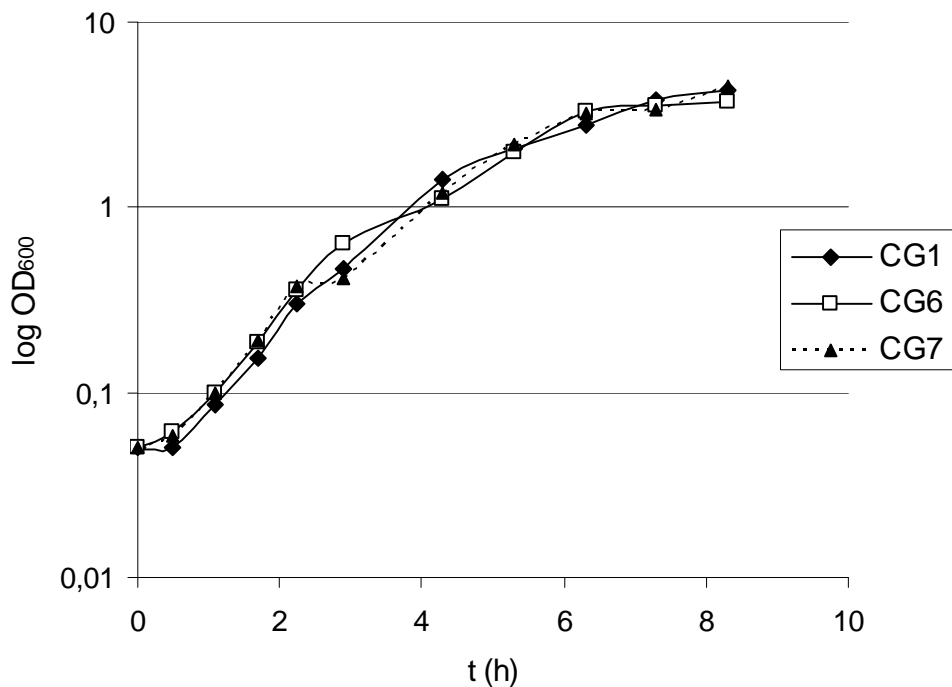


Abbildung 8:

Wachstumskurve (OD₆₀₀) der Stämme CG1 (8325-4 Φ 13), CG6 (8325-4 Φ 13kana) und CG7 (8325-4tet) über 8 Stunden.

3. ERGEBNISSE

Zusätzlich zu der Bestimmung von Wachstumskurven wurde eine Lebendkeimzahlbestimmung (Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE)) der beiden mutagenisierten Stämme und des in den Mischversuchen entstehenden doppelresistenten Lysogens CG19 (8325-4tet Φ 13kana) durchgeführt.

Hierbei konnte eine Inhibition im Wachstum von CG7 und CG19 auf den Tetracyclin-Selektivplatten festgestellt werden (Tab. 4). Das Verhältnis KBE auf Selektivplatte zu KBE auf Blut betrug bei CG7 und CG20 jeweils nur 4 %, während der kanamycinresistente Stamm CG6 ein annähernd gleiches Wachstum auf der Selektivplatte und der Blutplatte zeigt (Verhältnis KBE auf Selektivplatte / KBE auf Blut 125 %).

Tabelle 4:

Lebendkeimzahlbestimmung (KBE/ml) der Stämme CG6 (8325-4 Φ 13kana), CG7 (8325-4tet) und CG19 (8325-4tet Φ 13kana) auf der jeweiligen Selektivplatte und MH-Blutplatten.

S. aureus-Stamm	Inkubation	
	4 h	ÜN
CG6^a	125 % (+/- 26%)	63 % (+/- 13%)
CG7^b	4 % (+/- 2%)	32 % (+/- 5%)
CG7^b, AHT¹	83 % (+/- 2%)	98 % (+/- 15%)
CG19^c	4 % (+/- 1%)	n.b.
CG19^c, AHT¹	98 % (+/- 70%)	n.b.

Dargestellt sind die Verhältnisse KBE auf Selektivplatte in % der KBE auf Blut

^a Selektivplatte: Kanamycin 50 μ g/ml

^b Selektivplatte: Tetracyclin 5 μ g/ml

^c Selektivplatte: Kanamycin 50 μ g/ml, Tetracyclin 5 μ g/ml

¹ Inkubation mit AHT (200 μ g/ml)

n.b.: nicht bestimmt

+/- Standardabweichung

Diese Inhibition der Tetracyclinresistenz ließ sich durch Zugabe des Tetracyclinanalogons AHT minimieren. Dazu wurde in die CG7- und CG19-Flüssigkultur AHT in einer Konzentration von 200 µg/ml zugegeben. Nach 4-stündiger Inkubation bzw. Inkubation über Nacht wurde die Lebendkeimzahl bestimmt. Es ließ sich damit eine Annäherung der Keimzahlen auf der Selektivplatte an die Keimzahlen auf Blut erreichen (CG7, 4 h 83 %; CG7, ÜN 98 %; CG19 98 %) (Tab. 4).

AHT wurde daher auch in den nachfolgenden Versuchen verwendet um die Tetracyclinresistenzkassette zu induzieren.

3.2.2. Mischkulturexperimente unter verschiedenen Bedingungen

3.2.2.1. Infektionsrelevante Stimuli

Die Mischkulturexperimente sollten unter verschiedenen Bedingungen, welche bei Infektionen, z.B. im menschlichen Bronchialtrakt vorzufinden sind, durchgeführt werden, um infektionsrelevante Einflüsse auf den Phagentransfer zu untersuchen. Folgende Bedingungen wurden gewählt: Subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen: Mitomycin 0,3 µg/ml, Ciprofloxacin 0,125 µg/ml und Trimethoprim 0,125 µg/ml, eine erhöhte Inkubationstemperatur (42 °C) und Wachstum unter anaeroben Bedingungen. Als Kontrolle diente eine Probe ohne Zusatz, bei 37 °C inkubiert. Die beiden Bakterienstämme CG6 und CG7 wurden unter diesen Bedingungen für 2 bzw. 4 Stunden kokultiviert und anschließend die koloniebildenden Einheiten bestimmt (Abb. 9). Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch. Die induzierende Wirkung von Ciprofloxacin, die in Kapitel 3.1.2. gezeigt wurde, wirkte sich auch auf einen erhöhten Phagentransfer von Φ13kana vom Donorstamm auf den Rezipientenstamm aus ($2,2 \times 10^{-6}$ bei 2 h bzw. $0,8 \times 10^{-6}$ bei 4 h versus $0,2 \times 10^{-6}$ bzw. $0,4 \times 10^{-6}$ bei der Kontrolle (37 °C)). Für Trimethoprim konnte in den Induktionsversuchen (siehe Kapitel 3.1.2.) keine induzierende Wirkung nachgewiesen werden, jedoch ließ sich in den Mischkulturexperimenten ein erhöhter Phagentransfer unter Trimethoprim beobachten ($0,8 \times 10^{-6}$ bei 2 h bzw. $2,4 \times 10^{-6}$ bei 4 h). Ein Einfluss auf den

3. ERGEBNISSE

Phagentransfer unter erhöhter Inkubationstemperatur und anaeroben Wachstumsbedingungen konnte nicht nachgewiesen werden. Bei Mitomycin konnte nur eine sehr geringe Zahl an Lysogenen auf der Doppelselektivplatte Kanamycin-Tetracyclin gezählt werden. Neu entstandene Lysogene wurden durch die starke induzierende Wirkung von Mitomycin sofort wieder induziert und lysiert und waren daher nicht nachweisbar.

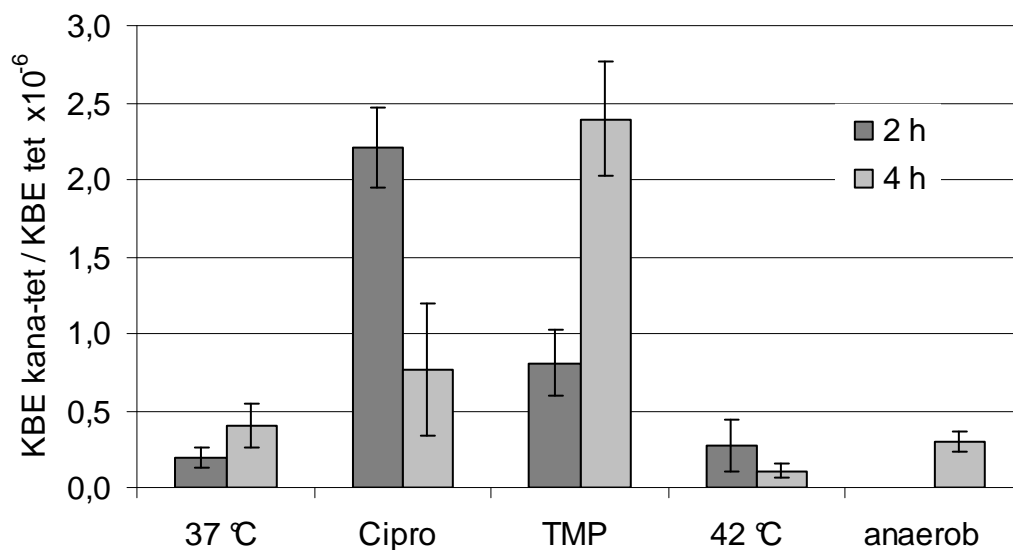


Abbildung 9:

Phagentransferrate (Verhältnis der ermittelten koloniebildenden Einheiten (KBE) auf TSA-Kanamycin-Tetracyclin-Platten / KBE auf TSA-Tetracyclin-Platten) nach Mischen von Donor (CG6) und Rezipient (CG7) im Verhältnis 1:5. Inkubation für 2 h und 4 h bei 37 °C, unter Zugabe von Ciprofloxacin (0,125 µg/ml) oder Trimethoprim (0,125 µg/ml), bei 42 °C oder unter anaerober Bedingung (Inkubationsdauer 4 h). Dargestellt ist ein exemplarischer Versuch. Die Mittelwerte wurden aus jeweils 2 Versuchsansätzen berechnet (+/- Standardabweichung).

3.2.2.2. Beitrag freier Phagen aus dem Überstand zur Transferrate

Es galt zu untersuchen welchen Beitrag zur Phagentransferrate die im Überstand einer Donorkultur enthaltenden freien Phagen gegenüber den während der Kokultivierung durch Induktion im Donor entstehenden Phagen leisten.

Dazu wurde zum einen eine phagenfreie Bakterienlösung (resuspendierte Pellets einer Donorkultur), zum anderen eine bakterienfreie Phagenlösung (Überstand einer Donorkultur) mit dem Rezipientenstamm kokultiviert:

Eine Donor-Bakterienkultur aus unterschiedlichen Wachstumsphasen (ÜN, 6 h, 4 h und 2 h) wurde zentrifugiert, das erhaltene Bakterienpellet gewaschen und resuspendiert, der Überstand sterilfiltriert. Die Bakterienlösung wurde mit dem Rezipienten (aus der exponentiellen Wachstumsphase) im Verhältnis 1:5 gemischt. Dieselbe Menge Rezipientenkultur wurde mit je 100 µl sterilfiltriertem Überstand versetzt. Nach 4-stündiger Inkubation wurden 10 µl des Donor-Rezipienten-, bzw. Überstand-Rezipienten-Gemisches in einer Verdünnungsreihe auf Blut- und Selektivplatten aufgetropft, um die KBE zu bestimmen. Die Phagentransferrate wurde berechnet.

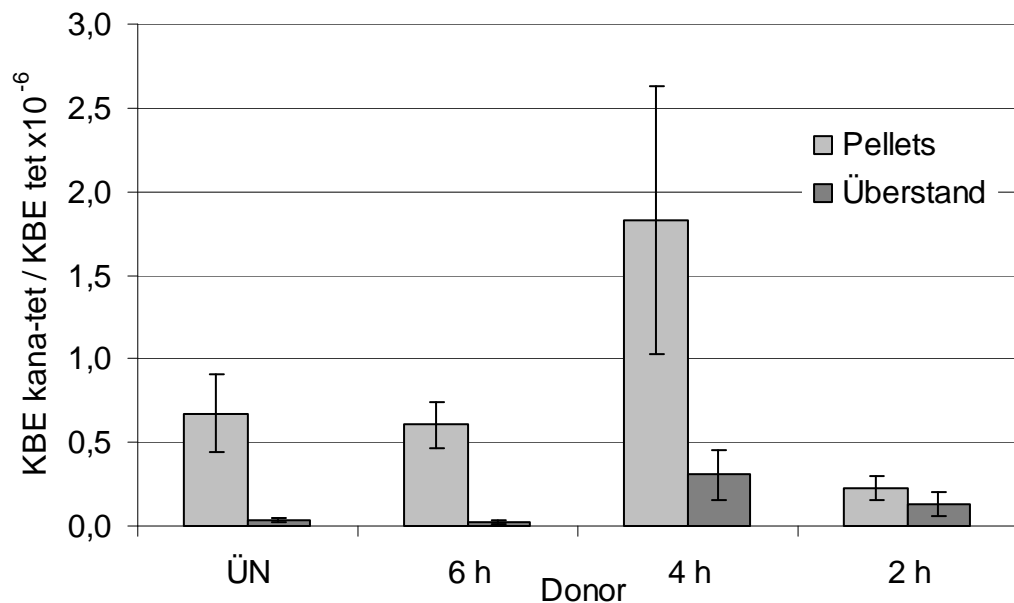


Abbildung 10:

Phagentransferrate (Verhältnis der ermittelten koloniebildenden Einheiten (KBE) auf TSA-Kanamycin-Tetracyclin-Platten / KBE auf TSA-Tetracyclin-Platten) nach Mischen von Donor (CG6) in Form von resuspendierten Donorzellen (Pellets), bzw. Phagen-enthaltendem Überstand aus den Wachstumsphasen ÜN, 6 h, 4 h und 2 h mit dem Rezipienten (CG7) aus der exponentiellen Wachstumsphase (2 h). Die Mittelwerte wurden aus 2 Versuchsansätzen berechnet (+/- Standardabweichung).

3. ERGEBNISSE

Es zeigte sich (Abb. 10), dass eine höhere Phagentransferrate bei Verwendung der Bakterien-Pellets (induzierte Phagen) erzielt werden konnte als bei Verwendung des Überstandes (freie Phagen). Bei den Überständen ergab der Überstand aus der exponentiellen Wachstumsphase (4 h) den höchsten Transfer von $\Phi 13$ kana auf den Rezipienten ($0,3 \times 10^{-6}$), der Transfer beim ÜN-Überstand war deutlich geringer ($0,04 \times 10^{-6}$). Der größte Transfer gelang bei Mischung des Rezipienten mit den Donorzellen (Pellets) aus der 4 h-Kultur ($1,8 \times 10^{-6}$).

