

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Genetische Regulation der Oxacillinresistenz bei *Staphylococcus epidermidis*

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
JÖRN CHRISTIAN HUCK
aus Hamburg

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Fickenscher
Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2015
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.5.2015
gez.: Prof. Dr. J. Roider

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
1.1. Der Genus <i>Staphylococcus</i>	2
1.2. Staphylokokken als nosokomiale Infektionserreger	3
1.3. Methicillinresistenz bei Staphylokokken	5
1.3.1. Penicillinbindende Proteine	6
1.3.2. <i>mecA</i> als Methicillinresistenz vermittelndes Gen	6
1.3.3. Für das Resistenzverhalten relevante Gene	7
1.4. Biofilmbildung von <i>Staphylococcus epidermidis</i>	9
1.5. Regulation der PIA Synthese in <i>Staphylococcus epidermidis</i>	11
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit	13
2. Material	15
2.1. Geräte	15
2.2. Chemikalien	16
2.3. Puffer und Lösungen	16
2.4. Nährmedien	17
2.5. Enzyme	17
2.6. Reagenziensets für molekularbiologische Standardverfahren	18
2.7. Oligonukleotide für quantitative Transkriptionsanalyse	18
2.8. Datenbanken und Programme	20
3. Methoden	21
3.1. Anzucht und Lagerung von Bakterienstämmen	21
3.2. Erstellen einer Wachstumskurve	21
3.3. Bestimmung der Biofilmbildung	21
3.4. Minimal Attachment Killing (MAK) für Oxacillin	22
3.5. Realtime PCR Analysen	24
3.5.1. RNA Präparation	25
3.5.2. DNA Verdau vor Transkriptionsanalyse	36
3.5.3. Primertestung	38
3.5.4. Transkriptionsanalyse	39
3.5.5. Auswertung und Rechenmethode	30
4. Ergebnisse	32
4.1. Wachstumskurve von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 1057	32
4.2. Biofilmbildung ausgewählter Stämme und Mutanten	33
4.3. Minimal Attachment Killing der Deletionsmutanten	35
4.4. Transkriptionsanalyse der Deletionsmutanten	37
4.4.1. Aktivität von <i>asp23</i> und <i>mecA</i>	37
4.4.2. Screening Transkriptionsunterschiede weiterer Gene	41
4.4.3. Bestätigung der im Screening auffälligen Genorte	43
5. Diskussion	48
5.1. Phänotypische Eigenschaften ausgewählter Stämme und Mutanten	48
5.2. Einfluss von <i>mecA</i> auf das gezeigte Resistenzverhalten	50
5.3. Diskussion der Transkriptionsanalyse weiterer Gene	53
6. Zusammenfassung	58
7. Literaturverzeichnis	59
8. Anhang	65
9. Danksagungen	74
10. Curriculum vitae	75

1. Einleitung

Wird eine Infektionskrankheit im Krankenhaus übertragen, so spricht man von einer nosokomialen Infektion. Da die in diesem Zusammenhang identifizierten Bakterien immer häufiger dazu neigen, Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika auszubilden, erweisen sie sich in der Behandlung immer weniger einer wirksamen Antibiotika-Therapie zugänglich. In der öffentlichen Diskussion werden diese multiresistenten Keime daher als Problemkeime thematisiert. Eine besondere Stellung innerhalb der Gruppe dieser Bakterien fällt hierbei den Staphylokokken zu, denen auch *Staphylococcus epidermidis* angehört: er wurde lange Zeit unterschätzt als Bestandteil der komensalen Hautflora, von dem keine Pathogenität in dem heute bekannten Maße erwartet wurde.

1.1. Der Genus *Staphylococcus*

Staphylokokken sowie die Gattungen *Stomatococcus*, *Micrococcus*, und *Planococcus* gehören taxonomisch zur Familie der Micrococcaceae. Es lassen sich derzeit 65 unterschiedliche Staphylokokkenspezies anhand Ihrer unterschiedlichen morphologischen, biochemischen, physiologischen und enzymatischen Merkmale klassifizieren. Aktuelle Empfehlungen schlagen die Einteilung in eine neue Familie der *Staphylococcaceae* mit den Gattungen *Staphylococcus*, *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* und *Salinococcus* vor (Garitty, Bell und Lilburn 2004, Kloos et al. 1994, Schleifer et al. 1986). Bei Staphylokokken handelt es sich um unbewegliche, fakultativ anaerobe und nicht sporenbildende, grampositive Kokken mit einem Durchmesser von etwa 1 µm. Sie zeichnen sich durch ihre unter dem Mikroskop sichtbare traubenhafte, oft auch kurze kettenförmige Anordnung aus, durch die sie ihren Namen erhalten haben (Parisi et al. 1985). Die Fähigkeiten einiger Spezies, bei Konzentrationen von bis zu 10 % NaCl wachsen zu können, sogar bei Temperaturen von bis zu 60°C für mindestens 30 Minuten zu überleben und gegen eine Vielzahl von Antibiotika resistent zu sein, machen sie zu den Widerstandsfähigsten unter den nicht sporenbildenden Bakterien. Das Zellwandpeptidoglycan von Staphylokokken enthält als Besonderheit eine Interpeptidbrücke aus multiplen Glycin-Resten. Somit sind sie empfindlich gegenüber dem an Glycin-Glycin-Bindungen angreifenden Enzym Lysostaphin (Wu et al. 2003). Als besonderes enzymatisches Unterscheidungsmerkmal innerhalb der Gattung dient die Plasmakoagulase. Staphylokokken die über Plasmakoagulase verfügen werden als Koagulase-positive

Staphylokokken von der Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) unterschieden, denen die Plasmakoagulase fehlt. Als Testverfahren zur Identifizierung des Enzyms dient die Koagulasereaktion, bei der die Koagulase an Prothrombin bindet und über dessen Aktivierung in der Gerinnungskaskade zu einer Gerinnung von Blutplasma führt (Kloos et al. 1994, Schleifer und Kloos 1975). Unter den Koagulase-positiven Staphylokokken gibt es nur eine humanpathogene Spezies, die daher auch zu den am besten untersuchten gehört: *Staphylococcus aureus*. Diese verursacht häufig invasive Infektionen sowie eitrige Infekte (Han et al. 2012) und ist in der Lage Superantigene zu bilden. Zu den Superantigenen zählen Exfoliatin A und B deren Produktion zum Staphylococcal scaled skin syndrom (SSSS) führen kann. Auch die Enterotoxine A bis E sowie G bis Q zählen zu den Superantigenen und bedingen Lebensmitteltoxikosen und können wie auch die Produktion von TSST-1 durch eine *S. aureus* Infektion zum Toxic-Schock-Syndrom (TSS) führen (Alouf et al. 2003). Die Spezies *S. delphini*, einzelne Stämme von *S. hyicus*, *S. pseudointermedius*, *S. lutrae* und *S. schleiferi* gehören ebenso zu den Koagulase-positiven, sind jedoch für den Menschen von untergeordneter Bedeutung aufgrund ihrer geringeren Pathogenität (Bond et al. 2012, Thibodeau et al. 2012).

1.2. Staphylokokken als nosokomiale Infektionserreger

Den weit größeren Teil der Gattung *Staphylococcus* machen die Koagulase-negativen Staphylokokken aus: Sie galten lange Zeit als apathogene Erreger, die zudem zur Kommensalen Bakterienflora von Haut und Schleimhaut von Warmblütern zählen und unter normalen Umständen keinerlei Infektionen auslösen. So auch der in dieser Arbeit untersuchte *S. epidermidis*, welcher auf der gesamten Körperoberfläche zu finden ist. An Schweißdrüsen, Haartalldrüsen und Schleimhaut der Nase stellt er mit mit 60-95 % die am häufigsten isolierte Art mit Populationsdichten von bis zu 10^4 - 10^6 Koloniebildenden Einheiten (KBE) pro cm^2 an dar (Kloos et al. 1994, 1997). Erst in den letzten drei Jahrzehnten hat sich das Bild von *S. epidermidis* im Bezug auf seine Pathogenität gewandelt, so dass der Nachweis von Koagulase-negativen Staphylokokken in Isolaten aus klinischen Untersuchungsmaterialien nun in vielen Fällen nicht als Kontamination gewertet werden kann (Piette et al. 2009). In den USA sind Koagulase-negative Staphylokokken die am häufigsten isolierten nosokomialen Keime die dem National Healthcare Safety Network (NHSN) in den Jahren 2006 und 2007 gemeldet wurden:

5.178 von 33.848 (15.3 %) Erregern aus 28.502 Infektionen (Hidron et al. 2008). Damit gehören Koagulase-negative Staphylokokken seit einiger Zeit trotz Ihrer vergleichsweise geringen Pathogenität zu den häufigsten nosokomialen Infektionserregern und sind als solche für ein hohes Maß an Morbidität und Mortalität verantwortlich (Rupp et al. 1994, Sydnor et al. 2011). Es lassen sich also Koagulase-negative Staphylokokken, vor allem aber *S. epidermidis* als wichtiger, in den meisten Fällen nosokomialer Infektionserreger, identifizieren. Deren Therapie stellt sich, gerade wenn es um fremdkörperassoziierte Infektionen geht, aufgrund einer ausgeprägten und häufigen mehrfachen Antibiotikaresistenz zunehmend schwieriger dar (Koksal et al. 2009, Raad et al. 1998).

Für den immunkompetenten Menschen mit habitueller Besiedelung sind Koagulase-negative Staphylokokken weitgehend apathogen. Kommen jedoch Risikofaktoren für eine nosokomiale Infektion hinzu, wie implantierte Liquor-Shunts, künstliche Herzklappen, Gelenkprothesen, Katheter zur chronisch ambulanten Peritonealdialyse (CAPD), Katheter zur intravasalen Flüssigkeitsapplikation oder allgemein implantierte Fremdkörper aus polymeren Kunststoffen oder Metallen, so steigt deren potentielle Gefahr. Von den durch durch Koagulase-negative Staphylokokken verursachten nosokomialen Infektionen entstehen zwei Drittel durch Assoziation mit kunststoffgefertigten Fremdkörpern (Dominguez de Villota et al. 1987, Seral et al. 2011). Eine Septikämie durch Koagulase-negative Staphylokokken, die unabhängig von implantierten Fremdkörpern auftritt, ist selten und tritt insbesondere bei Immunsuppression auf (Herwaldt et al. 1992). Fremdkörper assoziierte Infektionen zeichnen sich vor allem durch einen oftmals chronischen Verlauf mit Erregerpersistenz aus, die in Kombination mit einer gravierenden Antibiotikaresistenz oft als einzige kausale Behandlungsmöglichkeit die Entfernung des Fremdkörpers zulässt (Huebner et al. 1999). Insgesamt kommt der Implantation von Fremdkörpern in der modernen Medizin in den letzten Jahrzehnten ein immer größerer Stellenwert zu. So werden in Deutschland jährlich über 2,5 Millionen medizinische Fremdkörper wie künstliche Linsen, Zentral-venöse Katheter, künstliche Gelenke oder Herzklappen implantiert, wodurch die Zunahme der durch Koagulase-negative Staphylokokken verursachten Infektionen keineswegs verwunderlich erscheint (Mack et al 2004). Diese Infektionen entstehen nicht nur endogen durch die Haut. Koagulase-negative Staphylokokken haben die Fähigkeit auf Intensivstationen auf medizinischen Geräten

und Einrichtungen über Wochen und Monate zu persistieren und korrelierend nosokomiale Infektionen zu verursachen (Neely et al. 2000).

1.3. Methicillinresistenz bei Staphylokokken

Zu Beginn der neunziger Jahre nahm der Anteil der Methicillin resistenten *S. aureus* (MRSA) Stämme unter den klinischen Isolaten zunächst stetig zu. Der Anteil von MRSA an allen untersuchten *S. aureus* -Isolaten stieg von weniger als 2 % im Jahr 1990 auf mehr als 15 % im Jahr 1998. In den Jahren seit 2001 wird jedoch in einigen Ländern der Europäischen Union eine Stagnation oder sogar leichte Abnahme festgestellt. So berichteten 2010 sieben Länder (Österreich, Zypern, Estland, Frankreich, Griechenland, Irland und Großbritannien) über einen abnehmenden Trend für MRSA unter den Infektionserregern. In Deutschland wie auch in Italien, Ungarn und Slowenien stiegen die MRSA Infektionsraten 2010 im Vergleich zum Vorjahr jedoch signifikant an laut Daten des European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) welches koordiniert wird durch das European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Ein Viertel der Staaten der Europäischen Union berichtet 2010, dass von allen *S. aureus* Infektionen mehr als 25 % durch MRSA verursacht wurden (EARS-Net Daten).

Die Behandlungsmöglichkeiten bei MRSA Infektionen stellen sich weiterhin als eingeschränkt dar, da sowohl die komplette Klasse der Beta-Lactamantibiotika als unwirksam einzustufen ist und darüber hinaus häufig auch eine Multiresistenz gegenüber übrigen Substanzklassen besteht. Der Anteil von Oxacillin (Methicillin)-resistenten Stämmen bei *S. aureus* erhöhte sich von 17,5 % (2004) auf 20,3 % (2007), während die Resistenzhäufigkeit bei Erythromycin und Gentamicin 2007 jeweils um ca. 3 % rückläufig war. *S. aureus* Isolate mit verminderter Sensibilität gegen Glykopeptide (Vancomycin, Teicoplanin) oder Linezolid wurden nicht gefunden. Von den *S. epidermidis* Isolaten wurden 2007 15,4 % als Teicoplanin-intermediar und 2,1 % als Teicoplanin-resistent bewertet. (PEG Resistenzstudie 2007). Unter den *S. epidermidis* Isolaten lag die Resistenz gegenüber Oxacillin (Methicillin) 2007 bei bemerkenswerten 73,8 % (Kresken et al. 2007). Oxacillin zählt wie Cloxacillin oder auch Dicloxacillin zu den Beta-Lactamase-festen Antibiotika, die heute zur Therapie zur Verfügung stehen. Das bekannteste dieser Gruppe, heute jedoch nicht mehr im Handel, ist Methicillin. Beta-Laktamase-feste Antibiotika umgehen die Gefahr der Resistenzbildung von Bakterien, denen es durch Bildung

von Beta-Laktamase gelingt, den Beta-Laktam-Ring hydrolytisch zu spalten. Dadurch werden einfache Beta-Laktam-Antibiotika unwirksam, die durch Bindung an Penicillin bindende Proteine die Zellwandsynthese unterbrechen.

1.3.1. Penicillinbindende Proteine

Penicillinbindende Proteine (PBP's) sind membranassoziierte Proteine die sich unterteilen lassen in low-molecular-mass (LMM) PBP's, welche monofunktional als D,D-Carboxypeptidasen dienen, oder als multimodulare high-molecular-mass (HMM) PBP's mit verschiedensten funktionellen Rollen. Allgemein katalysieren PBP's die Transpeptidierung zur Quervernetzung der Peptidoglykane der Bakterienzellwand. Als Substrat Analoga können Beta-Laktam-Antibiotika kovalent an der PBP aktiven Seite binden und diese inaktivieren. Dabei sind HMM PBP's mit einer Masse von >60 kDa die kritischen Antibiotika Ziele. In Staphylokokken sind dies die PBPs 1,2, und 3 mit einer hohen Affinität zu den meisten Beta-Laktam-Antibiotika und essentiell für das Zellwachstum und das Überleben empfindlicher Stämme (Chambers et al. 1999, Navratna et al. 2010). PBP1 spielt eine essentielle Rolle bei der Zellteilung und scheint nicht die haupttragende Funktion bei der Zellwandsynthese zu haben (Pereira et al. 2007). PBP2 ist ein Enzym mit Transglycosylase und Transpeptidase Aktivität. Die Inhibierung dieses Proteins führt zu eingeschränkter Peptidoglykan Elongation und folglich zu einem Ausströmen von Cytoplasma Bestandteilen und letztendlich Zell Lyse (Leski et al. 2005). Die Inaktivierung von PBP3 ändert weder die Muropeptid Komposition der Zellwand noch erhöht sich die Autolyse der Zellen. Bei inaktiviertem PBP3 werden dennoch Zellen abnormer Größe und Form produziert. PBP3 ist sensitiver auf Methicillin als PBP1 oder PBP2 (Yoshida et al. 2012). Das LMM PBP 4 mit einer geringeren Masse wird nicht als kritisches Ziel von Beta-Laktam-Antibiotika angenommen, wenngleich es an der Zellwandsynthese beteiligt ist. Es scheint jedoch in der Funktion mit PBP2 hinsichtlich Zellwandsynthese zu kooperieren (Leski et al. 2005).

1.3.2. *mecA* als Methicillinresistenz vermittelndes Gen

Aufgrund der großen genetischen Ähnlichkeit zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* besteht die Möglichkeit, Anhaltspunkte über genetische Regulationsmechanismen aus *S. aureus* für *S. epidermidis* zu erhalten. Als verantwortlich für die Methicillin- und Oxacillinresistenz bei *S. aureus* (MRSA/ORSA) sowie bei koagulase-negativen Staphylokokken wurde ein alternatives Penicillin bindendes Protein identifiziert, das

so genannte PBP2a oder auch PBP2', das in Methicillin sensiblen Stämmen fehlt (Roychoudhury et al. 1994). PBP2a mit seiner geringen Affinität zu Beta-Laktam-Antibiotika ist in der Lage, bei sonst für das Bakterium letalen Antibiotika-Konzentrationen, essentielle Funktionen wie das Zellwachstum der Penicillin bindenden Proteine mit hoher Affinität zu übernehmen. Somit stellt sich darin ein zweiter äußerst wirkungsvoller Mechanismus neben der Bildung von Beta-Laktamase zu Resistenzbildung gegenüber Beta-Laktamantibiotika dar (Fuda et al. 2004). Das für PBP2a codierende Gen und damit verantwortlich für die Methicillinresistenz ist *mecA* welches in der mobilen *Staphylococcus* cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) lokalisiert ist. MRSA wird über den positiven Nachweis von *mecA* bzw. PBP2a oder eine Oxacillin-MHK > 2 mg/l (EUCAST-Grenzwert) in einem *S. aureus* Stamm definiert. Es lassen sich acht verschiedene SCC*mec* Typen in *S. aureus* unterscheiden und zudem weiter in Subtypen klassifizieren. SCC*mec* besteht aus drei Regionen: Erstens aus der so genannten Methicillin-Resistenzdeterminante (*mec*) zusammen mit den regulatorischen Elementen *mecI* und *mecR1* (falls vorhanden) (Berger-Bächi et al. 2002, Niemeyer et al. 1996). Die Expression von *mecA* wird von den Proteinen MecI (fungiert als Repressor Protein) und MecR1 (Signal Transduktion Protein) reguliert. Die Bindung von MecI an die Promotor Region von *mecA* bewirkt eine Hemmung der Transkription. Wenn Beta-Laktam-Antibiotika an MecR1 binden, wird über eine Protease Aktivität MecI degradiert und eine gesteigerte Expression von *mecA* ist die Folge. Zweitens gehört zur SCC*mec* ein *ccr* Komplex mit den cassette chromosome recombinase (*ccr*) Genen, welche für die Mobilität der SCC*mec* verantwortlich sind (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) 2009). Drittens zählt zur SCC*mec* eine Serie variabler „junkyard“ oder auch J Regionen (Ito et al. 2003). Darüber hinaus sind noch weitere von *mec* unabhängige Faktoren für *S. aureus* bekannt, von denen ein Einfluss auf die phänotypische Expression der Methicillin- und Oxacillinresistenz ausgeht und die im Folgenden vorgestellt werden sollen:

1.3.3. Für das Resistenzverhalten relevante Gene

Die chromosomalen *fem* (factor essential for methicillin resistance) Gene, auch aux (auxillary) factors genannt, sind notwendig für die vollständige Expression der Resistenz. Es sind insgesamt mehr als zwanzig dieser Gene beschrieben. Zu den

wichtigsten zählen *femA*, *femB*, *femC* (*glnR*), *femD* (*glmM*, *femR*), *femE* und *femF* (*murE*), dessen Funktion noch weitestgehend unbekannt ist (Tab. 1). Viele von Ihnen spielen eine direkte oder indirekte Rolle bei der Peptidoglycan Biosynthese und dessen Umsatz und beeinflussen damit den Zellwandmetabolismus (Berger-Bächi et al. 1998, 2002, Chambers et al.1997).

