

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

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Einfluss von Bakteriophagen auf die Genexpression
von Staphylococcus aureus**

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

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

**vorgelegt von
Julia Verena Gelsomina Schicks
aus
Wesel**

2010

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. C. Wolz

2. Berichterstatter:

Professor Dr. B. Flehmig

1. Einleitung.....	1
1.1. Staphylokokken und <i>S. aureus</i> – eine Einführung.....	1
1.1.1 <i>S. aureus</i> : Infektion und Therapie.....	2
1.1.2 <i>S. aureus</i> : Virulenzfaktoren	5
1.2. Bakteriophagen	8
1.2.1 Bakteriophagen: Einteilung und allgemeiner Aufbau	9
1.2.2 Lebenszyklus.....	9
1.2.3 Bakteriophagen von <i>S. aureus</i>	10
1.2.4 Phagen als Modulatoren der Virulenz.....	12
1.3 Ziele der Studie	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien.....	17
2.1.2 Antikörper	19
2.1.3 Enzyme.....	19
2.1.4 Molekulargewichtstandardmarker	20
2.1.5 Materialien	20
2.1.6 Geräte und Programme	20
2.1.7 Medien.....	21
2.1.8 Stammlösungen.....	22
2.1.9 Bakterienstämme.....	25
2.1.10 Plasmide.....	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Bakterienanzucht in Flüssigkulturen	28
2.2.2 RNA-Isolierung und Gewinnung von Protein-Überständen.....	29
2.2.3 RNA-Gelelektrophorese und Northern Blot.....	30
2.2.4 Herstellung Digoxigenin-markierter Gensonden mittels PCR	32
2.2.5 Hybridisierung und Detektion.....	34
2.2.6 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	35
2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.2.8 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele.....	36

2.2.9 Promotorkonstrukte: Klonierung der Stämme.....	38
2.2.10 Bakterienisolierung für Promotor-Assay	48
2.2.11 Durchführung des Promotor-Assays.....	48
2.2.12 Auswertung der Promotor-Assays	49
2.2.13 Gewinnung von Phagenlysaten	50
2.2.14 Phagen-Tropf-Assay.....	50
2.2.15 DNA-Isolierung	51
2.2.16 Pulsfeldgelelektrophorese	53
2.2.17 Southern Blot.....	55
2.2.18 Hybridisierung und Detektion.....	55
3. Ergebnisse.....	56
3.1 Grundlagen zur vorliegenden Arbeit.....	56
3.2 Wachstumsanalyse eines Stammpaares aus Delysogen und Lysogen ..	57
3.3 Expressionsanalyse eines Stammpaares aus Delysogen und Lysogen..	57
3.4 Genomloci der Virulenzfaktoren	61
3.5 Untersuchung weiterer Stammpaare aus CF-Patienten-Sputen	62
3.6 Verschiedene Phagen im gleichen Stammhintergrund im Stamm S64 ...	64
3.7 Verschiedene Phagen im gleichen Stammhintergrund im Laborreferenzstamm 8325-4.....	67
3.8 Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Expressions-differenz im Delysogen / Lysogen Stammpaar	70
3.9 Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Genexpression im Stammpaar 8325-4 / 8325-4 ϕ 13.....	72
3.10 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Genexpression im Stammpaar 8325-4 / 8325-4 ϕ 13	72
3.11 Untersuchungen möglicher Regulationsmechanismen in Delysogen / Lysogen Stammpaaren	74
3.11.1 Untersuchung der Regulatoren agr und sae.....	74
3.11.2 Untersuchung der Promotoren von eap, ORF SA 1813 und atl durch Promotorassays.....	75
3.12 Betrachtung der Expression in Lysogenen anderer Bakteriophagengruppen.....	78

3.13 Betrachtung der Expression bei Integration eines Plasmids am hlb- Phagen Integrationsort.....	82
4. Diskussion	84
4.1 Einfluss von Bakteriophagen auf ihren bakteriellen Wirtsorganismus	84
4.2 Untersuchungen potentieller Einflussfaktoren	87
4.2.1 Einfluss des Nährstoffangebotes	87
4.2.2 Einfluss der globalen Regulatoren sae und agr.....	88
4.3 Einfluss durch SOS-Response.....	88
4.4 cis- vs. trans-Effekt.....	90
4.5 klinische Relevanz und Fazit.....	95
5. Zusammenfassung	97
6. Abkürzungen.....	98
7. Literatur.....	100
8. Danksagungen.....	109
9. Lebenslauf	110

1. Einleitung

1.1. Staphylokokken und *S. aureus* – eine Einführung

Bereits im Jahre 1883 verwendete Sir Alexander Ogston, ein schottischer Chirurg, den Begriff „Staphylococcus“ zur Beschreibung von in Haufen angeordneten Kokken, die er als Ursache eiternder Abszesse identifizierte. 1884 gelang es dem Mikrobiologen Anton J. F. Rosenbach Staphylokokken zu isolieren und in Reinkultur zu züchten. Er differenzierte die Kolonien entsprechend ihres goldenen und weißen Erscheinungsbildes in *aureus* (griechisch aureus = golden) und *albus*-Stämme und gilt heute als Begründer der Begriffe *Staphylococcus* und *aureus* [1].

Nach einer Gramfärbung erscheinen Staphylokokken mikroskopisch als grampositive, nicht Sporen bildende Kugelbakterien mit einem Durchmesser von ungefähr 1 µm. Sie teilen sich in allen Ebenen des Raumes und bilden aufgrund ihrer Unbeweglichkeit traubenförmige Einheiten (griechisch staphyle = Traube) [2]. Im klinischen Kontext werden Staphylokokken entsprechend ihrer Koagulase-Aktivität, einem Prothrombin-Aktivator, in zwei Gruppen eingeteilt – die Koagulase-negativen und die Koagulase-positiven Stämme. *S. aureus* gehört zur Gruppe der Koagulase-positiven Staphylokokken und lässt sich neben dieser Eigenschaft zusätzlich durch positive Mannitolfermentations- und Desoxyribonukleasetestung sowie seine zumeist goldgelbe Färbung differenzieren [2].

Der Mensch stellt ein natürliches Reservoir für *S. aureus* dar. Typischerweise besiedeln Staphylokokken Haut und Schleimhäute des Menschen, insbesondere im Bereich des vorderen Nasenabschnittes. Die Besiedelung ist jedoch nicht bei allen Menschen gleich. 20% der Bevölkerung sind persistierende Träger mit einer dauerhaften Besiedelung des gleichen Bakterienstammes, 60% zeigen eine intermittierende Besiedelung mit einem zeitlich variierenden Wechsel des Stammes. Bei 20% der Bevölkerung finden sich keinerlei Staphylokokken im vorderen Nasenabschnitt [3]. Deutlich höhere

Besiedelungsraten sind beispielsweise bei Klinikpersonal oder bei Patienten zu finden - insbesondere im chirurgischen Bereich und bei immunsupprimierten Patienten [2, 4]. Dennoch sind die bestimmenden Faktoren für den Trägerstatus bisher weitgehend unbekannt [5]. Man vermutet neben menschlichen [6] und Umweltfaktoren auch bakterielle Faktoren. Kürzlich konnte die zellwandgebundene Lipoteichonsäure von *S. aureus* als zentraler Faktor diesbezüglich identifiziert werden [7].

1.1.1 *S. aureus*: Infektion und Therapie

S. aureus ist ein bedeutender Erreger sowohl ambulanter als auch im Krankenhaus erworbener Infektionskrankheiten. In beiden Bereichen kann man eine steigende Inzidenz beobachten. So gilt *S. aureus* in intensivmedizinischen Abteilungen bereits als häufigster Verursacher nosokomialer Erkrankungen. Das Spektrum der Infektionen reicht von oberflächlichen, sich selbst limitierenden Hautinfektionen bis hin zu lebensbedrohlichen Krankheitsbildern. Trotz seines hohen virulenten Potentials verläuft eine Kolonisation mit *S. aureus* in der Regel asymptomatisch. Jedoch bieten Störungen der Integrität von Haut- und Mukosabarrieren sowie eine verminderte Abwehrlage des Wirts eine ideale Eintrittspforte zu angrenzenden Geweben und dem Blutstrom [2]. Eine Infektion kann sowohl exogen als auch endogen ihren Ursprung nehmen. Als ein Hauptrisikofaktor der endogenen Infektion wird die Kolonisation des vorderen Nasenabschnittes angesehen [6, 8, 9]. Exogene Übertragungswege stellen vor allem kontaminierte Gegenstände, unzureichende Händehygiene des Klinikpersonals sowie Tröpfcheninfektionen bei nahem Kontakt mit *S. aureus*-Trägern dar [10].

Die Erkrankungen können entsprechend der Ätiopathogenese in 2 Gruppen unterschieden werden: solche, die durch das invasive Auftreten des Erregers bedingt sind, und solche, die durch Toxine verursacht werden. Als pathognomonische Infektionen der Haut und Hautanhangsgebilde sind die Follikulitis, der Furunkel und Abszesse zu nennen [4]. Ein nach wie vor

bedrohlicher Zustand verbunden mit einer hohen Mortalität ist die Bakteriämie [11]. Nahezu alle *S. aureus* Infektionen können zu diesem Zustand fortgeschrittener Infektion führen. Auffallend ist hierbei, dass zeitgleich mit einer Zunahme der Verwendung intravaskulär verbleibender Katheter auch die Inzidenz der Bakteriämien deutlich angestiegen ist. Eine Katheter-assoziierte Bakteriämie stellt mittlerweile mit 14% die dritthäufigste nosokomiale Infektion dar [12] und ist in 5-50% der Fälle durch *S. aureus* verursacht [13]. Absiedelungen der Staphylokokken in Form einer Endokarditis, Pneumonie oder metastatischer Infektionen sowie die Entwicklung eines septischen Syndroms gelten als gefürchtete Komplikationen [2].

Auch toxinbedingte Erkrankungen durch Staphylokokken sind weit verbreitet. So gehören durch *S. aureus* bedingte Lebensmittelvergiftungen zu den häufigsten weltweit [14]. Als weitere toxinbedingte Erkrankung ist das *Staphylococcal Toxic Shock Syndrome* (STSS) zu nennen, welches in den frühen 80er Jahren bei jungen menstruierenden Frauen im Zusammenhang mit stark absorbierenden Tampons beschrieben wurde, heute jedoch auch bei lokalen Infektionen oder chirurgischen Eingriffen beobachtet wird [15, 16]. Ein nicht nur dermatologisches Problem stellen die *Impetigo bullosa* und das *Staphylococcal Scaled Skin Syndrome* (SSS) dar. Durch lokale bzw. systemische Wirkung des verantwortlichen Exfoliativtoxins kommt es zur Trennung der Hautschichten zwischen Stratum granulosum und Stratum spinosum. Es folgt eine Blasenbildung und letztendliche Ablösung der oberen Hautschicht. SSS betrifft insbesondere Neugeborene sowie kleine Kinder und führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für Sekundärinfektionen [17].

Zur Therapie einer Staphylokokken-Infektion werden Antibiotika, zumeist aus der Gruppe der β -Laktame, eingesetzt. Bedingt durch die Fähigkeit von *S. aureus* sich schnell an den Selektionsdruck von Antibiotika anzupassen [18] sowie dem häufig praktizierten unkontrollierten Einsatz von Antibiotika sehen sich Ärzte weltweit jedoch mit immer neuen Resistenzen konfrontiert.

In diesem Zusammenhang ist insbesondere der wachsende Anteil Methicillin-resistenter *S. aureus* Stämmen (MRSA) hervorzuheben. In den 60er Jahren erstmals beschrieben, zeigen diese Stämme seit den 80er Jahren eine rapide

Ausbreitung und stellen somit ein zunehmendes Problem vor allen in den westlichen Industrienationen dar. Aktuelle Quellen sprechen von bis zu 20% MRSA-Stämmen unter den *S. aureus*-Isolaten in deutschen Krankenhäusern, wohingegen die Prävalenz in US-Krankenhäusern bereits bei 33% bis 55% liegt [19]. Obwohl die beschriebene nosokomiale Verbreitung im Vordergrund steht, ist zu beobachten, dass MRSA-Keime bereits die Grenzen des hospitalisierten Bereichs überschritten haben [20] [21]. Nicht zu unterschätzen ist auch die seit 1997 wachsende Beobachtung von multiresistenten Stämmen, die zusätzlich über Resistenzen gegenüber Reserveantibiotika wie Vancomycin verfügen [22]. Vor dem Hintergrund dieser Entwicklungen sowie der nach wie vor hohen Relevanz von *S. aureus*-Infektionen in nahezu allen Lebensbereichen ist die Entwicklung weiterer Therapiemöglichkeiten essentiell. Im Zentrum der aktuellen Forschung stehen, neben der Entwicklung neuer antimikrobieller Substanzen [23], insbesondere immunologische Strategien [24]. Impfstoffe zur aktiven Immunisierung, bestehend aus unterschiedlichen Oberflächenbestandteilen (Polysaccharide in StaphVAX [25], FnBP und Cna [26], Clumping Faktor A [27] etc.), sowie mehrere monoklonale Antikörper gegen bakterielle Strukturen [28, 29] zur passiven Immunisierung werden aktuell untersucht [30].

1.1.2 *S. aureus*: Virulenzfaktoren

Bei der Pathogenese einer Staphylokokken-Infektion handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Virulenzfaktoren.

S. aureus verfügt über ein weites Spektrum an zellwandständigen sowie sezernierten Proteinen, Enzymen und Toxinen. Mit ihren unterschiedlichen Funktionen befähigen sie *S. aureus* unter anderem zur Adhäsion an Matrix- und Plasmaproteine, zur Invasion von Geweben und zur Abwehr der unspezifischen und spezifischen Immunantwort des Menschen. Größtenteils sind diese Virulenz- und Resistenzfaktoren auf potentiell mobilen Elementen des Genoms, wie z.B. Transposons, Pathogenitätsinseln und Bakteriophagen zu finden [31].

Ein erster Schritt in der Ausbildung einer Infektion ist die Besiedelung wirtseigener Strukturen. Zahlreiche Proteine von *S. aureus* sind zur Adhäsion an eukaryontische Strukturen fähig. Zu den kovalent an die Zellwand gebundenen Proteinen, den MSCRAMMs (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) [32], werden Fibronektin bindende Proteine (FnBPs), Kollagen-Adhäsine (Cna) und Fibrinogen bindende Proteine („Clumping factor“), gezählt [33-35]. Sie binden, meist spezifisch, an bestimmte Wirtsproteine. Ein weiteres Oberflächenprotein aus der Gruppe der MSCRAMMs ist Protein A. In vitro konnte gezeigt werden, dass es die Opsonierung und Phagozytose von *S. aureus* hemmt und somit einen wichtigen Beitrag zur Überwindung der Immunantwort des Wirtes leistet [36]. Protein A bindet Immunglobuline des Typs G an der Fc-Region und kehrt somit ihre Orientierung auf der bakteriellen Oberfläche um. Neben den kovalent gebundenen MSCRAMMs können Adhäsionsproteine sowohl als lösliche Adhäsine als auch in Form integraler Transmembranproteine vorliegen [37].

Der Gruppe der löslichen Adhäsionsproteine wird das extrazelluläre Adhäsionsprotein, kurz *Eap*, zugerechnet [38]. Wegen seiner hohen strukturellen Ähnlichkeit zur N-terminalen β -Kette vieler Major Histocompatibility Komplexe (MHC) der Klasse II, wurde es zunächst als *Map* (MHC analogous protein) bezeichnet [39]. Neben seiner Funktion als adhäsiver Faktor in der Besiedelung des Wirtes, wurden seit seiner Entdeckung in den 90er Jahren zahlreiche immunmodulatorische Eigenschaften aufgedeckt [40].

Eap zeigt eine hohe Affinität zu extrazellulären Matrixbestandteilen und Plasmaproteinen sowie zu eukaryontischen Zellen. In vitro konnte nach Zugabe von Anti-*Eap*-Immunglobulinen zu *S. aureus*-Kulturen eine deutlich verminderte Adhäsion an Epithelzellen sowie Fibroblasten beobachtet werden [41]. Des Weiteren ist *Eap* in der Lage, Oligomere zu bilden und eine Agglutination durch Bindung an die Zellwand der Staphylokokken hervorzurufen [40]. Obwohl lange Zeit die Annahme bestand, *S. aureus* sei ein lediglich extrazelluläres Pathogen, weisen neuere Beobachtungen auf die Fähigkeit zur Internalisation in nicht-professionelle Phagozyten hin. Haggart *et al* berichteten 2003 über eine verminderte Aufnahme von *Eap*-defizienten *S. aureus*-Stämmen [42]; die genaue Beteiligung des Proteins an diesem Prozess ist jedoch noch unklar. Einfluss auf die Entzündungsreaktion übt *Eap* unter anderem durch Induktion von T-Zell-Apoptosen aus [43]. Eine Verminderung der Hypersensitivitätsreaktion Typ IV ist die Folge. Ebenso beeinflusst *Eap* die chemotaktische Auswanderung neutrophiler Granulozyten in entzündliche Gewebe, indem es den ICAM-1 Rezeptor von Endothelzellen blockiert [44]. Es wirkt hierbei mit CHIPS, einem Chemotaxis inhibierenden Protein von *S. aureus*, zusammen [45]. Die Expression von *Eap* wird durch die globalen Regulatoren *agr*, *sarA* und *sae* gesteuert [46] und weist ein Maximum in der späten exponentiellen Wachstumsphase auf [47].

Zu den extrazellulären Virulenzfaktoren von *S. aureus* gehören zahlreiche Exoenzyme und -toxine. Die genaue pathogenetische Bedeutung von Enzymen wie Proteasen, Lipasen und Hyaluronidasen ist noch nicht vollständig geklärt. Durch ihre Fähigkeit Gewebe zu zerstören wird jedoch eine Beteiligung an der Infektionsausbreitung, wie beispielsweise bei einem Abszess, angenommen. Toxine werden entsprechend ihres Wirkungsmechanismus eingeteilt. Das Toxic Shock Syndrom Toxin-1 (TSST-1), die Enterotoxine A-M sowie die Exfoliativtoxine A und B werden auch als pyrogene Superantigene bezeichnet. Sie sind in der Lage durch Bindung an MHC-II-Komplexe eine exzessive Aktivierung von bis zu 10-50% aller T-Lymphozyten mit Freisetzung zahlreicher Zytokine zu induzieren [31, 48]. Die klinische Symptomatik reicht von Fieber bis hin zu Schock mit Multiorganversagen [15].

Vertreter der Zytotoxine sind die vier Hämolsine (α , β , χ , δ) von *S. aureus*. Das bei weitem am ausführlichsten untersuchte Toxin dieser Gruppe ist das α -Hämolsin. Durch Porenbildung in Zellwänden, insbesondere von Thrombozyten, Monozyten, Keratinozyten und endothelialen Zellen, führt es zur Lyse der Zielzelle [16]. Ein weiteres Protein dieser Gruppe, das β -Hämolsin, (Hlb codiert durch *hlyB*) wurde 1989 identifiziert [49]. Seine genaue Bedeutung als Virulenzfaktor ist noch größtenteils unklar. In seiner Funktion als Mg^{2+} -abhängige Sphingomyelinase (Phospholipase C) ist es in der Lage, abhängig vom Sphingomyelingehalt der Zellmembranen eine Zellyse herbeizuführen [50, 51].

Neben α -Hämolsin verfügt *S. aureus* über eine weitere Gruppe porenbildender Toxine, die Bikomponenten-Leukotoxine (BL). Als Vertreter dieser Gruppe sind bisher vier Leukotoxine charakterisiert. Es handelt sich hierbei um die γ -Hämolsine (S-Komponente HlgA oder HlgC, F-Komponente HlgB) [52], die Leukocidine LukE/D [53] sowie LukM/F-PV-like [54] und das Panton-Valentin-Leukocidin (LukS-PV/LukF-PV) [52]. Aufgebaut sind die Bikomponenten-Leukotoxine jeweils aus einer S- und einer F-Komponente, die als wasserlösliche Proteine in der spät-exponentiellen Wachstumsphase in den Kulturüberstand sezerniert werden. Ihre Funktion können die beiden Komponenten nur gemeinsam ausüben, jede einzelne für sich ist inaktiv. Man geht davon aus, dass zunächst die S-Komponente an einen bisher unbekanntem Rezeptor der Zielzelle bindet und dadurch der F-Komponente die Bindung im Sinne einer Präpore ermöglicht [55]. Der genaue Ablauf der nachfolgenden Ausbildung einer für monovalente Kationen selektiven funktionellen Pore [56] sowie ihr genauer Aufbau sind noch nicht vollständig verstanden. Untersuchungen weisen auf Hexa- [57], Hepta- [58] oder Octamere [59] hin, auch ein Nebeneinander dieser Formen ist möglich. Interessanterweise scheinen ebenfalls heterologe Komponentenpaarungen möglich zu sein, wie z.B. zwischen PVL und γ -Hämolsin [52, 57]. Als gemeinsame Zielzellen konnten Monozyten, Makrophagen und Granulozyten identifiziert werden [52, 56]. Das Vorkommen der BL in einzelnen *S. aureus* Stämmen ist sehr unterschiedlich. So findet man Gene kodierend für γ -

Hämolysin in nahezu allen Stämmen [60, 61], während lediglich 2% der klinischen Stämme das PVL-Gen aufweisen [60]. Bezüglich der Virulenz wird ein synergistisches Zusammenspiel der einzelnen BL vermutet sowie eine zellspezifische Änderung der Toxine durch heterologe Komponentenpaarungen [57, 62].

Die Regulation der Virulenzfaktoren wird durch verschiedene regulatorische Loci (*agr*, *sar*-Familie, *sigB*, *sae*, *srr* etc.) und deren Interaktion gesteuert [63]. Sowohl die Wachstumsphase als auch Umgebungsfaktoren nehmen hierbei Einfluss [64]. Im Zentrum der Regulation steht das *agr*- (accessory gene regulator) System, welches in unterschiedlichem Ausmaß mit den übrigen Regulationssystemen interagiert. *Agr* kontrolliert die Expression der meisten Exoproteine von *S. aureus* [63]. Das Effektormolekül RNA III wird vor allem in der späten exponentiellen und stationären Wachstumsphase exprimiert. Während die Synthese extrazellulärer Proteine (z.B. Lipase, α -Toxin) aktiviert wird, unterdrückt es gleichzeitig die Bildung zellgebundener Proteine (z.B. Protein A) [65]. Aufgrund der Aktivität von *agr* in Abhängigkeit von der Bakteriendichte, wird es auch als quorum sensing System bezeichnet [66]. Als weitere komplexe Regulatoren nehmen *sarA* und *sae* auf transkriptionaler Ebene Einfluss auf die Genexpression [67, 68].

1.2. Bakteriophagen

Bakteriophagen (kurz: Phagen) sind Viren, die Bakterien befallen und diese als Wirtszellen nutzen. Sie weisen hierbei eine hohe Spezifität bis auf bakterielle Stammebene auf. Mit einer geschätzten Gesamtzahl von 10^{30} bis 10^{32} sind sie das häufigste Lebewesen unseres Planeten und in nahezu allen Bereichen des Ökosystems zu finden [69]. Insbesondere in den Ozeanen lassen sie sich in großer Anzahl nachweisen und bilden dort das sogenannte Viroplankton [70].

Als Entdecker gelten der Engländer Frederick Twort und Felix Hubert d'Herelle, ein kanadischer Mikrobiologe. In den Jahren 1915 und 1917 berichteten sie unabhängig voneinander über ein ungewöhnliches filtrierbares

und infektiöses Agens. Sie beobachteten wie es in bakteriellen Kulturen zur Ausbildung nahezu kreisförmiger Plaques führte und erklärten diese Lyse durch eine bisher unbekannte Infektion der Bakterienzellen [71].

1.2.1 Bakteriophagen: Einteilung und allgemeiner Aufbau

Bakteriophagen bilden unter allen Viren die größte Gruppe, mit aktuell 17 Phagenfamilien. In ihrer ausgeprägten Heterogenität weisen Bakteriophagen unterschiedlichste Größen, Formen und Lebensweisen auf.

Mit 96% machen geschwänzte Bakteriophagen den Hauptanteil dieser Spezies aus. Sie gehören den drei Familien Myoviridae, Siphoviridae und Podoviridae an, die als Caudovirales zusammengefasst werden. Andere, in ihrer Form vielflächige, filamentöse oder pleomorphe Vertreter sind wesentlich seltener zu finden [72]. Generell sind Bakteriophagen aus zwei Hauptbestandteilen, Proteinen und Nukleinsäuren, aufgebaut. Das Erbgut kann in Form von doppel- oder einzelsträngiger DNA oder RNA vorliegen und ist vor allem für die Replikation des Genoms, die Synthese von Strukturproteinen, häufig auch für die Kodierung von Virulenzfaktoren verantwortlich [73]. Die Größe des Genoms ist sehr variabel und reicht von 4 kb bis zu 600kb je nach Phagenfamilie [74]. Es wird von einer Hülle aus Proteinen, in selteneren Fällen zusätzlich von Lipoproteinen umgeben. In der Praxis wird zumeist eine Einteilung entsprechend des spezifisch befallenen Bakterienstammes verwendet.

1.2.2 Lebenszyklus

Bakteriophagen lassen sich in ihrer Heterogenität nach unterschiedlichsten Gesichtspunkten gliedern. Entsprechend ihrer Interaktion mit der Wirtszelle wird zwischen virulenten und temperenten Phagen unterschieden [73]. Der Lebenszyklus *virulenter* Bakteriophagen wird als lytisch bezeichnet und lässt sich in mehrere Schritte gliedern. Initial kommt es zur Adsorption des Bakteriophagen an Rezeptoren der Wirtszelle. Bei geschwänzten Phagen

geschieht dies mit dem distalen Schwanzende, während bei schwanzlosen Bakteriophagen ein Hüllprotein diese Funktion übernimmt. Aus der spezifischen Wechselwirkung zwischen Phage und Rezeptor des Bakteriums erklärt sich die hohe Wirtsspezifität.

Nach lokaler Lyse der Bakterienzellwand wird die Nukleinsäure des Phagen in das Zytoplasma des Bakteriums injiziert. Die Proteinhülle verbleibt außerhalb der Zelle. Schließlich erfolgt unter Hemmung der bakteriellen DNA-, RNA- und Proteinsynthese die Replikation der viralen Nukleinsäure und Translation der Phagenproteine. Nach Zusammenschluss der Bestandteile kommt es zur Freisetzung der, je nach Phagenart bis zu mehreren hundert, neuen Bakteriophagen unter Lyse der Wirtszelle.

Bei *temperenten* Bakteriophagen erfolgt nicht zwingend eine Replikation mit Lyse der Zielzelle. Stattdessen sind diese in der Lage, ihr Genom an spezifischen Lokalisationen, den „Attachment“ (att)-Stellen, in das Bakteriengenom zu integrieren. Dieser Prozess wird als Lysogenisation, das betroffene Bakterium als Lysogen und der integrierte Phage als Prophage bezeichnet. In Abhängigkeit von unterschiedlichen Faktoren, wie beispielsweise Antibiotika [75] oder UV-Licht, können diese Bakteriophagen jedoch erneut induziert werden und in das virulente Stadium zurückkehren. Bakterien können die Integration mehrerer Prophagen an unterschiedlichen Stellen ihres Genoms aufweisen. Jedoch ist die Aufnahme zweier Phagen der gleichen Familie durch einen bisher ungeklärten Mechanismus nicht möglich [20].