3.2.2.3. Variation der Wachstumsphasen

Im vorigen Versuch zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in den Transferraten bei Variation der Wachstumsphasen, aus denen der Donor entnommen wurde (Abb. 10).

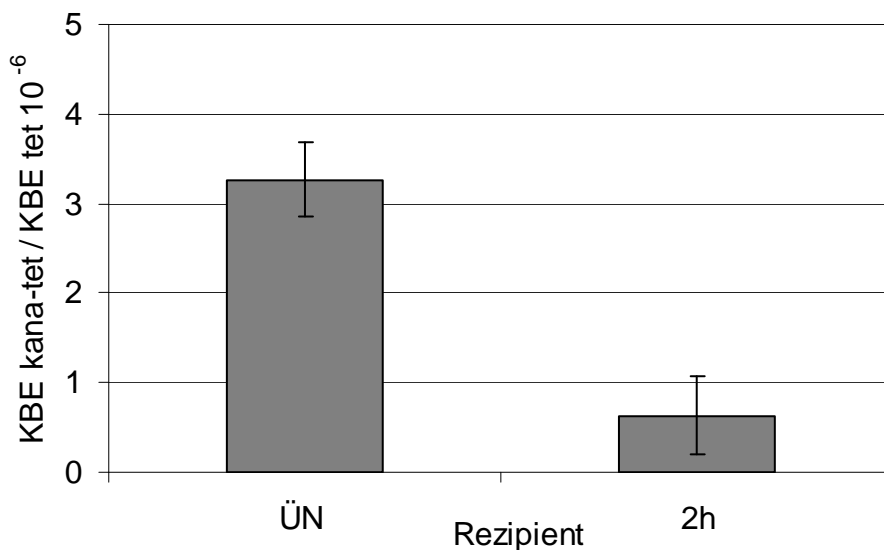


Abbildung 11:

Phagentransferrate (Verhältnis der koloniebildenden Einheiten (KBE) auf TSA-Kanamycin-Tetracyclin-Platten / KBE auf TSA-Tetracyclin-Platten) nach Mischen von Donor (CG6) und Rezipient (CG7) im Verhältnis 1:5. Der Donor wurde konstant aus der exponentiellen Wachstumsphase (2 h) entnommen, der Rezipient aus den Wachstumsphasen ÜN und 2 h und für 4 h gemeinsam inkubiert. Die Mittelwerte wurden aus 2 Versuchsansätzen berechnet (+/- Standardabweichung).

Nun sollte der Einfluss der Rezipienten-Wachstumsphase auf den Phagentransfer untersucht werden. Der Donor wurde konstant aus der exponentiellen Wachstumsphase (2 h) entnommen und mit dem Rezipienten aus der ÜN-Kultur und 2 h-Kultur gemischt. Dabei zeigte sich, dass es zu einer höheren Transferrate bei Verwendung des Rezipienten aus der ÜN-Kultur kommt ($3,2 \times 10^{-6}$) als bei der 2 h-Kultur ($0,6 \times 10^{-6}$) (Abb. 11).

3.2.2.4. Variation des Mischverhältnisses

In dieser Versuchsreihe wurden unterschiedliche Mischverhältnisse des Donors und Rezipienten getestet. Dazu wurden Donor und Rezipient jeweils aus der exponentiellen Wachstumsphase (2 h) in den Verhältnissen 10:1, 5:1, 1:1, 1:5 und 1:10 gemischt.

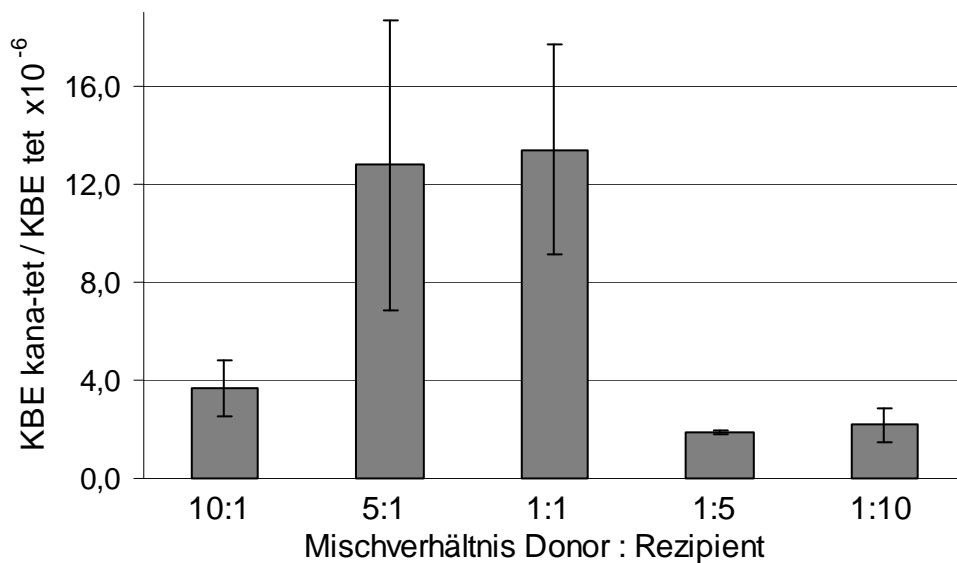


Abbildung 12:

Phagentransferrate (Verhältnis der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) auf Kanamycin-Tetracyclin-Platten / KBE/ml auf Tetracyclin-Platten) nach 2-stündiger Inkubation von Donor (CG6) mit dem Rezipienten (CG7) in unterschiedlichen Verhältnissen. Die Mittelwerte wurden aus 3-fach-Werten berechnet (+/- Standardabweichung).

3. ERGEBNISSE

Nach 2-stündiger Inkubation wurden 10 µl des Donor-Rezipienten-Gemisches in einer Verdünnungsreihe auf Blut- und Selektivplatten aufgetropft, um die KBE zu bestimmen. Die Phagentransferraten (KBE Doppel-Selektivplatte / KBE Tetracyclinplatte) wurden berechnet. Der höchste Phagentransfer zeigte sich bei dem Mischungsverhältnis 1:1 (13×10^{-6}) und 5:1 (12×10^{-6}) (Abb. 12).

3.2.2.5. Variation der Bakteriendichte

Beim Überprüfen des Protokolls stellte sich heraus, dass im vorherigen Versuch für das Mischungsverhältnis 1:1 eine geringere Bakteriendichte (OD_{600} 0,2) als bei den anderen Mischungsverhältnissen (OD_{600} 0,6) verwendet worden war.

Um diesen Einfluss der Bakteriendichte im Ansatz auf die Transferrate zu verifizieren, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Donor und Rezipient wurden hier im Verhältnis 1:1 gemischt, einmal zu einer Gesamt- OD_{600} von 0,2, zum anderen zu einer Gesamt- OD_{600} von 0,6.

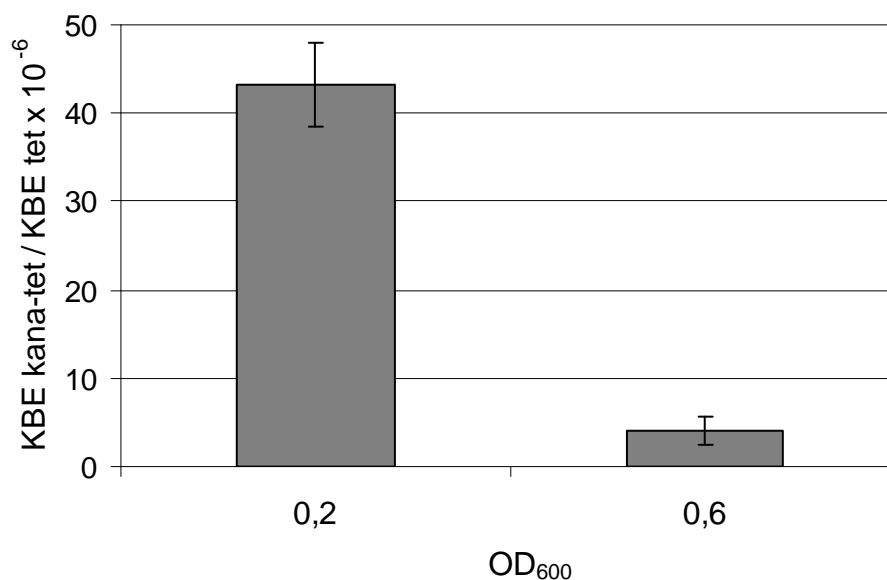


Abbildung 13:

Phagentransferrate (Verhältnis der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) auf Kanamycin-Tetracyclin-Platten / KBE auf Tetracyclin-Platten) nach Mischen von Donor (CG6) und Rezipient (CG7) in verschiedenen Dichten (OD_{600} 0,2 und OD_{600} 0,6), Inkubation 2 h. Die Mittelwerte wurden aus zwei Versuchsansätzen berechnet (+/- Standardabweichung).

In diesem Versuch (Abb. 13) konnte bestätigt werden, dass eine geringere Bakteriendichte im Ansatz zu einer höheren Transferrate führt (43×10^{-6} bei $OD_{600} 0,2$ versus 4×10^{-6} bei $OD_{600} 0,6$).

3.3. Mischkulturexperimente im Mausmodell

In vitro konnte ein Transfer des Phagen $\Phi 13_{\text{kana}}$ vom Donorstamm 8325-4 $\Phi 13_{\text{kana}}$ (CG6) auf den Rezipientenstamm CG7 nachgewiesen werden. (siehe Kapitel 3.2.). Mit einem Fremdkörperinfektionsmodell (Tissue-Cage-Modell) sollte untersucht werden, ob ein Phagentransfer zwischen CG6 und CG7 auch *in vivo* möglich ist.

Die Zucht und Infektion der Mäuse und die Gewinnung der Exsudate nach 2 und 8 Tagen wurde von Andrea Steinhuber im Kantonsspital Basel durchgeführt.

3.3.1. Wachstum von CG6 und CG7 im Mausmodell

Zunächst wurde das Wachstum des Donors und Rezipienten im Fremdkörperinfektionsmodell untersucht. Dazu wurden je 4 Mäuse mit CG6 oder CG7 infiziert (Inokulum 1×10^5 KBE/Maus), je 4 Mäuse mit CG6 oder CG7 mit einer Inokulummenge von 5×10^5 KBE/Maus.

Sowohl bei Inokulation des Donors als auch des Rezipienten konnte nur in einigen Mäusen ein zu erwartendes Wachstum (mindestens 1×10^7 KBE/ml) beobachtet werden (Inokulum mit CG6 bei 2 von 4 Mäusen, Inokulum mit CG7 bei 3 von 4 Mäusen) (Abb. 14). Je eine Maus zeigte nach 8 Tagen Inkubation eine nur geringe Bakteriendichte im Exsudat ($<1 \times 10^7$ KBE/ml). Bei jeweils einer Maus konnte keine Infektion etabliert werden: die Mäuseexsudate waren steril. Es war dabei kein Unterschied in der Virulenz der beiden Stämme zu erkennen.

Die Erhöhung der Inokulummengen um das 5-fache führte nicht zu einer höheren Rate an etablierten Infektionen von CG6 und CG7 in den Mäusen. Bei CG6 und CG7 wurde jeweils bei nur einer Maus die zu erwartende

3. ERGEBNISSE

Keimzahl erreicht, bei CG6 war ein Exsudat steril, bei CG7 waren es zwei, die Mediane fielen daher geringer aus.

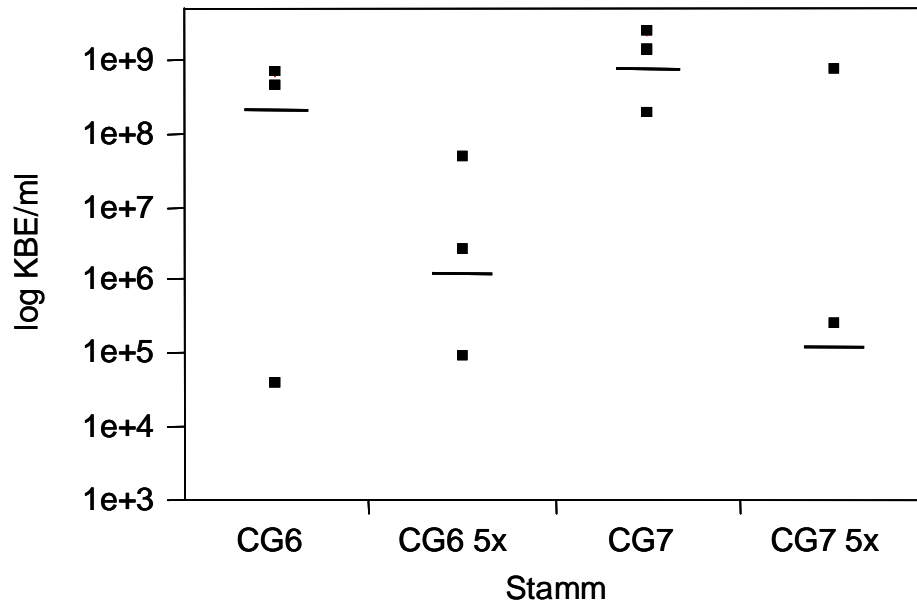


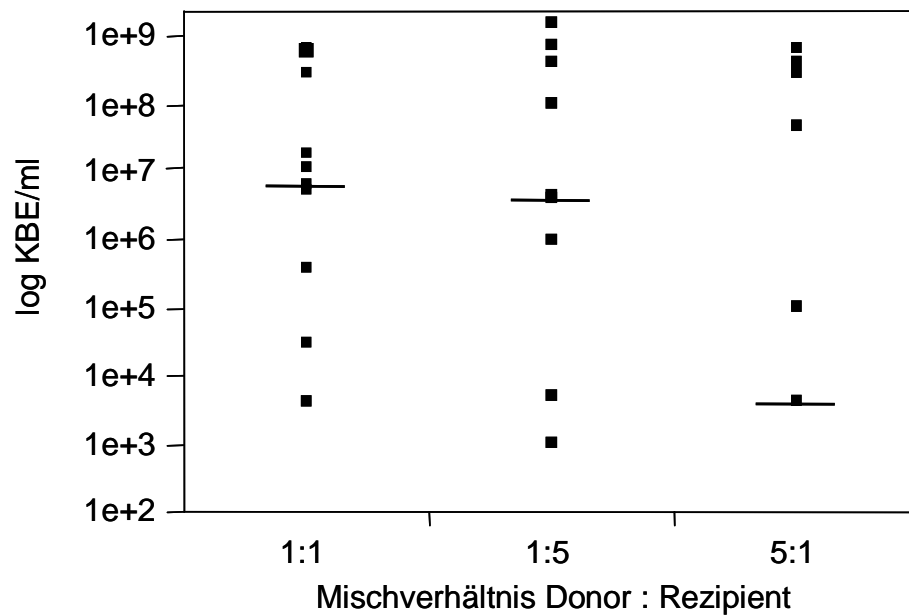
Abbildung 14:

Lebendkeimzahlbestimmung auf Blut (KBE/ml) aus Mäusexsudaten, gewonnen nach 8-tägiger Inkubation der Stämme CG6 und CG7 im Tissue-Cage-Modell. Je 4 Mäuse wurden mit 1×10^5 KBE/Maus, bzw. 5×10^5 KBE/Maus (5x) inokuliert. (— Median).