Tabelle 1: *fem* Gene

Gen (Synonym)	Alternation am Peptidoglycan	Literaturnachweis
<i>femA</i>	Interpeptidbildung; Addition des 2. und 3. Glycinrestes an das Stammpeptid.	Stranden et al. 1997
<i>femB</i>	Interpeptidbildung; Addition des 4. und 5. Glycinrestes an das Stammpeptid.	Stranden et al. 1997
<i>femC</i> (<i>glnR</i>)	Glutaminsynthetase Repressor Gen (<i>glnR</i>); Inaktivierung vermindert die Amidierung des D-Glutamatrestes des Stammpeptids und damit die Quervernetzung.	Gustafson et al. 1994
<i>femD</i> (<i>glmM</i> , <i>femR</i>)	Phosphoglukosaminmutase; Katalysiert die Interkonversion von Glukosamin-6-phosphat zu Glukosamin-1-phosphat und damit den ersten Schritt des Peptidoglycan-Vorläufermoleküls UDP-N-acetylglucosamin.	Jolly et al. 1997
<i>femF</i> (<i>murE</i>)	Katalysiert den Einbau von Lysin in das Peptidoglycan Stammpeptid.	Ornelas-Soares et al. 1994

Tabelle 2: Weitere relevante Gene:

Gen (Synonym)	Beschreibung	Literaturnachweis
<i>asp23</i>	Codiert für ein alkalines Schock Protein. In <i>S. epidermidis</i> σ^B abhängige Transkription, daher als Marker Gen für die Aktivität von σ^B geeignet. In <i>S. aureus</i> lässt sich keine Induktion der <i>asp23</i> Expression durch Ethanol oder Hitze Stress auslösen.	Gertz et al. 1999, Giachino et al. 2001, Knobloch et al. 2004, Senn et al. 2005
<i>blaR</i>	Codiert für ein Integrales Rezeptorprotein in <i>S. aureus</i> , dessen C-terminale Domäne auf der Oberfläche der Plasmamembran eine Beta-Lactam Bindedomäne darstellt. Reguliert über intrazelluläre Signalwege die Transkription von <i>blaZ</i> positiv und somit letztendlich die Produktion von Beta-Laktamase. Auf <i>blaZ</i> wirkt Blal als Repressor und verhindert die Transkription, auf <i>mecA</i> wirkt MecI als Repressor. Durch Induktion der Beta-Laktam-Antibiotika wird Blal wie auch MecI mittels Zink Protease proteolytisch gespalten und <i>mecA</i> kann ebenso wie <i>blaZ</i> transkribiert werden. Daneben existiert für <i>mecA</i> noch ein eigenes Rezeptorprotein MecR1, das im Gegensatz zu BlaR1 nicht mit allen Beta-Lactam-Antibiotika reagiert.	Golemi-Kotra et al. 2003, Hackbarth et al. 1994, Thumanu et al. 2006

Gen (Synonym)	Beschreibung	Literaturnachweis
<i>dltA</i>	Genprodukt von <i>dltA</i> ist die D-alanin-D-alanyl-Transport-Protein Ligase (Dcl) Diese aktiviert D-alanin durch ATP-Hydrolyse und wird an den Phosphopantetheine Co-Faktor eines spezifischen D-alanin-Transport-Proteins (Dcp) angekoppelt, für das <i>dltC</i> codiert. Am Ende der ablaufenden Reaktionskaskade steht die Anlagerung des positiv geladenen L-Alanins an die sonst negativ geladenen Teichoidsäuren der Bakterienzellwand. Inhibierung von Dcp mindert das Resistenzverhalten.	Debabov et al. 1996, May et al. 2005, Peschel et al. 1998
<i>fmtA</i>	Codiert ein fünftes Penicillin bindendes Protein für <i>S. aureus</i> mit geringer Bindungsaffinität zu Beta-Lactamen und der Fähigkeit eine durch Beta-Lactam- Antibiotika hervorgerufene unterdrückte Peptidoglycan Synthese der Zellwand zu kompensieren.	Fan et al. 2007, Komatsuzawa et al. 1999
<i>fmtB (mrp)</i>	Codiert ein Zelloberflächenprotein, Tn551-Insertion in <i>fmtB</i> bewirkt eine Reduktion der Oxacillin Resistenz in einem MRSA.	Komatsuzawa et al. 2000
<i>fmtC (mprF)</i>	Ein Membran assoziiertes Protein wird codiert. Inaktivierung von <i>mprF</i> führt zu einer verminderten Modifikation von Phosphatidylglycerol mit L-lysine und damit einer verminderten negativen Ladung der Membranoberfläche. Inaktivierung von <i>mprF</i> führt zu einer verstärkten Bindung von antimikrobiellen Peptiden an das Bakterium und verminderter Resistenz.	Midorikawa et al. 2003, Peschel et al. 2001
<i>llm</i>	Codiert für ein Protein mit Membranständiger Lokalisation. Ausschalten von <i>llm</i> in MRSA führt zu verringerter Resistenz.	De Lencastre et al. 1999, Maki et al. 1997
<i>lytM</i>	Autolytische Aktivität in <i>S. aureus</i> angenommen. Codiert für ein aussonderbares Protein.	Fujimura et al. 2008, Ramadurai et al. 1997
<i>murF</i>	Essentiell für eine volle Expression der Methicillin Resistenz in <i>S. aureus</i> . Veränderung in der Peptidoglykanstruktur von Mutanten, bei denen <i>murF</i> ausgeschaltet ist. In der <i>murF</i> Mutante F9 wurde zudem eine verminderte Transkription von <i>mecA</i> gefunden, wohingegen in Stämmen, die ihr hohes Resistenzlevel beibehalten haben, die Transkription von <i>mecA</i> gesteigert ist.	Sobral et al. 2003
<i>vas</i>	Deaktivierung des Gens <i>vraS</i> hat das Aufheben der Oxacillin-Resistenz bei MRSA zur Folge. <i>VraS</i> ist Teil des <i>vraS/vraR</i> -zwei-Komponenten Regulierungssystems und als solches induzierbar durch Beta-Laktam-Antibiotika. Es kontrolliert die transkriptionelle Induktion vieler Zellwand Gene wie <i>pbp2</i> .	Boyle-Vavra et al. 2006, Yin S et al. 2006

1.4. Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis*

Für die Fähigkeit von *S. epidermidis*, an Fremdkörpern assoziiert, als Bakteriämie Quelle im Organismus zu persistieren, ist maßgeblich die Bildung eines so genannten Biofilmes verantwortlich. Auf der Polymeroberfläche von Fremdkörpern bildet *S. epidermidis* einen mehrschichtigen Zellverband, wobei die meisten der aufliegenden Bakterien jeglichen direkten Kontakt zur Oberfläche verloren haben und

sich lediglich über interzelluläre Kräfte zu halten vermögen. Eingehüllt wird diese Bakterien Masse von einer schleimartigen Substanz aus Exopolysacchariden, die man als Biofilm bezeichnet. Man kann Biofilm-bildende Bakterien-Stämme von nicht Biofilm-bildenden unterscheiden. Da in epidemiologischen Studien beobachtet wurde, dass Biofilm bildende Koagulase-negative Staphylokokken wesentlich häufiger bei Fremdkörper-Assoziierten Infektionen angetroffen werden können als nicht Biofilm-bildende, lässt sich schließen, dass diese Fähigkeit in direktem Zusammenhang zur Pathogenität von Koagulase-negativen Staphylokokken steht und diese bedingt (Deighton und Balkau 1990, Ziebuhr et al. 2001, 2006). In diesem Zusammenhang wurden Persister Zellen in Biofilmen beschrieben, die in Anwesenheit von Antibiotika weder Wachsen noch absterben. Von Persister Zellen wird angenommen, dass es sich um auf das Überleben spezialisierte Zellen handelt, deren Entstehung nicht durch Antibiotika induziert wird und die keinem eigenen Stadium im Zellzyklus entsprechen (Keren et al. 2004, Singh et al. 2009).

Bei der Ausbildung eines Biofilmes von *S. epidermidis* lassen sich drei charakteristische Phasen unterscheiden: Initial kommt es in Phase 1 zu einer Anheftung der Bakterien an die entsprechende biotische oder abiotische Oberfläche des Fremdkörpers, der primären Adhäsion und Mikrokoloniebildung. In Phase 2 stehen die Interzelluläre Aggregation und Akkumulation der Bakterien im Vordergrund. Zudem werden durch disruptive Prozesse Kanäle für die spätere Versorgung tieferer Biofilmschichten mit Nährstoffen gebildet. In Phase 3 kommt es zur vollständigen Ausbildung eines Biofilmes. Die Bakterien sind nun vollkommen umhüllt von extrazellulärer Matrix und haben, obwohl sie darin fest an der Unterlage befestigt sind, zum größten Teil jeglichen Kontakt zur Unterlage verloren. Hierzu erfolgt die bereits in Phase 2 beginnende Absonderung eines interzellulären Polysaccharidadhäsins (PIA) und anderen Matrixsubstanzen wie Proteinen oder DNA, die gemeinsam mit den Bakterien den Biofilm bilden. Das für die Phase der Akkumulation verantwortliche Polysaccharid, wegen seiner Funktion Interzelluläres Polysaccharidadhäsins (PIA) genannt, aus *S. epidermidis* 1457 ließ sich experimentell aufreinigen und isolieren (Mack et al. 1996, Otto et al. 2012). Zwischen Biofilmbildung und PIA-Produktion konnte in einer Population von 179 *S. epidermidis* Stämmen eine Korrelation gezeigt werden (Mack et al. 1996). Dies drückt noch einmal aus, welche entscheidende Bedeutung PIA in der akkumulativen Phase der

Biofilmbildung zukommt. In Tiermodellen konnte zudem nachgewiesen werden, welche entscheidende Bedeutung PIA und dem für dieses Protein entscheidenden Operon bei Fremdkörper assoziierten Infektionen zukommt (Rupp et al. 1999, 2001). Alternativ zu PIA als Hauptbestandteil des Biofilmes existiert das accumulation associated Protein (AAP), welches in PIA negativen Biofilmen dessen Funktion zu übernehmen vermag (Rohde et al. 2005). Durch disruptive Kräfte und Detachment kommt es auch zur Weiterverbreitung der Bakterien (Dispersal). Zum Eintritt in die stationäre Wachstumsphase wird über ein Quorum-sensing System, in Staphylokokken Agr (accessory gene regulator) genannt, die Expression vieler Oberflächen Adhäsionsproteine vermindert. Dieser regulative Mechanismus, der in Mikroorganismen die Gen Expression in einer Zell-Dichte abhängigen Art und Weise kontrolliert, verstärkt zudem die Expression von Toxinen und die Bakterienablösung beeinflussenden Proteinen (Otto et al. 2012).

1.5. Regulation der PIA Synthese in *Staphylococcus epidermidis*

Der Genlokus, der in *S. epidermidis* mit seinen Genprodukten für die Biosynthese von PIA aus UDP-N-Acetylglukosamin als verantwortlich identifiziert werden konnte, ist *icaADBC*. Innerhalb der Genprodukte des *ica* (intercellular adhesion) Operons stellt IcaA ein Transmembranprotein von 412 Aminosäuren mit einer Homologie zu N-Acetyl-glukosaminyl-Transferasen dar. IcaB, bestehend aus 289 Aminosäuren, ist vermutlich ein Sekretionsprotein, und IcaC mit 355 Aminosäuren stellt ein hydrophobes integrales Membranprotein dar. Der Genort *icaD* verfügt über teilweise Überschneidungen mit den Genorten *icaA* und *icaB*. *IcaD* kodiert für ein weiteres Transmembranprotein (O'Gara et al. 2007). IcaA für sich genommen zeigt nur eine geringe N-Acetyl-glukosaminyl-Transferasen Aktivität und stellt das katalytische Enzym der PIA Synthese dar. Die Coexpression von IcaA und IcaD hingegen führt zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität und zur Produktion von N-Acetylglukosamin-Oligomeren mit einer Kettenlänge von maximal 20 Sacchariden. Die Tatsache, dass jedoch nur die Expression von IcaA, IcaD und IcaC gemeinsam zu einem Syntheseprodukt führt, das mit PIA-spezifischem Antiserum reagiert, zeigt die enge Interaktion der Gene untereinander (Gerke et al. 1998). Der *icaADBC* Genlokus kann nicht bei allen *S. epidermidis* Stämmen gefunden werden. Interessanterweise kommt er jedoch signifikant häufiger vor bei solchen, die sich im Rahmen von Infektionen isolieren ließen, im Vergleich zu Isolaten von Haut und

Schleimhäuten gesunder Probanden. So ließen sich bei 85 % eines Kollektives an *S. epidermidis*-Isolaten aus Blutkulturen die *ica*-Gene nachweisen. Das macht diesen Genlokus zu einem Ansatzpunkt in der klinischen Diagnostik, um potentielle Erreger frühzeitig zu identifizieren und ein Screening zu entwickeln (Freboung et al. 2000, Galdbart et al. 2000, Sharma et al. 2011, Ziebuhr et al. 1997). Das *ica*-Operon, die PIA-Produktion und damit auch die primäre Adhäsion werden in *S. epidermidis* auf verschiedene Art und Weise reguliert. Zum einen haben externe, auf das Bakterium wirkende Umweltfaktoren einen Einfluss auf die PIA-Synthese. So kann die Biofilmbildung durch Zugabe von Glucose zum Nährmedium unter bestimmten Voraussetzungen stimuliert werden (Knobloch et al. 2002, Mack et al. 1992, Rachid et al. 2000). Ebenso haben Osmolarität beziehungsweise NaCl Konzentration (Rachid et al. 2000) und Ethanol (Knobloch et al. 2001) einen Einfluss auf die PIA-Expression. Des Weiteren wurde ein Einfluss von anaeroben Anzuchtbedingungen sowie der Temperatur beobachtet (Bradford et al. 2011). Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass sich die *ica*-Transkription durch subinhibitorische Konzentration an Antibiotika in der Nährlösung stimulieren lässt. Dies gilt für Tetracyclin und Quinupristin-Dalfopristin (semisynthetisches Streptomycin), nicht jedoch für Penicillin, Oxacillin, Chloramphenicol, Clindamycin, Gentamicin, Ofloxacin, Vancomycin oder Teicoplanin (Fitzpatrick et al. 2002, Rachid et al. 2000). Auch eine entsprechende Konzentration an Desinfektionsmittel kann die PIA-Produktion beeinflussen (Fitzpatrick et al. 2002, Knobloch et al. 2002). Neben diesen Umweltfaktoren nehmen zum anderen genetische Faktoren Einfluss: *icaR* codiert einen Repressor für die Transkription des *ica*-Operons, der angrenzend upstream des Operons sitzt und somit also letztendlich auch die PIA-Produktion beeinflusst. *IcaR* ist als Repressor der Transkription des *ica*-Operons für die Aktivierung durch Ethanol, nicht jedoch die Aktivierung durch NaCl-Glucose erforderlich (Conlon et al. 2002).

Die Expression von PIA wird außerdem in *S. epidermidis* durch das σ^B -Operon kontrolliert. Eine funktionell inaktive Transposonmutante, in der das Gen *rsbU* (das erste Gen des σ^B -Operons) als funktioneller Aktivator von σ^B ausgeschaltet ist, zeigt einen Biofilm-negativen Phänotyp (Knobloch et al. 2001). σ^B bindet an die RNA-Polymerase (RNAP) und ist für die Erkennung spezifischer Promotoren erforderlich. Die Aktivität von σ^B wird durch den Antisigma-Faktor RsbW reguliert, der σ^B bindet

und somit inaktiviert. RsbW kann wiederum von dem Anti-Antisigma-Faktor RsbV gebunden werden. RsbW fungiert weiterhin als spezifische Kinase für RsbV und ist in der Lage, dieses durch Phosphorylierung (RsbV-P) in seine inaktive Form zu überführen. Durch die spezifische Phosphatase RsbU kann RsbV erneut aktiviert werden. RsbU stellt also ebenso wie RsbV einen positiven Regulator für σ^B dar (Abbildung 1).