1.2.3 Bakteriophagen von *S. aureus*

Für nahezu alle Bakterienarten sind Bakteriophagen beschrieben. Bei *S. aureus* sind sie sehr weit verbreitet und fast alle Stämme tragen spezifische Prophagen integriert in das bakterielle Genom. Stämme ohne Phagen hingegen stellen eine Seltenheit dar [76]. Somit scheint es nicht verwunderlich, dass eine Stammzuordnung durch Phagentypisierung die traditionelle Methode zur Typisierung von *S. aureus* darstellt. Hierbei werden Stämme aufgrund ihrer

Empfindlichkeit gegenüber einem international verwendeten Phagenbasissatz bestehend aus 23 Phagen bestimmter Phagengruppen zugeordnet [77]. Die Typisierungsphagen sind jedoch molekular kaum charakterisiert, die genauen Mechanismen der Phagenimmunität bisher wenig verstanden [78].

Temperente Phagen von *S. aureus* gehören größtenteils zur Gruppe der Siphoviridae (Obergruppe Caudovirales). Sie werden entsprechend ihrer lytischen Aktivität, Morphologie und serologischen Eigenschaften in die Phagentypen, 3A, 11, 77 und 187, eingeteilt [79]. DNA-Untersuchungen weisen auf eine Verwandtschaft unterschiedlichen Ausmaßes untereinander hin. Keine Verbindung besteht jedoch zu den lytischen „Twort-like“ Phagen, welche den Myoviridae angehören [79].

Eine andere Einteilung der *S. aureus*-Phagen beruht auf der Modulation bakterieller Eigenschaften durch Integration des Phagengenoms. Temperente Phagen integrieren ihr Erbgut an spezifischen „Attachment“ (*att*) Stellen. Falls das Phagengenom direkt in der kodierenden Region eines Genes lokalisiert ist, kommt es zum Ausfall dieses Genproduktes. Man spricht hierbei von negativer lysogener Konversion. Eine (positive) lysogene Konversion liegt vor, wenn die integrierten viralen Gene keine virale, sondern eine bakterielle Funktion ausüben und das Bakterium somit um eine Eigenschaft bereichern.

Typische *att*-Stellen bei *S. aureus* befinden sich beispielsweise innerhalb des Lipasegens (*geh*) sowie innerhalb des β -Hämolysegens (*hly*). Lysogene sind daher am Verlust der β -Hämolyse bzw. am Verlust der Glycerol-Ester-Hydrolase (codiert durch *geh*) zu erkennen [80, 81]. Inwiefern diese negativen Konversionen von pathogenetischer Bedeutung sind, ist noch nicht geklärt.

In ca. 80% der *S. aureus*-Stämme findet man *hly*-konvertierende Prophagen. Meist weisen diese Phagen zusätzlich zur negativen *hly*-Konversion eine positive Konversion für verschiedenste Virulenzfaktoren auf. Ein Beispiel hierfür ist der Phage ϕ 13 des Stammes 8325, welcher das Gen *sak* der Staphylokinase trägt [82]. Bei den Lipase-konvertierenden Phagen, wie beispielsweise ϕ L54a, wurden bisher keinerlei übertragene Virulenzfaktoren nachgewiesen [76]. Weitere Phagengruppen zeichnen sich durch positive Konversionen für

unterschiedliche Toxine (Panton-Valentin-Leukocidin, Enterotoxin A, α -Hämolysin etc.) aus.

Tabelle 1: exemplarische Übersicht über die Bakteriophagen von *S. aureus*, Einteilung nach Pantucek et. al. [79], modifiziert.

Sero-gruppe	Ausgewählte Phagen	Integrations-stelle (in N 315)	Kodierte Virulenzfaktoren
A	ϕ 12, ϕ STL, ϕ Sa2mw, ϕ 252A	SA 1321	lukS-PV, lukF-PV
	ϕ Sa4ms	Intergenic, 997.086	
	ϕ L54, ϕ Col	<i>Geh</i>	
B	ϕ 11	Intergenic 1.940.651	
	ϕ eta, ϕ Mu50B	SA0778	eta
F	ϕ 13, ϕ Sa3mw, ϕ Sa3ms, ϕ N315, ϕ PVL, ϕ 77, ϕ 252B	<i>Hlb</i>	sek, seg, sea, sep, sak, chp, lukS-PV, lukF-PV

1.2.4 Phagen als Modulatoren der Virulenz

Ungefähr 25% des Genoms von *S. aureus* bestehen aus mobilen genetischen Elementen wie Pathogenitätsinseln, Plasmiden, Transposons und Bakteriophagen. Ihre herausragende Eigenschaft liegt in der Möglichkeit zum horizontalen Transfer von genetischem Material zwischen unterschiedlichen Stämmen und selbst unterschiedlichen Bakterienarten [20]. Bei zahlreichen der codierten Gene handelt es sich um Virulenz- sowie Resistenzfaktoren. Bakteriophagen gehören, nicht nur bei *S. aureus*, zu den wichtigsten Vermittlern des horizontalen Gentransfers. Sie spielen somit eine bedeutende Rolle in der Evolution bakterieller Virulenz und leisten einen großen Beitrag zur genetischen Individualität einzelner Bakterienstämme [74] [83].

Die ersten bakteriellen Virulenzfaktoren, bei denen man einen Transfer durch Bakteriophagen erkannte, waren Toxine. Prominente Vertreter sind das

Diphtherietoxin von *Corynebacterium diphtheriae*, das Scharlach-Toxin von *Streptococcus pyogenes* sowie das Botulinumtoxin von *Clostridium botulinum* [84-86]. Ein interessantes Beispiel ist *Vibrio cholera*, Erreger der weltweit epidemisch vorkommenden Cholera. Virulente Stämme benötigen zwei genetische Elemente, VPI und CTX ϕ . CTX ϕ , ein filamentöser Phage, codiert das Cholera-toxin, verantwortlich für die stark sekretorische Diarrhö [87]. VPI hingegen enthält die genetische Information für einen Toxin-coregulierten Pilus, der zum einen in der intestinalen Besiedelung des Wirtes sowie als Rezeptor für den Phagen CTX ϕ von Bedeutung ist. Karaolis *et al.* zeigten 1999, dass es sich bei VPI um Prophagenom handelt und beschrieben als erste eine Virus-Virus-Interaktion, verantwortlich für bakterielle Pathogenität [88]. Auch zahlreiche *S. aureus*-Toxine sind auf Prophagenomen codiert. Hierzu gehören unter anderem Enterotoxin A (SEA) und andere Enterotoxine sowie das Exfoliativtoxin codiert auf ϕ eta [76].

Es finden sich jedoch nicht nur bakterielle Exotoxine im Genom der Bakteriophagen. Auch andere Virulenzfaktoren, die der Adhäsion, Invasion und Abwehr der humanen Immunantwort dienen, können Bakterien durch lysogene Konversion erlangen [89, 90]. *Streptococcus mitis* adhärirt im Rahmen der Endokarditis mit Hilfe der Proteine PblA und PblB an die Oberfläche von humanen Thrombozyten. Bensing *et al.* konnten zeigen, dass die codierenden Gene zur Erbsubstanz des lysogenen Phagen SM 1 gehören [91]. Auch einige Faktoren von *S. aureus*, die im Rahmen einer Infektion von Bedeutung sind, werden durch Phagen codiert. Das Gen (*chp*) des Chemotaxis inhibierenden Proteins CHIPS sowie das zytotoxische Pantan-Valentin-Leukocidin befinden sich auf Prophagenom. CHIPS wird, ebenso wie die Gene *sak* (codiert Staphylokinase) und *sea* (codiert Enterotoxin A), durch einen *h1b*-kovertierenden Phagen übertragen. Aufgrund der gleichzeitigen Beeinflussung dreier bakterieller Funktionen, wird der verantwortliche Bakteriophage ϕ 42 auch als triple-konvertierend bezeichnet [92].

Bei den übertragenen Virulenzfaktoren muss es sich jedoch nicht zwingend um Phagen-eigene Gene handeln. Durch Interaktion zwischen Bakteriophagen und den bakteriellen Genen sind Phagen in der Lage, beliebige Abschnitte des

bakteriellen Chromosoms, aber auch andere mobile Elemente, durch Integration in die eigene Erbsubstanz zu mobilisieren und in andere Bakterienstämme zu überführen. Man nennt diesen Vorgang generalisierte Transduktion. So wird die Pathogenitätsinsel SapI1, welche das Toxic Shock Syndrom Toxin codiert, mit hoher Frequenz mobilisiert und vom Phagen $\phi 80\alpha$ zwischen *S. aureus* Stämmen übertragen [89, 93]. Ein vergleichbarer Mechanismus liegt bei der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen unter grampositiven Bakterien vor. Beispiele von Resistenzgenen codiert auf Phagengenomen sind jedoch bisher nicht bekannt [76, 89].

Neben der beschriebenen lysogenen Konversion sowie der generalisierten Transduktion bakterieller DNA-Sequenzen, kann die Aufnahme eines temperenten Phagen sowohl den Verlust bestimmter Gene als auch die Expression eines neuartigen Genproduktes zur Folge haben. Der Genverlust wurde im Falle von *S. aureus* bereits am Beispiel des β -Hämolysins und der Glycerol-Ester-Hydrolase erläutert. Dass der Verlust eines Genes auch pathogenetische Vorteile haben kann, zeigt das Beispiel der *Shigellen*. Hier hat der Verlust des Genproduktes eine verminderte Hemmung des bakteriellen Enterotoxins zur Folge [83].

Auf eine weitere, interessante Funktion der Bakteriophagen deuten die Ergebnisse von Untersuchungen bakterieller Genome hin. Beobachtete Inversionen und andere Rearrangements der prokaryotischen Genome lassen eine Beteiligung der Phagen an einer Rekombination der prokaryontischen Erbinformation vermuten [83, 94]. Goerke *et al* konnten an Isolaten aus Cystische-Fibrose-Patienten zeigen, dass Rekombinationen bzw. Veränderungen im Genom von *S. aureus* im Falle einer Infektion gehäuft zu finden sind [95]. Diese Phagen-dynamischen Genomveränderungen scheinen einen Beitrag zur Adaptation des Bakteriums an unterschiedlichste Wirtsbedingungen zu liefern [96].

Die genauen Regulationsmechanismen der Virulenz- und Resistenzgene sind noch nicht vollständig geklärt. Viele der viral codierten Virulenzgene unterliegen einer Regulation durch chromosomale Transkriptionsfaktoren des Wirtsbakteriums. Bei *S. aureus* erfolgt die Regulation einiger phagencodierter

Enzyme durch *agr* [97] [89]. Neben diesem Mechanismus scheint der virale Lebenszyklus ebenfalls Einfluss auf die Genexpression zu nehmen [98]. Bereits 1960 beobachteten Barsdale *et al* eine erhöhte Expression von phagencodierten Toxinen durch Induktion eines Bakteriophagen von *Corynebacterium diphtheriae* [99]. Auch im Falle von *S. aureus* konnten Sumbly *et. al.* eine erhöhte Expression von Virulenzfaktoren nach Phageninduktion mit Mitomycin C, Goerke *et al* nach Induktion mit Ciprofloxacin und Trimetoprim zeigen [75, 100]. In vivo scheint eine Induktion vor allem im Rahmen einer Infektion stattzufinden [89]. Diese Beobachtung ist insbesondere deshalb von Bedeutung, weil somit der Phage nicht nur durch Bereitstellung des Virulenzfaktors, sondern vielmehr durch Expression zum Zeitpunkt der Infektion die Pathogenität des Wirtsbakteriums direkt beeinflusst.

Auch wenn wir erst einen kleinen Einblick in die Rolle von Bakteriophagen im Rahmen einer Infektion haben, so wird ihre Bedeutung, insbesondere im Falle von *S. aureus*, dennoch deutlich. Es ist anzunehmen, dass weitere Untersuchungen noch zahlreiche weitere Interaktionen zwischen Wirt, Bakterium und Phagen aufdecken werden.

1.3 Ziele der Studie

In Rahmen vorhergehender Projekte wurden *S. aureus* Stämme von CF (Cystische Fibrose)-Patienten untersucht [101, 102]. Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Überstandsproteine von Stammpaaren, bestehend aus einem phagen-freien Stamm und dem entsprechenden *h1b*-konvertierten Lysogen, wurden mehrere Unterschiede in den Bandenmustern beobachtet, zumeist im Sinne zusätzlicher oder verstärkt exprimierter Proteinbanden des Lysogens. Da es sich bei den Stammpartnern um genomisch identische, lediglich in der Integration des Phagens differierende Stämme handelte, lag eine virale Beteiligung an der veränderten Proteinexpression nahe. Ziel dieser Arbeit war es, diese Beobachtung genauer zu charakterisieren.

Nachdem die betroffenen Proteine identifiziert waren, wurden sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene folgende Fragestellungen untersucht:

- Handelt es sich um ein isoliertes Phänomen einzelner Stammpaare oder ist dieser Effekt generell bei *h1b*-konvertierenden Phagen anzutreffen?
- Ist die Beobachtung von einem bestimmten Bakteriophagen abhängig?
- Zeigt sich ein Einfluss durch veränderte Wachstumsbedingungen (Antibiotika, Anzuchtmedien)?
- Welchem Mechanismus unterliegt der beobachtete Effekt? Sind globale Regulatoren von *S. aureus* involviert? Wird der Promotor der betroffenen Gene beeinflusst?
- Zeigen sich ebenfalls Unterschiede in Lysogenen mit Phagen anderer Serogruppen, integriert an anderen Stellen des bakteriellen Genoms?

Sowohl verschiedene CF-Patientenstämme, als auch der gut charakterisierte *S. aureus* Stamm 8325-4 wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose, DNA	Biozym, Oldendorf
Agarose, low melting point	Biorad, München
Agarose, Seakem LE (RNA)	BMA, Rockland, USA
Agarose, small DNA	Biozym, Oldendorf
Aceton	AppliChem, Darmstadt
Acrylamid	Biorad, München
APS	Biorad, München
β -Galaktosidase	Sigma, München
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, München
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Casamino acid	Difco, Augsburg
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Chloromycin	Apotheke, Klinikum Tübingen
Ciprofloxacin	Ciprobay 100, Bayer AG
Coomassie Blau G 250	Merck, Darmstadt
dNTPs	Roche, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt

Ethanol 99%	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
FluoReporter lacZ / Galactosidase Quantitation Kit	Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, NL
Formaldehyd 37%	AppliChem, Darmstadt
Formamid	Ambion, Austin, USA
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycerophosphat	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumphosphat	Merck, Darmstadt
Lab lemco powder	Difco, Augsburg
Laurylsarcosin	Sigma, München
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Mitomycin C	Sigma, München
Multiplex-PCR-Kit	Qiagen, Hilden
MOPS	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natrium Citrat pH 6,5	Ambion, Wiesbaden
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Nucleospin Extract III	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren
Nucleasefreies H ₂ O	Ambion, Wiesbaden
Page Blue Protein Staining Solution	Fermentas, St. Leon-Roth
SDS	AppliChem, Darmstadt

Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Spectinomycin	Apotheke, Klinikum Tübingen
SSC 20x	AppliChem, Darmstadt
TCA	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Biorad, München
Trimethoprim	Apotheke, Klinikum Tübingen
Tris	Sigma, München
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trytone Peptone	Difco, Augsburg

2.1.2 Antikörper

Anti-Digoxigenin AP	Roche, Mannheim
---------------------	-----------------

2.1.3 Enzyme

Eco R I	Fermentas, St. Leon-Roth
Lysostaphin	Ambi Products, NY, USA
Proteinase K	Sigma, München
Polymerase, High Fidelity	
Polymerase, Taq Hot Star	Qiagen, Hilden
SAP (shrimp alkaline phosphatase)	Fermentas, St. Leon-Roth
SMA I	Fermentas, St. Leon-Roth
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.4 Molekulargewichtstandardmarker

SDS-PAGE Molecular Weight Standards low	Biorad, München
PageRuler Unstained Protei Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth
100 bp DNA ladder	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb Ladder	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Materialien

Hyperfilm ECL	Amersham, Buckinghamshire, UK
96-well Mikrotiterplatte	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Mini Protean 3	Biorad, München
Electrophoresis System	
Homogenisator	BioSavant, Dianova, Hamburg
Nylonmembran Biodyne 0,45 µm	Pall Cooperation, USA
Nylonmembran für Southern Blot	Roche, Mannheim
Sterilfilter 0,45 µm	Millipore, Bedford, USA
Turboblotter	Whatman, Brentford, UK
0,1 mm Zirconia / Silica Beads	Roth, Karlsruhe

2.1.6 Geräte und Programme

Argus X 1	Biostep, Jahnsdorf
ECM 399 Elektroporation System	Harvard Apparatus, Holliston, USA
FL Winlab Software	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
GS Gene Linker	Biorad, Münche

Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Touch down thermal cycler	Hybaid, Teddington, UK
Phoretix Power Scan	Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK
Photometer	Milton Roy, USA
Photometer Ultropec 2100 pro	Amersham, Buckinghamshire, UK
Zentrifuge 3 K 10	Sigma, Osterode
Zentrifuge 3 K 30	Sigma, Osterode

2.1.7 Medien

CYPG	10 g Casamino acid, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 935 ml dest. H ₂ O auf, autoklavieren. Zugabe von 12,5 ml sterilfiltrierter 20 % Glucose und 20 ml 1,5 M Glycerophosphat.
LB	10 g Tryptone, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, ad 1 l dest. H ₂ O; pH 7,0 einstellen
TSB	30 g TSB ad 1l H ₂ O
BM-Medium	5 g Pepton, 2,5 g Hefe-Extrakt, 6,5 g Glucose, 2,5 g NaCl, 0,5 g K ₂ PO ₄
NB2-CaCl ₂ -Platten	10 g/l Lab-lemco-powder, 10 g/l Peptone, 5 g/l NaCl ad 975 ml dest. H ₂ O, autoklavieren. Sterilfiltrierte 2,27 ml 100 mM CaCl ₂ pH 7,5 hinzugeben.
4 x PAB	35 g Antibiotic Medium 3, ad 500 ml H ₂ O, autoklavieren
TSA	1,5 g Agar, ad 1 l TSB
TSA-CaCl ₂ -Platten	2,5 ml 100 mM CaCl ₂ , ad 500 ml TSA

TSA-Top-Agar 7,5 g TSA-Agar, 30 g TSB, ad 1 l H₂O

2.1.8 Stammlösungen

Blue Juice 50 % Glycerin, 1 mM EDTA pH 8,0 und 0,25 % Bromphenolblau

Denaturierungspuffer

DIG wash and block buffer set Roche, Mannheim

dTNP-Mix

100 mM dATP, 100 mM dCTP,
100 mM dGTP, 100 mM dTTP

Einfriermedium

TSB und Glycerin im Verhältnis 3:1

5 x Elektrophoresepuffer für SDS-Gele

9 g Tris, 43,2 g Glycin, 3 g SDS, ad
600 ml H₂O

High-SDS

7 % SDS, 5 x SSC, 2 % Blocking, 50
mM Natriumphosphat, pH 7,0, 0,1 %
N-Laurylsarcosin

Lysepuffer pH 7,6 (PFGE)

6 mM Tris, 100 mM EDTA, 1 M NaCl,
0,5% Brij 58, 0,2% Na-Desoxycholat,
0,5 % Laurylsarcosin, mit H₂O
auffüllen, autoklavieren

10 x MOPS pH 6,7

200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat,
10 mM EDTA pH 6,7

Phagenpuffer

1 ml 100 mM MgSO₄, 4 ml 100 mM
CaCl₂, 5 ml 1 M Tris pH 7,8, 0,59 g
NaCl, 0,1 g Gelantine, ad 100 ml H₂O,
autoklavieren

Phagen-Top-Agar

0,75 g Casamino Acids, 0,75 g Hefe-
Extrakt, 1,48 g NaCl, 1,88 g Agar, ad
250 ml H₂O, autoklavieren, dann 62,5
ml 1 M Natriumcitrat

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4	19,7 ml 1M Kaliumphosphat und 80,3 ml 1M Natriumphosphat, autoklavieren
5 x Phosphatpuffer pH 6,8	79,25 g Na ₂ HPO ₄ , 60,25 g NaH ₂ PO ₄ , ad 1 l nukleasefreies H ₂ O
Probenpuffer (RNA)	750 µl Formamid, 150 µl 10 x MOPS, 262 µl Formaldehyd, 5 µl Ethidiumbromid
Proteolysepuffer	0,25 M EDTA, 20 mM EGTA, 1% Laurylsarcosin pH 9,0
Reaktionspuffer	0,2033 g 1 mM MgCl ₂ und 3,16 ml - Mercaptoethanol ad 1 l 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4
3 x SDS-Probenpuffer	1,875 ml 1M Tris/HCl pH 6,8, 0,6 g SDS, 3 g Glycerin, 30 mg Bromphenolblau, ad 10 ml H ₂ O
2 x SMM pH 6,5	34,2 g Sucrose, 0,462 g Maleinsäure, 0,81 g MgCl ₂ , ad 100 ml H ₂ O, sterilfiltrieren
SMMP	2 x SMM pH 6,5 und 4 x PAB 1:1 mischen
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
Stop Puffer	21,198 g Na ₂ CO ₃ ad 1 l dest. H ₂ O, autoklavieren
50 x TAE	2 M Tris-HCl, 1 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,2
5 x TBE pH 8,2	0,05 M Tris, 0,05 M Borsäure, 0,1 mM Na ₂ EDTA
10 x TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
1,5 M Tris pH 8,8	18,1 g Tris, mit HCl den pH einstellen
0,5 M Tris pH 6,8	6 g Tris, mit HCl den pH einstellen
Waschlösung für PFGE	10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl pH 7,5

1,1 mM Working solution

275 µl Komponente A des Fluo
Reporter Kits und 9,73 ml
Reaktionspuffer

2.1.9 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
S64 ϕ S64	CF-Isolat	Goerke et al. (2006)
S64c	Phagen-freies Derivat von S64	Goerke et al. (2006)
S64c ϕ 13	ϕ 13-Lysogen von S64c	diese Arbeit
S64c ϕ S80	ϕ S80-Lysogen von S64c	diese Arbeit
S64c ϕ S84	ϕ S84-Lysogen von S64c	diese Arbeit
S80 ϕ S80a ϕ S80b	CF-Isolat	Goerke et al. (2006)
S80c ϕ S80b	Partiell phagenfreies Derivat von S84	Goerke et al. (2006)
S84 ϕ S84a ϕ S84b	CF-Isolat	Goerke et al. (2006)
S84c ϕ S84b	Partiell phagenfreies Derivat von S84	Goerke et al. (2006)
Mi54a	CF-Isolat	diese Arbeit
Mi54b	CF-Isolat	diese Arbeit
8325-4	Phagenfreies Derivat von NCTC 8325	Novick (1967)
8325-4 ϕ 13	ϕ 13-Lysogen von 8325-4	Goerke et al. (2006)
8325-4 ϕ S64	ϕ S64-Lysogen von 8325-4	diese Arbeit
8325-4 ϕ S80	ϕ S80-Lysogen von 8325-4	diese Arbeit
8325-4 ϕ S84	ϕ S84-Lysogen von 8325-4	diese Arbeit
RN 4220	Derivat von 8325-4, restriktionsdefizient	De Azavedo et al. (1985)
RN 6390 ϕ 6390	Derivat von 8325-4	Peng et al. (1988)
8325-4 ϕ 6390	ϕ 6390-Lysogen von 8325-4	diese Arbeit
ISP 479C	Derivat von 8325-4	Luchansky/Pattee (1984)
COL ϕ L54		diese Arbeit
MSSA 476 ϕ Sa4ms		diese Arbeit
M 46 ϕ M46		diese Arbeit
8325-4 ϕ L54	ϕ L54-Lysogen von 8325-4	diese Arbeit
8325-4 ϕ Sa4ms	ϕ Sa4ms-Lysogen von 8325-4	diese Arbeit
8325-4 ϕ M46	ϕ M46-Lysogen von 8325-4	diese Arbeit
8325-4 ϕ 12	ϕ 12-Lysogen von 8325-4, PVL-Toxin	diese Arbeit

8325-4	Sae::kana, sae-Mutante, Kanamycin-res.	Mainiero, Med. Mikrobiologie, Tübingen
8325-4 ϕ 13	Sae::kana, ϕ 13-Lysogen der sae-Mutante, Kanamycin-res.	Mainiero, Med. Mikrobiologie, Tübingen
8325-4	Agr::tet, agr-Mutante, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
8325-4 ϕ 13	Agr::tet, ϕ 13-Lysogen der agr-Mutante, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
8325-4	geh::pCG10, atl-Promotor, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
8325-4 ϕ 13	geh::pCG10, atl-Promotor, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
8325-4	geh::pCG11, luk-Promotor, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
8325-4 ϕ 13	geh::pCG11, luk-Promotor, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
8325-4 ϕ S64	geh::pCG11, luk-Promotor, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
8325-4	geh::pCG27, eap-Promotor, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
8325-4 ϕ 13	geh::pCG27, eap-Promotor, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
S64c	geh::pCG11, luk-Promotor, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit
S64 ϕ S64	geh::pCG11, luk-Promotor, Tetrazyklin-res.	diese Arbeit

2.1.10 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCG 6	pCL84 mit spoVG-lacZ Kasette aus pKO10	Geiger et. al. (2008)
pCG 11	pCG 6 mit 1033bp putativer hlb-Promotor kloniert über EcoR1	diese Arbeit
pCG 27	pCG 6 mit eap-Promotor	Harraghy et. al. (2005)
pCG 33	pCG3 mit Austausch attP L54 gegen 252 bp Fragment attP ϕ 13	diese Arbeit
pCG 3	pCL84 mit Austausch tetK-Resistenzkasette gegen ermB-Resistenz	diese Arbeit

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienanzucht in Flüssigkulturen

Die bei -70°C eingefrorenen Reinkulturen wurden auf Blutagarplatten ausgestrichen und bei 37°C bebrütet. Für die Isolierungen wurden die Bakterien in einer Über-Nacht-Kultur in 5 ml Flüssigmedium bei 37°C unter Schütteln (210 rpm) angezogen. Genetisch veränderten Organismen mit Resistenzen wurde hierbei das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Am Folgetag wurde eine Tagkultur von 10 ml Flüssigmedium mit Bakterien der Über-Nacht-Kultur zu einer optische Dichte $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,05 angeimpft. Das Wachstum erfolgte ebenfalls unter Schütteln (210 rpm) bei 37°C und wurde photometrisch anhand der $\text{OD}_{600\text{nm}}$ überwacht

In Abhängigkeit von der jeweiligen Wachstumsphase wurden die Bakterien geerntet. Dies geschah, sofern nicht anders vermerkt, bei einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 1,9 (ca. 4 h, t 2) und 2,5h später (t 3).

Eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 1 entspricht einer Bakteriendichte von ca. 109 koloniebildenden Einheiten (KBE) /ml.

Anzucht mit Antibiotika

Zur Betrachtung des Verhaltens der Bakterienstämme unter Einfluss von Antibiotika wurde jeweils 1/2 MIC (minimale Inhibitionskonzentration) dieser den Tagkulturen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,8 (t 1) zugegeben.

2.2.2 RNA-Isolierung und Gewinnung von Protein-Überständen

Bei Erreichen der gewünschten OD wurde eine definierte Menge der Tagkultur mittels Zentrifugation für 3 min bei 10.000 g und 4° C getrennt. Der Kulturüberstand wurde abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung zu je 1 ml Aliquots bei – 20° C aufbewahrt. Das Pellet wurde mit 1 ml Trizol suspendiert und in ein Schraubgefäß mit Glasperlen (100 µl, Circona/Silica beads, Roth) überführt. Es erfolgte ein Schütteln der Gefäße für 20 Sekunden im Homogenisator bei 6500 rpm. An diesem Punkt konnte die Arbeit unterbrochen werden, indem man die Proben bei -70° C einfroren. Zur Isolierung der RNA wurden die, gegebenenfalls aufgetauten, Proben mit je 200 µl Chloroform versetzt und 30 Sekunden leicht geschüttelt.

Danach wurden die Proben zunächst für 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 15 Minuten bei 12.000 g und 4° C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation erfolgte eine Unterteilung in drei Phasen, wobei sich die RNA in der oberen, wässrigen Phase befand. Diese Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, ohne dass dabei Teile der anderen beiden Phasen mit abgenommen wurden. Um eine Gleichbehandlung aller Proben zu garantieren, wurde immer in etwa die gleiche Menge abgesaugt (ca. 550 µl).

Die abgesaugte wässrige Phase wurde in Eppendorf Cups überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach kurzem Umschütteln wurden die Proben 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation, diesmal für 30 Minuten bei 12.000 g und 4° C. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und bei 7.500 g für 5 Minuten bei 4° C nochmals abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde dem Pellet 50 µl Natrium-Citrat zugefügt und für 10 Minuten bei 55° C inkubiert. Nach einem Vortexen für 4 Minuten wurden die Proben bei -70° C eingefroren. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei A260 .

Bei der RNA-Isolierung sowie beim weiteren Umgang mit RNA wurde streng auf sauberes Arbeiten (Tragen von Handschuhen, Verwendung spezieller Pipetten usw.) geachtet.

2.2.3 RNA-Gelelektrophorese und Northern Blot

Zur Herstellung des Gels wurden 0,8 g Agarose mit 64 ml nukleasefreiem H₂O bei 440 W in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurden 4 ml 37% Formaldehyd und 8 ml 10x MOPS zugegeben, durchmischt und in eine Gelkammer mit Kamm gegossen.

Die Herstellung des Probenpuffers für die RNA-Proben erfolgte durch Mischung von 750 µl Formamid, 262 µl 37% Formaldehyd, 150 µl 10x MOPS und 5 µl Ethidiumbromid in einem Eppendorf Cup.

Anhand des photometrisch gemessenen RNA-Gehaltes der Proben konnte berechnet werden, welches Volumen für eine RNA-Menge von 4 µg benötigt wurde. Die entsprechende Menge wurde in Eppendorf Cups pipettiert. Da in der Regel unterschiedliche RNA-Konzentrationen in den Proben vorlagen, ergaben sich hierbei unterschiedliche Volumina. Daher wurde den einzelnen Proben, orientierend an der Probe mit dem größten Volumen, nukleasefreies H₂O zugesetzt, um die jeweilige Volumendifferenz auszugleichen. Nach Zugabe der dreifachen Menge Probenpuffer, wurden die Proben zur Denaturierung der RNA für 15 Minuten auf 65° C erhitzt. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis abgekühlt und mit Blue Juice versetzt, wobei die zugegebene Menge 1/6 der Gesamtmenge aus RNA-Volumen und Probenpuffer betrug.

Nach kurzem Vortexen wurden die Proben auf das Gel aufgetragen, wobei jede Probe auf zwei Taschen verteilt wurde. Der Inhalt jeder Tasche bestand somit aus jeweils 2 µg RNA.

Es folgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben in 1x MOPS bei 65 Volt. Nach ca. 2 Stunden wurden die Banden des Gels unter UV-Licht sichtbar gemacht und digital abfotografiert.

Danach wurde das Gel für 30 Minuten in nukleasefreiem H₂O unter Schütteln gespült. Um eine freie Zugänglichkeit der aufgetrennten RNA-Moleküle zu er-

möglichen, wurden diese mittels Northern Blot aus dem Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Bei dem Transfer nutzt man die Kapillarkwirkung von Filterpapier aus, um einen gerichteten Sog zu erzeugen. Der Aufbau bestand aus einer bestimmten Vorrichtung (Turbo Blotter, Whatman, UK), in welche zunächst Filterpapiere und darauf eine Nylonmembran (Pall Corporation, USA) positioniert wurden. Das Gel wurde mit den Taschenöffnungen nach oben auf die Membran gelegt, so dass die glatte Fläche zur Nylonmembran zeigte. Über der Membran folgten erneut Filterpapiere, wobei das oberste Filterpapier an beiden Enden mit einem Transferpuffer in Verbindung stand.

Die Herstellung des Transferpuffers erfolgte aus einer Mischung von 175,5 g NaCl, 0,32 g NaOH sowie 0,63 g Lauryl-Sarcosin, welche mit nukleasefreiem H₂O auf 1 Liter aufgefüllt wurde.

Nach Abdeckung mit Frischhaltefolie, wurde der Aufbau zur Verstärkung des Kapillareffektes mit einem Gewicht beschwert und 2,5 Stunden laufen gelassen. Danach wurde die Membran für 5 Minuten in 1 x Phosphatpuffer unter Schütteln gewaschen und die RNA durch beidseitiges Crosslinken an die Membran gebunden (125 J). Der Erfolg des Transfers konnte durch Sichtbarmachen der 23S und 16S rRNA Banden mittels UV-Licht überprüft werden.

2.2.4 Herstellung Digoxigenin-markierter Gensonden mittels PCR

Für die Hybridisierung der Northern Blots wurden Digoxigenin-markierte Gensonden mithilfe des Dig-labeling Kits (Roche, Mannheim) hergestellt. Als Template wurden 1 ng chromosomale DNA von *S. aureus* eingesetzt.

Folgende Oligonukleotide wurden für die Dig-Markierung eingesetzt:

Tabelle 2: Oligonukleotide zur Herstellung Dig-markierter Gensonden

Name	Länge	Oligosequenz	basiert auf
mapW-rev	20	CGGCACAAGCCAAAACATTT	N315 (Acc.No.BA00018)
mapW-for	24	TGGTGTTGATGTGCCATTTACTGC	N315 (Acc.No.BA00018)
lukM-rev2	22	GCAGCAACGACTCAAGCAAATT	8325 (Acc.No.CP000255)
lukM-for2	22	TTTTACCGCTGGCAATTGTGTC	8325 (Acc.No.CP000255)

Alle Primer wurden zu einer Endkonzentration zu 100 pmol/µl in Nuclease-freiem H₂O gelöst und bei – 20° C aufbewahrt. Für die PCR wurden 1:10 verdünnte Aliquots eingesetzt.

Tabelle 3: PCR-Mix zur Herstellung Dig-markierter Gensonden

Reagenz	Menge
10 x Reaktionspuffer	5 µl
MgCl ₂	4 µl
Primer rev	1 µl (= 1 pmol)
Primer for	1 µl (= 1 pmol)
DNA	1 µl (= 1 ng)
PCR-Mix (Dig-markiert)	2,5 µl
Nukleasefreies H ₂ O	32,25 µl
High Fidelity Polymerase	0,75 µl

Die Polymerase wurde unmittelbar vor der Inkubation zugegeben und ein Heißstart durchgeführt. Für die Amplifikation wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

Tabelle 4: Temperaturprofil der PCR zur Herstellung Dig-markierter Gensonden

Temperatur	Zeit		Zyklen
94° C	2 min	Denaturierung	1 Zyklus
94° C	30 s	Denaturierung	
45 – 55° C	30 s	Annealing	35 Zyklen
72° C	45 s + Zyklusverlängerung von 5 s für jeden Zyklus	Verlängerung	
72° C	7 min	Verlängerung	1 Zyklus

Nach der Amplifikation wurden die Produkte auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und anhand des Größenverhältnisses mit einem Molekulargewichtsmarker kontrolliert. Durch die erfolgte Dig-Markierung muss dabei eine Größenveränderung berücksichtigt werden.

Die Aufreinigung erfolgte mit dem Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers.

Die DNA wurde mit 50 µl H₂O eluiert und die Proben bei – 20° C aufbewahrt.

2.2.5 Hybridisierung und Detektion

Zunächst wurden die Northern Blots in Glaszylindern in 10 ml High-SDS für 30 Minuten bei 64° C vorhybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht mit 10 ml High-SDS und 5 µl der hergestellten Dig-markierten PCR-Sonden, welche zuvor für 10 Minuten in kochendem Wasser denaturiert worden waren. Die Sonden wurden bei - 20° C aufbewahrt und konnten nach erneuter Denaturierung wieder verwendet werden.

Am nächsten Tag erfolgten zunächst mehrere Waschschriffe: zweimaliges Waschen mit 10 ml 2 x SSC für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur und zweimaliges Waschen mit 10 ml 0,2 x SSC für jeweils 15 Minuten bei 64° C.

Zur Detektion wurden folgende Lösungen verwendet (DIG wash and block buffer set):

- Maleinsäure
- Waschpuffer
- Blockierungslösung
- Detektionspuffer

Alle anschließenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurde die Membran eine Minute mit 10 ml Waschpuffer gewaschen, dann für mindestens 30 Minuten mit 10 ml Blockierungslösung vorgeblockt. Anschließend erfolgte für exakt 30 Minuten das eigentliche Blockieren mit 10 ml Blockierungslösung und 1 µl Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP). Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml Waschpuffer für jeweils 15 Minuten, wurde die Membran mit 1 ml Detektionspuffer für 2 Minuten vordetektiert. Die nachfolgende Detektierung erfolgte mit 1 ml Detektionspuffer und 10 µl CSPD für 5 Minuten. Danach wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Nach 45 Minuten bis 2 Stunden wurde der Film entwickelt und digital abfotografiert.

2.2.6 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Die bei -20°C eingefrorenen 1 ml Proteinüberstände wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 200 μl kaltem 100% TCA versetzt. Nach kurzem Mischen wurden die Proben für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 14.000 g und 4°C . Danach wurde der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe vollständig entfernt.

In den zwei folgenden Waschschrritten wurden zunächst 500 μl eiskaltes Aceton auf das Pellet pipettiert und abgesaugt, dann mit 500 μl 99% Ethanol ebenso verfahren. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur für ca. 20 Minuten getrocknet und anschließend in 20 μl bidest. H_2O durch kräftiges Vortexen resuspendiert. Die Proben konnten nun entweder direkt oder durch Lagerung bei -20°C zu einem späteren Zeitpunkt weiterverwendet werden.

2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese von Proteinen wurde das Mini Protean 3 Electrophorese System von Biorad verwendet. Das Gel wurde in zwei Schichten (Trenngel und Sammelgel) zwischen Glasplatten gegossen. Diese mussten sehr sorgfältig mit Seife und 99% Ethanol gereinigt werden, um ein Auslaufen des Gels und Proteinverunreinigungen zu vermeiden.

Zunächst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol bedeckt, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach ca. 45 Minuten war das Trenngel vollständig auspolymerisiert und die Deckschicht aus Isopropanol konnte mit einem Filterpapier abgesaugt werden. Das Sammelgel wurde zwischen die Glasplatten pipettiert und die Kämme eingesetzt. Nach ca. 1 Stunde lag auch hier eine vollständige Polymerisation vor.

Die beiden Ansätze wurden wie folgt hergestellt:

12 % Trenngel	3,35 ml bidest. H ₂ O, 100 µl 10% SDS und 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 wurden gemischt. Zuletzt wurden 50 µl 10% APS und 5 µl TEMED hinzugefügt.
4 % Sammelgel	6,1 ml bidest. H ₂ O, 100 µl 10% SDS und 1,3 ml 0,5 M Tris pH 8,8 wurden gemischt. Zuletzt wurden 50 µl 10% APS und 10 µl TEMED hinzugefügt.

Nach Mischung aller Bestandteile mussten die Gele zügig gegossen werden, da die Polymerisation sofort begann.

Die TCA-gefällten Proben wurden nun mit 10 µl 3 x SDS-Probenpuffer versetzt, gemischt und für 5 Minuten im Heizblock bei 100° C inkubiert, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen. Das Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und diese mit 1 x Elektrophoresepuffer gefüllt. Nach kurzem Kühlen der Proben auf Eis, wurden pro Tasche jeweils 10 µl aufgetragen.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 Volt für ca. eine Stunde.

2.2.8 Färbung der SDS-Polyacrylamidgеле

Coomassie Brilliant Blau (CBB) G 250 Färbung mit TCA

Nach einer einstündigen Fixierung des Polyacrylamidgels in 12% TCA, wurde es über Nacht unter Schwenken in einer Färbelösung aus 2 ml 100% TCA, 10 ml 1% CBB G 250 und 88 ml bidest. H₂O gefärbt. Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau führt zu einer unspezifischen Proteinfärbung, indem er sich an

basische Aminosäureketten anlagert.

Anschließend wurde das Polyacrylamidgel in einer Entfärberlösung aus 40 ml Methanol, 5 ml Essigsäure und 55 ml bidest. H₂O geschwenkt bis die Proteinbanden deutlich dargestellt waren. Die Entfärberlösung wurde dabei mehrmals erneuert.

Page Blue Protein Staining Solution (Fermentas, St. Leon-Roth)

Im Laufe der Studie wurde die Coomassie Brilliant Blau (CBB) G 250 Färbung mit TCA durch Page Blue Protein Staining Solution ersetzt. In einem Versuch konnte gezeigt werden, dass beide Methoden eine vergleichbare Anfärbung der Proteinbanden gewährleisten.

Das Vorgehen orientierte sich an dem "Conventional Protocol" des Herstellers. Zunächst wurde das Polyacrylamidgel für 15 Minuten in 12% TCA fixiert. Es folgten zwei 10 minütige Waschschriffe in bidest. H₂O. Die Färbung wurde über Nacht unter Schwenken durchgeführt.

Die Entfärbung erfolgte in bidest. H₂O für maximal 5 Minuten. Zur Dokumentation wurde das gefärbte Polyacrylamidgel eingescannt und bei Bedarf in 5% Essigsäure aufbewahrt.

Silberfärbung (nach Blum et al., 1987)

Für eine im Vergleich zur CBB-Färbung sensitivere Anfärbung der Proteine, wurde die Silberfärbung nach Blum et al. angewandt. Alle Inkubationsschritte wurden unter Schwenken durchgeführt, die Lösungen frisch angesetzt.

Die Fixierung der Polyacrylamidgele erfolgte über Nacht in einer Lösung aus 40% Methanol und 12% Essigsäure. Anschließend wurden die Gele dreimal für jeweils 20 Minuten in 30% Ethanol gewaschen. Es folgte eine Sensitivierung für eine Minute in 0,2 g/l Natriumthiosulfat.

Nach drei weiteren Waschschriffen für jeweils 20 Sekunden in bidest. H₂O, wurde die Färbung in einer Lösung aus 0,3 g Silbernitrat und 19,25 µl 37% Formaldehyd auf 150 ml bidest. H₂O für 20 Minuten durchgeführt. In diesem Schritt kommt es zu einer Anlagerung von Silberionen an die Proteine.

Die Gele wurden erneut zweimal für 20 Sekunden in bidest. H₂O gewaschen,

um überschüssige Ionen zu entfernen. Danach folgte die Entwicklung der Gele in einer Lösung aus 15 g Natriumcarbonat und 65,5 µl 37% Formaldehyd auf 250 ml bidest. H₂O, bei der es durch eine Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber zu einer schwarzen Färbung der Proteinbanden kommt. Sobald die gewünschte Färbeintensität erreicht war (ca. 3-5 Minuten) wurde die Reaktion durch Wässern mit bidest. H₂O gestoppt.

Zur Dokumentation wurde auch hier das Polyacrylamidgel eingescannt und anschließend in 1% Glycin aufbewahrt.

2.2.9 Promotorkonstrukte: Klonierung der Stämme

Im Folgenden wird die Klonierung der Stämme

- 8325-4 geh::pCG 10
- 8325-4 geh::pCG 10
- 8325-4 geh::pCG 11
- 8325-4 geh::pCG 11
- 8325-4 geh::pCG 11
- S64c geh::pCG 11
- S64 geh::pCG 11
- 8325-4 geh::pCG 27
- 8325-4 geh::pCG 27

beschrieben.

Das den *eap*-Promotor enthaltende Plasmid pCG 27 wurde freundlicherweise von Niamh Harraghy, Uniklinik Saarland, zur Verfügung gestellt.

PCR der Promotoren

Zunächst wurde eine PCR der zu untersuchenden Promotoren ORF SA1813 und *atl* durchgeführt. Bei der verwendeten DNA handelte es sich um ein Isolat aus dem *S. aureus* Stamm 8325-4.

Tabelle 5: PCR-Ansatz, die Gesamtmenge beträgt 50µl

Reagenz	Menge
nukleasefreies H ₂ O	34,5 µl
10 x PCR-Puffer (Qiagen)	5 µl
dNTP-Mix	4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Primer rev	1 µl
Primer for	1 µl
Hot Star Taq-Polymerase (Qiagen)	0,5 µl
DNA-Template	2 µl

Bei den Primern handelte es sich um folgende Oligonukleotide.

Tabelle 6: Primer der Promotor-PCR, EcoR1 Schnittstelle unterstrichen

Name	Länge	Oligosequenz	basiert auf
P-atl rev	37	GTCGAC <u>GAAATTC</u> GCCTTCAGGATT TACAATGGGAATG	N315 (Acc.No. BA00018)
P-atl for	36	GTCGAC <u>GAAATTC</u> TTTTGGTTGGAC AATAGCAGGGTC	N315 (Acc.No. BA00018)
P-luk for	30	GTCGAC <u>GAAATTC</u> TTGCTGCTGATA ACAATA	N315 (Acc.No. BA00018)
P-luk rev	37	GTCGAC <u>GAAATTC</u> CCAGATCCAGTT GGTTCAGCAATAA	N315 (Acc.No. BA00018)

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler entsprechend dem folgenden Temperaturprofil.

Tabelle 7: Temperaturprofil der Promotor-PCR

Temperatur	Zeit in min		Zyklen
94° C	15	Aktivierung der Polymerase	1
94° C	1	Denaturierung	1
55° C – 0,9° C pro Zyklus	1	Annealing	10
72° C	2	Verlängerung	1
94° C	1	Denaturierung	1
47° C	1	Annealing	30
72° C	2	Verlängerung	1
72° C	10	Verlängerung	1

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch in einem 1% Agarosegel (0,7 g DNA-Agarose, 70 ml 1 x TAE, 7 µl Ethidiumbromid) aufgetrennt. Hierzu wurden jeweils 5 µl Probe mit 3 µl Blue Juice gemischt und diese, sowie 3 µl 100 bp Molekulargewichtsstandard in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 Volt für ca. 30 Minuten. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und digital abfotografiert.

Verdau

Der Verdau wurde sowohl mit dem erhaltenen PCR-Produkt als auch mit dem Vektor durchgeführt, um diesen zu linearisieren. Bei dem zur Klonierung verwendeten Vektor handelt es sich um das Plasmid pCG 6.

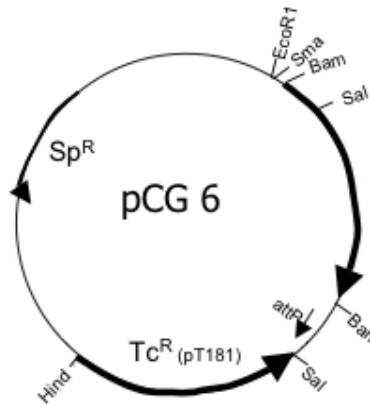


Abb. 1: Zur Klonierung verwendetes Plasmid pCG6

Zunächst wurden PCR-Produkt und Vektor mit dem Verdauansatz und 1 μ l EcoR I gemischt und für 2 Stunden inkubiert. Nach einer Zugabe von weiteren 1 μ l EcoR I wurde der Ansatz erneut für 2 Stunden inkubiert.

Tabelle 8: 1. Verdauansatz für PCR-Produkt, 20 μ l

Reagenz	Menge
DNA	5 μ l
Enzym Eco R I	2 μ l in 2 Schritten
BSA	1 μ l
Eco R I-Puffer	2 μ l
nukleasefreies H ₂ O	10 μ l

Tabelle 9: 1. Verdauansatz für Vektor pCG6, 50µl

Reagenz	Menge
DNA	10 µl
Enzym Eco R I	2 µl in 2 Schritten
BSA	1 µl
Enzym-Puffer	2 µl
nukleasefreies H ₂ O	35 µl

Das verwendete Restriktionsenzym Eco R I erkennt, bindet und schneidet an der folgenden Nukleinsäuresequenz. Die Schnittstelle ist jeweils mit einem senkrechten Strich markiert.

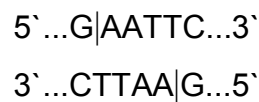


Abb. 2: EcoR I Schnittstelle

Anschließend wurden die Proben zur Entfernung des Enzyms mit einem PCR-Reinigungs-Kit (Nukleospin Extract, Macherey-Nagel, Düren) gereinigt und in 30 µl nukleasefreiem H₂O eluiert.

Es folgte ein weiterer Verdau in 50 µl Verdauansatz.

Tabelle 10: 2. Verdauansatz für Plasmid und PCR-Produkt, 50µl

Reagenz	Menge
eluierte DNA	30 µl
Enzym Eco R I	2 µl in 2 Schritten
BSA	1 µl
Eco RI-Puffer	2 µl
nukleasefreies H ₂ O	15 µl

Danach wurde das Enzym durch Erhitzen auf 65° C über 15 Minuten inaktiviert.

Zur Vermeidung einer Religation des Plasmids wurde eine Dephosphorylierung der freien 5`-Enden mit dem Enzym alkalische Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) durchgeführt. Hierzu wurde das Plasmid zunächst im folgenden Ansatz für 15 Minuten bei 37° C inkubiert.

Tabelle 11: Reagenzien zur Dephosphorylierung des Plasmids auf 50µl Verdau-Ansatz

Reagenz	Menge
SAP	2 µl
Enzym-Puffer	5 µl

Anschließend wurde das Enzym für 15 Minuten bei 65° C im Heizblock inaktiviert.

Zuletzt wurden beide verdauten Proben erneut mit dem PCR-Reinigungs-Kit gereinigt, der Vektor in 30 µl und das PCR-Produkt in 15 µl nukleasefreiem H₂O eluiert.

Ligation

Die Ligation dient der Integration des PCR-Produktes, hier der Promotoren der Gene SA1813 und atI, in das linearisierte Plasmid pCG 6.

Zunächst wurde eine gelektrophoretische Auftrennung der verdauten Proben in einem 1 % Agarosegel durchgeführt, um deren Mengen abzuschätzen und somit das richtige Mischverhältnis für den Ligations-Ansatz zu ermitteln. Hierbei ergab sich in der Regel ein Verhältnis von 1:1. Ein Kontroll-Ansatz ohne Zugabe von Insert sollte eine erfolgreiche Dephosphorylierung des Plasmids und somit fehlende Religation aufzeigen. Die Ligations-Ansätze wurden über Nacht bei 4° C inkubiert.

Tabelle 12: Ansätze für die Ligation

Reagenz	Probe	Kontrolle
Vektor	1 μ l	1 μ l
Insert	1 μ l	-
T4 Ligase	1 μ l	1 μ l
Enzym-Puffer	2 μ l	2 μ l
nukleasefreies H ₂ O	5 μ l	6 μ l

Transformation in E. coli

Zur Transformation in E. coli wurden die kompetenten Zellen TOP 10 (OneShot, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Auf die Zellen wurden jeweils 2 μ l Ligations- und Kontroll-Ansatz gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 45° C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 125 μ l SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe), wurden sie für eine Stunde bei 37° C unter Schüttel inkubiert. Zuletzt wurden Volumina von 50 und 100 μ l auf LB-Agarplatten mit Spectinomycin 100 mg/ml ausplattiert und diese über Nacht bei 37° C bebrütet.

Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wurden Einzelkolonien der LB-Spectinomycin-Agarplatten entnommen und direkt im vorbereiteten PCR-Ansatz suspendiert. Ziel dieser PCR war es, die Insert-Fragmente zu detektieren und ihre Orientierung im Plasmid zu überprüfen. PCR-Ansatz und Temperaturprofil entsprachen hierbei der Promotor-PCR. Bei den verwendeten Primer handelte es sich um die in Tabelle13 aufgeführten Oligonukleotide.

Tabelle 13: Primer der Kolonie-PCR

Name	Länge	Oligosequenz	basiert auf
P-atl for	36	GTCGAC <u>GAATTCTTTT</u> GGTTGGAC AATAGCAGGGTC	N315 (Acc.No.BA00018)
P-luk for	30	GTCGAC <u>GAATTCTT</u> GCTGCTGATA ACAATA	N315 (Acc.No.BA00018)
lacZ rev	23	CGGATTGACCGTAATGGGATAGG	lacZ-Gen von E.coli (Acc.No. J01636)

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt.

Plasmid-Präparation aus E. coli

Für die Plasmid Präparation aus E. coli wurden PCR-positive Kolonien verwendet. Die Bakterien wurden in 5 ml LB-Medium als Über-Nacht-Kultur angezogen und danach die gesamte Menge für 3 Minuten bei 10.000 g abzentrifugiert. Die weitere Präparation erfolgte mit dem NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um den S. aureus Stamm CYL 316. Zunächst wurden einige Kolonien in 5 ml BM-Medium mit 5 µl Chloromycin versetzt über Nacht bei 37° C unter Schütteln (210 rpm) angezogen. Anschließend wurden 50 ml BM-Medium mit 500 µl der Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37° C unter Schütteln weiter kultiviert bis eine OD_{578nm} von 0,5-0,6 erreicht war.

Die Flüssigkultur wurde für 5 Minuten bei 5000 g und 20° C abzentrifugiert und die Zellen in 50 ml sterilem 10% Glycerol resuspendiert. Nach einer weiteren

Abzentrifugation wurden die Zellen in 25 ml sterilem 10% Glycerol aufgenommen und wiederum abzentrifugiert.

Diese Schritte wurden nun erneut zunächst mit 2,5 ml, dann mit 100 µl sterilen 10% Glycerol durchgeführt. Nach Resuspension in 50 µl sterilem 10% Glycerol wurden die Zellen in Eppendorf Cups überführt und bei – 70° C gelagert.