3.3.2. Kokultivierung von CG6 mit CG7

Es wurden 3 unabhängige Versuche durchgeführt, bei denen je 7 Mäuse mit den Inokulum-Mischverhältnissen 1:1, 5:1 und 1:5 mit einem Gesamt-Inokulum von 1×10^5 KBE/Maus infiziert wurden und je 4 Mäuse mit einer Gesamt-Inokulummenge von 5×10^5 KBE/Maus, ebenfalls in den Mischungsverhältnissen 1:1, 5:1 und 1:5. Die nach 8 Tagen Inkubation gewonnenen Exsudate wurden jeweils auf Blut und Selektivplatten aufgetropft um die Keimzahl zu bestimmen.

3.3.2.1. Keimzahlen auf Blutplatten

**Abbildung 15:**

Lebendkeimzahlbestimmung auf Blut (KBE/ml) aus Mäuseexsudaten im Tissue-Cage-Modell, gewonnen nach 8-tägiger Kokultivierung des Donors CG6 mit dem Rezipienten CG7 in verschiedenen Mischverhältnissen. Es wurden je 11 Mäuse infiziert. (— Median).

Die ermittelten Keimzahlen auf Blut der insgesamt 11 Mäuse je Mischverhältnis sind in Abb. 15 dargestellt. Die inconstante Etablierung einer Infektion in den Mäusen, wie in 3.3.1. beschrieben, war auch in den Mischversuchen zu erkennen. Es waren große Unterschiede in den Keimzahlen zu beobachten. Dabei zeigten die Mischverhältnisse 1:1 und 5:1 die günstigste Etablierungsrate mit Medianen bei $6,5 \times 10^6$ KBE/ml bzw. $4,0 \times 10^6$ KBE/ml. Beim Mischverhältnis 5:1 lag der Median aufgrund der 5 sterilen Mäuse bei lediglich 4×10^3 KBE/ml.

3.3.2.2. Keimzahlen auf Selektivplatten

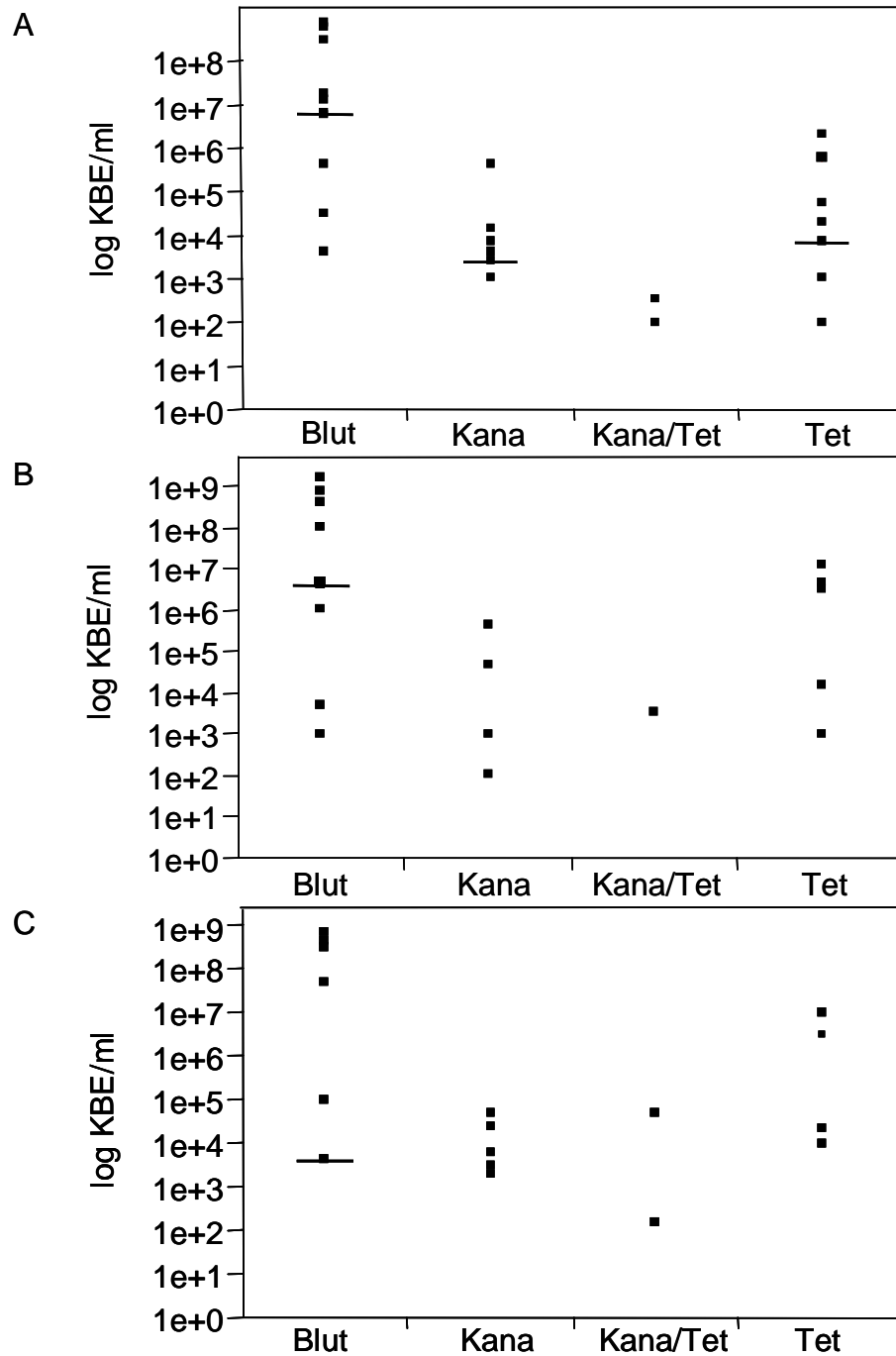


Abbildung 16:

Lebendkeimzahlbestimmung (KBE/ml) auf MH-Blutplatten (Blut) und Selektivplatten (TSA-Kanamycin (Kana) 50 µg/ml; TSA-Kanamycin-Tetracyclin (Kana-Tet) 50µg/ml, bzw. 3 µg/ml; TSA-Tetracyclin (tet) 3 µg/ml) aus Mäuseexsudaten im Tissue-Cage-Modell, gewonnen nach 8-tägiger Kokultivierung des Donors CG6 mit dem Rezipienten CG7 in den Mischungsverhältnissen 1:1 (A), 1:5 (B) und 5:1 (C) . Es wurden je 11 Mäuse infiziert. (— Median).

Es wäre zu erwarten, dass die Keimzahlen auf den Blutplatten (Donor und Rezipient) annähernd denen auf den Selektivplatten (Donor oder Rezipient) entsprechen. Jedoch war in den Versuchen auf den Selektivplatten TSA-Kanamycin und TSA-Tetracyclin eine starke Wachstumsinhibition zu beobachten: Die maximalen Keimzahlen auf TSA-Tetracyclin und TSA-Kanamycin lagen 2 – 3 Zehnerpotenzen unter denen auf Blut (Abb. 16 A-C) und auch die Mediane unterschieden sich deutlich. Beim Verhältnis 1:1 (A) lag der Median der Keimzahlen auf Tetracyclin-Selektivplatte bei 7×10^3 KBE/ml, auf Kanamycin-Selektivplatte bei $2,5 \times 10^3$ KBE/ml im Vergleich zum Median auf Blut ($6,5 \times 10^8$ KBE/ml). Für die Mischverhältnisse 1:5 und 5:1 lag der Median aufgrund der niedrigen Keimzahlen und sterilen Mäuse bei 0 (B, C).

Ungeachtet dieser Schwierigkeiten zeigten sich folgende Transferergebnisse: Auf der Doppelselektivplatte Kanamycin-Tetracyclin wuchsen beim Verhältnis 1:1 und 5:1 bei je 2 Mäusen Kolonien, beim Verhältnis 1:5 war es bei einer (Abb. 16). Diese Kolonien wurden gepickt und auf MH-Blut ausgestrichen um sie auf Hlb-Konversion hin zu überprüfen. Alle gepickten Kolonien waren Hlb-negativ. Es handelte sich somit um durch Phagentransfer entstandene Lysogene, ein Transfer von $\Phi 13$ kana hat also in diesen Mäusen stattgefunden.

3.3.3. Berechnung der Phagentransferrate

Aufgrund der inkonstanten Etablierung von Infektionen in den Mäusen und der Inhibition des Wachstums auf den Selektivplatten konnten zur Auswertung nur einige der Mäuse herangezogen werden: Es wurden Mäuse gewählt, die eine Keimzahl auf Blut von mindestens 5×10^6 KBE/ml aufwiesen und sowohl auf TSA-Kanamycin-Platten als auch auf TSA-Tetracyclin-Platten ein Wachstum zeigten. Von den insgesamt 11 Mäusen, die mit dem Donor-Rezipientenverhältnis 1:1 inokuliert worden waren entsprachen 3 Mäuse diesen Kriterien, beim Verhältnis 5:1 waren es 2 Mäuse. Beim Verhältnis 1:5 konnten 5 Mäuse zur Auswertung herangezogen werden.

3. ERGEBNISSE

Da sich die Inhibition der Tetracyclinresistenz sowohl auf die Koloniezahlen auf der Tetracyclinplatte (Rezipient) als auch auf der Kanamycin-Tetracyclinplatte (Lysogen) auswirkte (siehe 3.2.1.), konnte die Phagentransferrate (das Verhältnis Lysogene/Rezipient) trotz dieser Inhibition berechnet werden. Sie unterschied sich nicht wesentlich zwischen den einzelnen Mischverhältnissen ($6,3 \times 10^{-4}$ beim Mischungsverhältnis 1:1, $1,1 \times 10^{-3}$ bei 5:1 und $1,2 \times 10^{-3}$ bei 1:5) (Abb. 17). Drückt man den Phagentransfer in KBE auf Kanamycin-Tetracyclin in % der KBE auf Tetracyclin aus, so errechnen sich Transferraten von rund 0,06 - 0,1 %. Die *in vitro* Transferraten lagen deutlich unter diesen Werten (zw. 0,00002 % und $0,0004 \% = 0,2 - 4 \times 10^{-6}$).

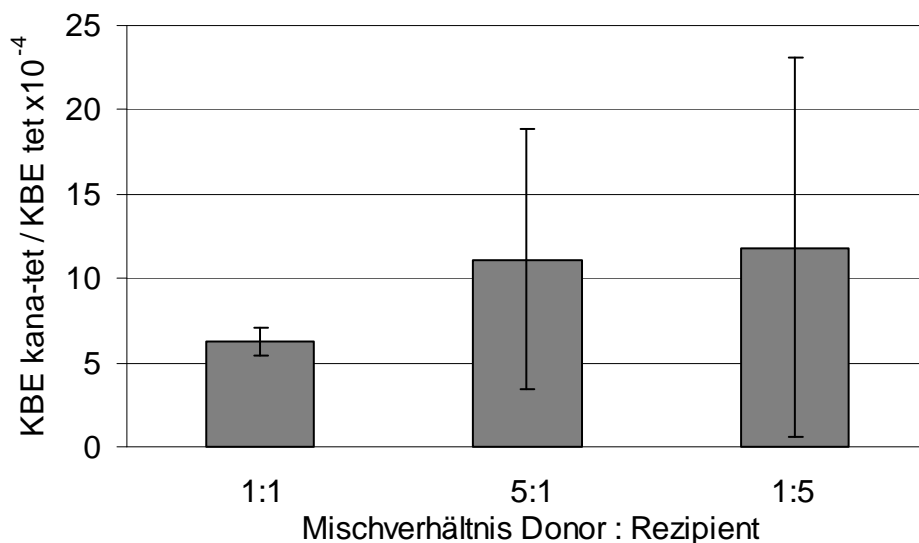


Abbildung 17:

Phagentransferrate (Verhältnis der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) auf Kanamycin-Tetracyclin-Platten / KBE auf Tetracyclin-Platten), bestimmt nach 8-tägiger Inkubation des Donors CG6 (8325-4Φ13kana) mit dem Rezipienten CG7 (8325-4tet) in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Zur Ermittlung der Mittelwerte (MW) wurden die Werte aus 3 unabhängigen Versuchen herangezogen (+/- Standardabweichung).

3.4. Lysogenisierungsexperimente mit freien Phagen

3.4.1. Lysogenisierung verschiedener Stämme

Aus dem lysogenen *S. aureus*-Stamm CG6 (8325-4 Φ 13kana) wurde durch Induktion mit Mitomycin und einem Anreicherungsschritt ein Φ 13kana-Phagenlysat mit freien Phagen gewonnen und dessen Phagentiter bestimmt (2×10^6 Phagen/ml). Dieses Lysat wurde dafür verwendet andere *S. aureus*-Stämme zu lysogenisieren. Folgende *S. aureus*-Stämme, die aus Patientensputen isoliert worden waren, wurden verwendet: S90, S158, CFS555, K106B, 19sa, 40a, 47a, der delysogenisierte Stamm S64c und der Laborstamm 8325-4. Jeder dieser Stämme war zu Beginn hlb-positiv, enthielt also keinen hlb-konvertierenden Phagen, und war sensibel für Kanamycin. Daneben sollten auch *hIb*-lysogene Stämme untersucht werden (CG1 (8325-4 Φ 13) und S64).