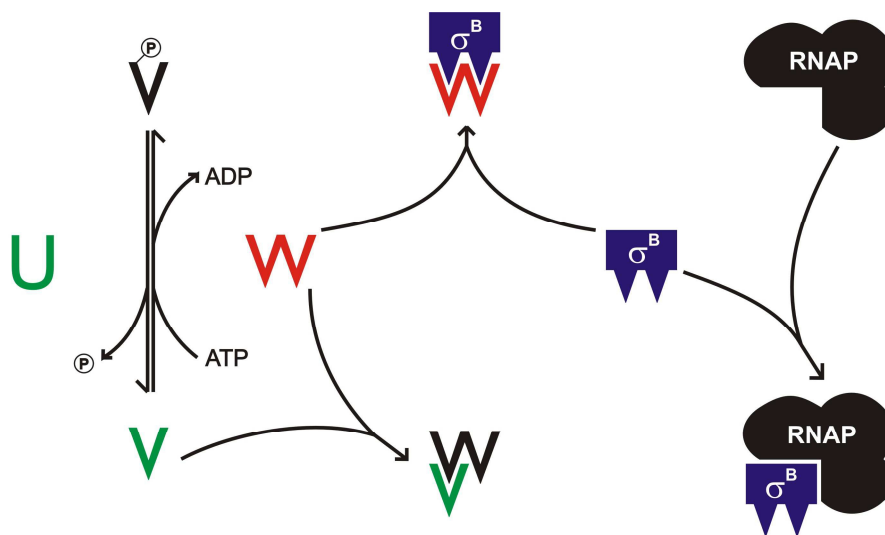


Abbildung 1: Regulation des alternativen Sigmafaktor σ^B (Knobloch et al. 2004)

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Um den Einfluss der σ^B Aktivität auf die Methicillin-Resistenz in *S. epidermidis* zu überprüfen, wurde in der Arbeitsgruppe von D. Mack die Deletion des σ^B Operons aus dem Methicillin-empfindlichen genetischen Hintergrund des Stammes 1457 in den heterogenen Methicillin- und Penicillin-resistenten *S. epidermidis* Stamm 1057 mittels Transposonmutagenese transduziert. Strukturelle Untersuchungen mittels multiplex PCR zeigten, dass die resultierenden Mutanten 1057rsbU, 1057rsbV, 1057rsbW, 1057sigB, 1057rsbUVW, 1057rsbUVWsigB ein intaktes *mecl/meR* Regulationssystem besitzen. Ziel der Arbeit war die Analyse des Einflusses des σ^B Operons in *S. epidermidis* auf die phänotypischen Eigenschaften der Bakterien hinsichtlich Biofilmbildung und Resistenzverhalten. Hierzu sollte unter dem Einfluss von Oxacillin geprüft werden, ob sich Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten von *S. epidermidis* in zwei unterschiedlichen in vivo Modellen beobachten lassen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollten die Grundlage der sich anschließenden Gen Analyse bilden. Hierbei sollte eine Beschreibung des Einflusses

von *mecA* auf das zuvor beobachtete Resistenzverhalten eine zentrale Rolle spielen. Daneben sollten auch weitere mögliche Regulatoren der spezifischen Oxacillinresistenz die im Zusammenhang mit dessen Biofilmbildung stehen könnten, identifiziert werden.

2. Material

2.1. Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Laborgerät	Hersteller
Cryofuge 6-6 Kühlzentrifuge	Heraeus-Christ, Osterode, Deutschland
Megafuge 1.0 R Kühlzentrifuge	
Biofuge pico Tischzentrifuge	
Brutschrank 5050E	
J2-21 Kühlzentrifuge	Beckmann, München, Deutschland
L5-50B Ultrazentrifuge	
Spectrophotometer 34	
Eppendorfszentrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorfsphotometer 1101M	
Thermomixer 5436	
Tischzentrifuge Rotana / S	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Primus 96 Thermocycler	MWG Biotech, München, Deutschland
Gelkammern	
iCycler iQ Thermocycler	BioRad, München, Deutschland
CHEF-DR II PFGE-System	
Gene Pulser II Elektroporationssystem	
PowerPac 3000 Power Supply	
SmartSpec Plus Spectrophotometer	
Gelkammern	
Thermoinkubator 5320	Nettler-Hinz, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, USA
Lab-Shaker Schüttelinkubator	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Inkubator F / 30	Dr. Gruß KG, Neuß am Rhein, Deutschland
GFL1083 Schüttelwasserbad	AD Krauth, Hamburg, Deutschland
PC4400 Waage	Mettler Waagen GmbH, Gießen, Deutschland
Feinwaage 2432	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Genequant	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Branson Sonifier 250-D	Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
ELISA	Behring, Marburg, Deutschland
Processor II Spectrophotometer	

Laborgerät	Hersteller
FastPrep FP120	Bio 101, Carlsbad, USA
Digital-pH-Meter 646	Knick, Berlin, Deutschland

2.2. Chemikalien

Bei den Chemikalien handelt es sich, soweit nicht anders angegeben, um analysenreine Substanzen der Firmen Fluka (Taufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma (Taufkirchen, Deutschland).

2.3. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in VE-Wasser angesetzt.

Tabelle 4: verwendete Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
EDTA-Lösung:	0,5 M Na-EDTA, pH 7,5
Gellademix (DNA):	0,25 % (wt/vol) Bromphenolblau, 0,25 % (wt/vol) Xylen Cyanol FF, 15 % (wt/vol) Ficoll
10 H MOPS:	200 mM Morpholinopropansulfonsäure, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0
NaCl-Puffer:	2,5 M NaCl, 50 mM Tris, 50 mM EDTA pH 7,0
NaCl-Stammlösung	5 M NaCl
PBS	140 mM NaCl, 9 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KCl, 1 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
SDS Stammlösung	20 % (wt/vol) Natrium-Dodecylsulfat
SE-Puffer	75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7,5
TBE-Puffer	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Tris-HCl	5 M Tris, pH 7,5 eingestellt mit HCl
Na-Acetat Lösung	3M Na-Acetat, pH 7,0

2.4. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden in VE-Wasser angesetzt und durch Erhitzen (15 min, 121°C, 3,0 bar) in einem Dampfaufoklaven sterilisiert. Um Flüssigmedien zu verfestigen wurde 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, Mi, USA) hinzugegeben. Die verwendeten Grundsubstanzen und fertigen Trockenmedien wurden von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, Md, USA), Difco und Oxoid (Basingstoke, England) bezogen.

Tabelle 5: verwendete Nährmedien

Nährmedium	Zusammensetzung
Blut-Agar	42,0 g/l Columbia-Agar, 1,0 g/l Bacto-Agar, 2,2 g/l Glukose, 72 ml/l Schafsblut, pH 7,0
Einfriermedium	100 ml 1,5 % (wt/vol) Bacto-Pepton, 60 ml Glycerin 87% Die Bestandteile wurden getrennt autoklaviert und anschließend zusammengefügt.
Mueller-Hinton Brühe (MH)	21 g/l Mueller-Hinton Brot, pH 7,3
MH mit Oxacillin (MH _{Oxa})	21 g/l Mueller-Hinton Broth, 1 µg/ml Oxacillin, 20g/l NaCl, pH 7,3
MH mit NaCl (MH _{NaCl})	21 g/l Mueller-Hinton Broth, 20g/l NaCl, pH 7,3
Trypton Soja Brühe (TSB)	30 g/l TSB BBL (Becton Dickinson), pH 7,3
TSB BBL mit 4% NaCl (TSB _{NaCl})	30 g/l TSB BBL (Becton Dickinson), 40,0 g/l NaCl, pH 7,3
TSB ohne Glukose:	17,0 g/l Trypton, 3,0 g/l Soja Pepton, 5,0 g/l NaCl, 2,5 g/l K ₂ HPO ₄ , pH 7,3

2.5. Enzyme

Tabelle 6: verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Lysostaphin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Lysozym	
RNase (DNase frei)	Boehringer, Mannheim, Deutschland
DNase (RNase frei)	Pharmacia, Freiburg, Deutschland

2.6. Reagenziensets für molekularbiologische Standardverfahren

Die angegebenen Reagenziensets wurden von den Firmen Bio 101 (Carlsbad, CA, USA), BioRad (München, Deutschland), Finnzym (Espoo, Finnland), Roche (Mannheim, Deutschland) und Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen.

Tabelle 7: verwendete Reagenziensets

Verfahren	Reagenzenset
RNA-Extraktion aus Zellen	RNAeasy Bacteria Kit
Polymerasekettenreaktion (PCR)	DyNzyme DNA Polymerase Kit, Expand High Fidelity PCR System, Expand Long Template PCR System
Real time PCR	iQ SYBR Green Supermix
Reverse Transcription	iScript cDNA Sythesis Kit

2.7. Oligonukleotide für quantitative Transkriptionsanalyse

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide I

Bezeichnung	Sequenz
<i>gyrB</i> -real1.for	CTGACAATGGCCGTGGTATTC
<i>gyrB</i> -real1.rev	GAAGATCCAACACCGTGAAGAC
<i>mecA</i> -real1.for	ATGGCTCAGGTAAGTCTGCTATC
<i>mecA</i> -real1.rev	CTGGTGAAGTTGTAATCTGGAAC
<i>asp23</i> real2.for	TCCAACCTTCTACAGATACGCC
<i>asp23</i> real3.rev	AAAATTGCAGGTATTGCAGC

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide II

Bezeichnung	Sequenz
<i>femA</i> -real2.for	CGCTGGTGGAACCTCAAATCG
<i>femA</i> -real3.rev	CCAGCATCTTCAGCATCTTCAC
<i>femB</i> -real2.for	ATCCGGCTCCTGAAGAAATTGG
<i>femB</i> -real3.rev	GTTCTAGCTTCAGTCTCTCGG
<i>femC</i> -real2.for	TGTCCTTAAAAACGCTAGAGG
<i>femC</i> -real2.rev	CACGTACTAAAGGTGAACGG

Bezeichnung	Sequenz
<i>femD</i> -real2.for	CACGTAATAAGGTGAACGG
<i>femD</i> -real2.rev	TCAACAACGTCAGCGATAC
<i>femF</i> -real2.for	TGACCAGGCATAATTTGATAAGG
<i>femF</i> -real2.rev	TTGATGACCGTGCAGAAGG
<i>fmtA</i> -real1.for	CCTCTTCAAAGTGAGATGGC
<i>fmtA</i> -real1.rev	ATAGGTCGAGTTTGACGTGC
<i>fmtB</i> -real1.for	CAAGTTGAGGCACATTCATCTG
<i>fmtB</i> -real1.rev	ACTGCCGCTCTAGCTTCTG
<i>fmtC</i> -real1.for	GCTGCTGCCATCCACTCAACAC
<i>fmtC</i> -real1.rev	ACCGTCGCACGACCTGTAGATAG
<i>pbp1</i> -real1.for	CGCTGGTGGAACTTCAAATCG
<i>pbp1</i> -real1.rev	CCAGCATCTTCAGCATCTTCAC
<i>pbp2</i> -real2.for	ATCCGGCTCCTGAAGAAATTGG
<i>pbp2</i> -real2.rev	GTTCTAGCTTCAGTCTCTCGG
<i>pbp3</i> -real1.for	TGTCCTTAAAAACGCTAGAGG
<i>pbp3</i> -real1.rev	CACGTAATAAGGTGAACGG
<i>lytM</i> -real2.for	CACGTAATAAGGTGAACGG
<i>lytM</i> -real2.rev	TCAACAACGTCAGCGATAC
<i>dltA</i> -real2.for	TGACCAGGCATAATTTGATAAGG
<i>dltA</i> -real2.rev	TTGATGACCGTGCAGAAGG
<i>murF</i> -real1.for	CCTCTTCAAAGTGAGATGGC
<i>murF</i> -real1.rev	ATAGGTCGAGTTTGACGTGC
<i>vras</i> -real1.for	CAAGTTGAGGCACATTCATCTG
<i>vras</i> -real1.rev	ACTGCCGCTCTAGCTTCTG
<i>icaR</i> -real1.for	GCTGCTGCCATCCACTCAACAC
<i>icaR</i> .real1.rev	ACCGTCGCACGACCTGTAGATAG
<i>gyrB</i> -real1.for	CTGACAATGGCCGTGGTATTC
<i>gyrB</i> -real1.rev	GAAGATCCAACACCGTGAAGAC
<i>icaA</i> -real1.for	TGTATCAAGCGAAGTCAATCTC
<i>icaA</i> -real1.rev	GGCACTAACATCCAGCATAG

Tabelle 10: Verwendete *Staphylococcus epidermidis* Laborstämme

Wildstammtyp	Bemerkung
<i>S. epidermidis</i> 1457	Stark Biofilm-positives, <i>mecA</i> negatives Isolat von einem infizierten zentralvenösen Katheter
<i>S. epidermidis</i> 1057	Biofilm-positives, <i>mecA</i> positives Isolat von einem infizierten zentralvenösen Katheter

Tabelle 11: Eingesetzte Deletionsmutanten

Stamm	Bemerkung
1457 <i>rsbV</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des Gens <i>rsbV</i>
1457 <i>rsbW</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des Gens <i>rsbW</i>
1457 <i>sigB</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion des Gens <i>sigB</i>
1457 <i>rsbUVW</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion der Gene <i>rsbU</i> , <i>rsbV</i> und <i>rsbW</i>
1457 <i>rsbUVWsigB</i>	<i>S. epidermidis</i> 1457 mit Deletion der Gene <i>rsbU</i> , <i>rsbV</i> , <i>rsbW</i> und <i>sigB</i>
1057 <i>rsbU</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbU</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057
1057 <i>rsbV</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbV</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057
1057 <i>rsbW</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbW</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057
1057 <i>sigB</i>	Transduktante von 1457 <i>sigB</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057
1057 <i>rsbUVW</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbUVW</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057
1057 <i>rsbUVWsigB</i>	Transduktante von 1457 <i>rsbUVWsigB</i> in <i>S. epidermidis</i> 1057

2.8. Datenbanken und Programme

Aus der NCBI- und der TIGR-Datenbank konnten die vollständigen Sequenzen von *S. epidermidis* ATCC 12228 und RP62A bezogen werden. Primersequenzen für die quantitative RT-PCR wurden mit dem Programm Beacon Designer 2 (Premier Biosoft International, Palo Alto, Ca, USA) generiert.

3. Methoden

3.1. Anzucht und Lagerung von Bakterienstämmen

Der jeweils verwendete *S. epidermidis* Stamm wurde zur Kultivierung aus der Stammhaltung (bei -80°C) auf eine Blutagarplatte ausgestrichen und reaktiviert. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Agarplatten bei 37°C im Brutschrank für 16 h. Anschließend wurden die Bakterien entsprechend ihres experimentellen Verwendungszweckes eingesetzt. Die Aufbewahrung der bewachsenen Stammpplatten erfolgte bei 4°C.

3.2. Erstellen einer Wachstumskurve

Aus einer frischen Übernacht-Vorkultur von 1057, 1057*rsbU*, 1057*rsbV*, 1057*rsbW*, 1057*rsbUVW*, 1057*sigB* und 1057*rsbUVWsigB* in TSB ohne Glucose wurden 100 µl pipetiert und damit 10ml MH_{Oxa} überimpft. Nach jeweils 5 h, 7 h, 9 h und 15 h wurde nun die OD 600 der Kultur bestimmt. Nach dreimaliger Versuchsdurchführung konnte anhand der Daten eine Wachstumskurve erstellt werden. Zum Zeitpunkt des größten exponentiellen Wachstums der Bakterien, in der naturgemäß die höchste Konzentration an RNA erwartet wird, soll in den folgenden Experimenten die RNA Extraktion und Analyse erfolgen.

3.3. Bestimmung der Biofilmbildung

Die im Folgenden beschriebene Methode dient der Quantifizierung an produziertem Biofilm. Untersucht wurden verschiedene Stämme bzw. Mutanten (Tabelle 10 und 11) unter unterschiedlichen Bedingungen in Bezug auf den Zusatz von NaCl zur Nährlösung. Als Vorkultur wurden jeweils 2 ml TSB ohne Glucose mit Bakterien einer frischen Übernachtskultur beimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator bei 120 upm bebrütet. Jeweils 20 µl der Vorkultur wurden zu je 2ml TSB oder TSB_{NaCl} gegeben. Aus diesen Ansätzen wurden 96-Microwell-Platten je Ansatz vierfach mit je 200 µl befüllt und diese für 20 h bis 22 h bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden danach sorgfältig entleert und ausgeschlagen sowie durch vierfaches Spülen der 96-Microwell-Platten mit jeweils 200 µL PBS Puffer je Vertiefung von nicht anhaftenden Überresten gereinigt. Die 96-Microwell-Platten trockneten nun 4 h bei 37°C im Brutschrank und es erfolgte das Anfärben der Oberfläche mit Gentianaviolett-Lösung. Dafür wurden in jede Vertiefung 50 µl Gentianaviolett-Lösung pipetiert und

der entstandene Biofilm 5 min angefärbt. Nach einem Ausspülen der Platten unter fließendem Wasser und erneutem Trockenvorgang der Platten konnte die photometrische Messung der Absorptionsrate bei einer Wellenlänge von 570 nm im BEPII-Photometer im „*evaluation mode 3*“ durchgeführt werden. Als biofilm-positiv wurden Stämme oder deren Mutanten mit Absorptionsraten $\geq 0,1$ gewertet. Unter Zusatz von Natriumchlorid zum Medium wurde eine Verdoppelung der Absorptionsrate als Induzierbarkeit der Biofilmbildung gewertet. Bei zuvor als phänotypisch biofilm-negativ bestimmten Bakterien wurde bereits eine Überschreitung des Grenzwertes als induzierbar gewertet.

3.4. Minimal Attachment Killing (MAK) für Oxacillin

Diese Methode wird verwendet, um die Empfindlichkeit von Bakterien auf Antibiotika zu testen. Um eine ähnliche Situation wie bei einer Fremdkörper assoziierten Infektion zu schaffen, geschieht dies nach Anlagerung der Bakterien an eine Oberfläche und Ausbildung eines Biofilms. Es spielt dabei keine Rolle, ob es sich bei den getesteten Bakterien um Biofilm positive- oder negative *S. epidermidis* handelt.

Zunächst sollte die Zellzahl der Bakterien ermittelt werden, die an den verwendeten Zapfen anhaften konnten: Um überhaupt ein Anhaften der Bakterien an den Kunststoffzapfen der verwendeten *transferable solid phase* Platten (TSP, Nunc, Roskilde, Dänemark) zu ermöglichen, wurden diese in mit 200 μl Poly-L-Lysin [20 $\mu\text{g/ml}$] je Kammer beschickten, 96-Microwell-Platten (TCP, Nunc) für 120 min inkubiert. Anschließend wurden die TSP-Platten steril getrocknet. Um nun an den Zapfen Bakterienzellen anzuhängen wurden sie in mit 150 μl aus den jeweiligen frischen Bakterien Übernacht- Vorkulturen zu je 2 ml in TSB ohne Glucose je Kammer beschickte 96-Microwell-Platten für 90 min inkubiert. Danach wurden die Zapfenplatten in mit 150 μl TSB mit 2% Ethanol beschickte Microwell-Platten gehängt und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Einem Waschvorgang der Zapfenplatten in PBS, um nicht gebundene Bestandteile zu entfernen, folgte das Trocknen der beschichteten TSP-Platten. Nun konnte sich ein Abschmelzen der Zapfen anschließen, um sie von der Platte zu lösen und sie in je 2ml PBS pro Zapfen zu überführen. Mittels Ultraschall im Branson Sonifier 250-D lösten sich die Bakterien von den Zapfen im Puffer und wurden in Verdünnungen von unverdünnt bis 10^{-3} auf Blutagar-Platten ausplattiert. Die gewachsenen Kolonien wurden ermittelt und der

Zellzahl der an den Zapfen anhaftenden Bakterien gleichgesetzt.