Transformation in *S. aureus* durch Elektroporation

Zur Elektroporation wurden 50 µl kompetente Zellen mit 2 µl Plasmid-Probe gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 2000 Volt elektroporiert und direkt in 1ml SMMP-Medium überführt.

Tabelle 14: 1ml Ansatz SMMP-Medium

Reagenz	Menge
2 x SMM	550 µl
4 x PAB	400 µl
10 % BSA	50 µl

Nach einer Inkubation für 1,5 Stunden bei 37° C wurden jeweils 100 µl pro Ansatz auf TSA-Tetrazyklin-Agarplatten ausplattiert. Der restliche Ansatz wurde abzentrifugiert, in 100 µl Überstand resuspendiert und auf eine weitere TSA-Tetrazyklin-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte für ca. 1-2 Tage bei 37° C im Brutschrank.

Lysat-Herstellung für die Transduktion

Zur Gewinnung von Lysat aus den erfolgreich transduzierten Zellen wurden zunächst einige Kolonien in 0,5 ml Phagenpuffer gut suspendiert und 50 µl des Phagen φ11 zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz in 4 ml 48° C warmen, aufgeschmolzenen TSA-Top-Agar pipettiert und auf eine TSA- 100mM CaCl₂ -Platte gegeben. Die Platten wurden bei 37° C für ca. 5-6 Stunden

inkubiert. Ebenso wurde mit einer Kontrolle ohne Zugabe von Phagen verfahren.

Anschließend wurden 3 ml TSB-Medium auf die Agar-Platte pipettiert und die oberste Schicht des Agars mithilfe einer Stangenpipette abgekratzt, zerkleinert und homogenisiert. Nach Überführung in einen Falcon wurden die Proben für 5-10 Minuten bei 40-50° C im Wasserbad inkubiert.

Es folgte eine Abzentrifugation für 10 Minuten bei 5000 g und 4° C. Zuletzt wurde der Überstand abpipettiert, sterilfiltriert (0,45 µm) und bei 4° C aufbewahrt.

Transduktion

Zunächst wurden einige Bakterienkolonien der Zielstämme in 600 µl Phagenpuffer suspendiert. Jeweils 200 µl der Suspension wurden mit 10 und 100 µl Phagen-Lysat versetzt und für 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Weitere 200 µl Suspension ohne Zugabe von Phagen-Lysat wurden als Kontrolle ebenso behandelt.

Nach Zugabe von 3,4 ml 48° C warmem, aufgeschmolzenem Phagen-Top-Agar und zweimaligem Invertieren, wurde der Agar auf einer TSA-Tetrazyklin-Platte verteilt. Die Inkubation erfolgte für 1-2 Tage bei 37° C im Brutschrank.

2.2.10 Bakterienisolierung für Promotor-Assay

Zur Gewinnung der Proben für den Promotor-Assay wurden die Bakterien in Flüssigkultur bis zu den gewünschten Wachstumsphasen angezogen. Die Ernte erfolgte bei einer OD_{600nm} von 1,9 (ca. 4 h, t₂) und 2,5h später (t₃). Nach einer genauen photometrischen Messung wurde die zu entnehmende Kulturmenge so berechnet, dass in allen Proben ca. 327 KBE (entspricht einer $OD_{600nm} = 3$ in 1 ml) vorlagen und eine Vergleichbarkeit der späteren Messwerte gewährleistet war.

Es folgte eine Zentrifugation der entnommenen Bakterienkultur für 3 Minuten bei 10.000 g und 4° C. Der Überstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 suspendiert und in ein Schraubgefäß mit Glasperlen (100µl) überführt. Nach einem Schütteln der Proben für 10 Sekunden bei 6500 bpm im Homogenisator, wurden die Proben zuletzt in ein Eppendorf Cup überführt und direkt weiterverwendet oder bei -20° C aufbewahrt.

2.2.11 Durchführung des Promotor-Assays

Um die Promotoraktivität zu beurteilen, wird häufig nicht das eigentlich zu untersuchende Gen verwendet, sondern nur der betreffende Promotor und ein Reporter gen. Ein solches Reporter gen ist LacZ. Das von LacZ kodierte Enzym β -Galaktosidase kann bereits in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden und ist daher sehr gut für einen sensitiven Nachweis der Promotoraktivität geeignet. Nach Zugabe des Substrats 3-Carboxy-Umbelliferyl β -D-Galaktopyranoside (CUG) katalysiert β -Galaktosidase die Umsetzung zu 7-Hydroxycoumarin.

Die Menge dieses Produktes kann am Lumineszenz Spektrometer aufgrund seiner stark fluoreszierenden Eigenschaft bestimmt werden.

Hierzu wurden jeweils 10 µl Probe in eine weiße, undurchsichtige 96-Well Mikrotiterplatte (Perkin Elmer) vorgelegt. Als Leerwert wurden 10 µl Reaktionspuffer verwendet.

Zur späteren Berechnung des β -Galaktosidase-Gehaltes der Proben wurde eine Standardkurve erstellt. Die in der zugrunde liegenden logarithmischen Verdünnungsreihe enthaltenen Mengen an Enzym reichten von $3,16 \cdot 10^2$ ng als maximalem bis $3,16 \cdot 10^{-3}$ ng als geringstem Wert. Zur Verdünnung wurde Enzym-Dilutions-Puffer verwendet. Nachdem auch die Proben der Verdünnungsreihe mit jeweils 10 μ l in die 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert waren, konnte die Reaktion gestartet werden. Dies erfolgte durch Zugabe von jeweils 100 μ l 1,1 mM Working Solution in die Vertiefungen. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 30 Minuten. Um die Reaktion zu stoppen, wurden jeweils 50 μ l Stop-Puffer in die Vertiefung pipettiert.

Anschließend wurde sofort die Messung am Lumineszenz Spektrometer (Perkin Elmer) bei 390 nm Exzitation und 460 nm Emission durchgeführt.

Die Zeitdauer von Beginn bis zur Beendigung der Reaktion bzw. Reaktionsende bis zur spektrometrischen Messung musste bei allen Versuchen möglichst identisch sein, um vergleichbare Messergebnisse zu erzielen.

2.2.12 Auswertung der Promotor-Assays

Zur Auswertung wurde zunächst der Leerwert von allen Proben subtrahiert.

Aus den Messwerten der Verdünnungsreihe wurde eine doppelt logarithmische Standardkurve erstellt, bei der die y-Achse die β -Galaktosidase und die x-Achse die Fluoreszenz repräsentierte. Durch den linearen Verlauf der Kurve wurde eine Gerade gelegt und die entsprechende Funktion ($y=a \cdot x^b$) dieser Geraden ermittelt. Anschliessend wurden die Messwerte der Proben jeweils als x-Wert in die Formel $y=a \cdot x^b$ eingesetzt, y berechnet und somit der Gehalt an β -Galaktosidase in den einzelnen Proben ermittelt.

2.2.13 Gewinnung von Phagenlysaten

Die Gewinnung von Phagenlysaten erfolgte aus Donorstämmen durch Induktion mit Mitomycin.

Tabelle 15: Donorstämme für Phagenlysate

Stamm	Phage
COL	ϕ L54
MSSA 476	ϕ Sa4ms
M 46	ϕ M46

Die Bakterienstämme wurden zunächst in einer Über-Nacht-Kultur, dann in einer Tag-Kultur angezogen. Als Flüssigmedium wurde TSB verwendet. Bei Erreichen einer OD_{600nm} von 0,8 erfolgte die Zugabe von 20 μ l Mitomycin (0,5mg/ml). Nach einem weiteren Wachstum von 4 Stunden wurden 2 ml der Flüssigkultur für 3 Minuten bei 10.000 g und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und nach einer Sterilfiltration mit einem 0,45 μ m Filter in Schraubröhrchen pipettiert. Ebenso wurde mit 2 ml der Flüssigkultur nach einem weiteren Wachstum über Nacht verfahren. Die Aufbewahrung der Lysate erfolgte bei 4° C.

2.2.14 Phagen-Tropf-Assay

Um Lysogene zu erzeugen, wurde ein Phagen-Tropf-Assay durchgeführt. Grundlage dieses Vorgehens ist es, neben den durch Bakteriophagen lysierten Bakterienkolonien insbesondere solche Kolonien zu gewinnen, die in den lysogenen Zyklus eingetreten sind und somit die Bakteriophagen als Prophagen in ihr Genom integriert haben. Beim Zielstamm handelte es sich um den Stamm 8325-4. Der restriktionsdefiziente Stamm RN 4220 wurde zusätzlich verwendet, falls die Phagen nicht direkt in den Zielstamm integriert werden konnten. Dies war bei dem Phagen ϕ M46 der Fall.

Zunächst wurde ein Lysogen des Stammes RN 4220 hergestellt. Mit dem hieraus gewonnenen Lysat konnte nun problemlos der Phage in den Zielstamm 8325-4 integriert werden.

Bakterienkolonien des Zielstammes wurden zu einer $OD_{600nm}=0,01$ in 10 ml PBS gelöst. Hieraus wurden jeweils 50 μ l entnommen, auf eine NB2-CaCl₂ - Platte pipettiert und ausplattiert. Anschließend wurden jeweils 10 μ l der zuvor gewonnenen Phagenlysate auf die angetrockneten Platten aufgetropft. Hatte sich in vorhergehenden Versuchen eine zu hohe Lysogenität der Phagenlysate gezeigt, wurden diese vor dem Auftropfen in 10er Schritten verdünnt. Es folgte eine Bebrütung der Platten bei 37° C über Nacht. Bei der Auswertung zeigten sich im Bereich des aufgetropften Phagenlysats annähernd klare Plaques. Kolonien, die innerhalb dieser Plaques gewachsen waren, wurden auf Blutagarplatten mehrere Male subkultiviert, um Reinkulturen zu erhalten.

2.2.15 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA wurden zunächst einige Kolonien der gewünschten Bakterienreinkulturen in 1 ml 10 x TE gelöst. Es folgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 10.000 g und 4° C. Der Überstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet in 100 μ l 10 x TE resuspendiert und 3 μ l Lysostaphin hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 37° C im Brutschrank, erfolgte die Zugabe von 100 μ l Proteolysepuffer und 10 μ l Proteinase K. Die Proben wurden nun bei 55° C für eine Stunde im Wasserbad, zuletzt bei 95° C für 10 Minuten im Heizblock inkubiert.

Multiplex-PCR

Um das Vorhandensein der Bakteriophagen im Genom des Zielstammes 8325-4 zu überprüfen, wurde eine Multiplex PCR durchgeführt. Bei den verwendeten Primern handelte es sich um den SG-Primer-Mix [79]. Für den PCR-Ansatz wurden 10 μ l (100 μ M) des Primer-Mixes mit 440 μ l H₂O verdünnt.

Tabelle 16: Reagenzien des Multiplex-PCR-Ansatzes

Reagenz	Menge
Nuklease-freies H ₂ O	18 µl
Multiplex-PCR-Kit	25 µl
Primer-Mix	5 µl
DNA-Templates	2 µl
Gesamtmenge	50 µl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler entsprechend dem folgenden Temperaturprofil.

Tabelle 17: Temperaturprofil für Multiplex-PCR-Amplifikation

Temperatur	Zeit		Zyklen
95° C	15 sec	Denaturierung	1 Zyklus
95° C	30 sec	Denaturierung	1 Zyklus
55° C – 50,5°C	1,5 min	Annealing	35 Zyklen
72° C	45 sec	Verlängerung	1 Zyklus
72° C	19 min	Verlängerung	1 Zyklus

Nach der Amplifikation wurden 5 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Blue Juice gemischt und auf ein Ethidiumbromid enthaltendes 3 % Agarose-Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 120 Volt, wurden die Banden mit UV-Licht sichtbar gemacht und digital abfotografiert.

2.2.16 Pulsfeldgelelektrophorese

Zusätzlich zur Multiplex-PCR wurde eine Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) durchgeführt. Hiermit sollte überprüft werden, ob die Bakteriophagen an der richtigen Stelle im Genom des Zielstammes 8325-4 integriert wurden.

DNA-Isolierung für die PFGE

Für die Isolierung der chromosomalen DNA wurden 5 ml TSB mit einer Staphylokokken- Kolonie angeimpft und als Über-Nacht-Kultur bei 37° C und 220 rpm bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Bakterien geerntet. Hierfür wurde eine Menge aus der Über-Nacht-Kultur entnommen, die einer $OD_{600nm} = 0,5$ entspricht. Diese wurde für 3 Minuten bei 10.000 g und 4° C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet mit 1ml Waschlösung gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 100 µl Waschlösung (10 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl pH 7,5) resuspendiert und auf 55° C erwärmt. 100 µl 2 % low melting point Agarose (in TE, pH 8,0) wurde nun ebenfalls auf 55° C erwärmt, mit der Probe vermischt und in vorgefertigte Gußkammern zum Aushärten pipettiert.

Nach 30 Minuten Kühlung bei 4° C wurden die erhärteten Agaroseblöckchen in 1 ml Lysepuffer mit 5 µl Lysostaphin überführt.

Die nachfolgende Inkubation erfolgte über Nacht bei 4° C unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde der Lysepuffer entfernt und durch 1 ml Proteolysepuffer mit 50 µl Proteinase K ersetzt. Es folgte eine erneute Inkubation der Agaroseblöckchen über Nacht in einem Wasserbad bei 55° C. Zum Abschluß wurden die Blöckchen fünfmal für mindestens zwei 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 in 0,5 M EDTA bei 4° C aufbewahrt. Zum Entfernen des EDTA wurden die Blöckchen mit TE gewaschen.

Restriktionsverdau

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

Tabelle 18: Restriktionsverdau-Ansatz (200µl)

Reagenz	Menge
Probe	ca. 100 µl
BSA (200 mg/ml)	1 µl
SuRE / Cut Buffer A	20 µl
Nuclease-freies H ₂ O	78 µl
Sma I (10 U/µl)	1 µl

Die Restriktionsendonuklease Sma I erkennt die folgende DNA-Sequenz:

...CCC|GGG...

Nach einer Inkubation bei 27° C über Nacht wurde der Verdau mit 500 µl TE gestoppt. Die Proben konnten nun entweder bei 4° C maximal einen Tag aufbewahrt werden oder direkt zur Elektrophorese eingesetzt werden.

Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 1 % Agarosegel (Seakam GTG in 0,5 x TBE) mit 0,5 x TBE als Laufpuffer. Als Molekulargewichtsstandard wurden in den äußersten Taschen jeweils Col (Sma I verdaute DNA des sequenzierten S. aureus Stamm 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 0,5 x TBE mit 0,5 g/ml Ethidiumbromid für 30 Minuten gefärbt und auf einem Transilluminator digital abfotografiert.

2.2.17 Southern Blot

Zur Vorbereitung des Southern Blots wurde das PFGE-Gel zunächst zum Bruch der DNA von jeder Seite zweimal genickt (60 mJ), anschließend für 15 Minuten in 0,25 M HCl und zweimal für jeweils 15 Minuten in Denaturierungspuffer geschwenkt.

Um eine genauere Betrachtung der aufgetrennten DNA-Moleküle zu ermöglichen, wurde diese nun auf eine Nylonmembran übertragen. Der Aufbau für den Transfer bestand aus einer Brücke aus Filterpapier, die mit beiden Enden mit Denaturierungspuffer in Kontakt stand sowie 2 weiteren getränkten Filterpapieren. Hierauf wurde das Gel mit den Taschen nach unten luftblasenfrei platziert. Es folgten die genau zugeschnittene Nylonmembran, ein weiteres Filterpapier und mehrere Lagen Zellstoff. Abschließend wurde der Aufbau zur Verbesserung des Kapillareffektes mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer wurde für mindestens 24 Stunden durchgeführt.

Danach wurde die Membran für 5 Minuten in 1 x Phosphatpuffer gewaschen. Eine permanente Fixierung der DNA an die Nylonmembran erfolgte durch beidseitiges Crosslinken (125 J). Die Membran konnte nun vorerst zwischen Filterpapieren aufbewahrt oder direkt weiteren Hybridisierungsexperimenten zugeführt werden.

2.2.18 Hybridisierung und Detektion

Die Herstellung der Dig-markierten Sonden erfolgte mittels einer PCR wie bereits im Rahmen der Northern Blot Analyse beschrieben wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Grundlagen zur vorliegenden Arbeit

Im Rahmen vorangegangener Arbeiten wurden aus CF-Patienten-Sputen gewonnene *S. aureus* Stämme untersucht [101, 102]. Hierunter befanden sich einige Stammpaare, bestehend aus einem phagenfreien Stamm und dessen hlb-konvertiertem Lysogen. Der phagenfreie Stamm (*syn*: Delysogen) ist am Vorhandensein des β -Hämolysins, sowohl durch einem Hämolyse-Hof auf Blutagar als auch durch eine Bande im Bereich von 34kDa in der Gelelektrophorese, zu erkennen. Im Lysogen hingegen unterliegt das β -Hämolysin einer negativen Konversion durch Integration des Phagen innerhalb des *hly*-Gens. (Abb. 3)

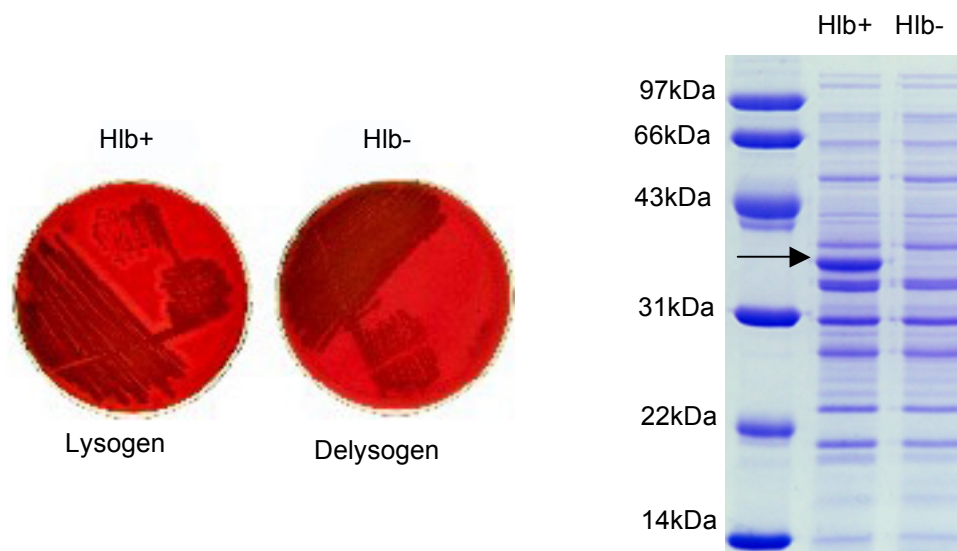


Abb. 3: Darstellung des Hämolysins (HlyB) im Lysogen (HlyB-) und Delysogen (HlyB+) Stammpaar. links: Ausstrich auf Blutagarplatte, rechts: Auftrennung der Überstandsproteine von Delysogen und Lysogen, HlyB-Bande bei 35kDa durch Pfeil markiert. 12%SDS-PAGE mit CBB-Färbung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob diese und weitere Lysogene generell eine Expressionssteigerung verschiedener Virulenzfaktoren im Vergleich zum phagenfreien Stammpartner aufweisen, sowie die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen aufzuklären.

3.2 Wachstumsanalyse eines Stammpaares aus Delysogen und Lysogen

Zunächst wurde - wie bereits im Rahmen der Dissertation von J. Köller dargestellt - eine vergleichende Wachstumsanalyse von phagenfreiem Stamm und dem entsprechenden Lysogen durchgeführt. Hierzu wurde exemplarisch das Stammpaar Mi54a (Delysogen) und Mi54b (Lysogen) kultiviert und die jeweiligen Wachstumsverläufe dokumentiert. Zu allen Messzeitpunkten wiesen Mi54a und Mi54b vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeiten und -muster auf. Somit konnte das Wachstumsverhalten als ein vom Delysogen abweichendes Merkmal des Lysogens ausgeschlossen werden.

3.3 Expressionsanalyse eines Stammpaares aus Delysogen und Lysogen

In den folgenden Untersuchungen sollte das Stammpaar bestehend aus phagenfreiem Stamm und seinem *h/b*-konvertierten Lysogen auf weitere mögliche Unterschiede untersucht werden.

Zur Betrachtung des Protein- Expressionsmusters der Stammpartner Mi54a und Mi54b wurden die im Rahmen vorangegangener Wachstumsanalysen gewonnenen Überstandsproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. Interessanterweise zeigte das Lysogen Mi54b hierbei ein vom Delysogen abweichendes Bandenmuster. Insgesamt konnten fünf deutlich abweichende Banden im Lysogen Mi54b beobachtet werden. Diese zeigten sich insbesondere in der Auftrennung der Proteine, die zum Zeitpunkt t3 geerntet

worden waren. Sie befanden sich im Bereich von 158 kDa (A), 123 kDa (B), 86 kDa (C) sowie bei 35 kDa (D) (Abb. 4).

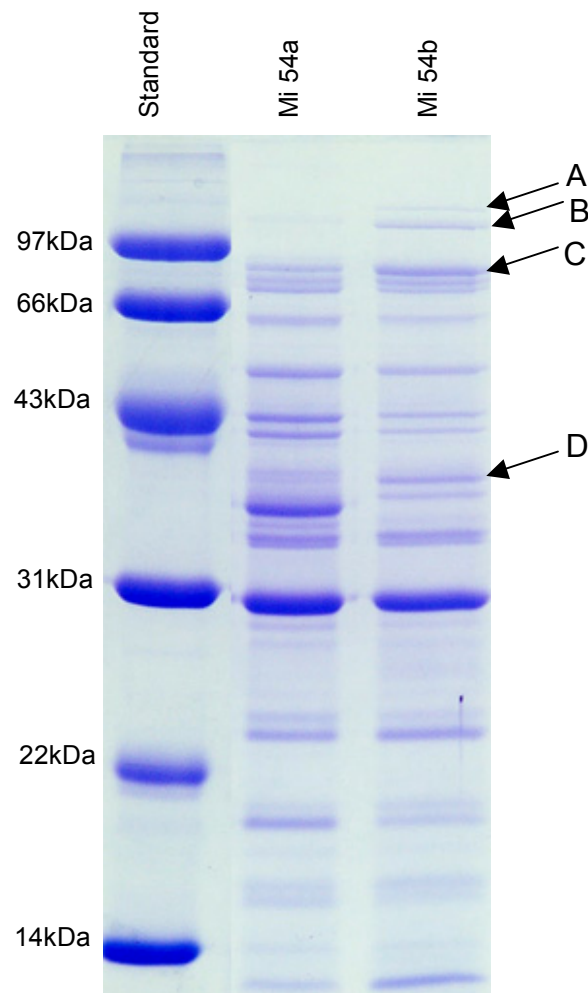


Abb. 4: Auftrennung von Überstandsproteinen (Zeitpunkt t3) der Stämme Mi54a und Mi54b. Differierende Banden durch Pfeile A (158kDa), B (123kDa), C (86 kDa) und D (35kDa) markiert. 12% SDS-PAGE mit CBB-Färbung. Standardmarker Biorad.

Zur näheren Charakterisierung der im Lysogen abweichend exprimierten Proteine wurden die entsprechenden Proteinbanden A-D mittels einer MALDI-TOF-Analyse massenspektrometrisch untersucht. Die Untersuchung zeigte, dass es sich bei den Proteinen um verschiedene Virulenzfaktoren von *S. aureus* handelt. Die Banden A und B enthielten ein Autolysin (codiert durch *atl*).

Als vorrangiger Bestandteil der Bande C konnte eine Glycerol-Ester-Hydrolase (syn.: Lipase, codiert durch *geh*) identifiziert werden. Bei dem Protein der Bande D handelte es sich um SA1813, ein Leukocidin-Homologon. Tabelle 19 fasst die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung zusammen.

Tabelle 19: Ergebnisse der MALDI-TOF-Untersuchung von abweichend exprimierten Proteinen des Stammes Mi54b (Lysogen).

Pfeil	Proteingröße in Dalton (Da)	Protein
A	136.750,58	Autolysin
B	136.750,58	Autolysin
C	76542,91	Glycerol Ester Hydrolase
D	40461,18	SA1813

Nach Identifikation der im Lysogen verstärkt exprimierten Proteine, sollten diese Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Mittels einer Northern Blot Analyse wurde hierzu die Gen-Transkription der Virulenzfaktoren Autolysin und ORF SA1813 in den Stämme Mi54a und Mi54b quantitativ betrachtet. Interessanterweise ließ sich im Lysogen Mi54b eine im Vergleich zum Delysogen signifikante Steigerung der Transkription des Gens ORF SA1813 detektieren. Die stärkste Differenz zum Delysogen ergab sich zum Zeitpunkt t₂, ließ sich jedoch zu allen Zeitpunkten in unterschiedlich schwächerem Ausmaß nachweisen (Abb. 5).

Die Identifizierung von *atl* in der Northern Blot Detektion gelang nicht, wahrscheinlich begründet durch die erhebliche Größe des Autolysin-Transkriptes.

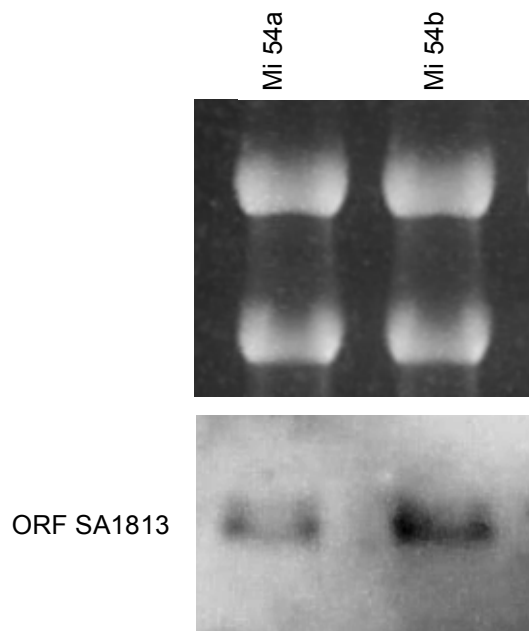


Abb. 5: Northern Blot Analyse mit RNA (Zeitpunkt t3) der Stämme Mi54a und Mi54b (Lysogen) unten: mRNA-Detektion von ORF SA1813; oben: rRNA-Agarosegel als Beladungskontrolle

Somit konnte im Rahmen dieser Expressionsanalysen gezeigt werden, dass auf Proteinebene sowohl von *atl* als auch von ORF SA1813 eine gesteigerte Expression im *hIb*-konvertierten Lysogen vorliegt. In der quantitativen mRNA-Untersuchung gelang ebenfalls der Nachweis einer gesteigerten Transkription im Lysogen, jedoch war dies lediglich für SA1813 möglich.

3.4 Genomloci der Virulenzfaktoren

Durch Betrachtung der Genkarte von *S. aureus* sollte die Lage der vorhergehend identifizierten Virulenzfaktoren sowie ihre Beziehung zum Integrationslocus der *hly*-konvertierenden Bakteriophagen untersucht werden.