Tabelle 5:

Verschiedene *S. aureus*-Stämme nach Inkubation mit Φ 13kana-Lysat

	<i>S. aureus</i> Ausgangs- stämme	Wachstum auf Kanamycin- Selektivplatte ¹	Nachweis von Φ 13kana im Blot ²
nicht-lysogene Stämme (Hlb-positiv)	S90	+	-
	S158	+	-
	CFS555	+	-
	K106B	+	-
	19sa	+	-
	40a	+	-
	47a	+	-
	S64c	+	+
	8325-4	+	+
lysogene Stämme	S64	+	+
	CG1(8325-4 Φ 13)	+	+

¹ Wachstum auf Kanamycin-Selektivplatte nach Inkubation mit Φ 13kana

² Banden im Southern-Blot mit den Sonden für die Φ 13kana-kodierten Gene *sak* und *aphA3* (Kanamycinresistenzgen)

3. ERGEBNISSE

Die Stämme wurden für 4 h mit 50 µl des Φ 13kana-Phagenlysats bebrütet und dann auf Kanamycin-Selektivplatten und MH-Blutplatten aufgetropft. Einzelne Kolonien von den Kanamycin-Selektivplatten wurden anschließend mittels PFGE und Hybridisierung mit den phagenkodierten Genen *sak* und *aphA3* (Kanamycinresistenzgen) auf eine stattgefundene Lysogenisierung überprüft (Southern-Blot).

Bei allen Stämmen waren Kolonien auf der Kanamycin-Selektivplatte zu beobachten. Jedoch zeigten sich alle Derivate der Patientenstämme mit Ausnahme von S64c und S64 in der PFGE und Hybridisierung als negativ für diese phagenkodierten Gene *sak* und *aphA3*. Sie hatten also den Phagen nicht ins Genom aufgenommen. Die beobachteten Kolonien auf der Kanamycin-Selektivplatte müssen durch Auftreten von Spontanresistenzen erklärt werden. In den Stämmen S64, S64c und in den beiden Laborstämmen 8325-4 und CG1 konnte jedoch eine Lysogenisierung mit Φ 13kana nachgewiesen werden (Tab. 5; Abb. 18B und C). In Abb. 18 ist das PFGE-Bild und die Southern-Blot-Bilder der nicht-lysogenen *S. aureus*-Ausgangsstämme S64c und 8325-4 (keine Banden im *sak* und *aphA3*-Blot), sowie der lysogenen Ausgangsstämme S64 (Bande bei 113 kB im *sak*-Blot, was dem S64-Prophagen entspricht) und CG1 (Bande bei 160 kB im *sak*-Blot, was dem Φ 13-Prophagen entspricht) zu sehen. (Der S64-Prophage enthält eine *Sma*I-Schnittstelle, es entstehen 113 kB große Restriktionsstücke. Prophage Φ 13kana enthält keine Schnittstelle für *Sma*I, was zu 160 kB großen Banden führt.)

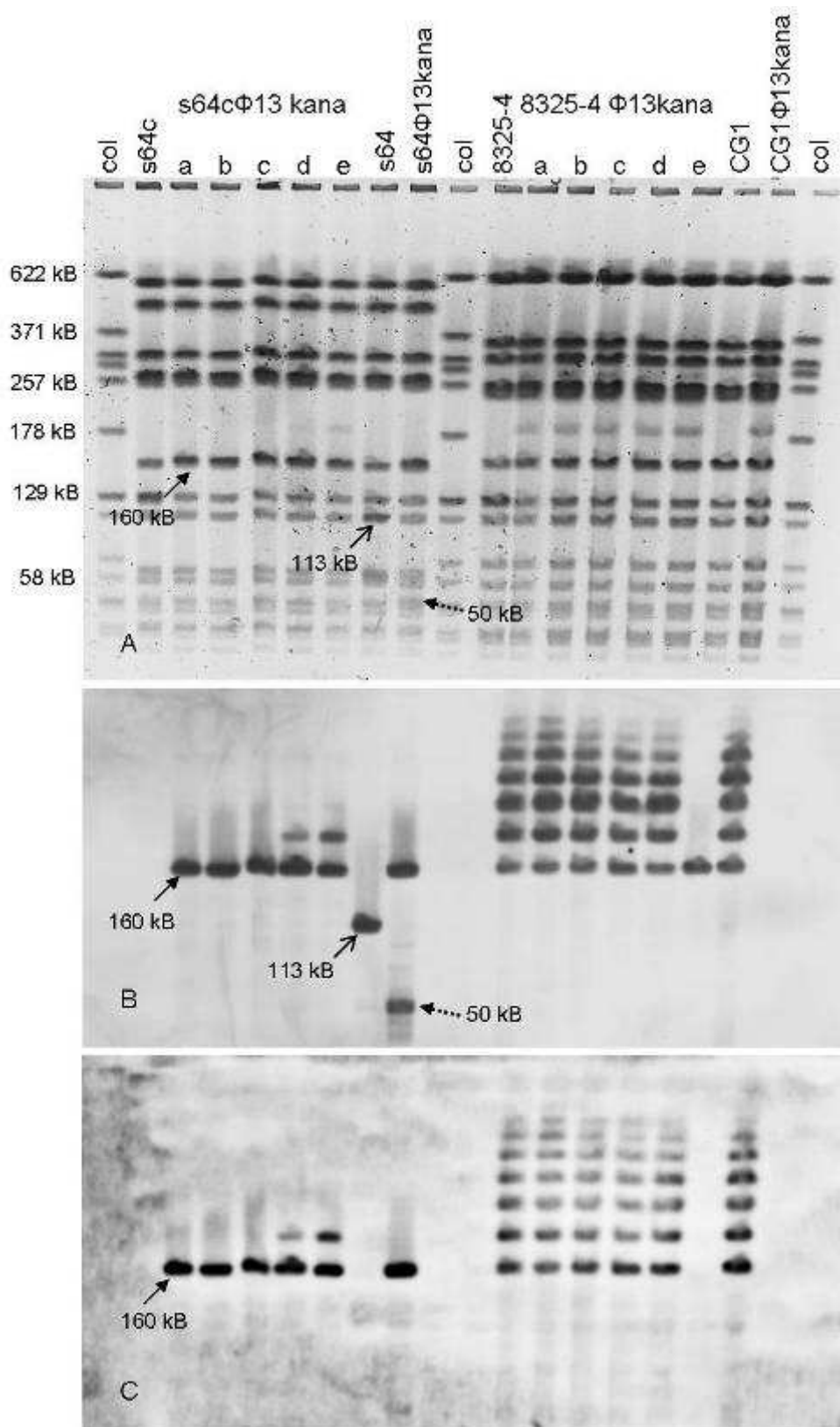


Abbildung 18:

PFGE nach *Sma*I-Verdau (A) und Hybridisierung mit *sak* (B) und *aphA3* (C) der *S. aureus*-Ausgangsstämme 8325-4, S64c, CG1(8325-4Φ13) und S64 und deren Φ13kana-Lysogene. col: *S. aureus*-Referenzstamm. Erläuterung siehe Text.

3. ERGEBNISSE

Zudem zeigt Abb. 18 die Integration von $\Phi 13\text{kana}$ ins bakterielle Genom nach Inkubation der Ausgangsstämme mit einem $\Phi 13\text{kana}$ -Phagenlysat: Im neu-lysogenisierten Stamm S64c $\Phi 13\text{kana}$ konnte die Aufnahme von $\Phi 13\text{kana}$ ins bakterielle Genom im *sak*- und *aphA3*-Blot verifiziert werden (Banden bei 160 kB). Im Stamm S64 konnte nach Kontakt mit $\Phi 13\text{kana}$ eine Verdrängung des bestehenden S64-Prophagen durch $\Phi 13\text{kana}$ festgestellt werden: Es wurde eine Bande im *sak*- und *aphA3*-Blot bei 160 kB (entspricht Prophage $\Phi 13\text{kana}$) und eine Bande bei ca. 50 kB nur im *sak*-Blot (entspricht dem verdrängten, freien S64-Phagen) beobachtet. Die ursprüngliche S64-Prophagen-Bande bei 113 kB fehlte.

In den neu-lysogenisierten Stämmen 8325-4 $\Phi 13\text{kana}$ und CG1 $\Phi 13\text{kana}$ trat das so genannte Leiterstruktur-Phänomen auf. Der neu erworbene Prophage $\Phi 13\text{kana}$ (Bande bei 160 kB) replizierte sich. Die beim Phagenreplikationsvorgang („rolling circle“) entstehenden Concatemere (aneinanderhängende replizierte Phagengenome) wurden als zusätzliche Banden (> 160 kB) im *sak*- und *aphA3*-Blot sichtbar.

3.4.2. Ermittlung der Lysogenisierungsrate

Für die lysogenisierungsfähigen Stämme 8325-4, S64c, CG1 und S64 wurden die Lysogenisierungsraten bestimmt: Die Stämme wurden für 4 h mit 50 µl des Φ 13kana-Phagenlysats (Titer: 2×10^6 Phagen/ml) bebrütet und dann auf TSA-Kanamycin-Selektivplatten und MH-Blutplatten in Verdünnungsstufen aufgetropft und die KBE bestimmt. Die Lysogenisierungsrate wurde berechnet (Abb. 19). Die höchste Lysogenisierungsrate wurde im Laborstamm 8325-4 erzielt ($4,3 \times 10^{-5}$), im Patientenstamm S64c konnte ebenfalls eine, wenn auch geringere, Lysogenisierung festgestellt werden ($0,12 \times 10^{-5}$). Die beiden lysogenen Stämme 8325-4 Φ 13 und S64 zeigten Lysogenisierungsraten von $0,01 \times 10^{-5}$ (CG1) bzw. $0,04 \times 10^{-5}$ (S64).

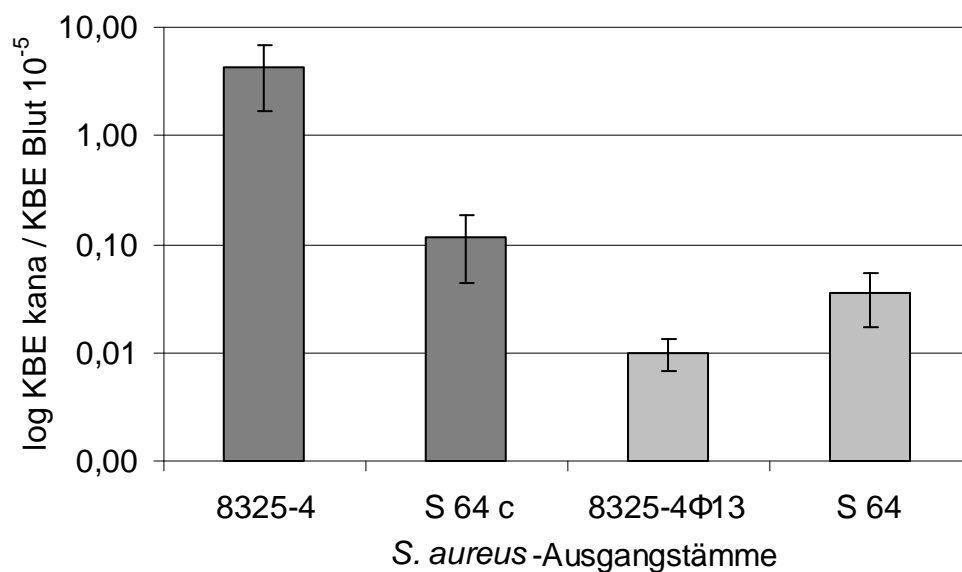


Abbildung 19:

Lysogenisierungsrate (KBE auf Kanamycin-Platten (100 µg/ml) / KBE auf MH-Blutplatten) des phagenfreien Laborstamms 8325-4 und Patientenstamms S64c und der hlb-Phagen-Lysogene CG1 (8325-4 Φ 13) und S64 nach 4-stündiger Inkubation mit Phagenlysats Φ 13kana (Titer: 2×10^6 Phagen/ml). Die Mittelwerte wurden aus 2 separaten Versuchsansätzen errechnet (+/- Standardabweichung).

4. Diskussion

4.1. Induktion, Replikation und Transfer von *S. aureus*-Phage $\Phi 13$ unter verschiedenen infektionsrelevanten Bedingungen

4.1.1. Spontan

Die spontane Induktion von Prophagen lässt sich durch das Auftreten von spontanen DNA-Schäden erklären, d.h. Schäden, die nicht durch experimentelle Manipulation, z.B. durch Zugabe von induzierenden Antibiotika, entstehen [20]. Für λ wird geschätzt, dass in ca. 10-30 % der Zellen einer Population solche Schäden auftreten und in 0,1-0,01 % die daraus entstehende SOS-Antwort groß genug ist, um zur Induktion von Prophagen zu führen [61]. Die spontane Induktionsrate für $\Phi 13$ betrug in dieser Arbeit ca. 0,01 % (Abb. 4B). Jedoch kann sie sehr unterschiedlich sein. Für den *S. aureus*-Stamm Newman beschrieben Bae et al. eine spontane Induktion der Phagen $\Phi NM1$, 2 und 4 von nur 0,001 %. $\Phi NM3$ zeigte dagegen keine spontane Induktion und ließ sich auch mit Mitomycin nicht induzieren [3]. Die am Laktokokken-Phagen $\Phi LC3$ durchgeführten Experimente ergaben je nach Laktokokkenstamm sogar Induktionsraten von 0,1 – 9,0 % (ermittelt mit Real-Time-PCR-Strategie) und wiesen eine gewisse Temperaturabhängigkeit auf [65]. Es zeigt sich also, dass die Stabilität des Phagenrepressors und somit die Stabilität der Lysogenität sehr variabel sein kann. Die um ein 5-faches höhere spontane Induktion von $\Phi 13_{kana}$ im Stamm CG6 im Vergleich zu $\Phi 13$ im Stamm CG1 könnte mit der vorangegangenen Mutagenisierung des Phagen erklärt werden, durch die es zu Veränderungen am Phagenrepressor gekommen sein könnte.

Die nach erfolgter Induktion replizierten und freigesetzten neuen Phagen werden mit der Burst-size beschrieben. Diese liegt beim *E. coli*-Phagen λ bei ca. 100 [10], für *S. aureus* SA113 und Newman wird von einer Burst-size von 150 Phagen pro induzierter Zelle ausgegangen [3]. Beim lytischen *S. aureus*-Phagen $\Phi MR11$ liegt sie bei ca. 100 [69].