Um nun die MAK der Stämme und ihrer Mutanten zu ermitteln, wurde zunächst eine Verdünnungsreihe an MH_{NaCl} mit unterschiedlichen Oxacillin-Konzentrationen erstellt. Die Oxacillin-Konzentrationen waren von 0,5 $\mu\text{l/ml}$ in zweier Potenzen ansteigend bis 1024 $\mu\text{l/ml}$. Zunächst wurden nun wieder TSP-Zapfenplatten wie oben beschrieben mit Poy-L-Lysin vorbehandelt. Danach wurden die Zapfenplatten in 96-Microwell-Platten für 90 min inkubiert, welche mit 150 μl aus frischen Bakterien Übernachtskulturen zu je 2 ml in TSB ohne Glucose je Kammer beschickt waren. Die Zapfenplatten wurden herausgenommen und inkubierten darauf über Nacht im Brutschrank bei 37°C in frischen mit 150 μl TSB mit 2% Ethanol je Kammer beschickten Microwell-Platten. Zur Bestimmung der MAK wurden die so behandelten Zapfenplatten in 96-Microwell-Platten gehängt, welche aus der Oxacillin-Verdünnungsreihe mit je 200 μl je Kammer beschickt wurden und nun bei 37°C für 18-20 Stunden inkubiert. Jeder Stamm und jede Mutante wurde dabei doppelt getestet. Jede Zapfenreihe wurde in Kammern mit MH Nährlösung und Oxacillin Konzentrationen zu folgenden Konzentrationen gestellt: 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 32 $\mu\text{g/ml}$, 64 $\mu\text{g/ml}$, 128 $\mu\text{g/ml}$, 256 $\mu\text{g/ml}$, 512 $\mu\text{g/ml}$ und 1024 $\mu\text{g/ml}$. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die Zapfen unter aseptischen Bedingungen für 30 Sekunden in PBS gewaschen und in mit frischer TSB- Nährlösung beschickte 96-Microwell-Platten, 150 μl je Kammer, überführt. Die an den Zapfen anhaftenden Bakterienzellen hatten nun über Nacht die Möglichkeit die Kammern zu besiedeln. Für jede Platte wurden zudem 2 Reihen mit Zapfen als sterile Kontrolle mitgeführt. An den rekultivierten Platten ließen sich nun zwei unterschiedliche Arten der erneuten Besiedelung, und damit der Resistenz gegenüber dem getesteten Antibiotikum erkennen: Zum einen lässt sich eine gleichmäßige Besiedelung der Kammern bis zu einer bestimmten Konzentration beobachten: Die Antibiotikakonzentration, bei der eine Kammer steril bleibt, ist als MAK_{homo} definiert. Mit MAK_{hetero} hingegen wird das Phänomen, unregelmäßig bis zu einer bestimmten Konzentration Kammern erneut zu besiedeln oder auch einige Kammern nicht besiedeln zu können beschrieben. Die MAK_{hetero} wird also als diejenige Antibiotikakonzentration definiert, nach der bei keiner höheren noch eine Besiedelung zu erkennen ist.

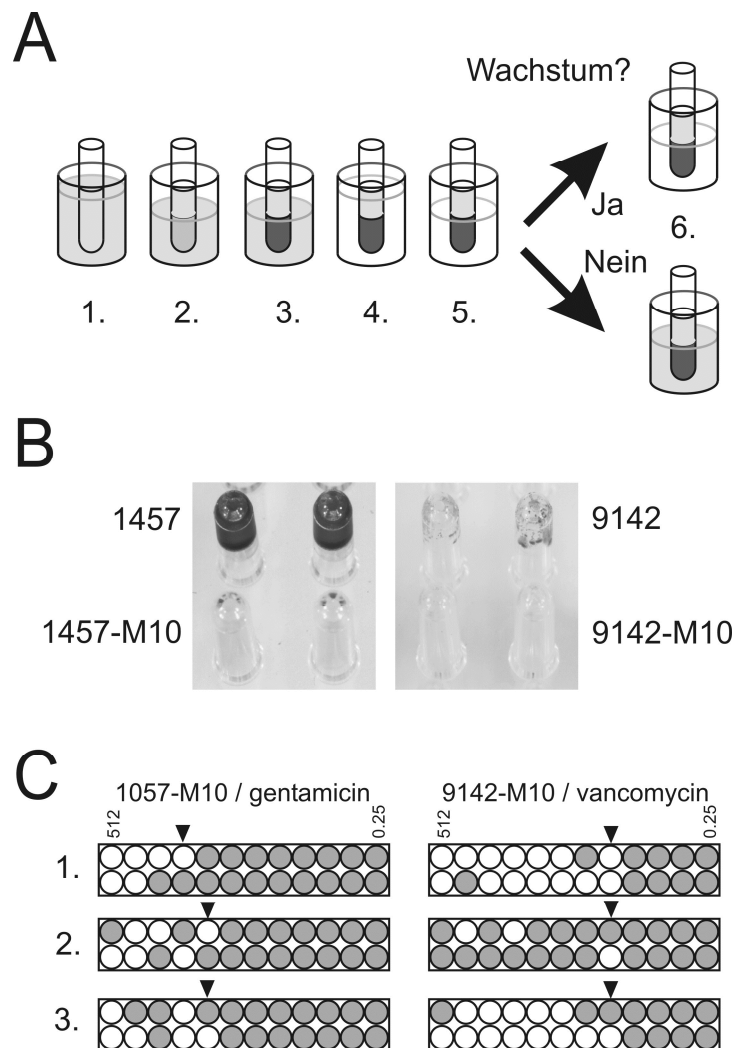


Abbildung 2: Bestimmung des minimal attachment killing (MAK), Abbildung aus: Knobloch J. K. M., von Osten H., Horstkotte M. A., Rohde H., and Mack D. 2002. Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. *Med. Microbiol. Immunol.*; 191:107-114

(A) Nachweis der Biofilmbildung an den Zapfen der TSP Platte in der Gentaiolettfrbung als Hinweis auf anhaftende Bakterien. Zu beobachten: ein homogener Biofilm links oben, rechts oben eine heterogene Biofilmbildung. Darunter: kein Biofilmnachweis. (B) Schematischer Ablauf des MAK Tests. 1. Beschichtung der Zapfen mit Poly-L-Lysin; 2. Primäre Bakterien Anheftung; 3. Kultur zur verstärkten Biofilmbildung; 4. Inkubation in antibiotikahaltigem Medium; 5. Subkultur in frischem Medium; 6. Wachstumskontrolle und Bestimmung der MAK. (C) Homogene und heterogene Resistenz. Die grauen Zellen markieren kultivierte Zellen. Der Pfeil zeigt die Grenze der homogenen Besiedelung MAK_{homo} . Über diese Konzentration hinaus finden sich noch einzelne und damit heterogen besiedelte Zellen.

3.5. Realtime PCR Analysen

Die im Nachfolgenden beschriebenen Präparationen und Versuche wurden mit dem biofilmbnegativen Stamm 1057 sowie den Mutanten 1057*rsbUVW* und 1057*rsbUVWsigB* durchgeführt (Tabelle 10).

3.5.1. RNA Präparation

9cm Zellkulturschalen mit 10 ml MH_{Oxa} pro untersuchtem Stamm und Deletionsmutante wurden mit je 100 μ l aus 2 ml Übernacht-Vorkultur von 1057, 1057*rsbUVW*, 1057*rsbUVWsigB* (Tabelle 10 und 11) in TSB ohne Glucose beimpft. In einem zweiten getrennten Ansatz wurde ebenso mit weiteren 9 cm Zellkulturschalen verfahren, hier wurde jedoch auf den Zusatz von Oxacillin verzichtet und MH_{NaCl} verwendet. Um zu gewährleisten, dass je Stamm genügend RNA bei unterschiedlicher individueller Wachstumsrate zur Verfügung steht, wurden für die Stämme 3 oder 4 Zellschalen gewählt. Danach wurden die Bakterien bei 37°C für 9 Stunden und für 17 Stunden kultiviert. Die Inkubationsphase wurde beendet, indem die Zellkulturschalen auf Eis mit einem Cellscrapper geerntet und mitsamt dem Medium in eiskalte 50 ml Falcon Tubes überführt wurden. Die Tubes wurden nun bei 6000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand sorgfältig verworfen war, wurden die Pellets mit je 2 ml eiskaltem PBS Puffer überschichtet. Um größere Zellverbände in den Proben zu lösen, wurden diese für 10 sek bei einer Amplitude von 70%, Microtip mit dem Sonifier mit Ultraschall bearbeitet. Je 1,5 ml der erhaltenen homogenen Suspension wurden zu je 3 ml einer RNAeasy- Lösung (Quiagen) in 15 ml Falcon Tubes pipetiert. Die gut durchmischten Proben wurden dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und somit eine Stabilisierung der RNA erreicht. Es folgte ein Abzentrifugieren bei 5000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur. Um die extrazelluläre Matrix der Bakterien zu entfernen, wurden die Pellets nun zunächst mit 10 ml PBS Puffer überschichtet. Einer dreimaligen Behandlung mit Ultraschall für 30 sek bei einer Amplitude von 70%, Microtip, mit 30 sek Pausen zwischen den einzelnen Ultraschall-Phasen folgte ein erneutes Zentrifugieren für 5 min bei 6000 rpm und Raumtemperatur. Der Waschvorgang wurde fortgesetzt, indem die erhaltenen Pellets erneut mit 10 ml PBS Puffer überschichtet und im selben Programm wie zuvor erneut dreimalig mit Ultraschall behandelt wurden. Ihren Abschluss fand diese Prozedur mit einem Zentrifugieren bei 6000 rpm für 5 min. Die so gesäuberten Pellets wurden optional bis zur späteren Weiterverarbeitung der RNA-Extraktion bei -20°C eingefroren.

Die Pellets wurden in 180 μ l TE Puffer resuspendiert und in Eppendorf Tubes überführt. Nachdem je Probe 20 μ l Lysostaphinstammlösung (1.500 U/ml) hinzugefügt worden war, wurde unter mehrfachem Durchmischen für 10 min bei 37°C auf

dem Heizblock inkubiert. Die Proben wurden daraufhin mit 700 µl einer Mischung aus RLT Puffer mit Mercaptoethanol versetzt (pro 1 ml RLT Puffer 10 µl Mercaptoethanol). Nach einem 15 sek Vortexen wurden die Proben nun in 2 ml Lysing MatrixB Röhrchen überführt. Einem dreimaligen Homogenisieren für 20 sek und maximaler Geschwindigkeit in einem FastPrep FP120-Gerät folgte ein Zentrifugations Schritt für 60 sek und 16.000 g bei Raumtemperatur. Der erhaltene Überstand wurde in ein frisches Cup überführt um anschließend 470 µl Ethanol beizumengen. 700 µl der erhaltenen Lösung wurden nach gründlichem Mischen auf eine RNeasy Spin Column gegeben. Diese zentrifugierten 15 sek bei 8.000 g. Der Rest des Ethanol-Proben Lysates wurde auf die Säule gegeben und ebenfalls zentrifugiert. Um die Säule zu waschen wurden 700 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und 15 sek bei 8000 g abzentrifugiert. In einem frischen Tube folgte ein zweimaliges Waschen mit 500 µl RPE Puffer zunächst mit anschließendem zentrifugieren für 15 sek bei 8000 g und im zweiten Schritt 2 min bei 8000 g. Abschließend zum Waschvorgang wurde eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Um die gereinigte RNA von der Membran zu eluieren, wurden 50 µl RNase freies Wasser auf die Membran gegeben und 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut aufgetragen und die Zentrifugation wiederholt. Die RNA-Konzentration in der Probe sowie die Gesamt- RNA wurden durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Anhang Tabelle 13) Die Proben wurden daraufhin bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.5.2. DNA Verdau vor Transkriptionsanalyse

Um DNA-Kontaminationen in den RNA-Proben (aus 3.5.1) zu eliminieren und somit eine regelgerechte Analyse der RNA zu gewährleisten, wurde der RT-PCR ein DNA-Verdau vorgeschaltet. Dafür wurde zunächst ein Ansatz zu 20 µl, bestehend aus 4 µl (4 U) DNase, 2 µl Puffer, 4 µg RNA in entsprechendem Proben Volumen und konsekutiv entsprechendem Volumen Wasser hergestellt. Zusammen mit einer Kontrollprobe je RNA-Probe welche selbigen Inhaltes war, aber statt der DNase mit Wasser zu 20 µl ergänzt wurde, inkubierten die Ansätze für 45 min bei 37°C im Heizblock. Durch Zugabe von 2 µl Stop-Solution und den Verbleib des Verdaus für 10 min im 65°C heißen Wasserbad wurde die Reaktion gestoppt. Die RNA-Proben wurden 1:10 verdünnt zur Kontrolle auf den Erfolg des DNA Verdau eine Realtime PCR auf in den Proben verbliebene DNA durchgeführt. Hierzu musste zunächst

das Probenvolumen mit 178 μ l RNase freiem Wasser auf 200 μ l verdünnt werden. 3 μ l dieser Proben dienten bei der Kontroll-PCR nun als Matrize, dem noch 25 μ l Supermix (Biorad) sowie 20 μ l RNase freies Wasser hinzugefügt wurden. Als Primer der Reaktion dienten je 1 μ l *gyrB*-real1.for und *gyrB*-real1.rev (Tabelle 8). Die RT-PCR wurde in einem iCycler iQ Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Cycle 1: (1X)

Step 1: 95,0°C für 03:00 min

Cycle 2: (35X)

Step 1: 95,0°C für 00:30 min

Step 2: 55,0°C für 00:30 min

Step 3: 72,0°C für 00:30 min

Cycle 3: (62X)

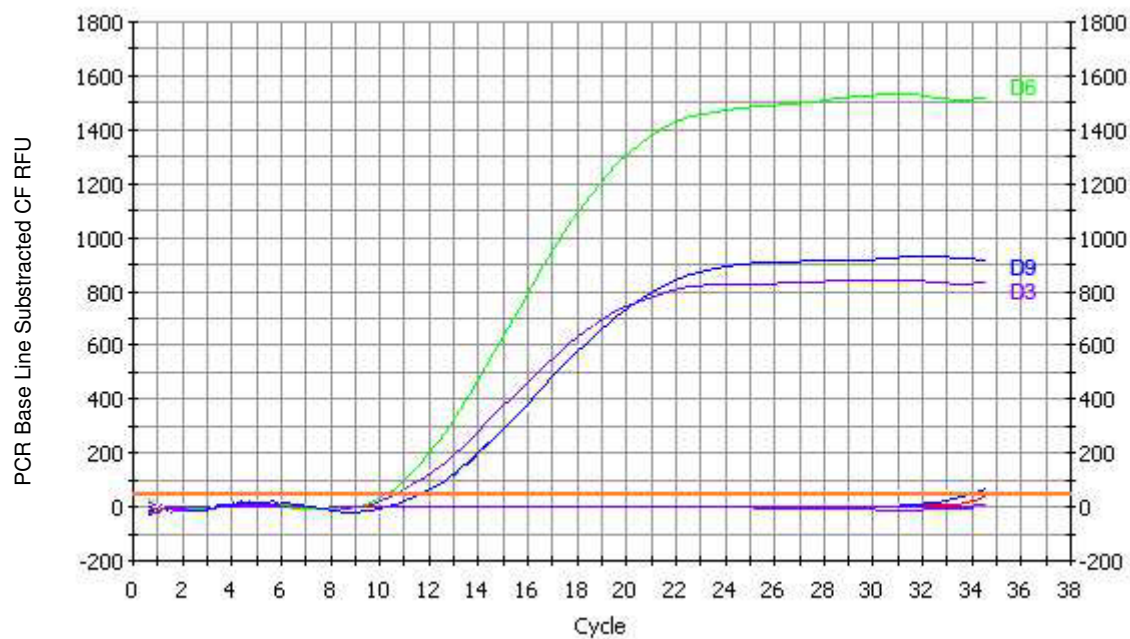
Step 1: 65,0°C für 00:10 min

Erhöhung der setpoint Temperatur nach cycle 2 um 0,5°C

Cycle 4: (1X)

Step 1: 4,0°C für 05:00 min

Zur Negativkontrolle wurde jeweils eine Probe mit RNase freiem Wasser im Volumen der Matrize an dessen statt mitgeführt. Die aus dem DNA-Verdau hervorgegangen DNA-freien Proben an RNA wurden bis zur weiteren Labortechnischen Untersuchung bei -20°C eingefroren. In Abbildung 3 ist exemplarisch eine Kontroll-PCR-Quantifizierung dargestellt. Man erkennt deutlich, dass bei den unverdauten Kontroll Proben eine Amplifikation stattgefunden hat, da sie bereits nach ca. 12 Zyklen positiv werden. Der DNA- Verdau hat die in den Proben verbliebene DNA auf ein Minimum reduziert. Hier liegen mindestens 19 Zyklen zwischen dem positivem Umschlag der Kontrolle und dem DNA-Verdau. Diese geringen Konzentrationen haben, auch aufgrund nachfolgender weiterer Verdünnung, keinerlei Auswirkung auf die Analyse mehr.



Well	Identifizier		Ct Setpoint
B03	1057	DNA Verdau	34,1
B06	1057 <i>rsbUVW</i>	DNA Verdau	N/A
B09	1057 <i>rsbUVWsigB</i>	DNA Verdau	32,7
D03	1057	Kontrolle	10,7
D06	1057 <i>rsbUVW</i>	Kontrolle	10,3
D09	1057 <i>rsbUVWsigB</i>	Kontrolle	11,8
E11	H ₂ O	Negativkontrolle	N/A

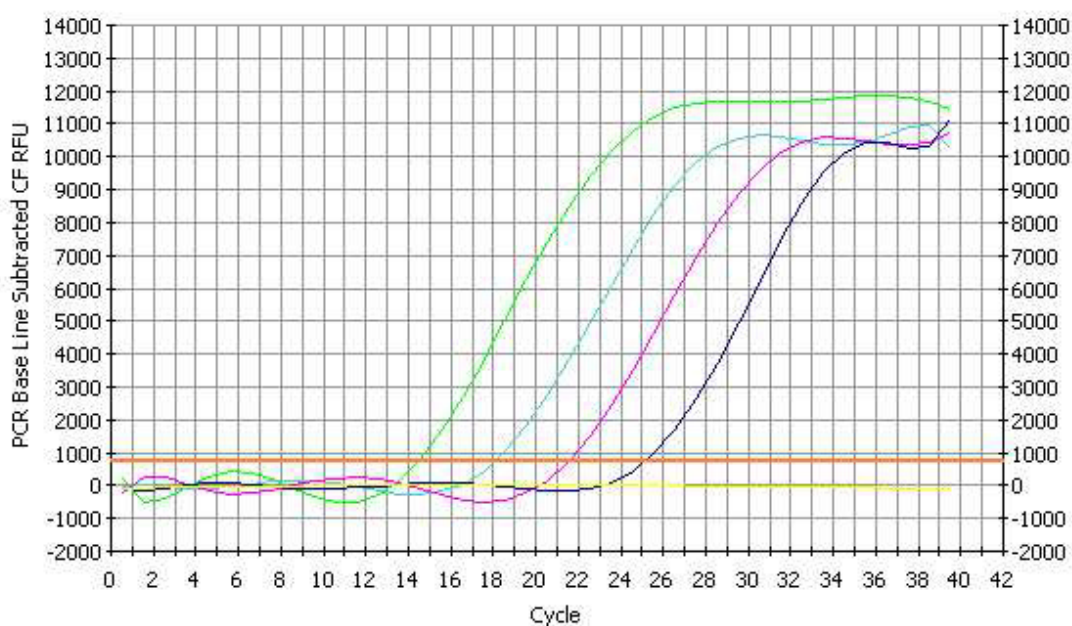
Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung der Kontrolle des DNA Verdau

3.5.3. Primertestung

Die im Folgenden verwendeten und unter Tabelle 8 und 9 aufgeführten Primerpaare für die quantitative Transkriptionsanalyse mittels Realtime-PCR wurden mit dem Programm „Beacon Designer 2“ beziehungsweise dem Programm „Primer“ des HUSAR identifiziert. Um Ihre einwandfreie Funktionabilität zu testen, wurde mit DNA des Staphylokokken Stammes 1057 in 1:10 Verdünnung und dem entsprechenden Primerpaar eine reguläre PCR gefahren. Die generierten Templates wurden mit einem Marker gekennzeichnet und mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Anhand der Größe der Fragmente ließ sich der Erfolg der PCR mit dem getesteten Primer ablesen. In unterschiedlicher Verdünnung (Abbildung 4) wurden sie alsdann in der Realtime PCR mit o.g. DNA verwendet um zu überprüfen, in welcher Verdünnung sie eingesetzt werden können. Die RT-PCR wurde in einem

iCycler iQ Thermocycler unter den in 3.5.2. genannten Bedingungen durchgeführt:

Die Abbildung 4 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Realtime-PCR für das Primerpaar *pbp1*. Es ergeben sich zuverlässig gleichmäßige Abstände in den unterschiedlichen Verdünnungen. Aufgrund der Analyse wurde in 3.5.4. und 3.5.6. eine Verdünnung der DNA Proben von 1:500 für die Analysen ausgewählt.