Es zeigten sich hierbei die folgenden Lokalisationen. ORF SA1813 befindet sich auf Position 2.052.73, unmittelbar downstream des *hly*-Genes, welches den Integrationslokus *hly*-konvertierender Bakteriophagen darstellt. Somit ergab sich für die untersuchten Lysogene eine direkte Nachbarschaft von Bakteriophagen und erhöht exprimiertem Virulenzfaktor ORF SA1813.

Interessanterweise zeigte sich ein weiterer Virulenzfaktor unmittelbar upstream des *hly*-Gens. Es handelt sich hierbei um das Gen *eap* an der Position 2.003.028, welches somit wie ORF SA1813, eine direkte Nachbarschaft zum integrierten *hly*-Phagen aufweist. Um zu klären, ob auch *eap* einer verstärkten Transkription im Lysogen unterliegt, wurde dieser Virulenzfaktor in den folgenden Versuchen untersucht.

Der Genlokus des Autolysins befand sich auf Position 1.026.342, an einer entfernten Stelle im Genom von *S. aureus*, und wies somit keine direkte Lagebeziehung zum integrierten Bakteriophagen auf.

Abbildung 6 veranschaulicht die Lagebeziehung der beiden Virulenzfaktoren *eap* und ORF SA1812, SA1813 zum *hly*-konvertierenden Phagen in den untersuchten Lysogenen.



Abb. 6: Darstellung der Lage der Gene ORF SA1812, SA1813, *eap* und des integrierten *hly*-Phagen im *S. aureus* Stamm 8325-4

3.5 Untersuchung weiterer Stammpaare aus CF-Patienten-Sputen

Die vorhergehenden Untersuchungen wurden exemplarisch an dem CF-Stammpaar Mi54a und Mi54b durchgeführt. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die beobachteten Differenzen im Genexpressionsmuster von phagenfreiem Stamm und Lysogen lediglich auf dieses Stammpaar beschränkt oder ebenso in weiteren *hIb*-konvertierten Lysogenen anzutreffen sind, wurde erneut die Gentranskription von ORF SA1813, sowie zusätzlich von *eap* durch Northern Blot-Analyse quantitativ untersucht. Hierzu wurden weitere Stammpaare der CF-Patienten-Sputen, bestehend aus einem phagenfreien Stamm und dessen *hIb*-konvertierten Lysogen mit ansonsten genomisch identischem Hintergrund, ausgewählt. Es handelte sich um die Paare S64c und S64 ϕ S64, S80c und S80 ϕ S80 sowie S84c und S84 ϕ S84.

Die Untersuchung ergab bei allen betrachteten Lysogenen eine vergleichbar erhöhte mRNA-Transkriptionsrate von ORF SA1813 im Vergleich zum jeweiligen Delysogen. Die größte Differenz der Transkriptmengen konnte zum Zeitpunkt t2 nachgewiesen werden (Abb. 6). Andere Untersuchungszeitpunkte wiesen ebenfalls eine Steigerung der mRNA-Transkription im Lysogen auf, jedoch war die Differenz der Expression beider Stammpartner wesentlich geringer. Interessanterweise ergab die Untersuchung des Virulenzfaktors *eap* ebenfalls eine erhöhte mRNA-Transkription in allen Lysogenen (Abb. 7). Der zeitliche Verlauf mit einem Maximum der Differenz zum Zeitpunkt t2 entsprach den Beobachtungen bezüglich des Gens ORF SA1813.

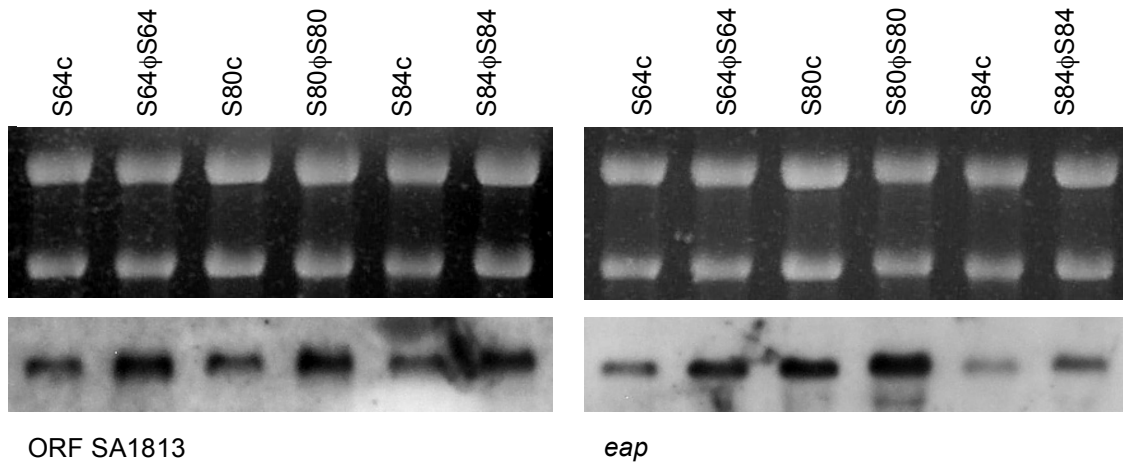


Abb. 7: Northern Blot Analyse mit RNA (Zeitpunkt t3) der Stämme S64c, S64, S80c, S80, S84c und S84. unten: mRNA-Detektion von ORF SA1813 (rechts) und *eap* (links). oben: rRNA-Agarosegele als Beladungskontrolle.

Somit konnte gezeigt werden, dass beide Virulenzfaktoren, die sich in direkter Nachbarschaft des *hly*-Genes befinden, nach Integration eines Bakteriophagen eine gesteigerte Transkription aufweisen. Des Weiteren ergab sich aus diesen Untersuchungen, dass es sich bei dieser Transkriptionssteigerung nicht um ein isoliertes Phänomen eines Stammpaares, sondern um ein in unterschiedlichen Isolaten in vergleichbarem Ausmaß und zeitlichem Verlauf reproduzierbares Ereignis handelt.

3.6 Verschiedene Phagen im gleichen Stammhintergrund im Stamm S64

Bisher konnten eine erhöhte mRNA-Transkription von ORF SA1813 und *eap* sowie ein differierendes Protein-Bandenmuster in den Lysogenen verschiedener Stammpaare aus CF-Sputen beobachtet werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob diese Veränderungen im Lysogen eine Abhängigkeit von einem bestimmten *h1b*-Phagen aufweisen oder ein generelles Phänomen unabhängig von einem bestimmten Bakteriophagen vorliegt. Zunächst wurden verschiedene Lysogene des Stammes S64c untersucht. Die Lysogene enthielten ϕ S64, den ursprünglichen Phagen des Stammes S64, den Phagen ϕ S80 aus dem Stamm S80 sowie den Phagen ϕ 13 aus dem Stamm 8325-4.

In der SDS-PAGE ließ sich auch nach Austausch des integrierten Phagen in allen Lysogenen eine erhöhte Expression des Proteins ORF SA1813 im Bereich von 35kDa beobachten. Diese konnte jedoch nur bei Untersuchung der Überstandsproteine des Zeitpunktes t3 beobachtet werden (Abb. 8). Die Untersuchung der mRNA-Transkription von ORF SA1813 und *eap* konnte ebenso in allen Lysogenen eine im Vergleich zum Delysogen deutlich gesteigerte Transkription beider Virulenzfaktoren zeigen. Während in der Proteinelektrophorese einzig zum Zeitpunkt t3 eine Expressionsdifferenz zu beobachten war, lieferte auf RNA-Ebene der Zeitpunkt t2 die stärkste Expressionssteigerung der beiden untersuchten Gene im Lysogen (Abb. 9). Andere Untersuchungszeitpunkte wiesen diese Differenz ebenfalls, jedoch in deutlich geringerem Maße, auf. Durch diese Untersuchungen konnte die Abhängigkeit des beobachteten Effektes von einem bestimmten *h1b*-konvertierenden Bakteriophagen ausgeschlossen werden.

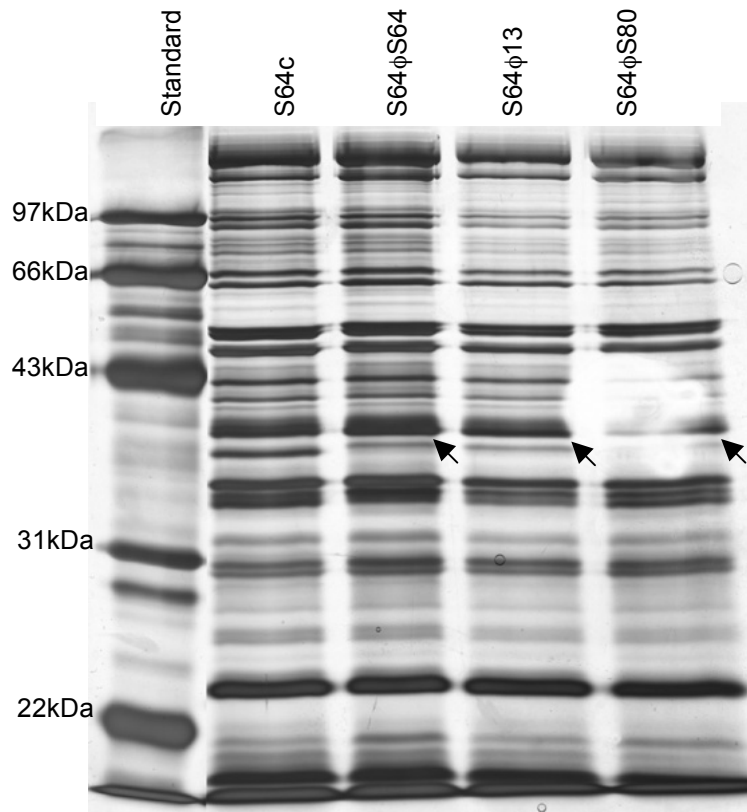


Abb. 8: Auftrennung der Überstandsproteine (Zeitpunkt t3) der Stämme S64c, S64, S4φ13 und S64φS80. ORF SA1813 im Bereich von 35 kDa. 12% SDS-PAGE mit Silberfärbung (CBB nicht sensitiv genug). Standardmarker Biorad.

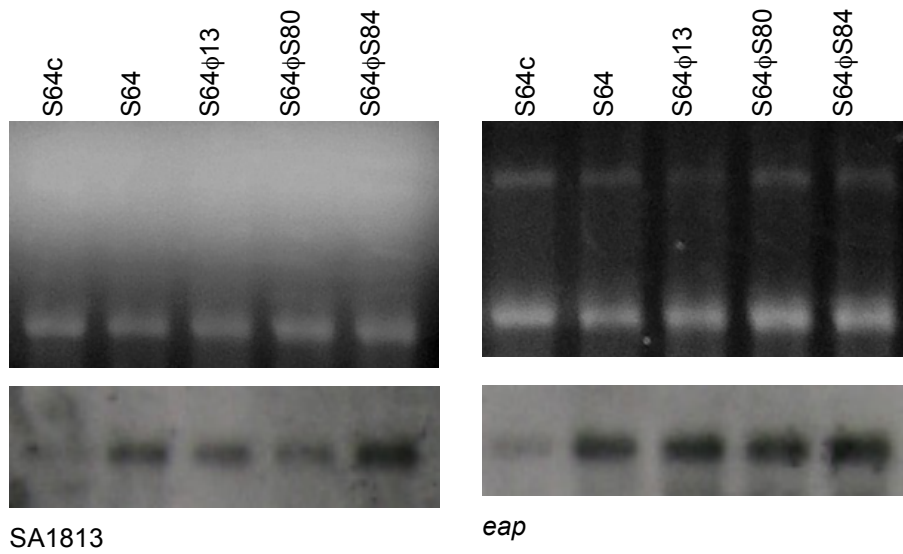


Abb. 9: Northern Blot Analyse mit RNA (Zeitpunkt t2) der Stämme S64c, S64, S64 ϕ 13, S64 ϕ S80, S64 ϕ S84. unten: mRNA-Detektion von ORF SA1813 (rechts) und *eap* (links). oben: rRNA-Agarosegel als Beladungskontrolle.

3.7 Verschiedene Phagen im gleichen Stammhintergrund im Laborreferenzstamm 8325-4

Die bisherigen Versuche wurden an kaum charakterisierten Stämmen aus Sputumisolaten von CF-Patienten durchgeführt. Aufgrund dessen sollte der vorhergehende Versuch erneut an dem gut charakterisierten Laborreferenzstamm 8325-4 durchgeführt werden. Die hierbei untersuchten Lysogene des Laborreferenzstammes enthielten die Phagen $\phi 13$, den ursprünglichen Phagen dieses Stammes, sowie die Phagen $\phi S64$, $\phi S80$ und $\phi S84$ der CF-Isolat-Stämme.

Auch bei Verwendung des Laborreferenzstammes wiesen alle untersuchten Lysogene in der Proteinelektrophorese eine im Vergleich zum phagenfreien Stamm 8325-4 erhöhte Expression von ORF SA1813 auf. Die stärkste Ausprägung der ORF SA1813 Bande ließ sich zum Zeitpunkt t2 darstellen. Weitere Differenzen im Bandenmuster des Lysogens konnten im Bereich von 32-29 kDa beobachtet werden (Abb. 10).

Zur Untersuchung der Lysogene auf RNA-Ebene wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Wie Abbildung 11 verdeutlicht, wiesen hierbei alle Lysogene eine gesteigerte mRNA-Expression der beiden untersuchten Virulenzfaktoren ORF SA1813 und *eap* auf. Die größte Differenz der Transkription in Lysogen und Delysogen ergab sich hierbei zum Zeitpunkt t3.

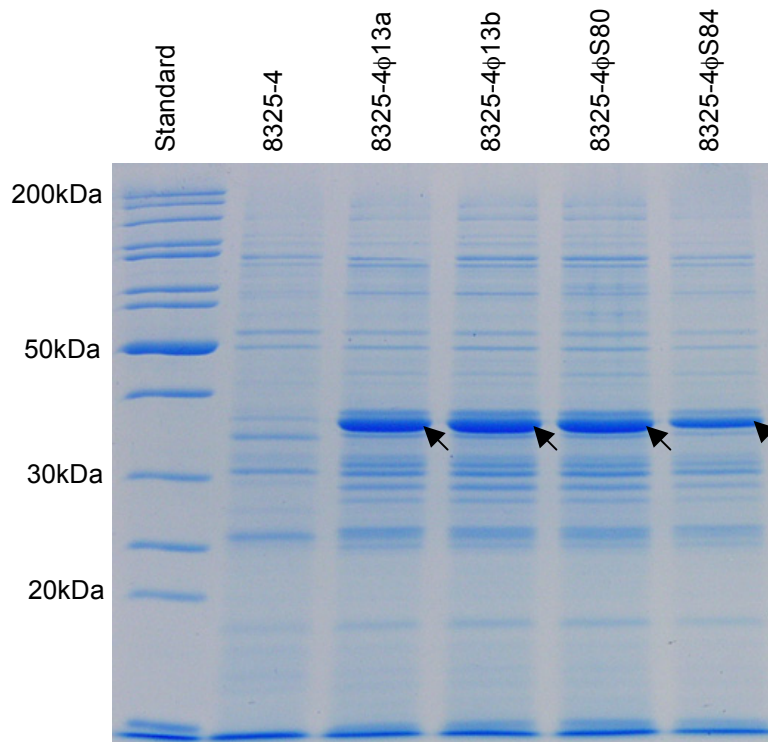


Abb. 10: Auftrennung von Überstandsproteinen (Zeitpunkt t2) der Stämme 8325-4, 8325-4φ13a, 8325-4φ13b, 8325-4φS80 und 8325-4φS84. 12% SDS-PAGE mit CBB-Färbung. Standardmarker Fermentas.

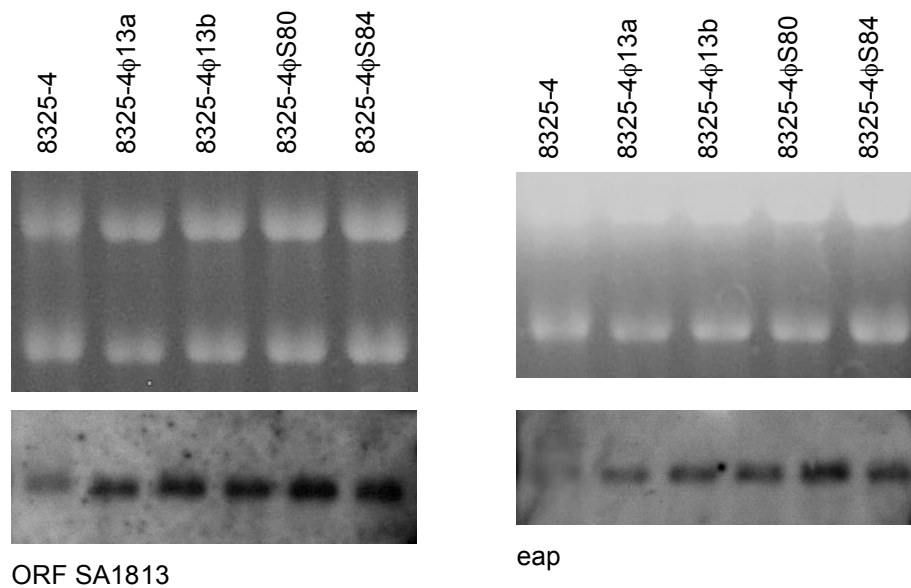


Abb. 11: Northern Blot Analyse mit RNA (Zeitpunkt t3) der Stämme 8325-4, 8325-4φ13a, 8325-4φ13b, 8325-4φS80 und 8325-4φS84. unten: mRNA-Detektion von ORF SA1813 (rechts) und *eap* (links). unten: rRNA-Agarosegel als Beladungskontrolle.

Mit diesem Versuch konnte somit gezeigt werden, dass auch unter Verwendung des Laborreferenzstammes und verschiedener Lysogene dieses Stammes der beobachtete Effekt reproduzierbar ist. Alle weiteren Untersuchungen konnten nun an diesem gut charakterisierten Referenzstamm durchgeführt werden.

3.8 Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Expressionsdifferenz im Delysogen / Lysogen Stammpaar

Bei den vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich, dass lediglich ein enges Zeitfenster zur Darstellung der gesteigerten Expression im Lysogen existiert. Aufgrund dessen sollte in einer Zeitreihe die Dynamik des Effektes aufgezeigt werden. Hierzu wurden halbstündlich geerntete Überstandsproteine des Stammpaares 8325-4 und 8325-4 ϕ 13 in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Im Vergleich zum Delysogen konnte gesteigerte Expression von ORF SA1813 im Lysogen erstmals ab einem 5 stündigem Wachstum beobachtet werden. Die stärkste Expressionsdifferenz zwischen Delysogen und Lysogen ergab sich nach einem 6 stündigen Wachstum und nahm im Anschluss wieder ab. Über Nacht ergab sich keine erneute Steigerung der Expressionsdifferenz. Bei diesen Untersuchungen wurden zwei unabhängig voneinander entstandene Lysogen-Kolonien des Stammes 8325-4 ϕ 13 verwendet, um einen zufälligen Effekt eines einzelnen Stammes sicher auszuschließen. (keine Abbildung)

Bereits in der CBB-Färbung wurden neben der erhöhten Expression von ORF SA1813 im Lysogen, insbesondere nach weiterem Wachstum über Nacht, zusätzliche Unterschiede im Bandenmuster beobachtet. Durch eine sensitivere Darstellung mittels Silberfärbung konnten im Laufe des Wachstums zahlreiche weitere Abweichungen im Bandenmuster des Lysogens verglichen mit dem phagenfreien Laborreferenzstamm 8325-4 nachgewiesen werden (Abb. 12). Diese wurden jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht genauer charakterisiert.

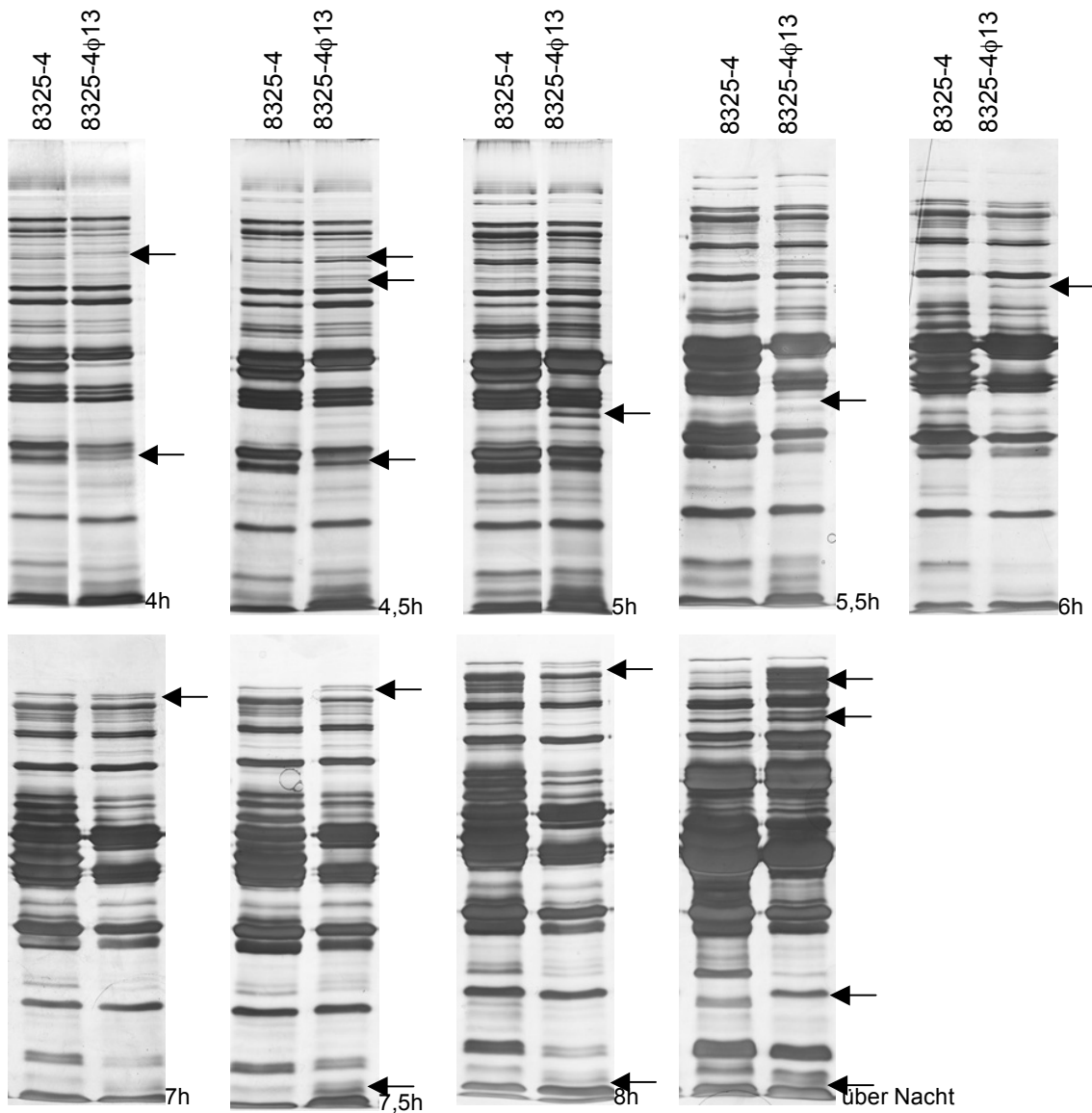


Abb. 12: Auftrennung von Überstandsproteinen der Stämme 8325-4 (1) und 8325-4 ϕ 13 (2). Unterschiede in den Bandenmustern mit Pfeilen markiert. 12% SDS-PAGE mit Silberfärbung.

Mit diesen Versuchen konnte somit gezeigt werden, dass es sich bei der Expressionssteigerung der *hIb*-konvertierten Lysogene um einen dynamischen Prozess handelt, dessen optimale Darstellung nur in einem engen Zeitfenster möglich ist. Zusätzlich konnten neue Unterschiede in der Proteinexpression von Lysogen und Delysogen beobachtet werden. Durch Verwendung unabhängiger Kolonien des Lysogens konnte hierbei ein zufälliger Effekt eines einzelnen Stammes ausgeschlossen werden.

3.9 Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Genexpression im Stammpaar 8325-4 / 8325-4 ϕ 13

Wachstumsbedingungen und das Nährstoffangebot nehmen sowohl in vivo als auch in vitro Einfluss auf das Expressionsmuster bakterieller Gene. Zur Untersuchung der Auswirkung veränderter Umgebungsfaktoren auf die beobachtete Expressionssteigerung von ORF SA1813 und *eap* in den *hlyB*-konvertierten Lysogenen, wurden *S. aureus* Stammpaare unter variierten Anzuchtbedingungen kultiviert und ihre Proteinexpression sowie RNA-Transkription betrachtet. Hierzu wurde das Expressionsmuster von *S. aureus* unter Verwendung verschiedener Wachstumsmedien untersucht. Verwendet wurden die nährstoffärmeren Medien TSB und LB, im Vergleich zu dem bisher verwendeten Standardmedium CYPG. Es zeigte sich nach Wachstum in allen drei Medien eine Expressionssteigerung von ORF SA1813 in der Proteinelektrophorese sowie eine verstärkte mRNA-Transkription der untersuchten Virulenzfaktoren ORF SA1813 und *eap* im Lysogen verglichen mit dem phagenfreien Stamm 8325-4. Neue bzw. zusätzliche Veränderungen des Expressionsmusters traten unter den veränderten Bedingungen nicht auf. Jedoch verschlechterte sich bei Verwendung der Medien TSB und LB die allgemeine Darstellung sowohl in der SDS-PAGE als auch in der Northern Blot Analyse aufgrund einer insgesamt schwächeren Genexpression in diesen nährstoffärmeren Medien (nicht dargestellt).

3.10 Einfluss von Ciprofloxacin auf die Genexpression im Stammpaar 8325-4 / 8325-4 ϕ 13

Des Weiteren wurden der Einfluss einer Zugabe subinhibitorischer Konzentrationen verschiedener Antibiotika auf die Expression im Lysogen 8325-4 ϕ 13 verglichen mit dem phagenfreien Stammpartner 8325-4 untersucht. Bei den verwendeten Antibiotika handelte es sich Trimethoprim und Ciprofloxacin. Nach Zugabe von Trimethoprim konnte sowohl auf Protein- als

auch auf RNA-Ebene weiterhin eine Expressionssteigerung von ORF SA1813 und *eap* im Lysogen beobachtet werden. Jedoch kam es im Vergleich zum Wachstum ohne Antibiotikum zu keinerlei Veränderung bzw. Steigerung dieses Effektes. Interessanterweise zeigte sich hingegen nach Zugabe von Ciprofloxacin eine weitere Steigerung der vermehrten Expression im Lysogen im Vergleich zur Expression im Delysogen. Im phagenfreien Stamm hingegen blieb die Expression mit und ohne Ciprofloxacinzugabe identisch. (Abb. 14). Dieses Ergebnis ließ sich jedoch nicht konstant reproduzieren.