Diese Zahlen, wie auch die oben genannten Induktionsraten bei λ und Newman, sind Ergebnis von Titerbestimmungen durch Phagentropfassays nach Induktion der Lysogene, eine Methode, die mit einer gewissen Ungenauigkeit einhergeht und deren Ergebnisse oft vom verwendeten Indikatorstamm abhängt [88]. Daher wurde von Lunde et al. eine weit sensitivere Methode für die Bestimmung von Phagen in deren Lebenszyklus eingeführt, die auf einer Quantifizierung spezifischer Phagen- und Bakterien-DNA mittels Real-Time-PCR beruht [64]. Sie wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt. Mit dieser Methode ergaben sich beim Laktokokken-Phagen Φ LC3 Zahlen von 10 - 60 Φ LC3-Partikel pro induzierter Zelle, was indirekt mit der Burst-size gleich gesetzt werden kann. Lunde et al. verwendeten Inkubationstemperaturen von 15 bzw. 30 °C und es waren starke Schwankungen in der Burst-size in den verschiedenen lysogenen Laktokokken-Stämmen auszumachen. Daraus wurde geschlossen, dass die Vermehrung von Φ LC3 nach Induktion vom Wirtsbakterienstamm abhängig ist [66]. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Burst-size nicht nur von Stamm zu Stamm sehr variabel ist, sondern sich in verschiedenen Bakterienarten ebenfalls unterscheidet.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Burst-size von ca. 3000 Φ 13-Genome pro induzierter *S. aureus*-Zelle erscheint trotz dieser in der Literatur beobachteten Variabilität sehr hoch. Dies könnte eine Eigenart des Φ 13-Phagens in *S. aureus* sein und sollte weitergehend auch an anderen *S. aureus*-Stämmen untersucht werden. Daneben wäre denkbar, dass ein methodischer Fehler in der Real-Time-PCR zu zu niedrigen *hIb*-Werten geführt haben könnte und somit die Burst-size (Anzahl extrachromosomaler Phagen-DNA pro Kopie *hIb*) zu hoch berechnet wurde. Hierfür sprechen die vergleichsweise niedrigen berechneten Induktionsraten (Anzahl wiederhergestellter *hIb* in Prozent der Gesamtmenge an Wirtsgenomen): Die Induktion von Φ 13 wurde bei Goerke et al. durch die Frequenz der *Hlb*-Konversion quantifiziert und ergab für Ciprofloxacin eine Rate von größer 1 % [31] im Vergleich zu 0,2 % Induktion in dieser Arbeit. Um dies zu eruieren

müssen weitere Optimierungsschritte in der Bestimmung des *h/b* unternommen werden.

Die auf die Lysogene einwirkenden induzierenden Stimuli hatten keinen Einfluss auf die Zahl neu gebildeter Phagen (die Burst-size war unter allen Bedingungen in etwa gleich), was zu erwarten war, da es sich immer um den selben Bakterienstamm handelte.

In den bisher aufgeführten Ergebnissen wurde die Mobilisation von Phagen über die Induktion beschrieben. Daneben wurde in dieser Arbeit eine Methode etabliert, mit der es mittels resistenzmarkiertem *S. aureus*-Stamm und $\Phi 13$ -Phage möglich ist, den Transfer von Bakteriophagen zwischen dem Donor- und Rezipientenstamm zu untersuchen. Beim Donor handelte es sich um ein $\Phi 13$ kana-Lysogen des Stamms 8325-4, der Rezipient (ebenfalls Stamm 8325-4) hat durch Mutagenisierung eine Tetracyclinresistenz erhalten. Mit dieser Methode konnte ein Transfer von Phage $\Phi 13$ kana vom Donorstamm auf den Rezipientenstamm auf Kanamycin-Tetracyclin-Selektivplatten nachgewiesen werden. Die Rate des spontanen Transfers war dabei gering (2 bis 3 von 1 000 000 Rezipientenzellen hatten während der Kokultivierung einen Phagen aufgenommen).

4.1.2. Antibiotika

DNA-schädigende Vorgänge und die damit verbundene zelluläre SOS-Antwort können zu einer Inaktivierung des Phagenrepressors führen und somit zur Induktion des Prophagens [61].

Die von Goerke et al. [31] gezeigte induzierende Wirkung von Ciprofloxacin auf den Prophagen $\Phi 13$ im *S. aureus*-Stamm CG1 konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Diese induzierende Wirkung von Ciprofloxacin spiegelt sich auch im ermittelten Phagentransfer wieder. So konnte unter Ciprofloxacinzugabe ein erhöhter Phagentransfer beobachtet werden.

Ein induzierender Effekt von Trimethoprim auf $\Phi 13$, wie er von Goerke et al. beschrieben worden war, konnte nicht gezeigt werden. Dieser Effekt kam

jedoch bei einer TMP-Konzentration von 1 MIC zustande. Im vorliegenden Versuch war eine subinhibitorische Konzentration eingesetzt worden (1/2 MIC). Eine Konzentrationsabhängigkeit für die Induktion durch Antibiotika wurde bei Goerke et al. gezeigt [31]. Obwohl in den Induktionsversuchen kein wesentlicher induzierender Effekt von subinhibitorischem Trimethoprim beobachtet worden war, kam es dennoch zu einem gesteigerten Transfer von Φ 13kana unter dieser Inkubationsbedingung. Das Ausmaß des Phagentransfers kann somit nicht allein mit dem Ausmaß der Induktion im Donor erklärt werden. Eigenschaften des Rezipienten, die die Aufnahme und Integration des Phagen betreffen, müssen ebenso eine Rolle spielen. Es wäre zu vermuten, dass Trimethoprim diese Eigenschaften des Rezipienten beeinflusst.

Es wurde beobachtet, dass *S. aureus*-Genomveränderungen bei CF-Patienten signifikant häufiger sind als Genomveränderungen in gesunden *S. aureus*-Trägern in der Nase. Diese Genomveränderungen konnten auf die Mobilisierung von *hly*-konvertierenden Phagen zurückgeführt werden [33]. Diese *in vivo* Phagenmobilisation könnte mit der regelmäßigen Antibiotikaexposition zu tun haben, da CF-Patienten neben der Therapie von akuten Exacerbationen auch teilweise eine prophylaktische Dauerantibiose erhalten. Hierzu werden zum Teil auch die Antibiotika Ciprofloxacin und Trimethoprim eingesetzt [70; 89]. Welche Auswirkungen diese Phagenmobilisation und möglicher Phagentransfer unter Antibiotika im CF-Patienten auf den Verlauf und die Prognose der Erkrankung hat, lässt sich jedoch an dieser Stelle nicht beantworten.

4.1.3. Temperatur

Als weiterer Faktor, der während Infektionen vorkommt, ist eine erhöhte Körpertemperatur zu nennen. Es zeigte sich jedoch, dass eine Inkubationstemperaturerhöhung auf 42 °C *in vitro* keinen induzierenden Effekt auf den lysogenen *S. aureus*-Stamm hatte. Die Anzahl replizierter Phagen war nicht verändert. Unter 42 °C kam es zu keinem verstärkten Transfer von

Φ13kana. Eine erhöhte Temperatur scheint daher zu keiner nennenswert erhöhten SOS-Antwort in *S. aureus* zu führen.

Beim Shigatoxin-produzierenden *E. coli*-Stamm STEC war sogar beobachtet worden, dass eine Erhöhung der Inkubationstemperatur zu einer geringeren Produktion von Shigatoxin führt, was ein indirekter Hinweis auf eine reduzierte Induktion des Shigatoxin-tragenden Phagen unter 42 °C ist [45].

4.1.4. Anaerobiose

Worlitzsch et al. [117] hatten beobachtet, dass während Infektionen im Bronchialtrakt von CF-Patienten teilweise anaerobe Bedingungen herrschen. Es kam in den vorliegenden *in vitro*-Versuchen unter anaeroben Wachstumsbedingungen jedoch zu keiner veränderten Induktion und Replikation und zu keinem veränderten Transfer. Auch in der Literatur gibt es keine Hinweise, welchen Einfluss Anaerobiose auf das bakterielle SOS-System hat. Jedoch wurde in der oben zitierten Arbeit an STEC neben der Inkubationstemperatur auch der Einfluss von anaeroben Wachstumsbedingungen auf die Shigatoxin-Bildung untersucht [45]. Dabei zeigte sich auch unter anaeroben Bedingungen eine verminderte Toxinproduktion und somit eine verminderte Induktion.

4.1.5. Sputum

Die Entdeckung eines phageninduzierenden Faktors aus humanen pharyngealen Epithelzellen [9] und die induzierende Wirkung von ROS und H₂O₂, während Infektionen von Abwehrzellen gebildet [106, 107], zeigt, dass nicht nur exogene Faktoren wie Antibiotika während Infektionen zu einer Induktion von Prophagen führen können, sondern auch wirtseigene Faktoren eine Rolle spielen. Das Sputum von CF-Patienten mit chronischen Atemwegsinfekten könnte solche Faktoren enthalten. Mit der hier angewandten Methode ließ sich diese Vermutung beim *S. aureus*-Phagen Φ13 jedoch nicht bestätigen.

4.1.6. Beitrag freier Phagen aus dem Überstand zur Transferrate

Die Versuche zeigten, dass sowohl während der Inkubationszeit induzierte Phagen, als auch schon in der Donorlösung enthaltene freie Phagen den Rezipienten lysogenisieren können und somit zur Transferrate beitragen, wenn auch in viel geringerem Maße. Es wäre zu erwarten, dass Überstände von Donor-ÜN-Kulturen mehr Phagen enthielten als Überstände aus 4 h-Kulturen und so eine höhere Transferrate erzielen. Das Gegenteil wurde beobachtet. Dies lässt sich erklären mit der Beobachtung, dass es in lysogenen Bakterienkulturen zu einer Abnahme des Phagentiters in der späten exponentiellen und der stationären Wachstumsphase kommt und somit weniger Phagen für einen Transfer in den Rezipienten zur Verfügung stehen. Zwei Ursachen konnten hierfür identifiziert werden: (i) *S. aureus* produziert Proteasen als sekundäre Virulenzfaktoren, welche Wirtsproteine abbauen und somit die Etablierung einer Infektion ermöglichen [41; 42]. Resch et al. haben beschrieben, dass diese Proteasen ebenso Bakteriophagen inaktivieren und dabei zum Abfall von Phagentitern führen [87]. (ii) Die vermehrte Bindung von Phagen an den bakteriellen Teichonsäure-Rezeptor und Injektion ihrer DNA in Bakterienzellen führt zur Reduktion des Phagentiters in lysogenen Kulturen in der stationären Wachstumsphase [3]. Diese Injektion bleibt jedoch ohne Folgen, da die lysogene Zelle immun gegen Superinfektionen ist (siehe unten).

4.1.7. Bakterielle Wachstumsbedingungen

Bedingungen, die das Wachstum der Donor- und Rezipientenzellen beeinträchtigen, zeigten in den Versuchen einen Einfluss auf die Transferraten von $\Phi 13\text{kana}$. So führten eine erhöhte Bakteriendichte und das wahrscheinlich damit verbundene knappere Nährstoffangebot im Versuchsansatz zu einer verminderten Transferrate. Dies könnte daran liegen, dass der lysogene Infektionsweg favorisiert wird. Dies geschieht durch eine verstärkte Repression des lytischen Wegs, wenn die Zellen über das exponentielle Wachstum hinaus sind oder schlechte Nahrungsbedingungen

im Medium herrschen („old and starved cells“)[25; 115]. Laut Echols könnte der physiologische Nutzen dieser „old and starved“-Regulation sein, den lytischen Infektionsweg zu verhindern unter Bedingungen, in denen die Bakterienzellen schlecht ausgestattet sind für die Produktion einer großen Zahl neuer Phagenpartikel [25].

Neben den Wachstumsbedingungen zeigte auch die Wachstumsphase des Rezipienten einen Einfluss auf die Transferrate. Die höhere Transferrate von Φ 13kana bei Verwendung des Rezipienten aus der ÜN-Kultur könnte ihren Ursprung in einer höheren Phagenrezeptordichte an der Zelloberfläche von Bakterien in der stationären Wachstumsphase haben und damit einer verbundenen vermehrten Adsorption.

4.1.8. Mischkulturexperimente: Methodendiskussion

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener infektionsrelevanter Stimuli auf den Phagentransfer waren 4 unabhängige Versuche durchgeführt worden (Kapitel 3.2.2.1). Jedoch wurde nur ein Versuch exemplarisch dargestellt, welcher die Tendenz in den Ergebnissen der 4 Versuche wiedergibt. Die großen Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen ließen eine gemeinsame Auswertung nicht zu. Ein Grund für diese schlechte Reproduzierbarkeit könnte in der Methode zur Bestimmung der KBE liegen. Kleine Ungenauigkeiten beim Verdünnen der Bakteriensuspensionen und beim Auszählen der Kolonien wirkten sich v. a. in den höheren Verdünnungsstufen als große Varianz aus. Zudem befanden sich die Zahlen auf der Doppelselektivplatte an der unteren Nachweisgrenze.

4.1.9. *in vivo*: Mausmodell

In den *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass Phagentransfer zwischen den 8325-4-Stämmen CG6 und CG7 stattfindet und es wurden Stimuli ermittelt, die diesen Transfer begünstigen. Im Tissue-Cage-Modell an Mäusen konnte der Transfer von $\Phi 13$ kana zwischen den Stämmen ebenso *in vivo* nachgewiesen werden.

Sowohl bei Einzelinkubation mit nur dem Donor oder Rezipient als auch in den Mischkulturen war eine Infektion der Mäuse möglich, jedoch nicht in allen Mäusen. Diese inkonstante Etablierung einer Infektion in den Mäusen und die großen interindividuellen Unterschiede in den Keimzahlen der einzelnen Mäuseexsudate könnten mit einer grenzwertigen Inokulummenge an Bakterien erklärt werden. Einige Mäuse waren dazu in der Lage, die Infektion abzuwehren, bei anderen Mäusen könnte die Keimzahl gerade hoch genug gewesen sein, um eine Infektion zu etablieren. Im dritten Versuch wurde daher die Inokulummenge erhöht (auf 5×10^5 KBE/Maus). Diese Inokulummenge war jedoch nicht ausreichend und blieb ohne Auswirkung auf die Gleichmäßigkeit der Ergebnisse (Kapitel 3.3.1.). Andere Arbeiten zum Tissue-Cage-Modell hatten gezeigt, dass Inokulummengen von 5×10^3 KBE/Maus [49] und 1×10^4 KBE/Maus [71] bei Verwendung derselben Mäuse (C 57 BL/6-Mäuse, 10-12 Wochen alt) ausreichend waren. Als *S. aureus*-Stamm war in diesen Arbeiten der Stamm SA113 verwendet worden. Dieser Stamm ist eine Variante des Stamms 8325 und trägt somit alle ursprünglichen 8325-Phagen. Kristian et al. konnten zeigen, dass bei SA113-Mutanten im *dtl*-Gen (*dtl*⁻) 500-1000-fach höhere Inokulummengen nötig waren um eine Infektion im Tissue-Cage-Modell zu etablieren. Das *dtl*-Gen kodiert für ein Protein, welches den Einbau von Alanin in Teichonsäure, einem *S. aureus*-Zellhüllenpolymer, katalysiert und damit das Bakterium vor der Immunabwehr des Wirts schützt [49]. Der *S. aureus*-Stamm Newman, ebenfalls ein klinisches Isolat, besitzt ähnlich wie Stamm 8325 vier Prophagen. Prophage Φ NM3 trägt dabei ähnlich wie $\Phi 13$ u. a. die Virulenzfaktoren SEA, SAK, CHP und SCN. Der Verlust dieser Prophagen führt auch bei Newman zu einem Verlust an Infektiösität in der Maus [3].