Verdünnung	Ct setpoint
<i>pbp1</i> 1:50	14,5
<i>pbp1</i> 1:500	18,1
<i>pbp1</i> 1:5000	21,6
<i>pbp1</i> 1:50000	25,2
H ₂ O Negativkontrolle	N/A

Abbildung 4: Exemplarische Darstellung einer Primertesting mittels Realtime PCR (Ausgewähltes Primerpaar: *pbp1-real1.for*, *pbp1-real1.rev*)

3.5.4. Transkriptionsanalyse

Um die aus den vorangegangenen Schritten erhaltene RNA einer Transkriptionsanalyse mittels Realtime PCR unterziehen zu können, musste zunächst entsprechende cDNA synthetisiert werden. Zur Erststrangsynthese wurden 5 µl der 1:10 verdünnten Proben (entspricht jeweils 0,1 µg RNA) aus dem DNA-Verdau (3.5.2) mit Reagenzien aus dem iScript cDNA Synthese Kit: 1 µl reverse Transkriptase, 4 µl Reaktionmix und

10 µl H₂O zusammengebracht und nach Hersteller-Angaben inkubiert. Um eine 1:4 Verdünnung zu erhalten, wurden den 20 µl Proben der cDNA Reaktion jeweils 60 µl H₂O hinzugefügt. Ermittelt werden sollten die transkriptionellen Unterschiede für die in Tabelle 8 sowie Tabelle 9 aufgeführten Gene. Untersucht wurden der Stamm 1057 sowie die Mutanten 1057*rsbU* und 1057*rsbUVW* nach den bereits beschriebenen Anzuchtbedingungen. Die hierzu durchgeführten Realtime-PCR-Analysen erfolgten jeweils im Dreifachansatz für mindestens drei unabhängige RNA Präparationen je Anzuchtbedingung und untersuchtes Bakterium. Für die in Tabelle 6 genannten Gene wurde der Analyse ein Screening im Zweifachansatz für mindestens drei unabhängige RNA Präparationen je Anzuchtbedingung und untersuchtes Bakterium vorgeschaltet. Der verwendete Ansatz bestand aus 2µl eines Primerpaares (1 µl forward Primer und 1 µl reverse Primer, Tabelle 8 und 9), 25 µl iQ SYBR Green Supemix, 20 µl H₂O sowie 3 µl der verdünnten Proben cDNA. Die Realtime-PCR wurde unter den in 4.5.2 genannten Bedingungen in einem iCycler iQ Thermocycler durchgeführt. Bei allen Experimenten wurden neben den Primern der zu analysierenden Gene auch Primer für *gyrB* als Referenzgen (Tabelle 8) verwendet sowie eine Negativkontrolle in Form von H₂O als Probe im Ansatz mitgeführt.

3.5.5. Auswertung und Rechenmethode

Die realtime PCR ist eine der zuverlässigsten und sensitivsten quantitativen Verfahren zur Analyse der Expression von Genen. Eine PCR hat drei Phasen: Exponentielle Phase, Lineare Phase und Plateau Phase. Die Menge an PCR Produkt nimmt in der exponentiellen Phase exponentiell zu, da in dieser frühen Phase die Reagenzien unbeschränkt vorhanden sind. In der sich anschließenden linearen Phase hat sich die Menge an Reagenzien limitiert und so kommt es nur zu einem linearen Ansteigen der Produkte. Unter Umständen kann in späteren Zyklen auch die Plateau Phase erreicht werden, wenn die Reagenzien erschöpft sind. Bei der realtime PCR macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass unter idealen Bedingungen die Menge an PCR-Produkt in der exponentiellen Phase im Verhältnis zu initialem Template steht. Den Verlauf der PCR kann man mithilfe eines DNA Binde-Farbstoffes, in diesem Falle Sybr Green beobachten, dessen Färbung in direktem Zusammenhang mit der Anzahl an Amplifikaten steht. Die im Folgenden erläuterte statistische Auswertung dieser Arbeit wurde beratend unterstützt durch das Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie am UKE, Hamburg

Eppendorf. Als Ct-Wert bezeichnet man die Anzahl an Zyklen an einer zu definierenden Schwellengrenze (threshold) der Logarithmus basierten Fluoreszenz. Dieser Wert ist von besonderem Interesse, da er für die Berechnungen um die transkriptionellen Unterschiede notwendig ist. Die Berechnung erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (Livak und Schmittgen, 2001, Yuan, Reed, Chen und Steward, 2006) Dabei wurden zunächst aus den drei für jedes Gen ermittelten Ct- Werten ein Mittelwert berechnet. Um einen deltaCt-Wert zu erhalten wurde nun vom Ct Mittelwert eines Genes der Ct-Mittelwert des Referenzgenes abgezogen. Als Referenz-Gen wurde *gyrB* gewählt, dass bei jeder RT PCR mituntersucht wurde, um Fehler in der Referenz zu vermeiden. Einen deltadeltaCt-Wert erhält man, wenn man nun vom deltaCt Wert für die untersuchten Gene der Mutanten den jeweiligen deltaCt-Wert des Gens für den Wildtyp subtrahiert. Wenn man diesen deltadeltaCt-Wert als negativen Exponenten zur Basis zwei setzt, so ergibt die Potenz den transkriptionellen Unterschied des jeweiligen Genes der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Um rechnerisch mögliche Werte kleiner 1 zu vermeiden, wird für diese noch der Kehrwert gebildet, um entsprechend einen negativen Faktor für den transkriptionellen Unterschied zu erhalten. Ein signifikanter Unterschied in der Transkription der untersuchten Gene wurde für Werte ab 2,5 definiert.

4. Ergebnisse

4.1. Wachstumskurve von *Staphylococcus epidermidis* 1057

Um transkriptionelle Vorgänge zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Bakterien Wachstums zu untersuchen, soll eine Wachstumskurve der zeitlichen Orientierung unter den gegebenen Wachstumsbedingungen dienen. Aus Abbildung 5 wird ersichtlich, dass sich die Bakterien der einzelnen Stämme über die Beobachtungszeit bei ähnlicher Wachstumsgeschwindigkeit in vergleichbaren Wachstumsphasen befinden. Das exponentielle Wachstum beginnt nach ca. 7 h und endet nach ca. 15 h. Als Zeitpunkte der RNA Extraktion wurden daher 9 h zur Beginn der exponentiellen Phase und 17 h zu Beginn der stationären Phase gewählt.

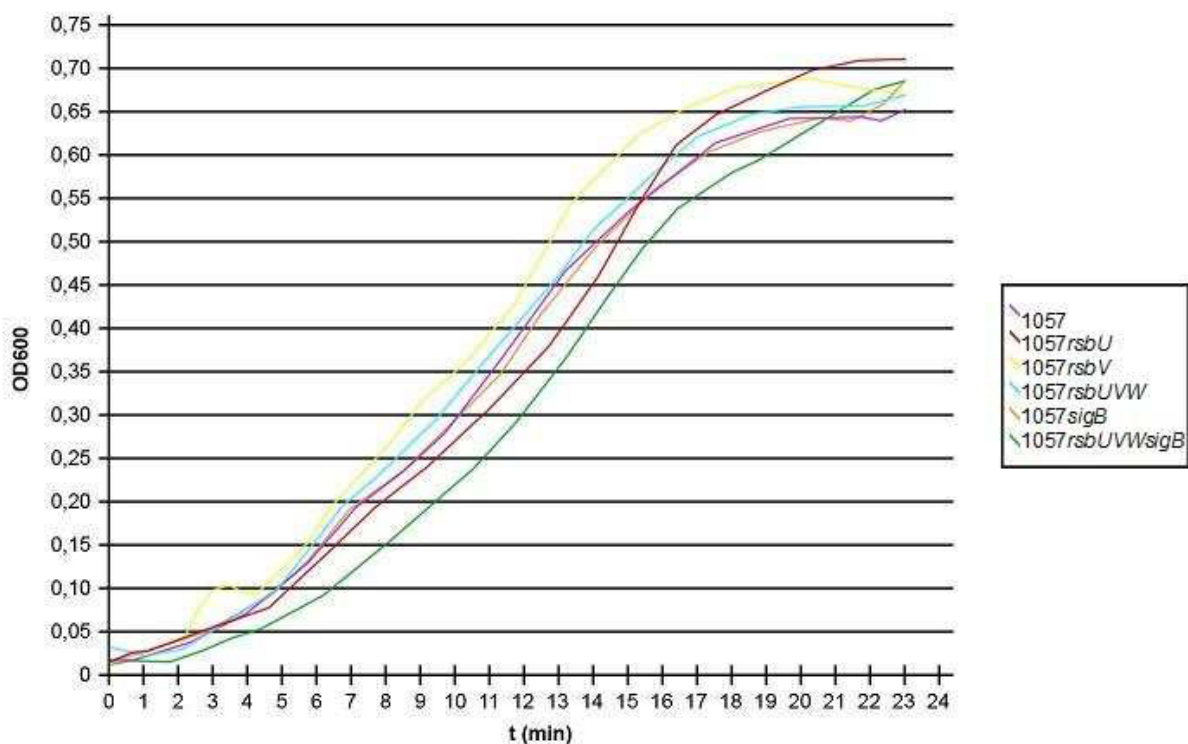


Abbildung 5: Wachstumskurve der Deletionsmutanten von *S. epidermidis* 1057

4.2. Biofilmbildung ausgewählter Stämme und Mutanten

Eine wesentliches phänotypisches Charakteristikum von *S. epidermidis*, das Einfluss auf die Antibiotikaresistenz hat, ist seine Fähigkeit, eine extrazelluläre Matrix bestehend aus Mukopolysacchariden und damit besonders PIA zu bilden. Bei den untersuchten Stämmen handelt es sich um klinische Isolate aus infizierten zentralen Venenkathetern. Aus Voruntersuchungen ist dabei über den Wildtyp 1457 bekannt, dass er einen stark biofilmbildenden *mecA*-negativen Stamm darstellt, wohingegen der Stamm 1057 als schwach biofilmbildend und *mecA*-positiv beschrieben wird. Will man die Biofilmbildung quantifizieren, zu kann man dies, indem man die im Biofilm befindlichen Bakterien mit Gentionviolett anfärbt. Eine geringere Färbung und somit niedrigere Absorptionsrate korreliert mit einer geringen Produktion an extrazellulärer Matrix. Um physiologische Bedingungen auf der Haut zu simulieren, wurde auch die Biofilmbildung der Bakterien in TSB_{NaCl} untersucht.

Der Stamm 1457 war mit einer durchschnittlichen Absorptionsrate von 1,30 in TSB deutlich stärker Biofilm positiv im Vergleich zur durchschnittlichen Absorptionsrate des Stammes 1057 mit 0,19. Auch für die Mutanten von 1457 lagen die durchschnittlichen Absorptionsraten im Vergleich zu den jeweiligen Mutanten von 1057 bei Anzucht in TSB auf einem deutlich höheren Niveau. Es lässt sich jedoch für die Mutanten sowohl von 1457 als auch 1057 mit geringer oder nicht mehr vorhandener σ^B Aktivität, also 1457*rsbU* und 1057*rsbU*, 1457*rsbV* und 1057*rsbV*, 1457*sigB* und 1057*sigB* als auch 1457*rsbUVWsigB* und 1057*rsbUVWsigB* in TSB eine im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp deutlich verminderte Biofilmbildung beobachten. Die geringere Biofilmbildung der Mutanten mit geringer σ^B -Aktivität lässt sich auch durch Zusatz von NaCl zum Nährmedium nicht steigern (Abbildung 6 und 7). Die Biofilmbildung bei Mutanten, in denen σ^B konstitutiv aktiviert ist, ist in TSB im Vergleich zum Wildtyp deutlich gesteigert. In 1457*rsbW* beträgt die Absorptionsrate 2,38, in 1457*rsbUVW* 2,35 und liegt damit deutlich über der durchschnittlichen Absorptionsrate von 1,30 in 1457. Auch die Mutanten 1057*rsbW* und 1057*rsbUVW* waren deutlich stärker Biofilm-bildend als der Wildtyp 1057 mit Absorptionsraten von 0,31 bzw. 0,78 im Vergleich zu einer Absorptionsrate von 0,19 bei 1057. Für diese Mutanten gilt ebenso wie jeweils für den Wildtyp, dass sich die Biofilmbildung durch Zugabe von NaCl zur Nährlösung induzieren lässt. Dies wird aufgrund des geringeren Grundniveaus der Biofilmbildung in 1057 und den Mutanten 1057*rsbW*

und 1057*rsbUVW* deutlicher erkennbarer als in den σ^B aktivierten Mutanten von 1457.

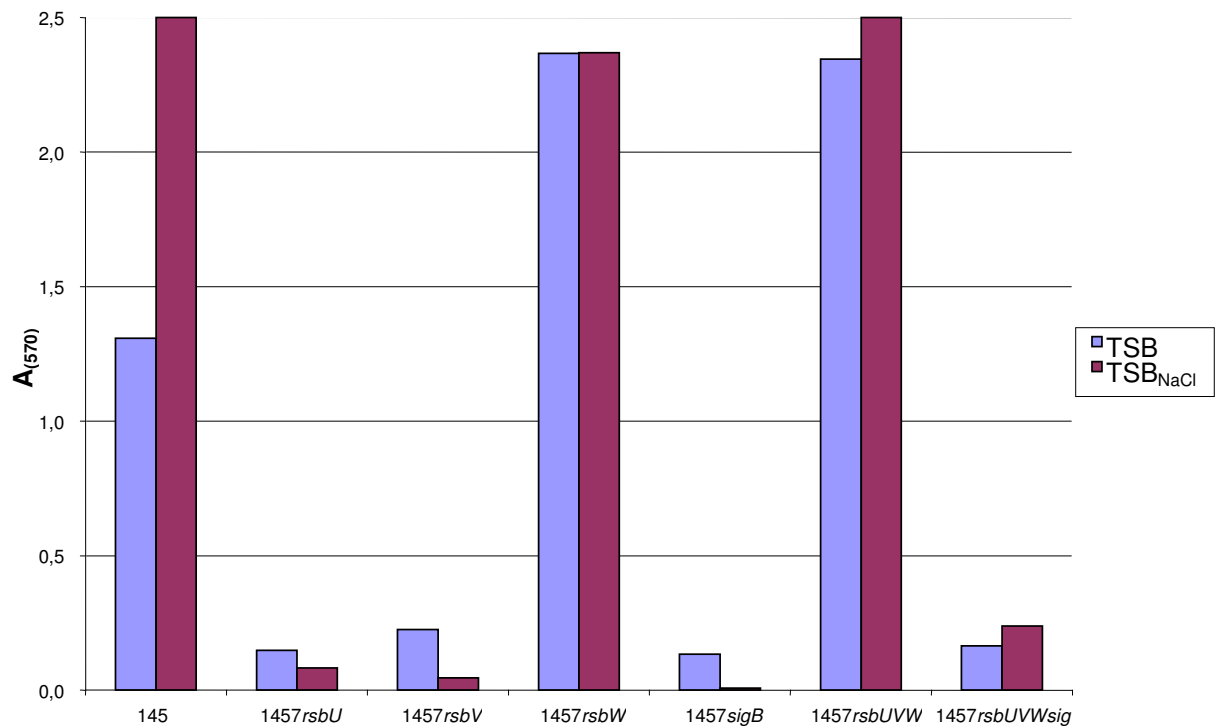


Abbildung 6: Biofilmbildung von 1457 in TSB / TSB_{NaCl}.

Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Biofilmbildung der Mutanten 1457*rsbW* und 1457*rsbUVW*, in denen σ^B konstitutiv aktiviert ist, ist bei Anzucht in TSB im Vergleich zum Wildtyp deutlich gesteigert. In den übrigen Mutanten mit geringer oder nicht mehr vorhandener σ^B Aktivität findet sich eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Biofilmbildung

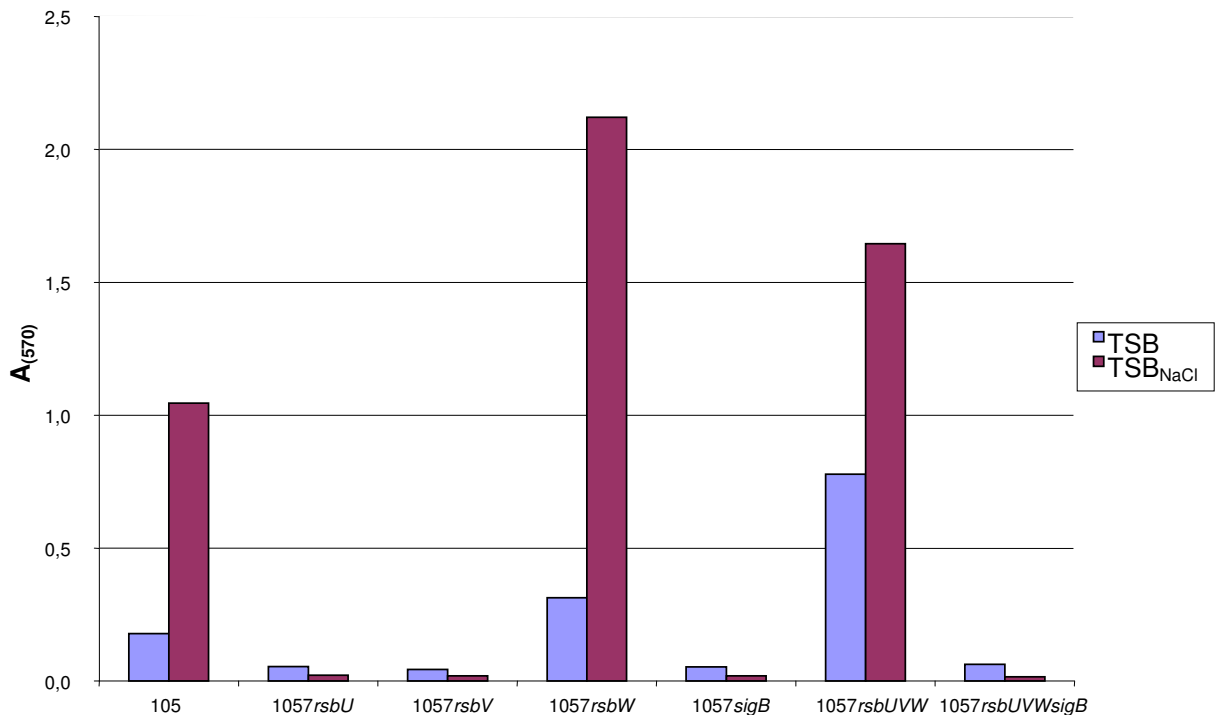


Abbildung 7: Biofilmbildung von 1057 in TSB / TSB_{NaCl}.

Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Biofilmbildung der Mutanten 1057rsbW und 1057rsbUVW, in denen σ^B konstitutiv aktiviert ist, ist bei Anzucht in TSB und TSB_{NaCl} im Vergleich zum Wildtyp deutlich gesteigert. In den übrigen Mutanten mit geringer oder nicht mehr vorhandener σ^B Aktivität findet sich eine im Vergleich zum Wildtyp geringere Biofilmbildung

4.3. Minimal Attachment Killing der Deletionsmutanten

Für die zuvor beschriebenen Deletionsmutanten von *S. epidermidis* 1057 wurde ihr Expressionsphänotyp durch die Bestimmung des Minimal Attachment Killings (MAK) bestimmt. Dabei lassen sich ein homogenes wie auch ein heterogenes Wachstumsmuster unter unterschiedlichen Oxacillinkonzentrationen unterscheiden. Bei gleichmäßiger Wiederanzucht überlebender Persisterzellen bis zu einer bestimmten Konzentration sprechen wir von der homogenen MAK (MAK_{homo}), bei unregelmäßiger Wiederanzucht die einzelne Oxacillinkonzentrationsstufen auszulassen oder zu überspringen vermag, von der heterogenen MAK (MAK_{hetero}). Dabei ist die MAK_{hetero} derjenigen Oxacillinkonzentration gleichzusetzen, bei der keine Wiederanzucht mehr erfolgreich ist.

Der Wildtyp *S. epidermidis* 1057 zeigt in der Analyse ein heterogenes Expressionsmuster. Bei einer MAK_{hetero} von ≥ 2048 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin ist es

einer Subpopulation von Bakterien noch möglich zu wachsen, wenngleich ein homogenes Bakterienwachstum nur bis zu einer MAK_{homo} von 512 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin möglich ist. Für die Deletionsmutanten, in denen die σ^B -Aktivität stark vermindert oder inaktiv ist, beobachtet man mit einer durchschnittlichen MAK_{homo} von 128 $\mu\text{g/ml}$ eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringere Resistenz. Jedoch zeigt 1057*rsbUVWsigB* in der die komplette Regulationskaskade mit σ^B ausgeschaltet ist, ebenso wie der Wildtyp für eine geringe Subpopulation ein hohes Resistenzverhalten mit Wachstum bei einer MAK_{hetero} von ≥ 2048 $\mu\text{g/ml}$. Die Deletionsmutanten 1057*rsbU* und 1057*sigB* lassen ebenfalls eine signifikante Steigerung der MAK_{hetero} auf 1024 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin bzw. 256 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin im Vergleich zu ihrer MAK_{homo} erkennen (Abbildung 8). Interessanter Weise zeigen die Mutanten, in denen *rsbW* inaktiviert ist, ein im Vergleich zum Wildtyp geändertes Resistenzverhalten. Man kann feststellen, dass sich der heterogene Expressionsphänotyp des Wildtyps 1057 in ein homogenes Expressionsmuster der Oxacillinresistenz geändert hat. Auch bei einer MAK_{homo} von ≥ 2048 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin ist es einer breiten Population an Bakterien möglich zu überleben.

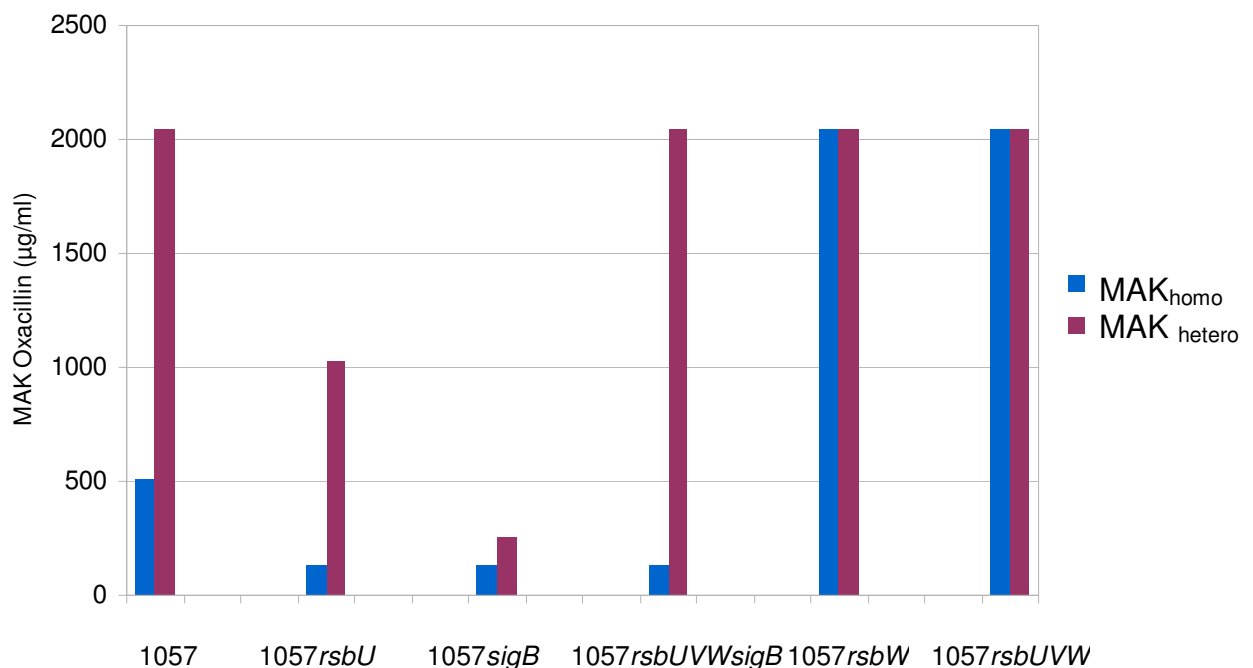


Abbildung 8: Expressionsphänotypisierung der Oxacillinresistenz der Deletionsmutanten von *S. epidermidis* 1057. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Der Wildtyp 1057 zeigt ein heterogenes Resistenzverhalten mit einer MAK_{hetero} die über der MAK_{homo} liegt. Die Mutanten 1057*rsbW* und 1057*rsbUVW*, in denen σ^B konstitutiv aktiviert ist, weisen ein heterogenes Resistenzverhalten auf, mit einer MAK_{hetero} die auf dem Niveau der MAK_{homo} liegt.

4.4. Transkriptionsanalyse der Deletionsmutanten

4.4.1. Aktivität von *asp23* und *mecA*

Ziel der durchgeführten RT-PCR zur Transkriptionsanalyse war, den Einfluss von σ^B auf *mecA* zu überprüfen. Für das alternative Penicillin bindende Protein PBP2a codiert *mecA* und ist somit für die Oxacillinresistenzbildung bei Staphylokokken verantwortlich. Als Marker für die σ^B -Aktivität dient *asp23*. Zu untersuchen waren die Transkriptionsunterschiede bei den Deletionsmutanten, die durch ihren im Vergleich zum Wildtyp geänderten homogenen Expressionstyp aufgefallen waren. Exemplarisch wurde daher der Stamm 1057*rsbUVW* ausgewählt, in dem der Antisigmafaktor *rsbW* ausgeschaltet ist und σ^B somit konstitutiv aktiviert ist. Darüber hinaus wurde auch die Mutante 1057*rsbUVWsigB* zur Analyse ausgewählt, um Vergleiche zum Zustand der σ^B Inaktivität ziehen zu können.

Eine relevant geringere Transkription für das σ^B abhängige Gens *asp23* findet sich in Relation zum Wildtyp 1057 für die Mutante 1057*rsbUVWsigB* mit einem Transkriptionsunterschied von -23,8 in der exponentiellen bzw. -42,3 in der stationären Wachstumsphase. Unter Induktion durch Oxacillin im Nährmedium treten diese Transkriptionsunterschiede zum Wildtyp mit -71,3 in der exponentiellen bzw. -603,9 in der stationären Wachstumsphase noch deutlicher zu Tage. Eine erhöhte Transkription von *mecA* im Vergleich zum Wildtyp findet sich für die Deletionsmutante 1057*rsbUVWsigB*, die eine deutlich geringere Oxacillinresistenz aufweist, unter Wachstum in MH_{NaCl} mit einem Wert von 6,0 in der exponentiellen bzw. 4,5 in der stationären Wachstumsphase. Diese Unterschiede sind unter Wachstum in MH_{Oxa} bei Transkriptionsunterschieden von 1,5 in der exponentiellen und -2,0 in der stationären Wachstumsphase nicht mehr signifikant (Tabelle 12). Für 1057*rsbUVW* zeigt ich bei Anzucht in MH_{NaCl} bei exponentiellem Wachstum eine Hochregulierung von *asp23* auf +3,0, wohingegen die Aktivität im Vergleich zum Wildtyp unter stationären Bedingungen auf -4,3 vermindert ist. Unter Anzucht in MH_{Oxa} beobachtet man dahingegen eine Verminderung im exponentiellen Wachstum auf -4,8, wobei die Transkription von *asp23* in der stationären Phase bei einem Transkriptionsunterschied von 1,1 mit der des Wildtyps 1057 vergleichbar ist. Es lassen sich also sowohl in der exponentiellen wie auch stationären Phase für 1057*rsbUVW* unter beiden untersuchten Wachstumsbedingungen im Vergleich zu 1057*rsbUVWsigB* deutlich geringere Veränderungen der Transkriptionsunter-

schiede für *asp23* zum Wildtyp beobachten. (Abbildung 9 und 10). Für *mecA* lassen sich in der Mutante 1057*rsbUVW* im Rahmen dieser Untersuchung keine relevanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp feststellen.

Tabelle 12: Transkriptionsunterschiede für *mecA/asp23* im Vergleich zu 1057

Stamm	Gen	MH _{NaCl}		MH _{Oxa}	
		exponentiell	stationär	exponentiell	stationär
1057 <i>rsbUVW</i>	<i>mecA</i>	+1,0 ^a	+1,1	-1,7	+1,1
1057 <i>rsbUVW</i>	<i>asp23</i>	+3,0	-4,3	-4,8	+1,6
1057 <i>rsbUVWsigB</i>	<i>mecA</i>	+6,0	+4,5	+1,5	-2,0
1057 <i>rsbUVWsigB</i>	<i>asp23</i>	-23,8	-42,3	-71,3	-603,9

^a Relativer Transkriptionsunterschied im Vergleich zum Wildtyp 1057. Die Werte repräsentieren den Durchschnitt aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Werte mit Unterschieden $\geq 2,5$ und $\geq 2,5$ sind fett dargestellt

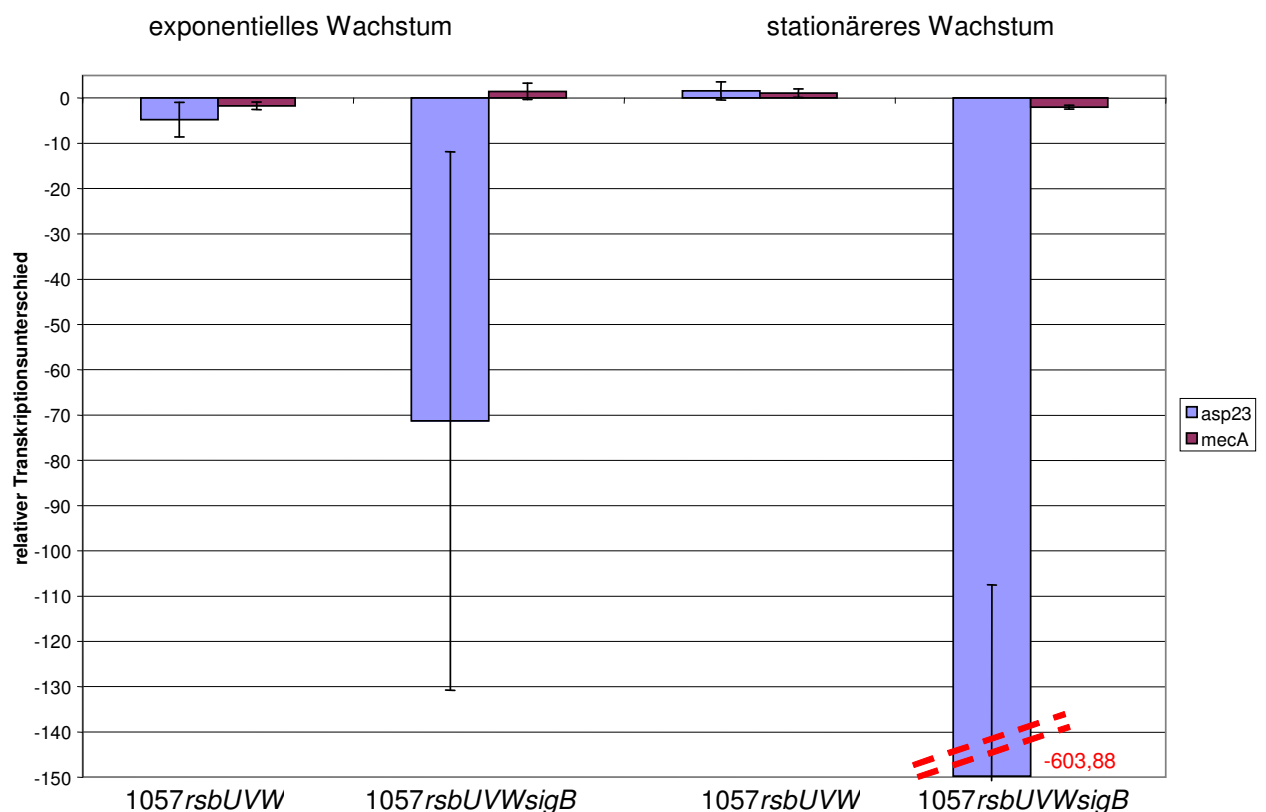


Abbildung 9: Transkriptionsunterschiede für *asp23* und *mecA* in 1057*rsbUVW* und 1057*rsbUVWsigB* bei Anzucht in MH_{Oxa} Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung. Relative Transkriptionsunterschiede von $\geq 2,5$ und $\geq 2,5$ wurden als signifikant gewertet. Die σ^B inaktive Mutante 1057*rsbUVWsigB* weist eine geringere Transkription von *asp23*, das als Marker der σ^B -Aktivität dient, in Relation zum Wildtyp auf.

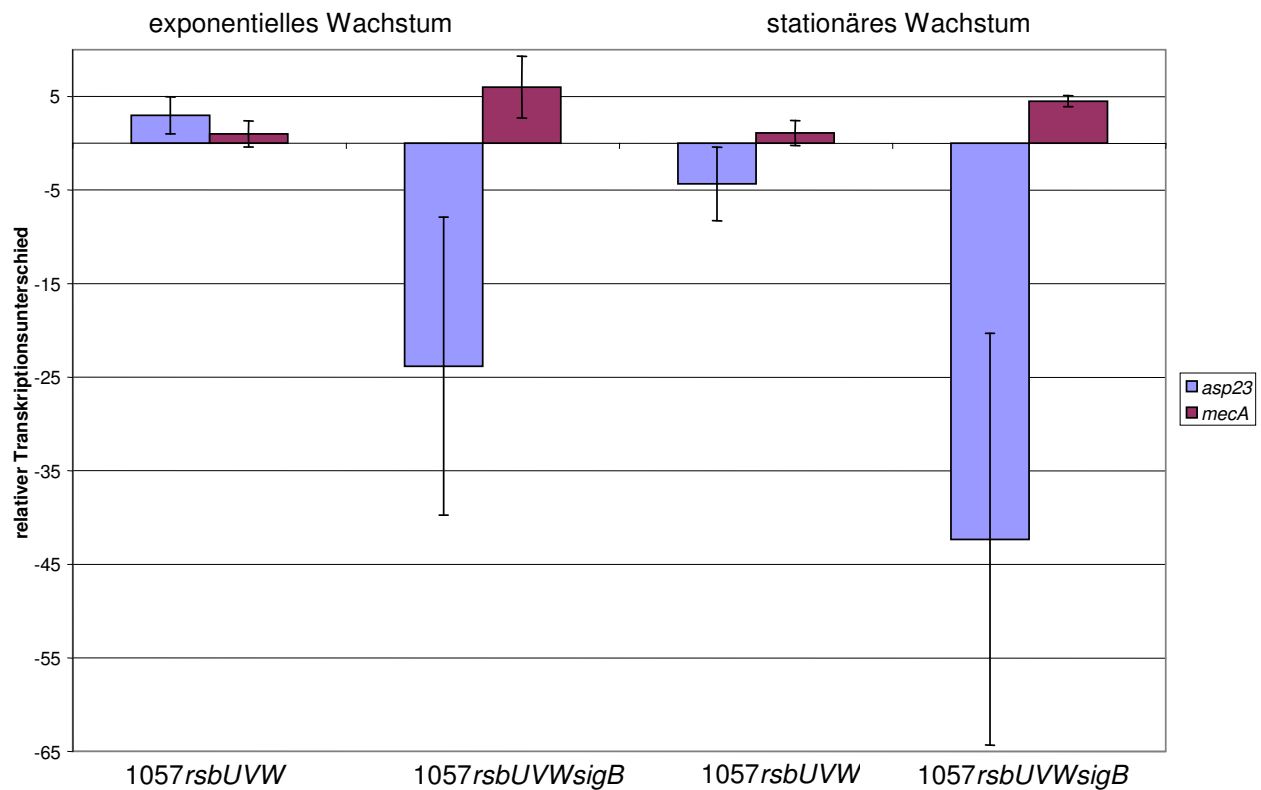


Abbildung 10: Transkriptionsunterschiede für *asp23* und *mecA* in 1057rsbUVW und 1057rsbUVWsigB bei Anzucht in MH_{NaCl} . Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung. Relative Transkriptionsunterschiede von $\geq 2,5$ und $\geq 2,5$ wurden als signifikant gewertet. Für die Mutante 1057rsbUVW zeigen sich in der Analyse keine signifikanten Transkriptionsunterschiede in Relation zum Wildtyp für *mecA*. Die σ^B inaktive Mutante 1057rsbUVWsigB weist eine geringere Transkription von *asp23*, das als Marker der σ^B -Aktivität dient, in Relation zum Wildtyp auf. 1057rsbUVWsigB zeigt eine signifikante Steigerung der Transkription von *mecA*.