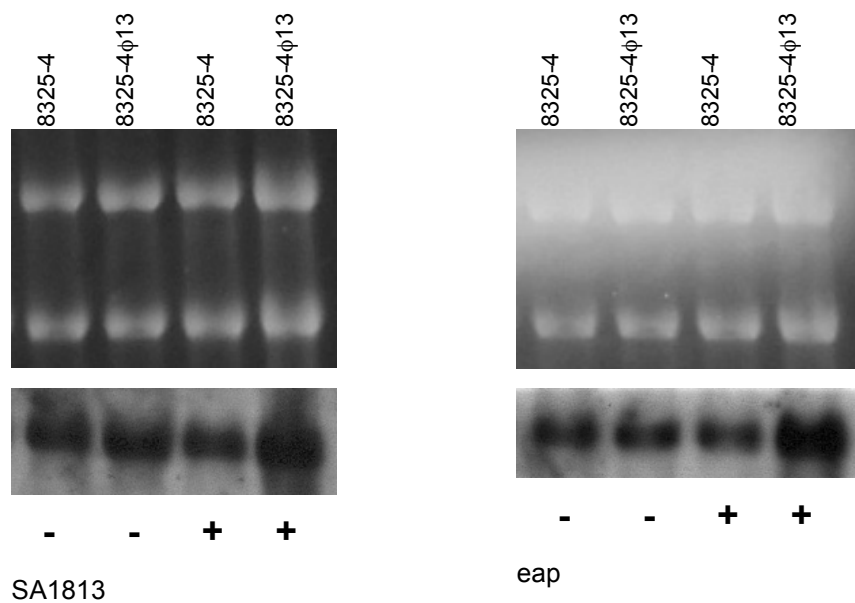


Abb. 13: Northern Blot Analyse mit RNA (Zeitpunkt t_3) der Stämme 8325-4 und 8325-4 ϕ 13 ohne (-) und mit (+) Ciprofloxacin-Zugabe. Unten: mRNA-Detektion von ORF SA1813 (rechts) und *eap* (links). Oben: rRNA-Agarosegel als Beladungskontrolle.

Es ergab sich hieraus, dass die Zugabe von Trimethoprim im Rahmen des bakteriellen Wachstums keine Veränderung der bisher beobachteten Expressionsdifferenz zwischen Lysogen und Delysogen bewirkt, der beobachtete Effekt jedoch auch unter diesen Bedingungen reproduzierbar ist. Interessanterweise rief die Zugabe des Antibiotikum Ciprofloxacin eine weitere Steigerung der erhöhten Expression im Lysogen unter gleichzeitiger Konstanz der Expression im Delysogen hervor und lässt somit einen Antibiotika-abhängigen Effekt auf die bisherigen Beobachtungen im Lysogen annehmen.

3.11 Untersuchungen möglicher Regulationsmechanismen in Delysogen / Lysogen Stammpaaren

Die bisherigen Versuche konnten zeigen, dass *hly*-konvertierte Lysogene sowohl der CF-Isolate als auch des Referenzstammes 8325-4 eine im Vergleich zum Delysogen gesteigerte Expression der Virulenzfaktoren ORF SA1813 und *eap* aufweisen, jedoch bislang ohne Kenntnis einer zugrunde liegenden Ursache. Im Folgenden sollten mögliche Mechanismen und Regulationen des beobachteten Effektes untersucht werden.

3.11.1 Untersuchung der Regulatoren *agr* und *sae*

Zwei zentrale Regulatoren von *S. aureus* sind das *agr*-System und der Zweikomponentenregulator *sae*. Ebenso wie viele andere Virulenzfaktoren des Bakteriums unterliegen ORF SA1813 und *eap* ihrer Steuerung. Zur Untersuchung einer möglichen Einflussnahme dieser Regulatorgene auf die Expressionssteigerung in den *hly*-konvertierten Lysogene wurden Protein- und mRNA-Expressionsanalysen in regulatordefizienten Mutanten verglichen mit regulatorintakten Vertretern der Stämme 8325-4 und 8325-4 ϕ 13. In den Untersuchungen auf Proteinebene ließ sich sowohl in den regulatordefizienten als auch in den -intakten Lysogenen die vorangehend beobachtete Expressionssteigerung von ORF SA1813 nachweisen. Jedoch lagen keine weiteren Veränderungen, wie beispielsweise eine Verminderung oder Verstärkung, des Effektes in den Regulatormutanten vor. Im Rahmen der Northern Blot-Analyse war in keinem der regulatordefizienten Stämme eine mRNA-Detektion der Virulenzfaktor-Transkripte möglich, wahrscheinlich begründet durch eine Verminderung der Genexpression infolge des Ausfalls der Regulatorgene (nicht dargestellt).

3.11.2 Untersuchung der Promotoren von *eap*, ORF SA 1813 und *atl* durch Promotorassays

Im folgenden Versuch sollte betrachtet werden, ob die Promotoren der untersuchten Virulenzfaktoren durch eine verstärkte Aktivität die beobachtete Expressionssteigerung in den Lysogenen hervorrufen. Hierzu wurden verschiedene Plasmide in die Bakterienstämme eingebracht, welche die jeweiligen Promotoren der Gene ORF SA1813, *eap* und *atl* sowie das *lacZ* Gen enthielten. Sofern möglich wurden diese Plasmide sowohl in die Stämme S64c und S64 als auch in den Laborreferenzstamm 8325-4 und seine Lysogene transduziert. Mit einem Promotor-Assay wurde anschließend das Ausmaß der β -Galaktosidase-Expression quantitativ bestimmt. Bei diesen Untersuchungen wurden, sofern vorhanden, zwei unabhängig voneinander entstandene Kolonien verwendet, um einen zufälligen Effekt einzelner Stämme auszuschließen. Diese lieferten jedoch bei allen Versuchen identische Ergebnisse und werden deshalb im Folgenden nicht getrennt aufgeführt.

Zunächst wurde die Aktivität des ORF SA1813-Promotors in den Stämmen S64c und S64 sowie 8325-4 und seinen Lysogenen mit den Phagen ϕ 13 und ϕ S64 untersucht. Es ergab sich bei Betrachtung der unterschiedlichen Wachstumsphasen eine insgesamt stärkere Aktivität zum Zeitpunkt t2 mit durchschnittlich 0,3 ng β -Galaktosidase als zum Zeitpunkt t3 mit ca. 0,2 ng des Enzyms. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte eine signifikant höhere β -Galaktosidase-Menge bei den Lysogenen verglichen mit den Delysogenen beobachtet werden. Laborreferenzstamm und CF-Isolatstämme wiesen hierbei keinen Unterschied auf, wenngleich in den CF-Stämmen durchschnittlich eine geringfügig höhere Menge β -Galaktosidase exprimiert wurde. (Abb. 14)

Die Betrachtung des *eap*-Promotors erfolgte ausschließlich im Laborreferenzstamm 8325-4 und seinem Lysogen 8325-4 ϕ 13, da die Transduktion in die übrigen Stämme missglückte. Die Untersuchungsergebnisse lieferten eine insgesamt deutlich höhere Enzymmenge, als bei den vorangegangenen Untersuchungen des ORF SA1813-Promotor, mit nun durchschnittlich 2,4 ng β -Galaktosidase. Zusätzlich

stellte sich die Differenz der Expressionsmengen zu den verschiedenen Wachstumsphasen wesentlich deutlicher dar. Zum früheren Untersuchungszeitpunkt t2 konnte 3,9ng β -Galaktosidase vermerkt werden, während dies zum später Zeitpunkt t3 lediglich noch 0,9ng waren. Die Lysogene wiesen mit 4,8ng (t2) und 1,1ng (t3) eine geringfügig, jedoch nicht signifikant, höhere β -Galaktosidase-Expression als das Delysogen mit 3,4(t2) und 0,9 ng (t3) auf. (Abb. 15)

Bei der Untersuchung des *atl*-Promotors konnten nur sehr geringe β -Galaktosidase-Mengen, meist jedoch gar keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Somit konnten bezüglich dieses Promotors keine weiteren Untersuchungen vorgenommen werden (keine Abb.).

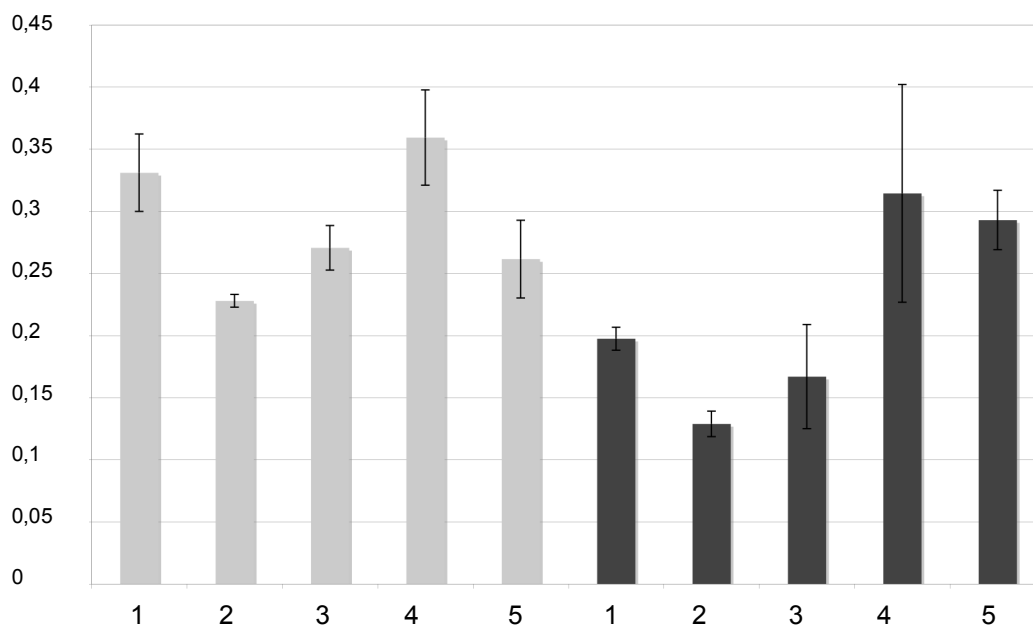


Abb. 14: Aktivität des Promotors von ORF SA1813; y: β -Galaktosidase in ng, x: Stämme 1:8325-4, 2:8325-4 ϕ 13, 3:8325-4 ϕ S64, 4:S64c, 5:S64. graue Säulen: t2, schwarze Säulen: t3.

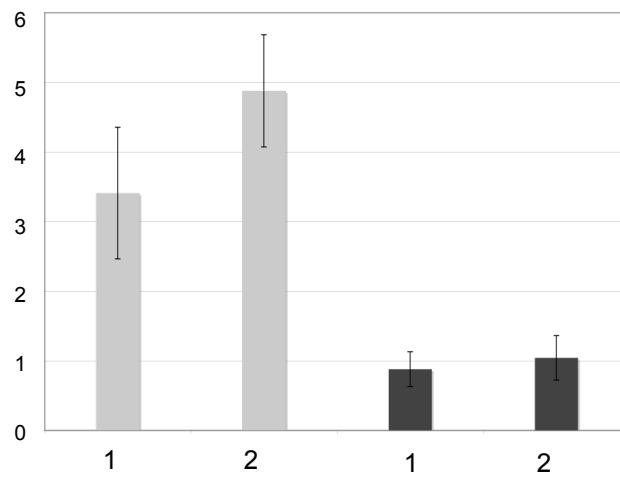


Abb. 15: Aktivität des Promotors von *eap*. y: β -Galaktosidase in ng, x: Stämme 1: 8325-4, 2: 8325-4 ϕ 13. graue Säulen: t2, schwarze Säulen: t3.

3.12 Betrachtung der Expression in Lysogenen anderer Bakteriophagengruppen

Die bei *S. aureus* weit verbreiteten Bakteriophagen gehören zu einer Vielzahl verschiedener Phagen-Gruppen mit unterschiedlichen Integrationsloci im bakteriellen Genom. Die in den vorangehenden Versuchen beobachtete verstärkte Expression zweier Virulenzfaktoren wurde bisher nur an Lysogenen mit Integration eines *hly*-konvertierenden Bakteriophagen gezeigt. Gegenstand der folgenden Untersuchungen sollte die Betrachtung weiterer Bakteriophagengruppen mit abweichenden Integrationsorten im *S. aureus*-Genom sein. Zu klären galt es, ob in diesen Stämmen ebenfalls ein abweichendes Expressionsmuster in den Lysogenen besteht. Hierzu wurde die Proteinexpression verschiedener Lysogene des Laborreferenzstammes mit dem Delysogen 8325-4 verglichen. Bei den Bakteriophagen der untersuchten Lysogene handelte es sich um drei Vertreter der 3A-like Phagen ϕ mw2, ϕ Sa4ms sowie ϕ L54, einen Vertreter der 11-like-Phagen ϕ m46, sowie den nicht klassifizierten Phagen ϕ 6390.

Die Ergebnisse lieferten je nach Lysogen unterschiedliche Abweichungen im Expressionsmuster.

Im Falle des Phagen ϕ mw2 ließ sich in der Gelelektrophorese eine deutliche Steigerung der ORF SA1813 Bande (ca. 36 kDa) beobachten. Jedoch ist dies wahrscheinlich auf die Codierung eines Leukocidins im Phagengenom zurückzuführen, welches eine mit ORF SA1813 vergleichbare Proteingröße aufweist. Die darunter liegende *hly*-Bande (ca. 35 kDa) stellte sich ebenfalls wesentlich stärker dar, verglichen mit dem Delysogen 8325-4. Weitere Veränderungen im Lysogen konnten bei 133 kDa, 110 kDa, 71 kDa, 62 kDa, 42 kDa, 31-32 kDa und 24 kDa nachgewiesen werden. (Abb. 16).

Bei Betrachtung des Phagen ϕ 6390 konnten wesentlich weniger Differenzen beobachtet werden. Die einzigen deutlich differierenden Banden konnten hierbei im Bereich von 27 kDa und 20 kDa beobachtet werden. (Abb. 16)

Die Stämme 8325-4 ϕ mw2 und 8325-4 ϕ 6390 wurden ausschließlich zum Zeitpunkt t2 untersucht, so dass keine Aussage bezüglich einer zeitlichen Dynamik der Expressionsdifferenz möglich ist.

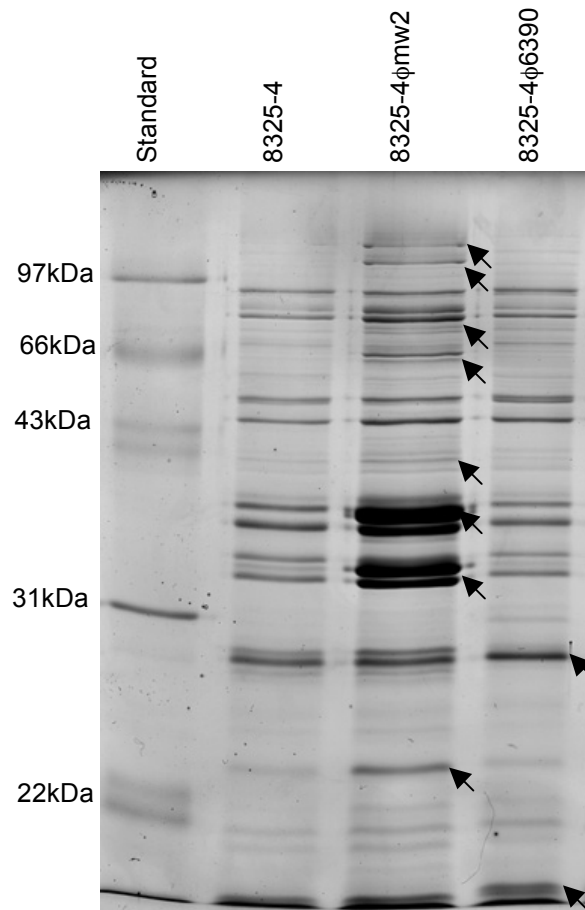


Abb. 16: Überstandsproteine (Zeitpunkt t2) der Stämme 8325-4, 8325-4 ϕ mw2, 8325-4 ϕ 6390 zum Zeitpunkt t2. 12% SDS-PAGE mit CBB-Färbung. Standardmarker Biorad.

Bei dem Lysogen 8325-4 ϕ M46 ließen sich keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zum Delysogen 8325-4 beobachten.

Der Stamm 8325-4 ϕ Sa4ms zeigte im Bereich von 26 kDa ein abweichendes Bandenpaket. Der Stamm 8325-4 ϕ L54 wies Unterschiede im Bereich von 75 kDa, 40 kDa und 26 kDa auf. (Abb. 17) In der sensitiveren Silberfärbung konnten keine weiteren Unterschiede beobachtet werden. (nicht dargestellt)

Wie Abbildung 18 verdeutlicht, ließen sich auch in diesem Versuch je nach Untersuchungszeitpunkt unterschiedliche Beobachtungen machen. Während zum Zeitpunkt t2 alle zuvor aufgeführten Unterschiede vorhanden waren, zeigten sich zum Zeitpunkt t3 lediglich noch die Veränderung des Stammes 8325-4 ϕ L54 im Bereich von 40 kDa. Wie bereits in vorangehenden Versuchen, wurden, sofern vorhanden, unabhängig voneinander entstandene Lysogene verwendet, um einen zufälligen Effekt eines einzelnen Stammes ausschließen zu können.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu den *hIb*-konvertierten Lysogenen, ebenso Lysogene mit Bakteriophagen an bisher nicht untersuchten Integrationsorten ein vom Delysogen abweichendes Proteinexpressionsmuster aufweisen. Diese Abweichungen unterschieden sich von denen bei Betrachtung *hIb*-konvertierender Phagen. Darüber hinaus lieferten die untersuchten Bakteriophagen untereinander unterschiedliche Expressionsabweichungen vom Proteinmuster des phagenfreien Stammes 8325-4. Diese Ergebnisse wurden jedoch bislang nicht reproduziert, so dass weitere Untersuchungen, insbesondere auch unter näherer Charakterisierung der Expressions-veränderten Proteine, nötig sind.

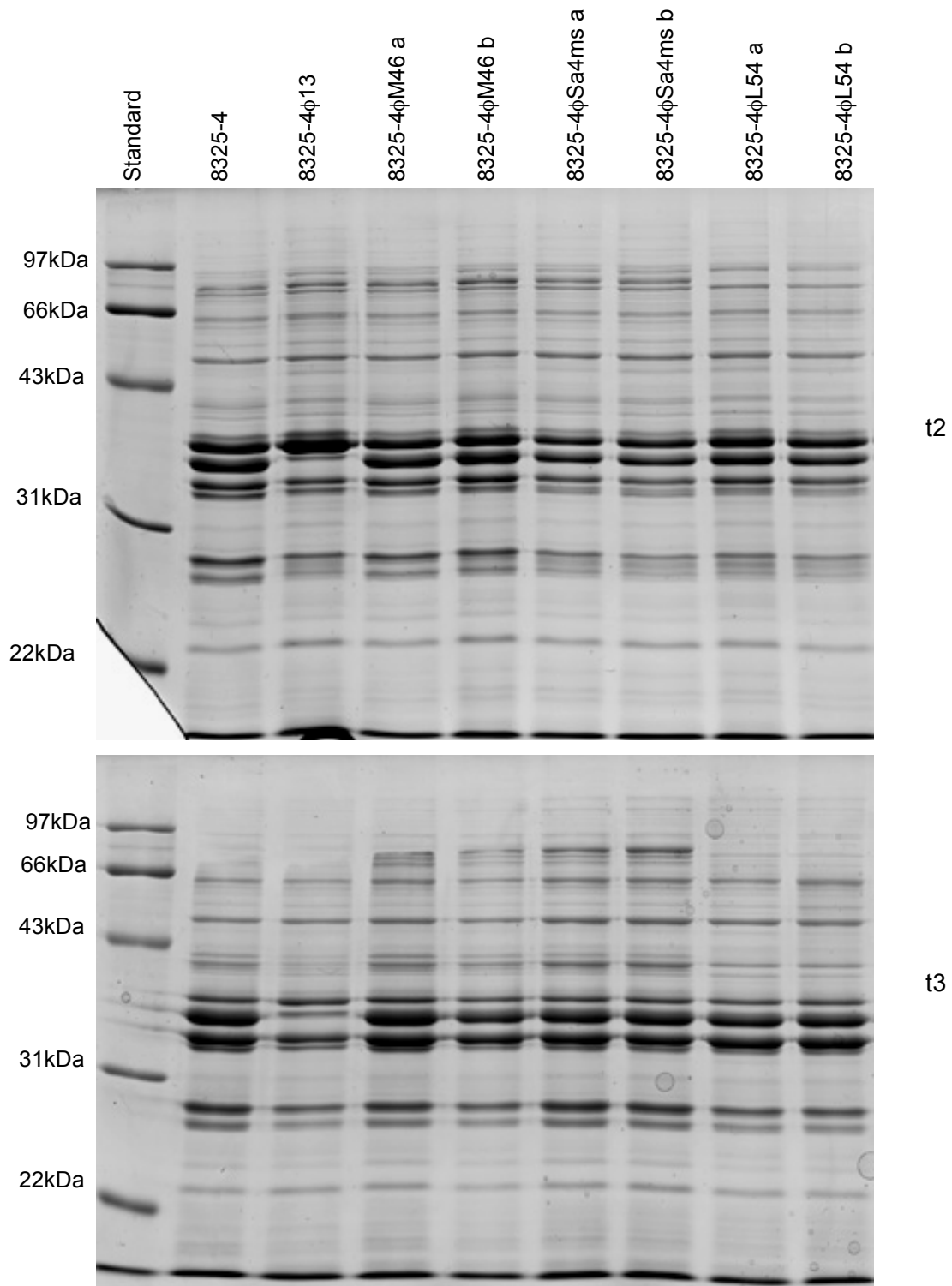


Abb. 17: Auftrennung von Überstandsproteinen (Zeitpunkt t2 oben, t3 unten) der Stämme 8325-4, 8325-4 ϕ 13, 8325-4 ϕ M46 a, 8325-4 ϕ M46 b, 8325-4 ϕ Sa4ms a, 8325-4 ϕ Sa4ms b, 8325-4 ϕ L54 a, 8325-4 ϕ L54 b. 8325-4 ϕ 13 zum Vergleich aufgetragen. 12% SDS-PAGE mit CBB-Färbung. Standardmarker Biorad.

3.13 Betrachtung der Expression bei Integration eines Plasmids am *h1b*-Phagen Integrationsort

Im den vorhergehenden Ausführungen konnte gezeigt werden, dass die Integration eines Bakteriophagen eine Veränderung des bakteriellen Expressionsmusters zur Folge hat.

Abschließend sollte die Frage untersucht werden, ob es sich bei diesen Beobachtungen um einen phagenspezifischen Effekt handelt oder ob lediglich die Integration eines beliebigen Nukleinsäurefragmentes bzw. eine Unterbrechung der bakteriellen DNA an der entsprechenden *attachment*-Stelle des Phagen eine Expressionsmodifikation bewirkt. Hierzu wurden Stämme betrachtet, bei denen an Phagen-Integrationsort im *h1b*-Gen anstelle des Bakteriophagengenoms der Abschnitt eines beliebigen Plasmids, hier das Plasmid pCG33, eingebracht wurde.

Wie Abbildung 18 verdeutlicht zeigte sich in der SDS-Gelelektrophorese tatsächlich nach Plasmidintegration die gleiche 35kDa-Bande sowie weitere Unterschiede vergleichbar mit denen der dargestellten Lysogenen.

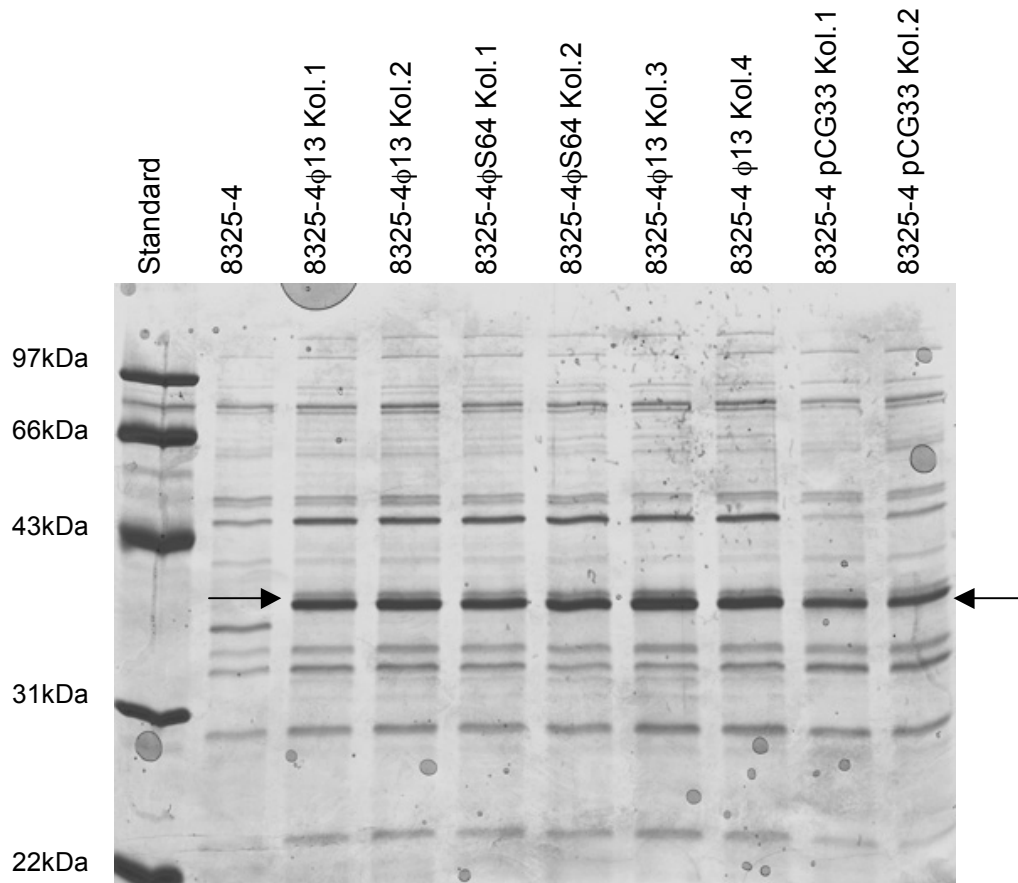


Abb. 18: Auftrennung von Überstandsproteinen (zum Zeitpunkt t2) der Stämme 8325-4, 8325-4 ϕ 13 Kol.1, 8325-4 ϕ 13 Kol.2, 8325-4 ϕ S64 Kol.1, 8325-4 ϕ S64 Kol.2, 8325-4 ϕ 13 Kol.3, 8325-4 ϕ 13 Kol.4, 8325-4 pCG33 Kol.1, 8325-4 pCG33 Kol.2 12% SDS-PAGE mit CBB-Färbung. Standardmarker Biorad.

4. Diskussion

4.1 Einfluss von Bakteriophagen auf ihren bakteriellen Wirtsorganismus

Bakterien und Bakteriophagen stehen als Wirt und Parasit in einem engen biologischen Verhältnis zu einander. Als Ergebnis einer andauernden Auseinandersetzung haben sie wechselseitig große Bedeutung für die biologische Diversität des jeweils anderen Organismus [90, 103].