4. DISKUSSION

Ausgehend von diesen Ergebnissen wäre zu vermuten, dass die in dieser Arbeit verwendeten Stämme CG6 und CG7 durch die in der vorangegangenen Mutagenese durchgeführten Veränderungen, anfälliger für die Immunabwehr der Mäuse geworden sind und aufgrund der fehlenden ursprünglichen 8325-Phagen an Virulenz verloren haben. Dies zeigt, dass Bakteriophagen einen essentiellen Beitrag zur Pathogenese von Bakterien leisten.

Ein weiteres Problem im Zusammenhang mit dem Mausmodell war die starke Inhibition im Wachstum von Rezipient und Donor auf den jeweiligen Selektivplatten. Genprodukte, die zu einer Resistenz gegen ein Antibiotikum führen, liegen nicht ständig aktiv in der Zelle vor. Vielmehr werden die jeweiligen Resistenzkassetten erst bei Kontakt des Bakteriums mit dem entsprechenden Antibiotikum induziert und die Resistenzdeterminanten, z.B. Enzyme, die zur Inaktivierung von Antibiotika führen, gebildet. Bei Kontakt der Bakterien mit dem Antibiotikum kann dieses also seine bakterizide Wirkung ausüben, bis der Induktions-Transkriptions-Translations-Mechanismus in den Zellen greift.

Die Tetracyclinresistenzinhibition war schon in den *in vitro*-Versuchen aufgefallen und konnte dort durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT) minimiert werden (Kapitel 3.2.1.). AHT wirkt als effizienter Induktor des Tetracyclin-Promotors [95].

Auch in den Mäuseversuchen wurde dem Exsudat das Tetracyclinanalogon AHT zugegeben, jedoch scheint eine Inkubation für 1 h nicht ausreichend, um die Tetracyclinresistenzkassette zu induzieren. In den Vorarbeiten zur Testung der Wirkung des AHTs auf die Anzüchtbarkeit des CG7 auf Tetracyclinplatten (siehe 3.2.1.) wurde eine Inkubationsdauer von 4 Stunden angesetzt, was zu einer Annäherung der Keimzahlen auf der Selektivplatte an die Keimzahlen auf Blut führte.

Eine Inhibition der Kanamycinresistenz wurde in den *in vitro*-Versuchen nicht beobachtet, war aber ausgeprägt in den *in vivo*-Versuchen vorhanden. Im Vergleich zu den *in vitro*-Versuchen liegen die aus dem Mausmodell kommenden Bakterien in einem Stoffwechsel-inaktiven Zustand vor. Die

Kanamycinresistenzenzyme müssen erst induziert werden. Hier sollten weitere Methoden etabliert werden, die die Anzüchtbarkeit der Stämme aus dem Mausmodell auf den Selektivplatten optimieren.

Da anzunehmen ist, dass sich die Tetracyclinresistenzinhibition auch im Mausmodell auf das neue doppelresistente Lysogen (CG19) auswirkt, wie in den *in vitro*-Versuchen gezeigt (Kapitel 3.2.1), sind die absoluten Zahlen neu entstandener Lysogene wahrscheinlich zu niedrig. Geht man davon aus, dass die Inhibition sich in gleichem Maße auf das Lysogen wie auf den Rezipienten auswirkt, so lässt sich dennoch eine Phagentransferrate berechnen. Dabei waren die Transferraten *in vivo* (ca. 0,06 - 0,1 %) (siehe 3.3.3.) höher als *in vitro* (ca. 0,00002 – 0,0004 %) (Kapitel 3.2.2.). Zieht man darüber hinaus in Betracht, dass sich die Kanamycinresistenzinhibition ebenfalls auf die Lysogene auswirkt, so muss von noch höheren Lysogenabsolutzahlen und damit verbunden einer noch höheren Transferrate im Mausmodell ausgegangen werden. Diese Inhibition könnte auch dazu geführt haben, dass bei nur ein bzw. zwei Mäusen je Mischverhältnis überhaupt Lysogene auf der Doppelselektivplatte gewachsen sind. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Einflüsse, die *in vivo* auf die Phageninduktion und den Transfer von Phagen einwirken, vielseitig sind und nicht mit einzelnen der *in vitro* gefundenen Faktoren erklärt werden kann.

Die Phagentransferrate berechnet sich aus dem Verhältnis der neu entstandenen doppelselektiven Lysogene zu der Rezipientenzahl. Daher könnten die verhältnismäßig hohen Transferraten *in vivo* mit einem eventuellen Selektionsvorteil der lysogenen Bakterien gegenüber den nicht-lysogenen Rezipienten erklärt werden. Bei Einzelkultivierung in der Maus hatte sich zwar keine Überlegenheit in der Virulenz des lysogenen Donors gegenüber des nicht-lysogenen Rezipienten ergeben, jedoch könnte es bei Kokultivierung der beiden Stämme zu einem Selektionsvorteil für den lysogenen Donor aufgrund des Virulenzfaktoren-tragenden Phagen kommen. Beträfe dieser Selektionsvorteil auch die neu entstandenen „Transfer“-Lysogene, so würde dies zu der hohen Transferrate beitragen. Dieser Umstand sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.2. Aufnahme von Bakteriophagen

4.4.1. Lysogenisierung von klinischen Isolaten

Die Mischkulturexperimente zeigten, dass der Transfer von $\Phi 13\text{kana}$ zwischen 8325-4-Stämmen möglich war, in den Lysogenisierungsversuchen war aber die Aufnahme von $\Phi 13\text{kana}$ in klinische Isolate blockiert (Kapitel 3.4.1.) Keines der verwendeten hlb-positiven Patientenisolat, mit Ausnahme von S64c, ließ sich mit Phage $\Phi 13\text{kana}$ lysogenisieren.

Waldorn et al. postulierten in ihrer Arbeit, dass das so genannte Sau1 Typ I-Restriktions-Modifikationssystem für diese Blockierung eine hauptsächliche Rolle spiele [109]: Im Labor gestaltet sich die genetische Manipulation, die Aufnahme von Fremd-DNA, des *S. aureus* als schwierig. Nur ein Stamm RN4220, ist bekannt, der z.B. *E. coli*-Plasmide durch Elektroporation aufnimmt. RN4220 ist ein Derivat des Stamms 8325-4, welcher wiederum eine phagenlose Variante des klinischen Stamms 8325 (auch als RN1 oder PS47 bekannt) ist. Weder 8325-4 noch 8325 können *E. coli*-DNA aufnehmen. Jedoch ist der Transfer von mobilen genetischen Elementen (MGE) durch Transduktion *zwischen* diesen beiden Stämmen möglich.

Waldron et al. stellten fest, dass diese Fähigkeit des Stamms RN4220 Fremd-DNA aufzunehmen, durch eine Mutation im *sau1hdsR*-Gen zustande kommt [109]. Dieses Gen ist Teil des Sau1 Typ I- Restriktions-Modifikationssystems. Sau1 wurde in jedem der 9 sequenzierten *S. aureus*-Stämme gefunden. RN4220 mit wiederhergestelltem *sau1hdsR* war resistent gegenüber Bakteriophagen, aber nur wenn der Phage aus einem *S. aureus* einer anderen Abstammungslinie stammte.

Es sind 10 dominante *S. aureus*-Abstammungslinien bekannt [58]. Waldron et al. [109] wiesen wesentliche Variationen in den zwei Sequenz-Spezifitäts-Genen des Sau1-Systems (*sau1hdsS1* und *Sau1hdsS2*) zwischen verschiedenen *S. aureus*-Isolaten nach. Diese Variationen korrespondierten mit den 10 bekannten *S. aureus*-Abstammungslinien. Ein Transfer ist daher zwischen Stämmen derselben Linie möglich, nicht jedoch zwischen fremden Linien und anderen Spezies.

Innerhalb der 10 Abstammungslinien fanden Lindsay et al. [58] wesentliche Unterschiede in der Zusammensetzung der MGE und ihren assoziierten Virulenz- und Resistenzgenen. Diese hohe Variation führten sie auf einen häufigen horizontalen Gentransfer innerhalb der Abstammungslinien zurück, was sich mit den Beobachtungen von Waldron et al. deckt. Diese nehmen an, dass Sau1 der Hauptmechanismus sowohl für die Blockade des Transfers von Resistenzgenen und anderen MGE aus anderen Spezies in *S. aureus* als auch für die Kontrolle der Ausbreitung von Resistenzgenen zwischen *S. aureus*-Isolaten verschiedener Abstammungslinien ist. Sau1 ist auch verantwortlich für einen erschwerten Transfer von genetischem Material aus Enterokokken durch Konjugation, einem Modell für den Transfer von Vancomycinresistenz. Dies könnte erklären, warum bisher nur vier Vancomycin-resistente *S. aureus*-Stämme identifiziert wurden trotz hohem Selektionsdruck in der klinischen Umgebung [109].

Es ist also anzunehmen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Patientenisolate, mit Ausnahme von S64c, einer anderen Abstammungslinie entstammten als der Φ 13-tragende 8325, sich daher im Sau1-Restriktions-Modifikations-System unterschieden und somit in der Lage waren, Φ 13 durch ihr R/M-System abzuwehren.

4.4.2. Lysogenisierung von *hly*-lysogenen Bakterien mit Φ 13k_{kana}

In den Versuchen stellte sich heraus, dass Φ 13k_{kana} in der Lage ist, schon *hly*-lysogene *S. aureus*-Stämme zu infizieren und dabei den bevorstehenden Prophagen zu verdrängen: Stamm S64 wies nach Kontakt mit Φ 13k_{kana} eine Kanamycinresistenz auf. In der PFGE und anschließendem Blot war Φ 13k_{kana} als neuer Prophage (160 kB-Bande) im *sak*- und *kana*-Blot zu erkennen. Der verdrängte Phage war als freier Phage (ca. 50 kB) im *sak*-Blot abgebildet.

Beim Stamm CG1 konnte ebenfalls Φ 13k_{kana} im *sak*- und *kana*-Blot bei 160 kB nachgewiesen werden, was ebenso vermuteten lässt, dass der

4. DISKUSSION

ursprüngliche $\Phi 13$ -Prophage von $\Phi 13_{\text{kana}}$ verdrängt worden war. Ein freier Phage war jedoch hier nicht zu identifizieren.

Für den lysogenen Modellphagen λ werden multiple Infektionen mit genetisch identischen Bakteriophagen ausgeschlossen [86]. Um die eigene Lysogenität aufrecht zu erhalten, schützt sich der Prophage vor anderen Phagen entweder durch direkte Repression des konkurrierenden Phagens, durch abortive Infektionssysteme (ABI) oder durch Veränderungen der Phagenrezeptoren an der Zellwand [25]. Nach Infektion eines Phagens können die Phagenrezeptoren inaktiviert werden, um das Eindringen von weiteren Phagen zu verhindern. Dies wurde bisher für den lytischen *E. coli*-Phagen T5 nachgewiesen [24]. Allison et al. beschrieben jedoch die Beobachtung einer simultanen Infektion eines *E. coli*-Wirtes mit zwei genetisch identischen Stx-Phagen. Diese Phagen gehören zu den lambdoiden Phagen, zeigen aber hier eine sich von λ unterscheidende Eigenschaft [2]. Zu dem Phänomen der Verdrängung genetisch ähnlicher Phagen, wie im Falle von CG1, oder genetisch verschiedener Phagen, wie im Falle von S64, ist jedoch in der Literatur nichts bekannt.

Eine hohe spontane Induktion von $\Phi 13_{\text{kana}}$ im Laborstamm CG6 im Vergleich zu $\Phi 13$ im Stamm CG1, war schon in den Induktionsversuchen aufgefallen. Diese instabile Lysogenität von $\Phi 13_{\text{kana}}$ zeigte sich in den Blot-Bildern als so genannte „Leiterstruktur“ in den Stämmen 8325-4 $\Phi 13_{\text{kana}}$ und CG1 $\Phi 13_{\text{kana}}$. Neben dem eigentlichen Phagen (Bande bei 160 kB) waren mehrere Banden mit größeren Restriktionsstücken zu sehen, welche während der rolling-circle-Replikation von Phagen entstehen (Concatemere). Dies lässt darauf schließen, dass ein Teil der Bakterien spontan induziert wurde und die Phagen replizierte. Eigenschaften des mutagenisierten Phagens könnten dabei eine Rolle spielen. Ebenso muss aber vermutet werden, dass auch stammspezifische Faktoren einen Beitrag zu dieser Beobachtung leisten, da zwar in den Laborstämmen CG6, 8325-4 $\Phi 13_{\text{kana}}$ und CG1 $\Phi 13_{\text{kana}}$ eine instabile Lysogenität von $\Phi 13_{\text{kana}}$ beobachtet werden konnte, jedoch nicht in Stamm S64c $\Phi 13_{\text{kana}}$ und S64 $\Phi 13_{\text{kana}}$. Welche Faktoren hierbei auf den

Phagenrepressor wirken bzw. wie er verändert ist, sollte weiter untersucht werden, z.B. durch Sequenzierung des Repressors.

Vergleicht man die Lysogenisierungsraten der Stämme, bei denen eine Lysogenisierung mit Φ 13kana in der PFGE und Blot nachweisbar war, so zeigte sich deutlich, dass der *hIb*-positive Laborstamm 8325-4 den Phagen am bereitwilligsten aufgenommen hatte (Kapitel 3.4.2.). Dies war zu erwarten, da dieser Stamm (8325) ja der ursprüngliche Wirt von Φ 13 ist. Wie oben erläutert muss der Patientenstamm S64c der gleichen Abstammungslinie wie 8325-4 angehören, denn auch hier konnte Φ 13kana integrieren. Dies geschah jedoch mit einer geringeren Rate. Die Lysogenisierung der *hIb*-negativen Stämme und damit einhergehende Verdrängung des *hIb*-Phagens in den Stämmen CG1 und S64 war wie oben beschrieben möglich. Es war jedoch ein relativ seltenes Ereignis. Dieses interessante Verdrängungsphänomen sollte ebenfalls weiter verfolgt werden.