Um die Transkriptionsunterschiede, die sich in der Anzucht der Bakterien in MH_{NaCl} im Vergleich zu der in MH_{Oxa} ergeben zu beschreiben, wurden die relativen Transkriptionsunterschiede der Anzuchtsbedingungen zueinander berechnet (Tabelle 13). Hier wird ersichtlich, dass für 1057rsbUVWsigB im Vergleich zum Wildtyp eine relativ verminderte Induktion der Transkription für *mecA* unter Anzucht in MH_{Oxa} im Vergleich zu MH_{NaCl} besteht.

Tabelle 13: Induktion der Transkription von *mecA* durch Oxacillin

Stamm	exponentiell	stationär
1057	97,0 ^a	24,6
1057 <i>rsbUVW</i>	57,5	30,8
1057 <i>rsbUVWsigB</i>	23,5	2,9

^a Relativer Transkriptionsunterschied in MH_{oxa} im Vergleich zu MH_{NaCl}. Die Werte repräsentieren den Durchschnitt aus drei unabhängigen Experimenten.

Zudem wurden auch die relativen Transkriptionsunterschiede für *asp23* in MH_{oxa} im Vergleich zu MH_{NaCl} berechnet. Hierdurch wurde geprüft, ob die Induktion durch Oxacillin einen Einfluss auf die Aktivität von σ^B , indirekt gemessen durch die Transkription des ausschließlich σ^B abhängig transkribierten Gens *asp23* hat. In Tabelle 14 erkennt man, dass in der exponentiellen Phase eine relativ verminderte Transkription von *asp23* bei der Anzucht in MH_{oxa} im Vergleich zur Anzucht in MH_{NaCl} für die Mutanten 1057*rsbUVW* und 1057*rsbUVWsigB* im Vergleich zu 1057 erfolgt. In der stationären Phase wird die Transkription von *asp23* für 1057*rsbUVW* im Vergleich zum Wildtyp vermehrt induziert. Für 1057*rsbUVWsigB* vermindert sich die Transkription von *asp23* in der stationären Phase durch den Einfluss von Oxacillin sehr stark und ist nicht mehr sinnvoll abbildbar.

Tabelle 14 Induktion der Transkription von *asp23* durch Oxacillin

Stamm	exponentiell	stationär
1057	1,7 ^a	1,4
1057 <i>rsbUVW</i>	-4,4	6,3
1057 <i>rsbUVWsigB</i>	-3,8	nicht messbar

^a Relativer Transkriptionsunterschied in MH_{oxa} im Vergleich zu MH_{NaCl}. Die Werte repräsentieren den Durchschnitt aus drei unabhängigen Experimenten.

4.4.2. Screening Transkriptionsunterschiede weiterer Gene

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse von *mecA* liefern noch keine Erklärung für den beobachteten Switsch von heterogenem zu homogenem Resistenzverhalten bei *S. epidermidis*. In Analogie zu der Untersuchung von *mecA* wurden daher nun in Form eines breit angelegten Screening weitere Gene untersucht, die im Verdacht stehen, einen Einfluss auf die Oxacillinresistenz zu haben oder von denen eine Regulation bereits aus *S. aureus* bekannt ist. Dafür wurden zunächst zwei unabhängige Einzelexperimente gewählt mit einem Cut off für relevante Transkriptionsunterschiede von 2,5. Relevante Ergebnisse sind fett hervorgehoben (Tabelle 15).

Tabelle 15: Relativer Transkriptionsunterschied zu 1057 - Screening

Stamm	Gen	MH _{NaCl}		MH _{oxa}	
		exponentiell	stationär	exponentiell	stationär
1057UW	<i>femA</i>	-1,1 ^a	-1,3	-1,9	1,4
1057US	<i>femA</i>	1,2	1,6	1,3	-1,4
1057UW	<i>femB</i>	-1,1	1,2	-2,0	1,1
1057US	<i>femB</i>	3,6	4,5	2,6	-1,6
1057UW	<i>femC</i>	-1,7	1,2	-1,7	1,6
1057US	<i>femC</i>	1,5	1,6	-1	-1,2
1057UW	<i>femD</i>	1,8	-1,2	-2,2	1,1
1057US	<i>femD</i>	6,0	5,3	2,5	2,0
1057UW	<i>femF</i>	1,0	-1,7	-1,7	1,0
1057US	<i>femF</i>	1,4	2,2	1,1	1,7
1057UW	<i>fmtA</i>	-1,1	1,8	-3,7	1,8
1057US	<i>fmtA</i>	23,9	21,1	6,2	3,3
1057UW	<i>fmtB</i>	-1,2	-1,3	-2,1	-1,0
1057US	<i>fmtB</i>	1,5	1,4	-1,2	1,1
1057UW	<i>fmtC</i>	1,5	-1,2	-1,7	1,3
1057US	<i>fmtC</i>	2,2	4,1	1,1	2,5
1057UW	<i>pbp1</i>	1,1	1,6	1,0	1,6
1057US	<i>pbp1</i>	-1,8	2,6	-1,5	-1,1

Stamm	Gen	MH _{NaCl}		MH _{oxa}	
		exponentiell	stationär	exponentiell	stationär
1057UW	<i>pbp2</i>	1,1	1,4	-1,3	1,4
1057US	<i>pbp2</i>	1,1	2,8	1,1	1,3
1057UW	<i>pbp3</i>	1,1	-1,3	-3,2	2,0
1057US	<i>pbp3</i>	4,2	1,7	1,6	2,1
1057UW	<i>llm</i>	1,7	-1,2	-3,2	1,8
1057US	<i>llm</i>	6,2	4,1	2,1	2,1
1057UW	<i>lytM</i>	1,6	-1,2	-1,4	1,5
1057US	<i>lytM</i>	1,9	2,8	1,7	2,4
1057UW	<i>dltA</i>	1,4	-1,2	-1,2	1,1
1057US	<i>dltA</i>	1,3	1,3	-1,2	1,3
1057UW	<i>murF</i>	1,3	-1,5	-1,7	1,2
1057US	<i>murF</i>	1,8	1,4	-1,3	1,5
1057UW	<i>vras</i>	1,5	1,4	-2,9	1,7
1057US	<i>vras</i>	5,6	1,7	4,4	1,0
1057UW	<i>blaR</i>	1,6	1,8	-3,7	1,7
1057US	<i>blaR</i>	19,5	17,1	6,6	1,3

^a Relativer Transkriptionsunterschied zu *S. epidermidis* 1057. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Fett dargestellt sind signifikante Transkriptionsunterschiede $\geq 2,5$ und $\leq -2,5$ sowie zur weiteren Analyse ausgewählte Gene.

Gene die unter mindestens zwei Bedingungen signifikante Unterschiede aufwiesen wurden zur weiteren Analyse eingeschlossen. Auffällig und somit weiter untersuchungswürdig erwiesen sich dabei die Gene *pbp3*, *llm*, *vras*, *blaR*, *femB*, *femD*, *fmtA* und *fmtC*. Für die übrigen in der Tabelle 15 dargestellten Gene wurde auf eine weitere Analyse verzichtet, da schon nach dem Screening nicht von einer entscheidenden Regulation der Oxacillinresistenz für diese Gene ausgegangen werden konnte.

4.4.3. Bestätigung der im Screening auffälligen Genorte

Die zuvor Anhand der Screening Ergebnisse ausgewählten Gene für die Deletionsmutanten 1057*rsbUVW* als auch 1057*rsbUVWsigB* wurden nun analysiert. Dabei erfolgte die Bestimmung des relativen Transkriptionsunterschiedes zum Wildtyp 1057 im Anzuchtmedium MH_{NaCl} als auch unter Induktion durch MH_{Oxa} im exponentiellen Wachstum wie auch in der stationären Phase. Die Rohdaten (Ct Werte) der aufgeführten Versuche sind im Anhang dargestellt.

Für 1057*rsbUVWsigB* ist eine deutlich verstärkte Transkription unter exponentiellem wie stationärem Wachstum ohne Oxacillin für *blaR* und *fmtA* zu beobachten. Der relative Transkriptionsunterschied beträgt für *fmtA* unter exponentiellen Bedingungen in MH_{NaCl} 27,3 und unter stationären Bedingungen 27,0. Für *blaR* wurde unter exponentiellen Bedingungen in MH_{NaCl} ein relativer Transkriptionsunterschied von 24,7 und unter stationären Bedingungen von 21,3 ermittelt. Auch die untersuchten Gene *pbp3*, *llm*, *vras*, *femB*, *femD* und *fmtC* zeigen für 1057*rsbUVWsigB* unter exponentiellem Wachstum in MH_{NaCl} eine verstärkte Transkription. Unter stationären Bedingungen in MH_{NaCl} beobachtet man für 1057*rsbUVWsigB* bei *pbp3* mit einem Transkriptionsunterschied von 2,4 keinen signifikanten Transkriptionsunterschied. Die Gene *llm*, *vras*, *femB*, *femD* und *fmtC* sind auch unter diesen Bedingungen verstärkt transkribiert in Relation zu 1057 (Abbildungen 11 und 12).

Hingegen zeigt in 1057*rsbUVW* unter exponentiellen Wachstumsbedingungen bei Anzucht in MH_{NaCl} nur *fmtC* mit einem Wert von 2,6 eine verstärkte Transkription. In der stationären Phase in MH_{NaCl} beobachtet man hier nur für *blaR* mit einem Wert von 2,5 eine verstärkte Transkription. Die übrigen Gene *pbp3*, *llm*, *vras*, *femB*, *fmtA* und *femD* zeigen zu beiden Zeitpunkten in 1057*rsbUVW* bei Anzucht in MH_{NaCl} keine signifikanten Regulationsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp (Abbildungen 11 und 12).

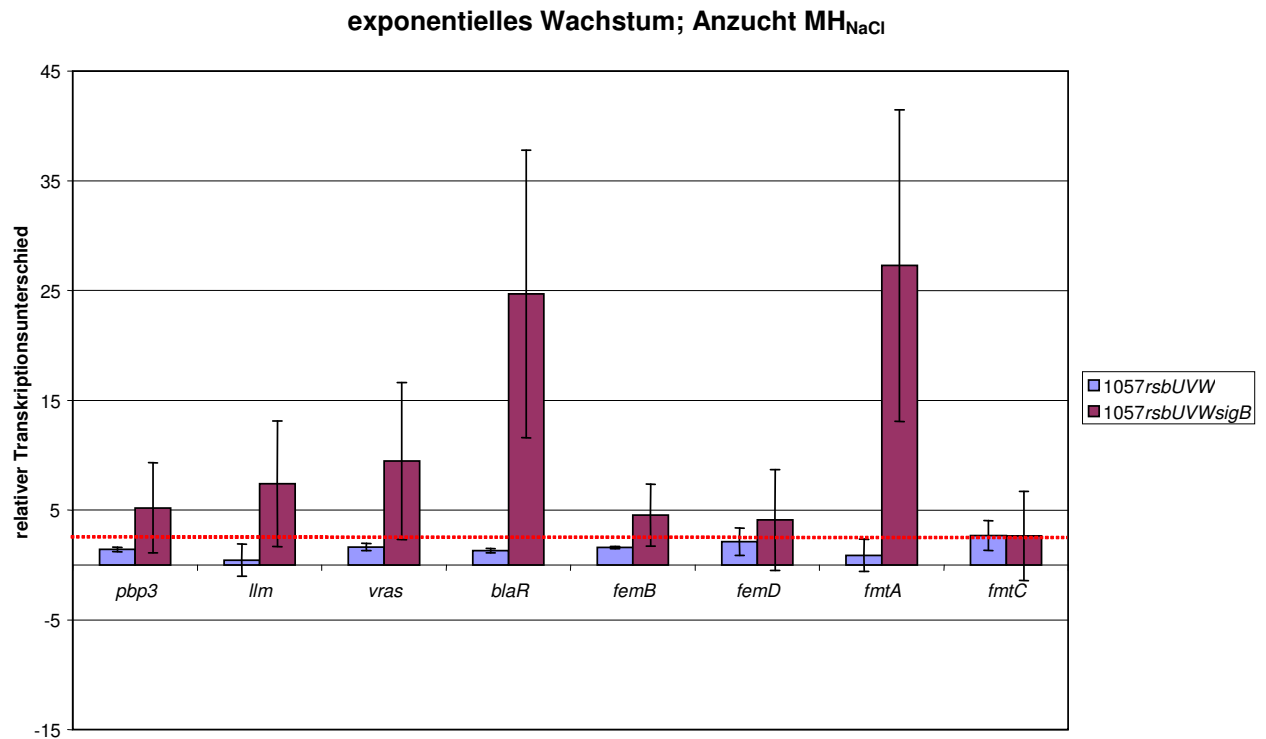


Abbildung 11: Relative Transkriptionsunterschiede auffälliger Gene in 1057rsbUVW (blau) und 1057rsbUVWsigB (rot) im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* 1057 bei Anzucht in MH_{NaCl} . Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Der „cut off“ für eine relevante Regulation wurde für 2,5 definiert (gestrichelt rote Linie).

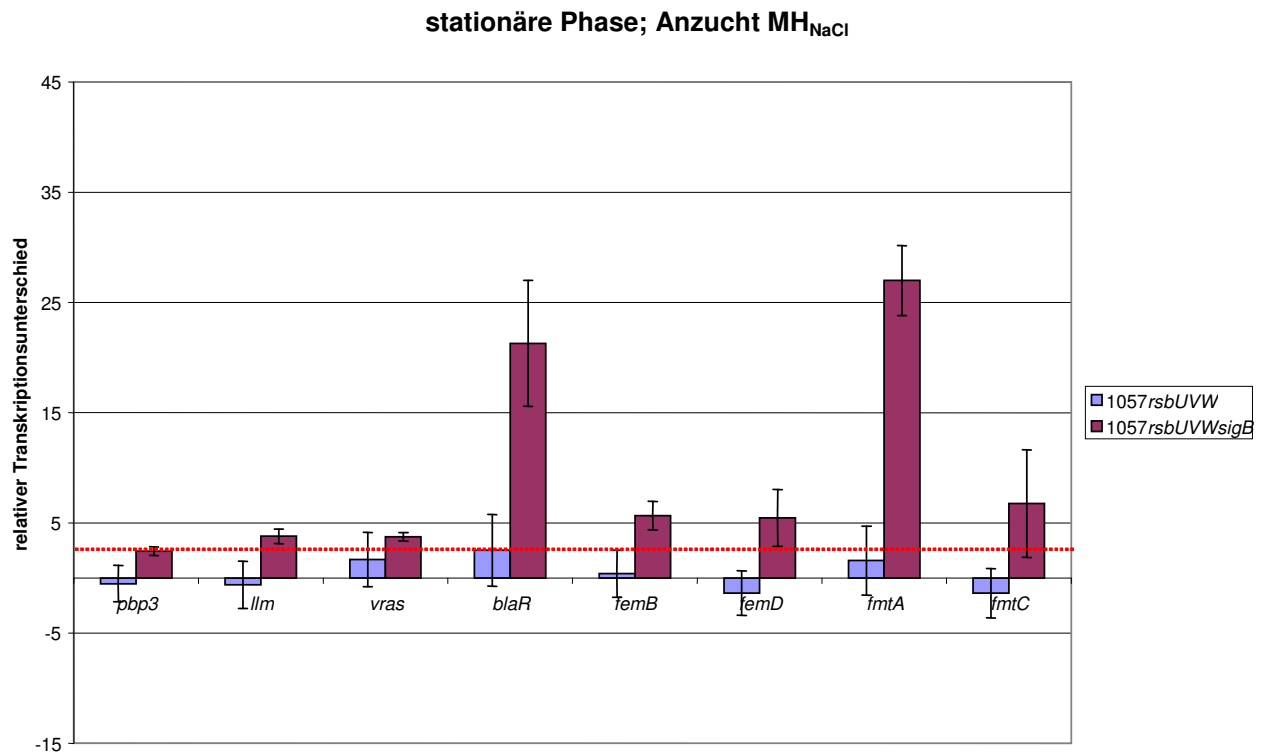


Abbildung 12: Relative Transkriptionsunterschiede auffälliger Gene in 1057rsbUVW (blau) und 1057rsbUVWsigB (rot) im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* 1057 bei Anzucht in MH_{NaCl}. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Der „cut off“ für eine relevante Regulation wurde für 2,5 definiert (gestrichelt rote Linie).

Unter Induktion durch Oxacillin erkennt man in der exponentiellen Phase sehr deutlich grafisch, dass die einzelnen Transkriptionsunterschiede der Gene zueinander in 1057rsbUVWsigB im Vergleich zur exponentiellen Phase ohne Oxacillin in stark abgeschwächter Form erhalten bleiben. Jedoch fällt die verstärkte Transkription in Relation zum Wildtyp 1057 wesentlich schwächer aus, so dass diese nur noch für *vras*, *blaR* und *fmtA* einen relevanten Ausschlag mit einem Transkriptionsunterschied über 2,5 erreicht. In der stationären Phase werden in MH_{Oxa} im Vergleich zur Anzucht in MH_{NaCl} nur noch die Gene *femD*, *fmtA*, *fmtC* verstärkt transkribiert. Mit Transkriptionsunterschieden von 4,0 (*femD*), 3,8 (*fmtA*) und 3,0 (*fmtC*) fallen diese aber insgesamt weniger deutlich aus als ohne Oxacillin mit Transkriptionsunterschieden von 5,5 (*femD*), 27,0 (*fmtA*) und 6,8 (*fmtC*) (Abbildung 13 und 14).

Für 1057rsbUVW fällt in Relation zum Wildtyp eine verminderte Expression sämtlicher untersuchter Gene unter exponentiellen Bedingungen unter Anzucht in

MH_{Oxa} auf. Bis auf *fmtC* (relativer Transkriptionsunterschied 1,7) unterschreiten diese Transkriptionsunterschiede nun für alle Gene die Signifikanzgrenze von -2,5. Am meisten vermindert ist die Transkription von *fmtA* in Relation zu 1057 mit einem Wert von -7,1. Dieses Bild wandelt sich unter stationären Bedingungen unter Anzucht in MH_{Oxa}. Hier wird nur *blaR* mit einem relativen Transkriptionsunterschied von 2,7 verstärkt transkribiert. Sowohl *vras* mit einem relativen Transkriptionsunterschied von 2,3, als auch *femD* mit einem Wert von 2,4 liegen wie die übrigen Gene unterhalb des „cut off“ von 2,5.