Bakteriophagen üben über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Rekombination des bakteriellen Genoms aus. In der Literatur sind folgende Beispiele bereits ausführlich beschrieben: Rearrangements des bakteriellen Genoms infolge lysogener Konversion [83, 95], Austausch von Wirtsgenomabschnitten über Transduktion [83] sowie die negative (z.B. β -Hämolysin, Lipase) und positive (z.B. sak, Panton-Valentin-Leukocidin, Exotoxine) Konversion [20, 92], bei welcher aufgrund von Integration und Induktion temperenter Bakteriophagen das bakterielle Expressionsmuster um ein viral codiertes Protein bereichert wird. Darüber hinaus sind verschiedene Mechanismen bekannt, welche Phagen befähigen, die bakteriellen Replikationssysteme für ihre eigene Vervielfältigung zu benutzen [103].

In der vorliegenden Arbeit steht nun ein weiterer, bisher wenig betrachteter Aspekt der bakteriell-viralen Interaktion im Vordergrund: eine *viral-induzierte* Steigerung des Expressionsniveaus *bakterieneigener* Virulenzfaktoren.

Grundlage der Arbeit waren Proteinuntersuchungen von *S. aureus* Isolaten aus CF-Patienten, bei welchen Unterschiede in der Expression phagenfreier Stämme und deren entsprechenden *h1b*-konvertierten Lysogenen auftraten. In unseren ersten Untersuchungen des zunächst exemplarisch betrachteten Lysogens Mi54b zeigten sich auf Protein- und mRNA-Ebene sowohl eine *stärkere Expression* einzelner, im phagenfreien Stamm bereits vorhandener

Proteine als auch eine *Expression zusätzlicher Proteine*, welche im phagenfreien Stamm bislang nicht exprimiert wurden. Interessanterweise ergab eine genauere Charakterisierung dieser Proteine, dass es sich hierbei nicht um *viral kodierte*, sondern um bestimmte *bakterieneigene* Virulenzfaktoren (näher betrachtet wurden hierbei *atl*, ORF SA1813, *eap*) handelt. Diese Beobachtungen konnten auf mRNA-Ebene sowie an weiteren Stammpaaren aus CF-Patienten-Sputumisolaten bestätigt werden. Weiterhin konnte diese Beobachtung auch nach Austausch des vorhandenen gegen andere *hlyB*-konvertierende Bakteriophagen bei identischem bakteriellen Stammhintergrund (a) in CF-Sputum-Isolaten und (b) dem Referenzstamm 8325-4 sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene reproduziert werden. Es lässt sich somit aus diesen Beobachtungen schließen, dass es sich um ein grundlegendes Phänomen *hlyB*-konvertierter Lysogene handelt.

Ebenso zeigte sich bei Betrachtungen weiterer Bakteriophagengruppen - wir betrachteten hiervon insbesondere Phagen der Gruppen 3A-like Phagen, 11-like Phagen und den nicht-klassifizierten Phagen $\phi 6390$ - Expressionsveränderungen und -steigerungen einzelner Proteine in den entsprechenden Lysogenen. Die Verwendung von Bakteriophagen anderer Gruppen ermöglichte somit nicht nur die Betrachtung weiterer Phagenintegrationssites, sondern insbesondere auch die Möglichkeit die Hypothese zu belegen, dass es sich um ein universelles Phänomen von *S. aureus* spezifischen lysogenen Bakteriophagen handelt. Im Rahmen dieser Arbeit beschränkten wir uns auf die gelelektrophoretische Auftrennung der Überstandproteine. Eine weitergehende Untersuchung müsste eine Charakterisierung der Proteine und gegebenenfalls genomisches Mapping umfassen, um möglicherweise eine Analogie zu den in *hlyB*-konvertierenden Phagen gefundenen Ergebnissen herzustellen.

Erste Spekulationen über mögliche Interaktionen zwischen Wirt und Parasit sind bei verschiedenen Autoren zu finden. So mutmaßt Waldor 1998 über die Möglichkeit des Einflusses von Bakteriophagen auf die Expression chromosomaler Gene, ohne hierbei jedoch genaue Interaktionsmöglichkeiten zu diskutieren [98]. Etwas konkreter vermuten Spanier *et al.* [104] im Falle der

Expression des Streptokokken-eigenen M-Proteins ein Zusammenspiel sowohl bakterieller als auch Phagen-eigener Regulatoren.

Die in der Literatur in den letzten Jahren detaillierter beschriebenen und untersuchten bakteriell-viralen Interaktionen beziehen sich insbesondere auf solche, bei welchen Bakteriophagen im Rahmen ihrer eigenen Reproduktion gezielt Komponenten der bakteriellen Reproduktion inhibieren und in folge für ihre eigene Vervielfältigung benutzen. Ein diesbezüglich gut untersuchter Organismus ist *E. coli*, bei dem Phagen-codierte Proteine - insbesondere während des lytisches Zyklus - bakterielle Bestandteile entscheidender metabolischer Signalwege angreifen und gezielt inhibieren oder in ihrer Funktion modulieren [103, 105]. Beispielsweise bindet das Genprodukt gp2 des Bakteriophagen T7 an die RNA-Polymerase des Bakteriums und inhibiert somit dessen Transkription [106]. Die Proteine P des Phagen λ und B des Phagen P2 binden jeweils an die DnaB Helicase des Wirtes und leiten sie zur Phagen-Replikation um [107, 108]. Im Falle von *S. aureus* konnten Liu et. al. zahlreiche open reading frames (ORF) verschiedener Bakteriophagen identifizieren, deren Genprodukte eine deutliche Inhibition des bakteriellen Wachstums vermitteln [109]. Demgegenüber sind in der Literatur bisher wenige Beschreibungen von Interaktionen zu finden, welche eine Zunahme der bakteriellen Genexpression bedingen. Ein diesbezüglich bereits in den 60 er Jahren beschriebenes Phänomen ist die Escape Reaktion: im Rahmen der Induktion temperenter Bakteriophagen wurde beobachtet, dass es neben einem Anstieg von Phagen-Bestandteilen gleichzeitig zu einem Anstieg verschiedener bakterieneigener Genprodukte kommt, die der Phagenintegrations-Stelle benachbart liegen [110, 111]. Aufgrund der hohen Relevanz für und Analogie zu den in Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen, wird diese Escape-Reaktion an anderer Stelle ausführlicher diskutiert.

4.2 Untersuchungen potentieller Einflussfaktoren

Nach Darstellung einer Expressionssteigerung in *hly*-konvertierten Lysogenen in verschiedenen Stammhintergründen untersuchten wir zur näheren Charakterisierung dieser Beobachtungen eine Auswahl möglicher externer und bakterieller Einflussfaktoren.

4.2.1 Einfluss des Nährstoffangebotes

Um mit den verschiedenen Umweltbedingungen und Erfordernissen, denen *S. aureus* je nach Besiedelungsort ausgesetzt ist, zurechtzukommen, ist das Bakterium in der Lage diese Bedingungen wahrzunehmen und sich entsprechend dem neuen Milieu anzupassen. Diese Fähigkeit ist auf ein globales Regulationsnetzwerk zurückzuführen, bestehend aus *sar*, *agr*, *sigB*, *rot*, *arlR/S*, *svrA* und *saeR/S* [112-115]. Viele dieser Regulatoren stellen Modulatoren der Virulenzfaktorexpression, wie auch von *eap* und ORF SA1813, dar [116]46]. Je nach Regulator nehmen unterschiedliche Umwelt- bzw. Umgebungsfaktoren (z.B. pH-Wert, Glukosekonzentration, Antibiotika) Einfluss [117- 120].

Zur Untersuchung solch externer Einflussfaktoren auf die Expressionssteigerung im Lysogen betrachteten wir exemplarisch die Auswirkungen einer Veränderung des Nährstoffangebotes. Im Falle einer deutlichen Differenzzunahme oder -modifikation der Expression im Lysogen könnte dies ein Anhalt für den Einfluss der oben genannten externen Stimuli auf den jeweiligen temperenten Bakteriophagen liefern.

In unseren Untersuchungen zeigte sich unter Veränderung der Nährstoffbedingungen im Vergleich der Expressionmuster von phagenfreien Stämmen und korrespondierenden Lysogenen lediglich ein global deutlich niedrigeres Expressionsniveau der Überstandproteine. Jedoch ließen sich keinerlei weitere Differenzen innerhalb der Stammpaare beobachten. Somit scheint die Expressionssteigerung im Lysogen unabhängig von - zumindest den hier untersuchten - Nährstoffveränderungen zu sein.

4.2.2 Einfluss der globalen Regulatoren *sae* und *agr*

Wie bereits vorangehend beschrieben unterliegen die in dieser Arbeit untersuchten Virulenzfaktoren einer Regulation der globalen Regulatorgene *sae* und *agr*. Als nächsten möglichen zugrunde liegenden Mechanismus betrachteten wir die Möglichkeit einer direkten Einflussnahme des Bakteriophagen auf die regulatorischen Loci. Unter Verwendung von Regulatordefizienten Mutanten der Regulatoren *sae* und *agr* versuchten wir mögliche Interaktionen von Phage und Regulatorgenen näher zu charakterisieren. Wir betrachteten, um einen ersten Anhalt zu bekommen, die Expressionsmuster der jeweiligen regulatordefizienten Delysogene und der entsprechend korrespondierenden Lysogene auf Protein- und mRNA-Ebene im Vergleich. Diese Untersuchungen lieferten jedoch - bedingt durch ein generell sehr niedriges Expressionsniveau - keine verwertbaren Ergebnisse. Um eine Aussage über einen Einfluss der Phagen auf Regulatorgene treffen zu können, wären somit weitere Untersuchungen durch sensitivere Verfahren notwendig. In der aktuellen Literatur fehlen bislang – auch bei anderen Bakterienarten - Beschreibungen eines direkten Einflusses integrierter Bakteriophagen auf Regulatorgene wirtseigener Virulenzfaktoren.

4.3 Einfluss durch SOS-Response

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses subinhibitorischer Antibiotikakonzentrationen verwendeten wir exemplarisch zwei Antibiotika: (a) Ciprofloxacin, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Fluorchinolone, sowie (b) Trimethoprim, ein Dihydrofolatreduktase-Hemmer. Beide Antibiotika werden regelhaft in der Therapie von Cystische Fibrose assoziierter infektiöser Lungenerkrankungen eingesetzt [121]. In unseren Untersuchungen zeigten sich nach Zugabe von Trimethoprim keinerlei Veränderungen des bisher beobachteten Expressionsmusters der Stammpartner bestehend Delysogen und Lysogen. Interessanterweise konnte jedoch unter Einwirkung von Ciprofloxacin eine weitere Steigerung der Expressionsdifferenz von *eap* und

ORF SA1813 zwischen phagenfreiem Stamm und Lysogen – insbesondere auch auf mRNA-Ebene- beobachtet werden.

Eine mögliche Erklärung für einen spezifischen Effekt durch Ciprofloxacin findet sich in Voruntersuchungen. *Goerke et al.* untersuchten den Effekt subinhibitorischer Konzentrationen der hier verwendeten Antibiotika auf *hly*-konvertierte *S. aureus* Lysogene. Hierbei konnten sie eine erhöhte Phageninduktion, ein genomisches Rearrangement sowie eine Expressionssteigerung phagen-codierter Virulenzfaktoren nachweisen [75]. Sie führten diese Expressionszunahme auf einen latenten Phagen-Promotor zurück. In ihrer Arbeit zeigten sich quantitative Unterschiede des Übergangs in den lytischen Zyklus zwischen Ciprofloxacin und Trimethoprim. Eine Erklärung ergibt sich aus der unterschiedlichen Aktivierung der SOS Response. Sowohl *Goerke et al.* als auch *Bisognano et al.* konnten im Falle von Ciprofloxacin und Mitomycin C eine deutliche Aktivierung von *recA* nachweisen, hingegen deutlich geringer bis gar nicht ausgeprägt im Falle von Trimethoprim [122]. Eine vergleichbar antibiotikaabhängige differenzielle Aktivierung etwaig vorliegender Modulatoren der bakteriellen Genexpression ist in Analogie zu diesen Ergebnissen ebenso bei unseren Beobachtungen zu vermuten.

Im Falle einer weiteren Bestätigung der vermehrten Virulenzfaktor—Transkription unter Einwirkung subinhibitorischer Antibiotikakonzentrationen könnte ein zusätzliches Risiko im klinischen Einsatz von Antibiotika darstellen, insbesondere bei unkontrollierter Anwendung oder unzureichender Dosierung.

4.4 *cis-* vs. *trans*-Effekt

Bei genauer Betrachtung der Genloci der vorrangig betrachteten Virulenzfaktoren in Bezug auf die Phagenintegrationsite zeigte sich, dass *atl* weit entfernt vom Integrationsort des *hly*-Bakteriophagen lokalisiert ist, während hingegen *eap* und ORF SA1813 in unmittelbarer Nachbarschaft jeweils flankierend up- und downstream lokalisiert sind (siehe Abb. 19).



Abb. 19: Darstellung der Lage der Gene ORF SA1812, SA1813, *eap* und des integrierten *hly*-Phagen im *S. aureus* Stamm 8325-4

Somit können prinzipiell zwei unterschiedliche Mechanismen vorliegen, die der Expressionssteigerung in den Lysogenen zugrunde liegen:

(1) Zum einen wäre ein mobiles Regulatorelement denkbar, welches den Bakteriophagen auch zur Einflussnahme auf entfernt im Genom lokalisierte Gene (***trans*-Effekt**) befähigt. Hiermit wäre eine hinreichende Erklärung für das entfernt lokalisierte *atl*-Gen gegeben. Ebenfalls könnte somit die Expressionssteigerung von *eap* und ORF SA1813 erklärt werden, wobei die besondere Lage in direkter Nachbarschaft zufällig und ohne Relevanz wäre.

(2) Die Lage direkt up- und downstream der *att*-Site des Bakteriophagen könnte jedoch auch hinweisend auf eine lokale Einflussnahme des temperenten Phagen auf die flankierenden Genomabschnitte (***cis*-Effekt**) sein. Eine Erklärung für eine gleichzeitige Expressionssteigerung von *atl* würde hierbei allerdings zunächst ausbleiben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit betrachteten wir Aspekte zu beiden Erklärungsmodellen:

cis-Effekt

Eine potentielle lokale Zielstruktur einer viralen „Fremdsteuering“ stellen die Promotoren der bakteriellen Virulenzfaktoren dar. Zur Untersuchung eines direkten Effektes des Phagen auf diese Strukturen klonierten wir zunächst die einzelnen Promotoren der Gene *eap*, ORF SA1813 und *atl* in das Plasmid pCG6 vor das *lacZ* Gen und brachten diese Klonierungsprodukte durch Transformation in mehrere Stammpaare aus Delysogen und korrespondierendem Lysogen ein. Sein Genprodukt, das Enzym β -Galaktosidase, ermöglichte uns mittels eines fluorometrischen Assays die Promotoraktivität indirekt durch die Enzymaktivität zu untersuchen. Die Promotoren wurden in das Lipasegen *geh* integriert. Es können also mit diesem Versuchansatz prinzipiell nur trans-aktivierende Mechanismen detektiert werden. Es ließ sich jedoch auch nach wiederholter Reproduktion in keinem der untersuchten Stammpaare eine signifikant erhöhte Promotoraktivierung im Lysogen nachweisen. Somit scheint eine virale Trans-Aktivierung der Promotoren unwahrscheinlich. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass aufgrund eines fehlenden Mappings der Promotoren, nicht diese sondern andere, eng benachbarte Fragmente kloniert wurden. Somit ist anhand dieses Untersuchungsmodells nur eine begrenzte Aussage bezüglich eines lokalen Effektes möglich. Zum sicheren Ausschluss einer phagenvermittelten lokalen Aktivierung der Promotoren von *eap*, ORF 1813 und *atl* wären weitere Untersuchungen mit genauem Mapping des Promotors und zusätzlichen Untersuchungen des Promotors an seiner natürlichen Lokalisation notwendig.

Eine mögliche Erklärung für einen lokalen Effekt liefert das so genannte Supercoiling: sowohl in vitro- als auch in vivo- Studien konnten zeigen, dass der Konformationszustand der bakteriellen DNA eine wichtige Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen, wie Replikation, Rekombination und Genexpression spielt [123, 124]. Diese Veränderung der dreidimensionalen Struktur der DNA scheint die Expression eines Großteils des bakteriellen Genoms zu beeinflussen, insbesondere im Sinne einer Steigerung der DNA-Transkription [125, 126]. Zum einen scheint dies durch eine

konformationsbedingte Erleichterung der DNA-Strangseparation bedingt [125, 127, 128], zum anderen fördert das DNA-Supercoiling zusätzlich die Schleifenbildungen der DNA, welche als Erkennungsstruktur für die RNA-Polymerase dienen. Die Hypothese einer Beteiligung des Bakteriophagen an diesem Phänomen stützen Untersuchungen des Phagen Mu. Dieser *E. coli* spezifische Bakteriophage exprimiert Gem, für welches eine Beteiligung an der Expressions-Modulation und eine Veränderung der DNA-Superhelix-Konformation des Wirtes nachgewiesen wurde. Das bakterielle Ziel des Gem-Proteins scheint hierbei die DNA-Gyrase des Wirts zu sein [129-132]. Vor dem Hintergrund dieses Phänomen ist (1) zum einen eine lediglich lokale Konformationsänderung durch zusätzlich integrierte DNA des Bakteriophagen denkbar, die zu einer Expressionveränderung der benachbarten Gene führt, oder (2) von *S. aureus*-Phagen codierte Gem-ähnliche Proteine. Diese würden allerdings nicht zwingend ausschließlich lokale Prozesse bedingen.

Eine weitere lokal bedingte Erklärungshypothese liefert die Escape-Reaktion [110, 111, 133]. Im Rahmen der Induktion temperenter Bakteriophagen kommt es hierbei zu einer vermehrten Transkription flankierender bakterieller Genomabschnitte. Zunächst wurde dieses Phänomen in den 60 er Jahren lediglich am temperenten Bakteriophagen Lambda in *E. coli* für das *Gal*-Operon beschrieben, welches sich nahe der Phagenintegrationssite befindet. 2005 konnten Frye et. al. vergleichbare Beobachtungen für vier verschiedene temperente Bakteriophagen in *Salmonella typhimurium* machen [134]. Als Grundlage dieser Beobachtungen wird folgender Mechanismus vermutet: Beim Übergang aus dem lysogenen in den lytischen Zyklus kommt es zunächst zu einem bidirektionalen Abschrieb (Theta-Modus) der viralen DNA. Aufgrund einer verspäteten Phagenexzision werden im Rahmen dieser viralen Replikation die angrenzenden bakteriellen Genomabschnitte mit umfasst und ebenfalls transkribiert.

Ein ähnliches Phänomen könnte den Beobachtungen dieser Arbeit zugrunde liegen. In beiden Fällen wird eine Expressionssteigerung bakterieller Gene in Nachbarschaft der Phagenintegrationsstelle beobachtet. Allerdings erweitert die vorliegende Arbeit die bisherigen Erkenntnisse insofern sie eine bakterielle

Expressionssteigerung nun auch für andere Bakterien- und Phagenklassen zeigt und zudem einige wichtige Unterschiede zwischen dem hier beschriebenen Phänomen und der Escape Reaktion bestehen: (1) die Escape Reaktion findet im Rahmen der Phageninduktion statt – hier jedoch ist eine Expressionssteigerung auch unabhängig von einem Übergang in den lytischen Zyklus zu detektieren; (2) im Rahmen der Escape Reaktion wird eine zufällige, stets wechselnde Anzahl flankierender bakterieller Gene transkribiert, während hier stets zwei benachbarte Virulenzfaktoren betroffen sind, sofern sich auf Grundlage der bisherigen Untersuchungen feststellen lässt; (3) während im Rahmen der Escape-Reaktion nur die Expressionssteigerung benachbarter Gene beschrieben wurde, sind in den vorliegenden Untersuchungen auch entfernte Expressionssteigerungen zu beobachten; (4) im Gegensatz zu der Expression von Genen vorrangig der Energiehomöostase durch die Escape Reaktion, wurde hier isoliert eine gesteigerte Expression bakterieller Virulenzfaktoren beobachtet. Damit könnten die kürzlich von Frye et al. gemachten Beobachtungen eine viel umfassendere Bedeutung zukommen als bisher vermutet.

trans Effekt

Die Integrationsstelle des *hly*-Phagen befindet sich im Bereich des β -Hämolyysin codierenden Gens. Kennzeichnend für *hly*-konvertierte Lysogene ist, dass sie dieses Toxin nicht mehr exprimieren. Hierbei wäre folgende Hypothese bezüglich eines möglichen trans-Mechanismus vorstellbar: Unter der Annahme eines negativ regulatorischen Effektes des β -Hämolyisins auf weitere Virulenzfaktoren, könnte ein Verlust dieses Toxins eine erhöhte Expression von *eap*, *atl* und ORF SA1813 in Lysogenen erklären. Somit würde dem Phagen kein intrinsischer Effekt mehr zukommen. Grundlage dieses trans-Effektes mittels β -Hämolyysin waren Beschreibungen von Vojtov et al. [135]. Sie konnten zeigen, dass das *S. aureus* eigene Superantigen Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1) auf der Ebene der Transkription eine negative regulatorische Wirkung auf zahlreiche weitere Exoproteine des Bakteriums ausübt.

Zur Untersuchung, ob β -Hämolysin an sich tatsächlich einen negativ regulatorischen Effekt auf weitere Virulenzfaktoren ausübt, brachten wir an die *hlyB*-Phagenintegrationsstelle anstelle des Phagen ein Plasmidfragment ein. Dieses diente lediglich zur Ausschaltung des Hämolysin-Gens ohne eigene Funktion. Auch in diesem Falle zeigte sich eine Expressionsteigerung der Virulenzfaktoren *eap* und ORF SA 1813, welcher der in Lysogenen beobachteten Expressionssteigerung vergleichbar ist.

Allerdings wäre diese Untersuchung auch vereinbar mit einer lokalen Konformationsänderung durch zusätzlich integrierte DNA (cis-Effekt). Zur näheren Differenzierung dieses Ergebnisses wären weitere Betrachtungen in *hlyB*-defizienten Stämmen notwendig, da bei diesen ein Verlust des β -Hämolysins vorliegt, ohne dass zusätzliche DNA integriert wurde und diese eine Konformationsänderung der DNA bewirkt haben könnte.

4.5 Klinische Relevanz und Fazit

Angesichts der hohen Prävalenz bakterieller Infektionen im klinischen Alltag mit teils letalen Folgen ist es notwendig, die genauen pathogenen Mechanismen bakterieller Virulenz auch in ihren Grundlagen genauer zu verstehen. Ein derart verbessertes Verständnis der Pathogenese und die Identifizierung zentraler mikrobieller Zielstrukturen sind insbesondere zur gezielten Entwicklung neuer antimikrobieller Strategien von großer Bedeutung. Bakteriophagen tragen einen wichtigen Anteil zu der Pathogenese bakterieller Infektionen bei: Erst durch die Distribution einzelner Toxine und weiterer Virulenzfaktoren, welche durch Bakteriophagen und andere mobile Elemente bewirkt wird, werden Bakterien befähigt, sich an das jeweilige Wirtsmilieu anzupassen und ein weites Spektrum an Toxinen zu produzieren. Interessanterweise scheint dies selbst über die biologischen Grenzen verschiedener Bakterienspezies hinweg möglich, so dass auch die Annahme eines engen Wirtsspektrums überholt ist und die Pathogenität noch weiter erhöht wird [136, 137] [138]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir einen weiteren Aspekt der zentralen Bedeutung von Bakteriophagen an der bakteriellen Pathogenese beleuchten: die Möglichkeit einer „Fremdsteuerung“ bakterieneigener Virulenzgene durch temperente Bakteriophagen. Wir konnten zeigen, dass (1) die Expressionsteigerung der Virulenzfaktoren *eap* und ORF SA1813 ein generelles Phänomen bei *hlyB*-konvertierten *S. aureus* Stämmen darstellt und (2) auch andere Bakteriophagengruppen nach Integration im bakteriellen Wirt eine Expressionssteigerung verschiedenster Proteine zeigen. Durch Untersuchungen verschiedener externer Einflussfaktoren und möglichen zugrunde liegende Mechanismen konnten wir sowohl Argumente für einen zugrundeliegenden cis- als auch einen trans-Effekt liefern. Bei bakteriellen Infektionen könnten somit nicht nur die Bakterienart an sich entscheidend sein, sondern vielmehr ihr jeweiliges durch Bakteriophagen verändertes Expressionsprofil an Virulenzfaktoren. Künftige Diagnostik müsste möglicherweise nicht nur auf die Bestimmung der Infektion-auslösenden

Bakterienart ausgerichtet sein, sondern auch ein spezifisches Expressionsprofil bestimmen. Entsprechend müssten antibiotische Therapien entwickelt werden, die dem jeweiligen spezifischen Expressionsprofil angepasst sind und durch diese wesentlich erhöhte Selektivität zu einer größeren Wirksamkeit bei der Bekämpfung bakterieller Infektionen führen.

5. Zusammenfassung

Bakterien und Bakteriophagen stehen als Wirt und Parasit in einem engen biologischen Verhältnis zu einander. Über verschiedene Mechanismen haben Bakteriophagen als mobile Elemente Einfluss auf die bakterielle Gen-Distribution sowie -Rekombination und können das Bakterium um entsprechende genetische Informationen, zumeist Antibiotikaresistenzen oder Toxine, bereichern. Grundlage der vorliegenden Arbeit war eine weitere, bisher in dieser Form nicht beschriebene Beobachtung der bakteriell-viralen Interaktion: eine Expressionssteigerung verschiedener bakteriell codierter Virulenzfaktoren in einzelnen *hly*-konvertierten Lysogenen (*S. aureus* mit Phageninsertion in *hly*, welches für das β -Hämolyysin codiert). Die vorliegende Arbeit untersuchte, ob eine derartige Phagen-vermittelte Expressionssteigerung bakterieller Gene als generelles Phänomen auch bei anderen Lysogenen zu beobachten ist und ob diese Effekte auf Transkriptionsebene zu detektieren sind. Zudem wurden mögliche Einflussfaktoren und postulierte Mechanismen analysiert. Es wurden zunächst verschiedene *hly*-Phagen-konvertierte Lysogene sowie Lysogene weiterer Bakteriophagengruppen betrachtet. Interessanterweise zeigte sich bei allen *hly*-Lysogenen eine Expressionssteigerung verschiedener Virulenzfaktoren (*eap* und SA1813) im Vergleich zu den isogenen delysogenen Stämmen. Dies konnte sowohl auf Proteinebene durch SDS-Gelelektrophorese als auch auf Transkriptionsebene durch Northern Blot-Hybridisierung gezeigt werden. Diese Effekte wurden durch Ciprofloxacin, einem Induktor der bakteriellen SOS-Antwort, beeinflusst. Die bakteriellen Gene *eap* und SA1813 sind direkt up- und downstream der Phageninsertionsstelle lokalisiert. Durch Promotorfusionsassays (*eap* und SA1813) konnten keine Hinweise auf trans-aktivierende Mechanismen gefunden werden. Diese Untersuchungen stützen daher die Hypothese eines lokalen konformatorischen Effektes durch Phageninsertion. Zusammenfassend konnte die Expressionssteigerung verschiedener Virulenzfaktoren als ein bei *S. aureus* Lysogenen generalisiertes Phänomen nachgewiesen werden. Die Hinweise auf cis- und transaktivierende Mechanismen der Phagen-Bakterieninteraktion stellen eine wesentliche Grundlage für weitere molekulare Untersuchungen dieser neuartigen Genregulationsmechanismen sowie für Studien zur Bedeutung der phagenvermittelten Genaktivierung für die Infektion und Kolonisation von *S. aureus* dar.