5. Zusammenfassung

Staphylokokkus aureus ist als weit verbreiteter Erreger von großer klinischer Relevanz. Die Anpassung an die Gegebenheiten im Wirt, der Übergang von symptomloser Trägerschaft zur krankmachenden Infektion und die unterschiedlichen umschriebenen Erkrankungen hervorgerufen durch einzelne Stämme erfordern genetische Variationen im Bakterium. Bakteriophagen tragen dabei durch Kodierung von Virulenzgenen und Insertion in bakterielle Gene wesentlich zu dieser Variation bei. Genomveränderungen während der Infektion konnten auf die Mobilisation von *S. aureus*-spezifischen Phagen zurückgeführt werden. Ziel dieser Studie war es, einzelne Stadien im Lebenszyklus des lysogenen *S. aureus*-Phagen $\Phi 13$ unter verschiedenen infektionsrelevanten Bedingungen am Stamm 8325 zu untersuchen. Dazu wurde eine Real-Time-PCR-Strategie eingesetzt, die spezifische bakterielle und virale Gensequenzen quantifiziert, um die Phageninduktion und –replikation zu bestimmen. Mischkulturexperimente mit resistenzmarkierten *S. aureus*-Stämmen und Phagen dienten zur Untersuchung des Transfers von $\Phi 13$ zwischen *S. aureus*-Zellen.

Folgendes konnte gezeigt werden: (i) Die Antibiotika Ciprofloxacin und Trimethoprim wirkten induzierend auf $\Phi 13$ in *S. aureus* und begünstigten den Transfer von $\Phi 13$. Der Transfer von $\Phi 13$ war dabei abhängig von den bakteriellen Wachstumsbedingungen. Weitere infektionsrelevante Bedingungen (erhöhte Temperatur, anaerobes Wachstumsmilieu und Patientensputum) zeigten keinen Effekt auf Induktion und Transfer. Die Anzahl replizierter Phagen Genome nach Induktion blieb gleich. (ii) Ein Transfer von $\Phi 13$ fand auch *in vivo* statt. Dies wurde in einem Tissue-cage-Modell an Mäusen untersucht. (iii) Die Lysogenisierung von Stämmen anderer Abstammungslinien als 8325 durch $\Phi 13$ war nicht möglich. (iv) $\Phi 13$ war in der Lage, schon vorhandene Phagen aus dem Wirtsgenom zu verdrängen.

In dieser Studie konnten mit den etablierten Methoden Grundlagen in der Phagendynamik bei *S. aureus* *in vitro* und *in vivo* erfasst werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Acheson, D.W.K, Donohue-Rolfe, A. 1989. Cancer-associated hemolytic uremic syndrome: a possible role of mitomycin C in relation to Shiga-like toxins. *J.Clin.Oncol.* 7:1943.
2. Allison, H.E., Sergeant, M.J., James, C.E., Saunders. J.R., Smith, D.L., Sharp, R.J., Marks, T.S., McCarthy, A.J. 2003. Immunity profiles of wild-type and recombinant shiga-like toxin-encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens. *Infect.Immun.* 71:3409-3418.
3. Bae, T., Baba, T., Hiramatsu, K., Schneewind, O. 2006. Prophages of *Staphylococcus aureus* Newman and their contribution to virulence. *Mol.Microbiol.* 42:1035-1047.
4. Bayer, M.E., Thurow, H., Bayer, M.H. 1979. Penetration of the polysaccharide capsule of *E. coli* (Bi161/42) by bacteriophage K29. *Virology.* 94:95-118.
5. Betley, M.J., Mekalanos, J.J. 1985. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by Phage. *Science.* 229:185-187
6. Bickle, T.A., Krüger, D.H. 1993. Biology of DNA restriction. *Microbiol.Rev.* 57:434-450.
7. Bone, R.C. 1994. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch.Intern.Med.* 154:26-34
8. Broudy, T.B., Fischetti, V.A. 2003. In vivo lysogenic conversion of Tox(-) *Streptococcus pyogenes* to Tox(+) with lysogenic streptococci or free phage. *Infect.Immunity.* 71:3782-3786.
9. Broudy, T.B., Pancholi, V., Fischetti, V.A. 2002. The in vitro interaction of *Streptococcus pyogenes* with human pharyngeal cells induces a phage-encoded extracellular DNase. *Infect.Immun.* 70:2805-2811.
10. Calendar, R., Inman, R. Phage life cycles. In *Phages: Their role in Bacterial Pathogenesis and Biochemistry.* ASM Press, Washington, D.C. 2005.
11. Casewell, M.W. 1998. The nose: an underestimated source of *Staphylococcus aureus* causing wound infections. *J.Hosp.Infect.* 40:3-11.

12. Chatterjee, A. N. 1969. Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 98:519-527.
13. Chiller, K., Selkin, B.A., Murakawa, G.J. 2001. Skin microflora and bacterial infections of the skin. J.Investig.Dermatol.Symp.Proc. 6:170-174.
14. Chopin, M.C., Chopin, A., Bidnenko, E. 2005. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. Curr.Opin.Microbiol. 8:473-479.
15. Cirz, R.T., Jones M.B., Gingles, N.A., Minogue, T.D., Jarrahi, B., Peterson, S.N., Romesberg, F.E. 2007. Complete and SOS-mediated response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. J Bacteriol. 189:531-9.
16. Coleman, D., Arbuthnott, J., Pomeroy, H., Birbeck, T. 1996. Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of the beta-lysin determinant from *Staphylococcus aureus*: evidence that bacteriophage conversion of beta-lysin activity is caused by insertional inactivation of the beta-lysin determinant. Microb.Pahtog. 1:549-564.
17. Coleman, D., Knights, J., Russell, R., Shanley, D., Birbeck, T.H., Dougan, G., Charles, I. 1991. Insertional inactivation of the *Staphylococcus aureus* beta-toxin by bacteriophage Φ 13 occurs by site- and orientation-specific intergration of the Φ 13 genome. Mol.Microbiol. 5: 933-939.
18. Coleman, D., Sullivan, D.J., Russell, R., Arbuthnott, J.P., Carey, B.F., Pomeroy, H.M. 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of β -Lysin, Staphylokinase and Enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. J.Gen.Microbiol. 135: 1679-1697.
19. Courecelle, J., Khodursdy, A., Peter, B., Brown, P.O., Hanawalt, P.C. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wildtype and SOS-deficient *Escherichia coli*. Genetics. 158:41-64.
20. Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J., Marians, K.J. 2000. The importance of repairing stalled replication forks. Nature. 404:37-41.
21. Defives, C., Werquin, M., Mary, P., Hornez, J.P. 1996. Roles of Exopolysaccharides and Lipopolysaccharides in the Adsorption of the Siphovirus Phage NM8 to *Rhizobium meliloti* M11S Cells. Curr.Microbiol. 33:371-376.

22. De Azavedo, J.C., Foster, T.J., Hartigan, P.J., Arbuthonott, J.P., O'Reilly, M., Kreiswirth, B.N., Novick, R.P. 1985. Expression of the cloned toxic shock syndrome toxin 1 gene (tst) in vivo with a rabbit uterine model. *Infect.Immun.* 50:304-309.
23. DeHaas, C.J., Veldkamp, K.E., Peschel, A., Weerkamp, F., von Wamel, W.J., heezius, E.C., *et al.* 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial anti-inflammatory agent. *J.Exp.Med.* 199:687-659.
24. Dunn, G., Duckworth, D. 1977. Inactivation of Rezeptors for Bacteriophage T5 during Infection of Escherichia coli B. *J.Virol.* 24:419-421.
25. Echols, H. 1972. Developmental pathways for the temperate phage: lysis vs lysogeny. *Annu. Rev. Genet.* 6:157-190.
26. Fang, S., Skeete, D., Cullen, J.J. 2004. Preoperative risk factors for postoperative *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. *Surg.Technol.Int.* 13:35-38.
27. Filee, J., Bapteste, E., Susko, E., Krisch, H.M. 2006. A selective barrier to horizontal gene transfer in the T4-type bacteriophages that has preserved a core genome with the viral replication and structural genes. *Mol.Biol.Evol.* 23:1688-1696.
28. Fitzgerald, J.R., Sturdevant, S.M., Mackie, S.M., Gill, S.R., Musser, J.M. 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: Insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 98:8821-8826.
29. Frobisher, M., Brown, J. 1927. Transmissible toxicogenicity of streptococci. *Bull.JohnsHopkinsHosp.* 41:167-173.
30. Garvey, P., Hill, C., Fitzgerald, G.F. 1996. The lactococcal plasmid pNP40 encodes a third bacteriophage resistance mechanism, one which affects phage DNA penetration. *Appl.Enviro.Microbiol.* 62:676-679.
31. Goerke, C., Köller, J., Wolz, C. 2006. Ciprofloxacin and Trimethoprim Cause Phage Induction and Virulence Modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 50 (1):171-177.
32. Goerke, C., Kraning, K., Stern, M., Döring, G., Botzenhart, K., Wolz, C. 2000. Molecular epidemiology of community-acquired *Staphylococcus aureus* in families with and without cystic fibrosis patients. *J.Infect.Dis.* 181: 984-989.

33. Goerke, C., Matias y Papenberg, S., Dasbach, S., Dietz, K., Zebach, R., Kahl, C., Wolz, C. 2003. Increased frequency of genomic alterations in *Staphylococcus aureus* during chronic infection is part due to phage mobilization. *J.Infect.Dis.* 188: 250-265.
34. Goerke, C., Wirtz, C., Flückinger, U., Wolz, C. 2006. Extensive phage dynamics in *Staphylococcus aureus* contributes to adaptation to the human host during infection. *Molecul.Microbiol.* 61:1673-1685. "CG 2006"
35. Gosbell, I.B. 2005. Diagnosis and management of catheter-related bloodstream infections due to *Staphylococcus aureus*. *Intern.Med.J.* 35 Suppl 2:45-62.
36. Hoiby, N. 1991. Cystic Fibrosis: Infection. *Schweiz.Med.Wochenschr.* 121(4):105-109.
37. Iandolo, J.J., Worrell, V., Groicher, K.H., Qian, Y., Tian, R., Kenton, S., et al. 2002. Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene.* 289:109-118.
38. Jarvis, W.D., Kolesnick, R.N., Fornari, F.A., Traylor, R.S., Gewirtz, D.A., Grant, S. 1994. Induction of apoptotic DNA damage and cell death by activation of the sphingomyelin pathway. *Troc.Natl.Acad.Sci. USA* 91:73-77.
39. Jin, T., Bokarewa, M., McIntyre, L., Tarkowski, A., Corey, G.R., Reller, L.B., Fowler, V.G. Jr. 2003. Fatal outcome of bacteraemic patients caused by infection with Staphylokinase-deficient *Staphylococcus aureus* strains. *J.Med.Microbiol.* 52:919-923.
40. Johnson, A.P., Pearson, A., Duckworth, G. 2005. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. *J.Antimicrob.Chemother.* 56:455-462.
41. Karlsson, A., Arvidson, S. 2002. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor sarA. *Infect.Immun.* 70:4239-4246.
42. Karlsson A., Saravia-Otten, P., Tegmark, K., Morfeldt, E., Arvidson, S. 2001. Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular protease. *Infect.Immun.* 69:4742-4748.

43. Kanafani, Z.A., Fowler, V.G. 2006. *Staphylococcus aureus* infection: new challenges from an old pathogen. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 24:182-193.
44. Karch, H., Goroncy-Bermes, H., Opferkuch, W., Droll, H.P., O'Brien, A.D. 1985. Subinhibitory concentrations of antibiotics modulate amount of Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli*. In: Adam, D., Hahr, H., Opferkuch, W., eds. *The influence of antibiotics on the host-parasite relationship*. Berlin: Springer Verlag. 239-245.
45. Kimmitt, P.T., Harwood, C.R., Barer, M.R. 2000. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg.Infect.Dis.* 6:458-465.
46. Kluytmans, J. A., van Belkum, A., Verbrugh, H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin.Microbiol.Rev.*10:505-520.
47. Kreiswirth, B., Kravitz, G.R., Schlievert, P.M., Novick, R.P. 1986. Nosocomial transmission of a strain of *Staphylococcus aureus* causing toxic shock syndrome. *Ann.Intern.Med.* 105:704-707.
48. Kresken, M., Hafner, D., Witt, W., René, R. 1999. Resistenzentwicklung bei Staphylokokken und anderen gram-positiven Erregern gegenüber Chemotherapeutika im mitteleuropäischen Raum. *Chemotherapie Journal.* 4:136-145.
49. Kristian, S. A., X. Lauth, V. Nizet, F. Goetz, B. Neumeister, A. Peschel, and R. Landmann. 2003. Alanylation of teichoic acids protects *Staphylococcus aureus* against Toll-like receptor 2-dependent host defense in a mouse tissue cage infection model. *J. Infect. Dis.* 188:414-423.
50. Krüger, D.H., Bickle, T.A. 1983. Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction system of their host. *Microbiol.Rev.* 47:345-360.
51. Kuroda, M., et al. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357:1225-1240.
52. Ladhani, S. 2001. Recent developments in staphylococcal scaled skin syndrome. *Clin.Microbiol.Infeck.* 7:301-307.
53. Landhani, S., Joannou, C.L., Lochrie, D.P., Evans, R.W., Poston, S.M. 1999. Clinical, microbial and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scaled-skin syndrome. *Clin.Microbiol.Rev.* 12:224-242.

6. LITERATURVERZEICHNIS

54. Le Loir, Y., Baon, F. and Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. GenetMol Res.2:63-76.
55. Lessing, M.P., Jordens, J.Z. and Bowler, I.C. 1995. Molecular epidemiology of a multiple strain outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* amongst patients and staff. J.Hosp.Infect. 31: 253-260.
56. Lijen, H.R., von Hoef, B., de Cock, F., Okada, K., Ueshima, S., Matsuo, O., Collen, D. 1991. On the mechanism of fibrin-specific plasminogen activation by staphylokinase. J.Biol.Chem. 266: 11826-11832.
57. Lindberg, A.A. 1973. Bacteriophage receptors. Annu.Rev.Microbiol. 27:205-241.
58. Lindsay, J.A., Moore, C.E., Day, N.P., Peacock S.J., Witney, A.A., Stabler, R.A., Husain, S.E., Butcher, P.D., Hinds, J. 2006. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. J.Bacteriol. 188:669-676.
59. Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N., Novick, R.P. 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. Mol.Microbiol. 29:527-543.
60. Little, J.W. 1993 LexA cleavage and other self-processing reactions. J.Bacterol. 175:4943-4950.
61. Little, J.W. Lysogeny, prophage induction and lysogenic conversion. In Phages: Their role in Bacterial Pathogenesis and Biochemistry. ASM Press, Washington, D.C. 2005.
62. Little, J.W., Mount, D.W. 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. Cell. 29:11-22
63. Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N.Engl.J.Med. 339:520-532.
64. Lunde, M., Blatny, J.M., Kaper, F., Nes, I.F., Lillehaug, D. 2000. The life cycles of the temperate lactococcal bacteriophage Φ LC3 monitored by a quantitative PCR method. FEMS.Microbio.Lett. 192:119-124.
65. Lunde, M., Blatny, J.M., Lillehaug, D., Aastveit, A.H., Nes, I.F. 2003. Use of Real-Time Quantitative PCR for the Analysis of Φ LC3 Prophage Stability in Lactococci. Appl.Environ.Microbiol. 69: 41-48.

66. Maiques, E., Ubeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R.P., Barbe, J., Penades, J.R. 2006. beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. J.Bacteriol. 188:2726-9.
67. Marcs, M.I. 1990. Clinical significance of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. Infection. 1990. Jan-Feb; 18(1):53-56.
68. Marshall, M.J., Bohach, G.A., Boehm, I. 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. J.Nat.Toxins. 9:125-138.
69. Matsuzaki, S., Yasuda, M., Nishikawa, H., Kuroda, M., Ujihara, T., Shuin, T., Shen, Y., Jin, Z., Fujimoto, S., Nasimuzzaman, M.D., Wakiguchi, H., Sugihara, S., Sugiura, T., Koda, S., Muraoka, A., Imai, S. 2003. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. J.Infect.Dis. 187:613-624.
70. McCaffery, K., Olver, R.E., Franklin, M., Mukhopadhyay, S., 1999. Systemic review of antistaphylococcal antibiotic therapy in cystic fibroses. Thorax. 54:380-383.
71. McCallum, N., Karauzum, H., Getzmann, R., Bischoff, M., Majcherczyk, P., Berger-Bachi, B., Landmann, R. 2006. In vivo survival of teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* and fitness cost of teicoplanin resistance. Antimicrob.Agents.Chemother. 50:2352-2360.
72. Merril, C.R., Scholl, D., Adhya, S.L. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. Nat.Rev.Drug.Discov. 2:489-497.
73. Miro, J.M., del Rio, A., Mestres, C.A. 2003. Infective endocarditis and cardiac surgery in intravenous drug abusers and HIV-1 infected patients. Cardiol.Clin. 21:167-184.
74. Mlynarczyk, A., Mlynarczyk, G., Jeljaszewicz, J. 1998. The genome of *Staphylococcus aureus*: a review. Zentralbl.Bakteriol. 287:277-314.
75. Möllby, R. Isolation and properties of membrane damaging toxins. In: Easmon CFS, Adlam, C. (eds.). 1983. Staphylococci and staphylococcal Infections. London: Academic press. 2: 619-662.
76. Moreno, F., Crip, C. Jorgensen, J.H., Patterson, J.E. 1995. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a community organism. Clin.Infekt.Des. 21:1308-1312.

77. Muhldorfer, I., Hacker, J., Keusch, G.T., et al. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect.Immun* 1996, 64:495-502.
78. Murray, N.E. 2000. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 64:412-434.
79. Novick, R.P. 1991. Genetic Systems on Staphylococci. *Methods Enzymol.* 204:287-636.
80. Novick, R.P. 1967. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology.* 33:155-166.
81. Panlilio, A., Culver, D.H., Gaynes, R.P., et al. 1992. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect.Control.Hosp.Epidemiol.* 13:582-586.
82. Pantucek, R., Doskar, J., Ruzickova, V., Kasperek, P., Oracova, E., Kvardova, V., Rosypal, S. 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. *Arch.Virol.* 149:1689-1703.
83. Pantucek, R., Rosypalova, A., Doskar, J., Kailerova, J., Ruzickova, V., Borecka, P., Snopkova, S., Horvath, R., Gotz, F., Rosypal, S. 1998. The polyvalent staphylococcal phage phi 812: its host range mutants and related phages. *Virology.* 246:241-252.
84. Parker, M.T. 1983. The significance of phage-typing patterns of *Staphylococcus aureus*. In: Eastmont CFS, Adlam, C., (eds.) *Staphylococci and staphylococcal infections*. London: Academy Press, 33-62.
85. Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F., Baquero, F. 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J.Antimicrob.Chemother.* 20:631-638.
86. Ptashne, M. 1992. *A genetic switch: phage λ and higher organisms*, 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
87. Resch, A., Fehrenbacher, B., Eisele, K., Schaller, M., Götz, F. 2005. Phage release from biofilm and planktonic *Staphylococcus aureus* cells. *FEMS.Microbiol.Lett.* 252:89-96.
88. Reyrolle, J., Chopin, M., Letellier, F., Novel, G. 1982. Lysogenic strains of lactic acid streptococci and lytic spectra of their temperate bacteriophages. *Appl.Environ.Microbiol.* 43:349-356.

89. Robinson, P. 2001. Cystic fibrosis. *Thorax*. 56:237-241.
90. Rooijackers, S.H., Ruyken, M., Roos, A., Daha, M.R., Presanis, J.S., Sim, R.B., *et al.* 2005. Immune evasion by a staphylococcal complement inhibitor that acts on C3 convertases. *Nat.Immunol.* 6:920-927.
91. Russel, R.J., Wilkinson, P.C., McInroy, R.J., McKay, S., McCartney, A.C., Arbutnott, J.P. 1976. Effects of staphylococcal products on locomotion and chemotaxis of human blood neutrophils and monocytes. *J.Med.Microbiol.* 9: 433-439.
92. Schmitz, F.J., Fluid, A.C., Gondolf, M., Beyrau, R., Lindenlauf, E., Verhoef, J., Heinz, H.P., Jones, M.E. 1999. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J.Antimicrob.Chemother.* 43:253-259.
93. Sharma, S., Verma, K.K. 2001. Skin and soft tissue infection. *Indian.J.Pediatr.* 68 Suppl 3: 46-50.
94. Shaw, D.R.D., Mirelmans, D., Chatterjee, A.N., Park, J.T. 1970. Ribitol Teichonic Acid Synthesis in Bacteriophage-resistant Mutants of *Staphylococcus aureus* H. *J.Biol.Chem.* 245:5101-5106.
95. Skerra, A. 1994. Use of the tetracycline promotor for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene.* 151:131-135.
96. Snyder, L. 1995. Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol.Microbiol.* 15:415-420.
97. Sussman, R., Zeev, H.B. 1975. Proposed mechanism of bacteriophage lambda induction: acquisition of binding sites for lambda repressor by DNA of the host. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA.* 72:1973-1976.
98. Spanier, J.G., Cleary, P.P. 1980. Bacteriophage control of antiphagocytic determinants in group A streptococci. *J.ExpMed.* 152:1393-1406.
99. Tinsley, C.R., Bille, E., Nassif, X. 2006. Bacteriophages and pathogenicity: more than just providing a toxin? *Microbes.Infest.* 8:1365-1371.
100. Titball, R. W. 1993. Bacterial phospholipase C. *Microbiol.Rev.* 57:347–366.

101. Tiwari, H.K. Sen, M.R. 2006. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. BMC.Infect.Dis. 6:156.
102. Valyasevi, R., W. E. Sandine, and B. L. Geller. 1990. The bacteriophage kh receptor of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KH is the rhamnose of the extracellular wall polysaccharide. Appl. Environ Microbiol. 56:1882–1889.
103. von Wamel, W.J.B., Rooijackers, S.H.M., Ruyken, M., von Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G. 2006. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. J.Bacteriol. 188:1310-1325.
104. von Eiff, C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, and G. Peters. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. N.Engl.J.Med. 344:11-16.
105. Wadström, T., Möllby, R. 1972. Studies on extracellular proteins of *Staphylococcus aureus*. VII. Studies on beta-hemolysin. Biochim. Biophys. Acta. 242: 308-420.
106. Wagner, P.L., Waldor, M.K. 2002. Bacteriophage control of bacterial virulence. Infect.Immun. 70:3985-3993.
107. Wagner, P.L., Acheson, D.W.K., Wildor, M.K. 2001. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 69:1934-1937.
108. Waldor, M.K., Mekalanos, J.J. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science 272:1910–4.
109. Waldron, D.E., Lindsay, J.A. 2006. Sau1: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. J.Bacteriol. 188:5578-5585.
110. Walev, I., Weller, U., Strauch, S., Foster, T., Bhakdi, S. 1996. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. Infect.Immun. 64:2974-2979.
111. Walker, C.W. 1996. The SOS response of *Escherichia coli*, p. 1400-1416, In F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K. Brooks Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and E.H. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*; cellular and molecular biology. ASM Press, Washington, D.C.

112. Walterspiel, J.N., Ashkenazi, S., Morrow, A.L., Cleary, T.G. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin 1. *Infection* 1992, 20:25-29.
113. Wegrzyn, G., Thomas, M.S. 2002. Modulation of the susceptibility of intestinal bacteria to bacteriophages in response to Ag43 phase variation – a hypothesis. *Med.Sci.Monit.* 8:15-18.
114. Wijaya, L., Hus, L.Y., Kurup, A. 2006. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: overview and local situation. *Ann.Acad.Med.Singapore.* 35:479-486.
115. Williamson, S.J., Paul, J.H. 2006. Environmental factors that influence the transition from lysogenic to lytic existence in the phiHSIC/Listonella pelagia marine phage-host system. *Microb Ecol.* 52:217-225.
116. Wilkinson, B.J., Holmes, K.M. 1979. *Staphylococcus aureus* Cell Surface: Capsule as a Barrier to Bacteriophage Adsorption. *Infct.Immun.* 23: 549-552.
117. Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J.R., Randell, S., Boucher, R.C., Döring, G. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J.Clin.Invest.* 109:317-325.
118. Yee, A.J., De Grandis, S., Gyles, C.L. 1993. Mitomycin-induced synthesis of a Shiga-like toxin from enteropathogenic *Escherichia coli* H.I.8. *Infect.Immun*61:4510-4513.
119. Yoshizawa, Y., Sakurai, S., Machida, K., Kondo, I., Masuda, S. 2000. An exfoliative toxin A-converting phage isolated from *Staphylococcus aureus* strain ZM. *Microbiol.Immunol.* 44:189-191.
120. Zhang, X., McDaniel, A.D., Wolf, L.E., Keusch, G.T., Waldor, M.K., Acheson, W.K. 2000. Quinolone antibiotics induce shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J.Infect.Dis.* 181:664-670.

7. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetracylin hydrochlorid
<i>aphA3</i>	Gen für Aminoglycosidphosphat-Transferase Typ3 (Kanamycinresistenzgen)
attB	attachment site of bacteria
attP	attachment site of bacteriophage
bp	Basenpaare
CF	Cystische Fibrose
CHIPS	Chemotaxis-inhibierendes Protein, kodiert durch <i>chp</i>
cipro	Ciprofloxacin
CI	λ -Repressor
DNA	Desoxyribonucleinacid, Desoxyribonucleinsäure
Eta	Exfoliativtoxin, kodiert durch <i>eta</i>
for	forward
<i>gyr</i>	kodierendes Gen für Gyrase
h	Stunde
Hlb	β -Hämolysin, kodiert durch <i>hly</i>
KBE	koloniebildende Einheit
kbp	Kilobasenpaare
LexA	Regulatorprotein während der SOS-Antwort
MH-Blut	Müller-Hinden-Blutagarplatten
min	Minute
MMC	Mitomycin C
M	Mol
m-	Milli-, 10^{-3}
MIC	minimale Hemmkonzentration
MRSA	methicillinresistenter <i>S. aureus</i>
μ -	Mikro, 10^{-6}
n-	Nano-, 10^{-9}
n.d.	nicht durchgeführt

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RecA	Regulatorprotein während der SOS-Antwort
rev	reverse
RexA, RexB	Proteine eines Phagenausschluss-Systems beim λ -Phagen
ROS	radikale Sauerstoffspezies
<i>S. aureus</i>	Staphylokokkus aureus
Sak	Staphylokinase, kodiert durch <i>sak</i>
Sea	Enterotoxin A, kodiert durch <i>sea</i>
sec	Sekunde
SCIN	Antiphagozytose-Protein kodiert durch <i>scn</i>
STEC	Shigatoxin produzierender <i>E. coli</i>
Stx	Shigatoxin
Tab.	Tabelle
TMP	Trimethoprim
TSST	Toxisches Schock Syndrom Toxin
ÜN-Kultur	Übernachtskultur
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WTA	Wall teiconic acid (Teichonsäure)
Φ	phi
λ	lambda

8. Danksagung

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Frau PD Dr. Christiane Wolz und Dr. Christiane Goerke durchgeführt. Bei ihnen möchte ich mich für die sehr gute Betreuung und Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Ebenso möchte ich Vittoria Bisanzio für ihre immer freundliche und herzliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung und die Beantwortung unzähliger Fragen danken. Besonderen Dank gilt Simone Esser für die Anfertigung der PFGE und der Southern-Blots. Andrea Steinhuber danke ich für die Organisation, Koordination und Durchführung der Mäuseversuche und Christiane Wirtz gilt mein Dank für ihre Hilfe im Rahmen der Auswertung der Mäuseversuche.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Petra Grözinger
Geburtstag:	27. Dezember 1981
Geburtsort:	Heidenheim an der Brenz
Eltern:	Albert und Waltraud Grözinger
Geschwister:	Simone, Thomas und Andreas Grözinger

Schulbildung

1989-1992	Grundschule, Steinheim a. A.
1992-1998	Realschule, Steinheim a. A.
1998-2001	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium, Heidenheim
6/2001	Abitur

Freiwilliges diakonisches Jahr

2001-2002	freiwilliges diakonisches Jahr im Ausland in der Highbury Congregational Church, Cheltenham, England
-----------	--

Hochschulbildung

seit 10/2002	Medizinstudium, Universität Tübingen
9/2004	Ärztliche Vorprüfung, Tübingen
2005-2007	Dissertation am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinik Tübingen
8/2007 – 7/2008	Praktisches Jahr
19. Juni 2009	Ärztliche Prüfung