6. Abkürzungen

μ	Mikro
φ	phi als Abkürzung für Phage
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AP	Antikörper
APS	Ammonium Persulfat
bidest.	zweifach destilliert
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	cured
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyriboukcleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(betaaminoethyl)- ether-4N`-tetraacetat
For	
G	Gramm
G	$g=9,0665 \text{ m/s}^2$
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H	Stunde
H ₂ O	Wasser
J	Joule
KBE	koloniebildende Einheit
M	Molar

M	milli
MIC	minimale Inhibitionskonzentration
Min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N	Nano
NaCl	Natriumchlorid
OD	optische Dichte
P	pico
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PVL	Panton-Valentin Leukocidin
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-gepuffertes EDTA
TCA	Trichloracetat
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Tryptone Soya Broth
UV	ultraviolett
W	Watt

7. Literatur

1. Parisi, J., *Coagulase-negative Staphylococci and the Epidemiological Typing of Staphylococcus epidermidis*. Microbiol Rev., 1985. **49**(2): p. 126-39.
2. Lowy, F., *Staphylococcus aureus infections*. N Engl J Med., 1998. **339**(8): p. 520-32.
3. Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh, *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*. Clin Microbiol Rev., 1997. **10**(3): p. 505-20.
4. Bamberger, D. and S. Boyd, *Management of Staphylococcus aureus infections*. Am Fam Physician., 2005. **72**(12): p. 2474-81.
5. Peacock, S., I. de Silva, and F. Lowy, *What determines nasal carriage of Staphylococcus aureus?* Trends Microbiol., 2001. **9**(12): p. 605-10.
6. Nouwen, J., et al., *Human factor in Staphylococcus aureus nasal carriage*. Infect Immun., 2004. **72**(11): p. 6685-8.
7. Weidenmaier, C., et al., *Role of teichoic acids in Staphylococcus aureus nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections*. Nature, 2004. **10**(3): p. 243-45.
8. Cole, A., et al., *Determinants of Staphylococcus aureus nasal carriage*. Clin Diagn Lab Immunol., 2001. **8**(6): p. 1064-9.
9. von Eiff, C., et al., *Nasal Carriage as a Source of Staphylococcus aureus Bacteremia*. N Engl J Med., 2001. **344**(1): p. 11-6.
10. Lessing, M., J. Jordens, and I. Bowler, *Molecular epidemiology of a multiple strain outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus amongst patients and staff*. J Hosp Infect., 1995. **31**(4): p. 253-60.
11. Lautenschlager, S., C. Herzog, and W. Zimmerli, *Course and outcome of bacteremia due to Staphylococcus aureus: evaluation of different clinical case definitions*. Clin Infect Dis., 1993. **16**(4): p. 567-73.
12. Bouza, E., A. Burillo, and P. Munoz, *Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment*. Clin Microbiol Infect., 2002. **8**: p. 265-274.
13. Gosbell, I., *Diagnosis and management of catheter-related bloodstream infections due to Staphylococcus aureus*. Intern Med J., 2005. **35** (2): p. 45-62.
14. Le Loir, Y., F. Baron, and M. Gautier, *Staphylococcus aureus and food poisoning*. Genet Mol Res, 2003. **2**(1): p. 63-76.
15. McCormick, J., J. Yarwood, and P. Schlievert, *Toxic Shock Syndrome and Bacterial Superantigens: An Update*. Annu Rev Microbiol., 2001. **55**: p. 77-104.
16. Dinges, M., P. Orwin, and P. Schlievert, *Exotoxins of Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev., 2000. **13**(1): p. 16-34.
17. Prevost, G., P. Couppie, and H. Monteil, *Staphylococcal epidermolysins*. Curr Opin Infect Dis, 2003. **16**(2): p. 71-6.

18. Deurenberg, R., et al., *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect., 2007. **13**(3): p. 222-35.
19. Appelbaum, P., *MRSA-the tip of the iceberg*. Clin Microbiol Infect., 2006. **12**: p. 3-10.
20. Lindsay, J. and M. Holden, *Staphylococcus aureus: superbug, super genome?* Trends Microbiol., 2004. **12**(8): p. 378.
21. Kollef, M. and S. Micek, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a new community-acquired pathogen?* Curr Opin Infect Dis, 2006. **19**: p. 161-68.
22. Smith, T., et al., *Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. Glycopeptide-Intermediate Staphylococcus aureus Working Group*. N Engl J Med., 1999. **340**(7): p. 439-501.
23. Kanafani, Z. and G. Corey, *Daptomycin: a rapidly bactericidal lipopeptide for the treatment of Gram-positive infections*. Expert Rev Anti Infect Ther., 2007. **5**(2): p. 177-84.
24. Shinefield, H. and S. Black, *Prospects for Active and Passive Immunization Against Staphylococcus aureus*. Pediatr Infect Dis J., 2006. **25**(2): p. 167-8.
25. Shinefield, H., et al., *Use of a Staphylococcus aureus conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis*. N Engl J Med., 2002. **346**(7): p. 491-6.
26. Zhuo, H., et al., *An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against Staphylococcus aureus infections in a mice model*. Vaccine, 2006. **24**(22): p. 4830-7.
27. Josefsson, E., et al., *Protection against experimental Staphylococcus aureus arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant*. J Infect Dis., 2001. **184**(12): p. 1572-80.
28. Domanski, P., et al., *Characterization of a humanized monoclonal antibody recognizing clumping factor A expressed by Staphylococcus aureus*. Infect Immun., 2005. **73**(8): p. 5229-32.
29. Benjamin, D., et al., *A blinded, randomized, multicenter study of an intravenous Staphylococcus aureus immune globulin*. J Perinatol., 2006. **26**(5): p. 290-5.
30. Stranger-Jones, Y., T. Bae, and O. Schneewind, *Vaccine assembly from surface proteins of Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16942-7.
31. Novick, R.P., P. Schlievert, and A. Ruzin, *Pathogenicity and resistance islands of staphylococci*. Microbes Infect., 2001. **3**(7): p. 585-94.
32. Foster, T. and M. Hook, *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol., 1998. **6**(12): p. 484-8.
33. Wann, E., S. Gurusiddappa, and M. Hook, *The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of Staphylococcus aureus is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen*. J Biol Chem., 2000. **275**(18): p. 13863-71.
34. McDevitt, D., et al., *Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 1994. **11**(2): p. 237-48.

35. Patti, J., et al., *Molecular characterization and expression of a gene encoding a Staphylococcus aureus collagen adhesin*. J Biol Chem., 1992. **267**(7): p. 4766-72.
36. Peterson, P., et al., *Effect of protein A on staphylococcal opsonization*. Infect Immun., 1977. **15**(3): p. 760-4.
37. Downer, R., et al., *The elastin-binding protein of Staphylococcus aureus (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein*. J Biol Chem., 2002. **277**(1): p. 243-50.
38. Palma, M., A. Haggar, and J. Flock, *Adherence of Staphylococcus aureus is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity*. J Bacteriol., 1999. **181**(9): p. 2840-45.
39. Jonsson, K., et al., *Staphylococcus aureus expresses a major histocompatibility complex class II analog*. J Biol Chem., 1995. **270**(37): p. 21457-60.
40. Harraghy, N., et al., *The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional Staphylococcus aureus protein Eap*. Microbiology., 2003. **149**(10): p. 2701-7.
41. Hussain, M., et al., *Insertional Inactivation of eap in Staphylococcus aureus Strain Newman Confers Reduced Staphylococcal Binding to Fibroblasts*. Infect Immun., 2002. **70**(6): p. 2933-40.
42. Haggar, A., et al., *Extracellular Adherence Protein from Staphylococcus aureus Enhances Internalization into Eukaryotic Cells*. Infect Immun., 2003. **71**(5): p. 2310-7.
43. Lee, L., et al., *The Staphylococcus aureus Map protein is an immunomodulator that interferes with T cell-mediated responses*. J Clin Invest., 2002. **110**(10): p. 1461-71.
44. Chavakis, T., et al., *Staphylococcus aureus extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes*. Nat Med., 2002. **8**(7): p. 687-93.
45. Foster, T., *Immune evasion by staphylococci*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(12): p. 948-58.
46. Harraghy, N., et al., *sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp*. Microbiology., 2005. **151**(Pt 6): p. 1789-800.
47. Dunman, P., et al., *Transcription profiling-based identification of Staphylococcus aureus genes regulated by the agr and/or sarA loci*. J Bacteriol., 2001. **183**(24): p. 7341-53.
48. von Bonin, A., et al., *Major histocompatibility complex class II-associated peptides determine the binding of the superantigen toxic shock syndrome toxin-1*. Eur J Immunol., 1995. **25**(10): p. 2894-8.
49. Projan, S., et al., *Nucleotid sequence: the beta-hemolysin gene of Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res., 1989. **17**(8): p. 3305.
50. Coleman, D., et al., *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 Pathog, 1986. **1**: p. 933-6.

51. Mölby, R., *Isolation and properties of membrane damaging toxins*. . In: Easmon CFS, Adlam, C. (eds.). *Staphylococci and staphylococcal Infections*. London: Academic press, 1983. **2**: p. 619-662.
52. Prevost, G., et al., *Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from Staphylococcus aureus ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities*. *Infect Immun.*, 1995. **63**(10): p. 4121-9.
53. Gravet, A., et al., *Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family*. *FEBS Lett.*, 1998. **436**(2): p. 202-8.
54. Kaneko, J., K. Muramoto, and Y. Kamio, *Gene of LukF-PV-like component of Panton-Valentine leukocidin in Staphylococcus aureus P83 is linked with lukM*. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 1997. **61**(3): p. 541-4.
55. Colin, D., et al., *Interaction of the two components of leukocidin from Staphylococcus aureus with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation*. *Infect Immun.*, 1994. **62**(8): p. 3184-8.
56. Prevost, G., et al., *Staphylococcal bicomponent leucotoxins, mechanism of action, impact in cells and contribution to virulence*. In: G. Menestrina, M. Dalla Serra, P. Lazarovici (eds.), *Pore forming peptides and protein toxins.*, 2003: p. 3-26.
57. Ferreras, M., et al., *The interaction of Staphylococcus aureus bi-component gamma-hemolysins and leucocidins with cells and lipid membranes*. *Biochim Biophys Acta.*, 1998. **1414**(1-2): p. 108-26.
58. Sugawara-Tomita, N., T. Tomita, and Y. Kamio, *Stochastic assembly of two-component staphylococcal gamma-hemolysin into heteroheptameric transmembrane pores with alternate subunit arrangements in ratios of 3:4 and 4:3*. *J Bacteriol.*, 2002. **184**(17): p. 4747-56.
59. Miles, G., L. Movileanu, and H. Bayley, *Subunit composition of a bicomponent toxin: staphylococcal leukocidin forms an octameric transmembrane pore*. *Protein Sci.*, 2002. **11**(4): p. 894-902.
60. Prevost, G., et al., *Epidemiological data on Staphylococcus aureus strains producing synergohymenotropic toxins*. *J Med Microbiol.*, 1995. **42**(4): p. 237-45.
61. von Eiff, C., et al., *Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 2004. **49**(3): p. 157-62.
62. Nilsson, I., et al., *Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote Staphylococcus aureus virulence in murine septic arthritis*. *Infect Immun.*, 1999. **67**(3): p. 1045-9.
63. Novick, R.P., *Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence*. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(6): p. 1429-49.
64. Archer, G., *Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen*. *Clin Infect Dis.*, 1998. **26**(5): p. 1179-81.
65. Goerke, C., et al., *Impact of the regulatory loci agr, sarA and sae of Staphylococcus aureus on the induction of alpha-toxin during device-*

- related infection resolved by direct quantitative transcript analysis.* Mol Microbiol, 2001. **40**(6): p. 1439-47.
66. Yarwood, J. and P. Schlievert, *Quorum sensing in Staphylococcus infections.* J Clin Invest., 2003. **112**(11): p. 1620-5.
67. Said-Salim, B., et al., *Global Regulation of Staphylococcus aureus Genes by Rot.* J Bacteriol., 2003. **185**(2): p. 610-9.
68. Novick, R.P. and D. Jiang, *The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing.* Microbiology., 2003. **149**(Pt 10): p. 2709-17.
69. Kutter, E. and A. Sulakvelidze, *Bacteriophages: biology and applications.* CRC Press, 2005.
70. Wommack, K. and R. Colwell, *Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems.* Microbiol Mol Biol Rev., 2000. **64**(1): p. 69-114.
71. Duckworth, D., *Who Discovered Bacteriophage?* Bacteriological Reviews, 1976. **40**(4): p. 793-802.
72. Ackermann, H., *5500 Phages examined in the electron microscope.* Arch Virol., 2007. **152**: p. 227-243.
73. Lipton, A. and A. Weissbach, *The bacteriophages.* Am J Med., 1969. **46**(2): p. 264-74.
74. Canchaya, c., G. Fournous, and H. Brussow, *The impact of prophages on bacterial chromosomes.* Mol Microbiol, 2004. **53**(1): p. 9-18.
75. Goerke, C., J. Koller, and C. Wolz, *Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother., 2006. **50**(1): p. 171-7.
76. Matthews, A. and R. Novick, *Staphylococcal Phages.* In: Waldor MK., Friedman DI., Adhya SL., eds. Phages. Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. ASM Press 2005: p. 297-319.
77. Parker, M., *The significance of phage-typing patterns of Staphylococcus aureus.* In: Easmon CFS, Adlam, C. (eds.). Staphylococci and staphylococcal Infections. London: Academic press, 1983: p. 33-62.
78. Doskar, J., et al., *Genomic relatedness of Staphylococcus aureus phages of the International Typing Set and detection of serogroup A, B, and F prophages in lysogenic strains.* Can J Microbiol., 2000. **46**: p. 1066-76.
79. Pantucek, R., et al., *Identification of bacteriophage types and their carriage in Staphylococcus aureus.* Arch Virol., 2004. **149**(9): p. 1689-703.
80. Lee, C. and J. landolo, *Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a genome into the lipase structural gene.* J Bacteriol., 1986. **166**(2): p. 385-91.
81. de Waart, J., K. Winkler, and C. Grootzen, *Lysogenic conversion in staphylococci.* Nature, 1962. **195**: p. 407-8.
82. landolo, J., et al., *Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of Staphylococcus aureus 8325.* Gene, 2002. **289**(1-2): p. 109-18.
83. Brussow, H., C. Canchaya, and W. Hardt, *Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion.* Microbiol Mol Biol Rev., 2004. **68**(3): p. 560-602.

84. Freeman, V., *Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of Corynebacterium diphtheriae*. J Bacteriol., 1951. **61**(6): p. 675-88.
85. Inoue, K. and H. Iida, *Phage-conversion of toxigenicity in Clostridium botulinum types C and D*. Jpn J Med Sci Biol., 1971. **24**(1): p. 53-6.
86. Weeks, C. and J. Ferretti, *The gene for type A streptococcal exotoxin (erythrogenic toxin) is located in bacteriophage T12*. Infect Immun., 1984. **46**(2): p. 531-6.
87. Waldor, M. and J. Mekalanos, *Lysogenic conversion by filamentous phage encoding cholera toxin*. Science., 1996. **272**(5270): p. 1910-4.
88. Karaolis, D., et al., *A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria*. Nature, 1999. **399**(6734): p. 375-9.
89. Wagner, P.L. and M.K. Waldor, *Bacteriophage Control of Bacterial Virulence*. Infect Immun., 2002. **70**(8): p. 3985-93.
90. Boyd, E. and H. Brüssow, *Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved*. Trends Microbiol., 2002. **10**(11): p. 521-9.
91. Bensing, B., I. Siboo, and P. Sullam, *Proteins PblA and PblB of Streptococcus mitis, Which Promote Binding to Human Platelets, Are Encoded within a Lysogenic Bacteriophage*. Infect Immun., 2001. **69**(10): p. 6186-92.
92. Coleman, D., et al., *Staphylococcus aureus bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion*. J Gen Microbiol., 1989. **135**(6): p. 1679-97.
93. Ruzin, A., J. Lindsay, and R.P. Novick, *Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2001. **41**(2): p. 365-77.
94. Brüssow, H. and R. Hendrix, *Phage Genomics: Small is Beautiful*. Cell, 2002. **108**: p. 13-16.
95. Goerke, C., et al., *Increased frequency of genomic alterations in Staphylococcus aureus during chronic infection is in part due to phage mobilization*. J Infect Dis. , 2004. **189**(4): p. 724-34.
96. Goerke, C., et al., *Extensive phage dynamics in Staphylococcus aureus contributes to adaptation to the human host during infection*. Mol Microbiol, 2006. **61**(6): p. 1673-85.
97. Tseng, C., S. Zhang, and G. Steward, *Accessory gene regulator control of staphylococcal enterotoxin d gene expression*. J Bacteriol., 2004. **186**(6): p. 1793-801.
98. Waldor, M.K., *Bacteriophage biology and bacterial virulence*. Trends Microbiol., 1998. **6**(8): p. 295-7.
99. Barksdale, L., L. Garmise, and K. Horibata, *Virulence, toxinogeny, and lysogeny in Corynebacterium diphtheriae*. Ann N Y Acad Sci., 1960. **88**: p. 1093-108.
100. Sumby, P. and M.K. Waldor, *Transcription of the toxin genes present within the Staphylococcal phage phiSa3ms is intimately linked with the phage's life cycle*. J Bacteriol., 2003. **185**(23): p. 6841-51.

101. Greßinger, M., *Die Ausbildung genetischer und phänotypischer Varianten von Staphylococcus aureus bei Patienten mit Zystischer Fibrose*. Eigenverlag, 2007.
102. Matias y Papenberg, S., *Genomveränderungen in Staphylococcus aureus während der chronischen Lungeninfektion bei Zystischer Fibrose*. Eigenverlag, 2004.
103. Nechaev, S. and K. Severinov, *The Elusive Object of Desire - Interactions of Bacteriophages and Their Hosts*. Curr Opin Microbiol., 2008. **11**(2): p. 186-193.
104. Spanier, J. and P. Cleary, *Bacteriophage control of antiphagocytic determinants in group A streptococci*. J Exp Med., 1980. **152**(5): p. 1393-406.
105. Chen, Y., et al., *Population fitness and the regulation of Escherichia coli genes by bacterial viruses*. PLoS Biol, 2005. **3**(7): p. e229.
106. Nechaev, S. and K. Severinov, *Inhibition of Escherichia coli RNA polymerase by bacteriophage T7 gene 2 protein*. J Mol Biol., 1999. **289**(4): p. 815-826.
107. Mallory, J.B., C. Alfano, and R. McMacken, *Host virus interactions in the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. Recruitment of Escherichia coli DnaB helicase by lambda P replication protein*. J Biol Chem., 1990. **265**(22): p. 13297-13307.
108. Odegrip, R., et al., *The interaction of bacteriophage P2 B protein with Escherichia coli DnaB helicase*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 4057-63.
109. Liu, J., et al., *Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics*. Nat Biotechnol., 2004. **22**(2): p. 167-8.
110. Willard, M. and H. Echols, *Role of bacteriophage DNA replication in lambda-dg escape synthesis*. J Mol Biol, 1968. **32**(1): p. 37-46.
111. Imae, Y. and T. Fukasawa, *Regional replication of the bacterial chromosome induced by derepression of prophage lambda*. J Mol Biol, 1970. **54**(3): p. 585-97.
112. Goerke, C., et al., *Role of Staphylococcus aureus global regulators sae and sigmaB in virulence gene expression during device-related infection*. Infect Immun, 2005. **73**(6): p. 3415-21.
113. Cheung, A.L., et al., *Regulation of exoprotein expression in Staphylococcus aureus by a locus (sar) distinct from agr*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6462-6.
114. Hart, M.E., M.S. Smeltzer, and J.J. Iandolo, *The extracellular protein regulator (xpr) affects exoprotein and agr mRNA levels in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 1993. **175**(24): p. 7875-9.
115. Giraud, A.T., et al., *Characterization of a Tn551-mutant of Staphylococcus aureus defective in the production of several exoproteins*. Can J Microbiol, 1994. **40**(8): p. 677-81.
116. Coulter, S.N., et al., *Staphylococcus aureus genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments*. Mol Microbiol, 1998. **30**(2): p. 393-404.
117. Giraud, A.T., A.L. Cheung, and R. Nagel, *The sae locus of Staphylococcus aureus controls exoprotein synthesis at the transcriptional level*. Arch Microbiol, 1997. **168**(1): p. 53-8.

118. Kuroda, M., et al., *Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2003. **49**(3): p. 807-21.
119. Novick, R.P. and D. Jiang, *The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with agr quorum sensing*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 10): p. 2709-17.
120. Regassa, L.B., R.P. Novick, and M.J. Betley, *Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (agr) in Staphylococcus aureus*. Infect Immun, 1992. **60**(8): p. 3381-8.
121. Richards, R.M.E., V.E.S. Hamilton, and M.R. Thomas, *In-vitro investigation of the antibacterial activity of agents which may be used for the oral treatment of lung infections in CF patients*. J Antimicrob Chemother., 1998. **42**(2): p. 171-178.
122. Bisognano, C., et al., *A recA-lexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in Staphylococcus aureus*. J Biol Chem., 2004. **279**: p. 9064-9071.
123. Wang, J., *DNA topoisomerases*. Annu Rev Biochem., 1985. **54**: p. 665-697.
124. Drlica, K., *Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases*. Microbiol Rev, 1984. **48**(4): p. 273-89.
125. Drolet, M., *Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology*. Mol Microbiol, 2006. **59**(3): p. 723-730.
126. Blot, N., et al., *Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 710-5.
127. Wang, J.Y. and M. Syvanen, *DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes*. Mol Microbiol, 1992. **6**(14): p. 1861-6.
128. Baaklini, I., et al., *Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation*. J Bacteriol, 2008. **190**(22): p. 7346-56.
129. Ghelardini, P., et al., *Suppression of the thermosensitive DNA ligase mutations in Escherichia coli K12 through modulation of gene expression induced by phage Mu*. Mol Gen Genet, 1989. **216**(1): p. 31-6.
130. Bianchi, E., et al., *Mu gem3 as a tool to investigate the influence of chromosome supercoiling on gene expression in Escherichia coli K12* FEMS Microbiolololy Letters, 1990. **6**: p. 135-140.
131. Butler, R.H., et al., *Global changes in gene expression in Escherichia coli K12 aduced by bacteriophage Mu Gem protein* Res. Microbiol., 1991. **142**: p. 13-21.
132. Paolozzi, L. and P. Ghelardini, *A case of lysogenic conversion: modification of cell phenotype by constitutive expression of the Mu gem operon* Res. Microbiol., 1992. **143**: p. 237-243.
133. Fukasawa, T., et al., *Regional replication of the bacterial chromosome induced by derepression of prophage lambda. IV. Escape synthesis of gal operon in phage 82*. Mol Gen Genet, 1978. **167**(1): p. 83-93.
134. Frye, J.G., et al., *Host gene expression changes and DNA amplification during temperate phage induction*. J Bacteriol, 2005. **187**(4): p. 1485-92.

135. Vojtov, N., H.F. Ross, and R.P. Novick, *Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 10102-7.
136. Mazodier, P. and J. Davies, *Gene transfer between distantly related bacteria*. Annu Rev Genet, 1991. **25**: p. 147-71.
137. Brabban, A.D., E. Hite, and T.R. Callaway, *Evolution of foodborne pathogens via temperate bacteriophage-mediated gene transfer*. Foodborne Pathog Dis, 2005. **2**(4): p. 287-303.
138. Selva, L., et al., *Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(4): p. 1234-8.

8. Danksagungen

Ich möchte mich herzlich bei all denjenigen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein erster, herzlichster und größter Dank gilt Frau Dr. Christiane Goerke. Mit ihrer hervorragenden Betreuung, steten Unterstützung in fachlichen und methodischen Fragen sowie der schnellen, unkomplizierten Kommunikation war sie für das Gelingen dieser Arbeit eine unbeschreiblich große Hilfe.

Für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und Bereitstellung des Themas muss ich mich in besonderem Maße bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. Christiane Wolz bedanken. Ebenso wie Frau Dr. Goerke war sie jederzeit für mich erreichbar und stand mir in wissenschaftlichen Fragen uneingeschränkt zur Seite.

Im Labor war Vittoria Bisanzio eine unersetzliche Stütze. Ich möchte von Herzen für die große Hilfe und geduldige Betreuung bei den verschiedensten Methoden danken. Nicht vergessen möchte ich ebenfalls Simone Esser und Markus Mainiero, die immer für Fragen offen waren und mir jederzeit tatkräftig zur Seite standen. Unvergessen werden auch die viele lustigen und familiären Stunden im Labor bleiben.

Nicht zuletzt möchte ich mich für die grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung meiner lieben Eltern bedanken. Sie waren immer für mich da und haben mich während des Medizin-Studiums, während meiner Dissertationsarbeit und in allen Lebenssituationen von Herzen unterstützt.

9. Lebenslauf

Julia Verena Gelsomina Schicks
geboren am 29.04.1982 in Wesel

Schulische Ausbildung

09/1988 – 07/1991	Grundschule, Isselburg-Werth
09/1991 – 07/1992	Grundschule, Kehl-Auenheim
09/1992 – 06/2001	Einstein-Gymnasium, Kehl am Rhein

Abitur 21. Juni 2001

Universität

10/2001 – 07/2002	Studium der Biochemie, Universität Tübingen
02/2005 – 03/2005	Kreiskrankenhaus Kehl am Rhein, Gastroenterologie
02/2006 – 03/2006	Universitätskrankenhaus Tübingen, Kardiologie
08/2006	Praxis Dr. Bauer/Weiss, Kehl, Neurologie
09/2006	Praxis Dr. Reuss, Tübingen, Gynäkologie
03/2007	Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australien, Neurologie
08/2007 – 07/2008	Praktisches Jahr Neurologie, Abteilung Neurodegeneration, Universitätsklinik Tübingen
10/2002 – 10/2008	Studium der Medizin, Universität Tübingen
28.10.2008	2. Staatsexamen (Ärztliche Prüfung)
04/2005 – 05/2009	Dissertation am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene , Universität Tübingen

Beruflicher Lebensweg

seit 01/2009	Ärztin und wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Neurologie Schwerpunkt Neurodegeneration, Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung Tübingen
--------------	--