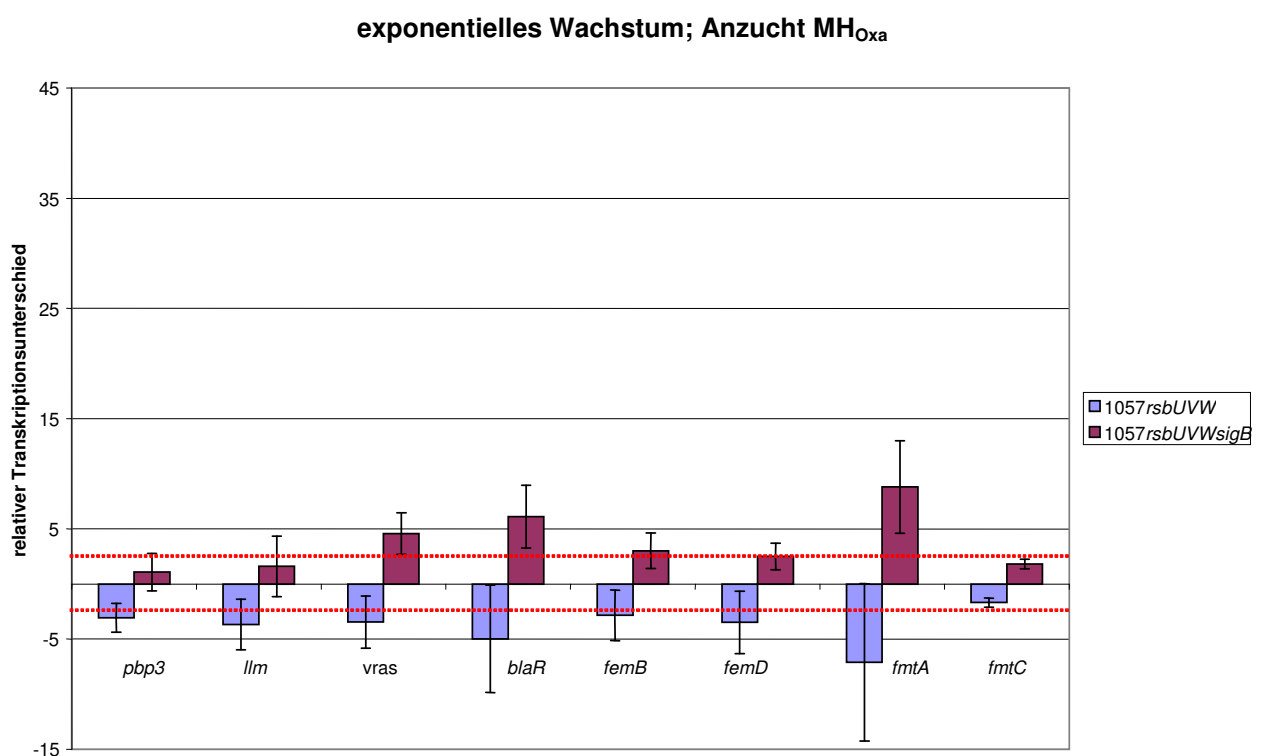


Abbildung 13: Relative Transkriptionsunterschiede auffälliger Gene in 1057rsbUVW (blau) und 1057rsbUVWsigB (rot) im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* 1057 bei Anzucht in MH_{Oxa}. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Der „cut off“ für eine relevante Regulation wurde für 2,5 definiert (gestrichelt rote Linie).

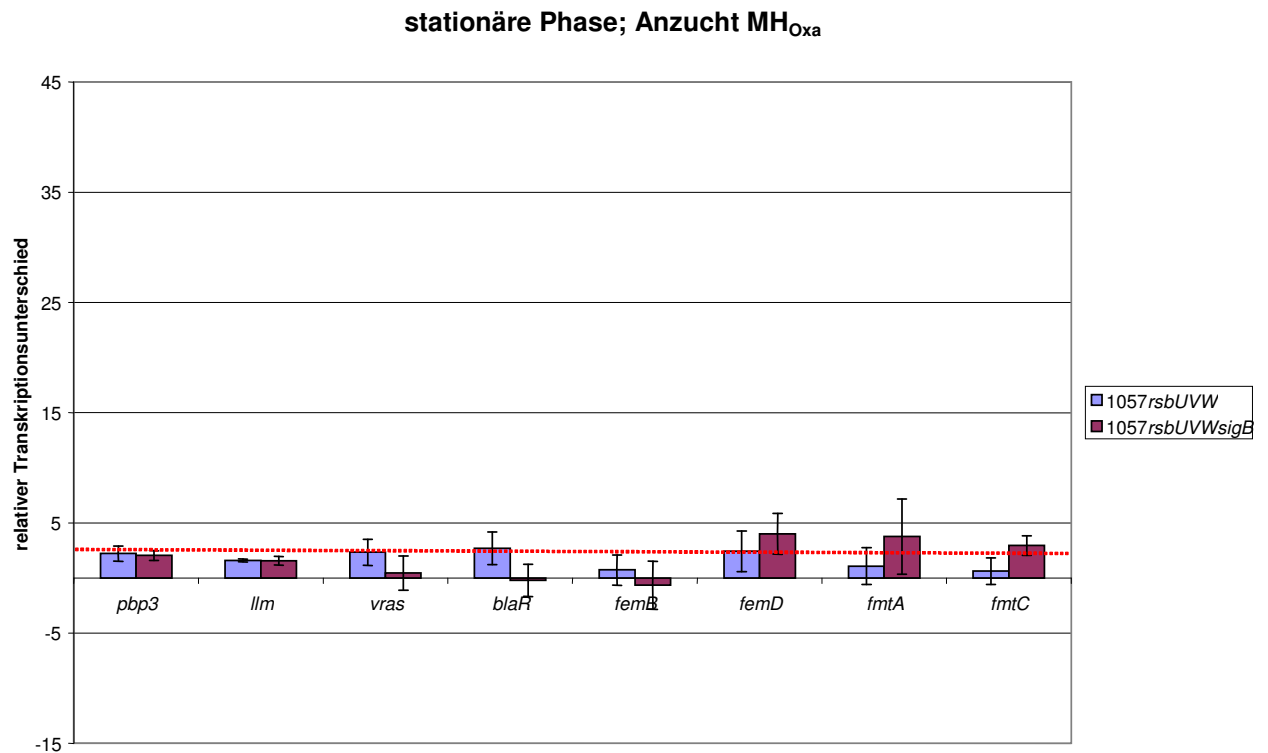


Abbildung 14: Relative Transkriptionsunterschiede auffälliger Gene in 1057rsbUVW (blau) und 1057rsbUVWsigB (rot) im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* 1057 bei Anzucht in MH_{Oxa}. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Der „cut off“ für eine relevante Regulation wurde für 2,5 definiert (gestrichelt rote Linie).

5. Diskussion

S. epidermidis gehört insbesondere bei Fremdkörper assoziierten Infektionen zu den am häufigsten isolierten Erregern und führt zu erheblicher Morbidität und auch Mortalität bei den betroffenen Patienten (Rupp et al. 1994). Die bei klinischen Isolaten regelmäßig beobachteten ausgeprägten Antibiotika-Resistenzen sind häufig vergesellschaftet mit dem Nachweis des *icaADBC* Operon, welches für die Biofilmbildung in *S. epidermidis* verantwortlich gemacht werden kann. (Christensen et al. 1982, Freborg et al. 2000). Zwischen *S. epidermidis* und *S. aureus* gibt es viele Homologien, die Rückschlüsse von der einen auf die andere Spezies zulassen. In Methicillin-resistenten *S. aureus* wurde beobachtet, dass σ^B Aktivität für die Expression einer hohen Antibiotika Resistenz erforderlich ist (Wu et al. 1996). Bei dem Operon σ^B handelt es sich um einen Regulator der PIA-Synthese und damit der Biofilmbildung. Als positiver Regulator des alternativen Sigma Faktors σ^B wurde RsbU beschrieben. Für *S. epidermidis* wurde bereits beobachtet, dass die Inaktivierung von *rsbU* zu einer verminderten Methicillin Resistenz und auch einer geringeren Biofilmbildung führt (Knobloch et al. 2004). Daher sollte in dieser Arbeit der Einfluss von σ^B auf die Expression der Methicillinresistenz in *S. epidermidis* genauer untersucht werden. Aus *S. aureus* ist bekannt, dass der wichtigste Mechanismus der Resistenz gegenüber Oxacillin durch die Bildung des alternativen Penicillin bindenden Proteins PBP2a vermittelt wird. PBP2A wird durch das Gen *mecA* codiert (Niemeyer et al. 1996). Um den Einfluss der σ^B Aktivität auf die Methicillin Resistenz in *S. epidermidis* zu untersuchen, wurde die Deletion des σ^B Operons aus dem Methicillin empfindlichen, *mecA* negativem Stamm *S. epidermidis* 1457 in den heterogenen Methicillin und Penicillin resistenten *mecA* positiven *S. epidermidis* Stamm 1057 transduziert, um so die Deletionsmutanten 1057*rsbU*, 1057*rsbV*, 1057*rsbW*, 1057*sigB*, 1057*rsbUVW* und 1057*rsbUVWsigB* zu erhalten. Für den Methicillin-resistenten *S. epidermidis* Stamm 1057 wurde bereits gezeigt, dass eine geringe Population an einer Oberfläche anheftender Bakterien auch unter sehr hohen Antibiotika Konzentrationen bestehen kann (Knobloch et al. 2002).

5.1. Phänotypische Eigenschaften ausgewählter Stämme und Mutanten

Zunächst wurde nun überprüft, inwiefern durch die Transduktion von 1457 zu 1057 die phänotypischen Eigenschaften hinsichtlich der Biofilmbildung beeinflusst

werden. Bei *S. epidermidis* handelt es sich um ein Bakterium, das typischer Weise auf der Haut zu finden ist, daher stellt sich seine Umgebung aufgrund von Schweiß Absonderung sehr oft als salzhaltig dar, so dass die Biofilmbildung auch unter 4% NaCl im Nährmedium untersucht wurde. In *S. aureus* ist NaCl zudem ein bekannter Induktor der Methicillin Resistenz durch Stimulation der PBP2a Produktion (Madiraju et al. 1987). Daher wurde NaCl dem Nährmedium in dem durchgeführten Screening auf Transkriptionsunterschiede zugesetzt. Sowohl für den *mecA*-negativen Stamm 1457, als auch den *mecA* positiven Stamm 1057 konnte gezeigt werden, dass diejenigen Mutanten, bei denen *rsbU* (der positive Regulator des alternativen Sigma Faktors σ^B) ausgeschaltet ist, eine verminderte Biofilmbildung aufweisen. Neben *rsbU* reguliert *rsbV* als Anti-Antisigma-Faktor ebenfalls positiv σ^B und seine Ausschaltung resultiert konsequenterweise ebenfalls in verminderter Biofilmbildung. Einen Biofilm-negativen Phänotyp zeigen daher auch 1057*sigB* und 1457*sigB* sowie 1057*rsbUVWsigB* und 1457*rsbUVWsigB*, in denen σ^B bzw. die komplette Regulationskaskade ausgeschaltet ist (Abbildungen 6 und 7). Insgesamt zeigen 1057 und 1457 also einen vergleichbaren Phänotyp, so dass sich auf einen generellen Einfluss von σ^B auf die Biofilmbildung schließen lässt.

Da für die Pathogenität von *S. epidermidis* letztendlich das Resistenzverhalten von großer Bedeutung ist, sollte nun auch geklärt werden, welchen Einfluss σ^B auf dieses ausübt. Um hierzu in vitro eine Fremdkörperassoziierte Infektion nachzubilden, wurde die MAK-Bestimmung ausgewählt. Hierbei sind die Bakterien an Kunststoff Zapfen angeheftet, dem Untersuchungsmedium ausgesetzt. Auf diese Weise wurden die Deletionsmutanten hinsichtlich ihres Resistenzverhaltens gegenüber Oxacillin untersucht. Der Wildtyp 1057 zeigte ein heterogenes Expressionsmuster, bei dem es einer kleinen Subpopulation möglich ist, auch bei höheren Oxacillinkonzentrationen zu bestehen. Die untersuchten Deletionsmutanten bei denen σ^B funktionell inaktiv ist, erwiesen sich als empfindlicher gegenüber hohen Oxacillin-Konzentrationen, obwohl eine Subpopulation zu überleben vermag, so dass auch bei diesen Stämmen von einem heterogenen Expressionsmuster gesprochen werden kann. Interessanter Weise zeigten die Mutanten, in denen nun der anti-Sigma Faktor *rsbW* ausgeschaltet ist und bei denen somit σ^B konstitutiv aktiv ist, ein vollkommen anderes Bild: Der heterogene Expressionsphänotyp des Wildtyps hat sich bis zu einer Konzentration von 1024 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin in einen homogenen Expressionsphänotyp der

Oxacillinresistenz geändert. Einer großen Population ist es möglich auch bei hohen Oxacillinkonzentrationen zu überleben (Abbildung 8). Diese Ergebnisse legen nahe, dass der alternative Sigma-Faktor σ^B für die Modulation der phänotypischen Expression der Methicillin Resistenz erforderlich ist. Diese Beobachtung wurde bereits für *S. aureus* beschrieben (Wu et al. 1996). Es konnte also anhand dieser Untersuchung gezeigt werden, dass die Inaktivierung des negativen Regulators der σ^B Aktivität *rsbW* die phänotypische Änderung einer heterogenen in eine homogene Expression der Methicillin Resistenz zur Folge hat. Um diese Beobachtungen zu stützen wurden innerhalb der Arbeitsgruppe Populationsanalysen durchgeführt, die zu den gleichen Aussagen führen (Knobloch et al. 2004). Die Mutante 1057*rsbU* zeigt zudem eine verminderte Oxacillin-Resistenz, wobei in dieser Mutante die Aktivität des Anti-*rsbW* Faktors *rsbV* unterdrückt wird und σ^B intakt bleibt. Aus diesen Daten könnte man schlussfolgern, dass *rsbW* einen Ort der so genannten Chromosomalen Mutationen (*chr**) darstellt, die für einen phänotypischen Resistenzwechsel verantwortlich sind, wie sie in vivo bei Methicillin resistentem *S. epidermidis* als auch MRSA Stämmen unter antibiotischer Therapie beobachtet werden (Ryffel et al. 1994).

5.2. Einfluss von *mecA* auf das gezeigte Resistenzverhalten

Nach diesen Beobachtungen musste nun überprüft werden, ob für die beobachtete phänotypische Änderung von heterogener zu homogener Expression der Oxacillinresistenz das Gen *mecA* mit dem Genprodukt PBP2a verantwortlich ist. Um dies zu klären, wurde die Transkription von *mecA* im Rahmen dieser Arbeit unter dem Einfluss von Oxacillin analysiert. Zu diesem Zweck wurde eine quantitative RT-PCR für die repräsentativen Mutanten 1057*rsbUVW* in der σ^B konstitutiv aktiviert ist und 1057*rsbUVWsigB* in der σ^B inaktiv ist, sowie den Wildtyp 1057 durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die Induktion durch Oxacillin auch einen Einfluss auf die Aktivität von σ^B hat wurde zudem *asp23* untersucht. Durch die Transkriptionsanalyse des ausschließlich σ^B abhängig transkribierten Gens *asp23* kann der Einfluss auf die Aktivität von σ^B indirekt abgeschätzt werden.

Die Mutante 1057*rsbUVWsigB* zeigt im Vergleich zum Wildtyp die erwartete signifikante Reduktion der durch *asp23* nachgewiesenen σ^B Aktivität: In der exponentiellen Phase bei Anzucht in MH_{NaCl} findet sich eine über 20fach verminderte

Transkription, in der stationären sogar eine über 40fach verminderte Transkription im Vergleich zum Wildtyp. Unter Induktion durch Oxacillin lassen sich noch deutlichere Unterschiede erkennen: bei exponentiellem Wachstum wurde eine über 70fach verminderte Transkription von *asp23*, in der stationären Phase sogar eine über 600fach verminderte Transkription in Relation zum Wildtyp gemessen (Tabelle 14). Da das σ^B abhängig transkribierten Gens *asp23* in *1057rsbUVWsigB* faktisch abgeschaltet ist, kommen die großen Transkriptionsunterschiede nur rechnerisch durch eine Hochregulation von *asp23* im Wildtyp zustande!

Bei der Betrachtung der Induktion der Transkription durch Oxacillin erkennt man, dass unter stationären Bedingungen die Transkription von *asp23* sehr stark supprimiert wird (Tabelle 14). Dies führt zu den bereits beschriebenen rechnerisch ermittelten Transkriptionsunterschieden zwischen 1057 und der σ^B inaktiven Mutante *1057rsbUVWsigB*. Die Tatsache, dass in der *1057rsbUVWsigB* Mutante eine starke Reduktion der *asp23* Transkription zu beobachten ist, bestätigt außerdem für die nachfolgenden Untersuchungen, dass wie vorausgesetzt, tatsächlich ein Stamm mit bekanntermaßen verminderter σ^B Aktivität untersucht wurde. In *1057rsbUVW* finden sich im Vergleich geringere Unterschiede für die *asp23* Transkription. Es ist eine konstitutive Aktivität von σ^B vorhanden, welche von der natürlichen Regulation der σ^B Aktivität (Autoregulation) entkoppelt ist. Ohne Oxacillininduktion findet sich in der stationären Phase eine mehr als 4fach verminderte Transkription in Relation zum Wildtyp. In der exponentiellen Phase hingegen ist hier eine signifikante Hochregulation zu messen. Diese könnte durch die fehlende Transkription des internen σ^B abhängigem Promoters (σ^B -like recognition sequence), der *rsbV* im σ^B Operon voransteht (Knobloch et al. 2001) und die dadurch fehlende σ^B Autoinduktion verursacht sein, mit einer daraus resultierenden konstitutiven Expression von σ^B unabhängig von der Wachstumsphase. Unter Oxacillininduktion lassen sich in der stationären Wachstumsphase keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp feststellen. In der exponentiellen Phase wird eine signifikant verminderte Transkription im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Tabelle 12). Betrachtet man die relativen Transkriptionsunterschiede bei Anzucht in MH_{oxa} im Vergleich zu MH_{NaCl} , so erkennt man eine Suppression der *asp23* Transkription in der exponentiellen, nicht jedoch der stationären Phase. Hierdurch lassen sich die beobachteten Unterschiede, welche in *1057rsbUVW* zwischen beiden

Wachstumsphasen bestehen erklären (Tabelle 14). Für die Transkription von *mecA* fanden sich erstaunlicherweise in der wesentlich resistenteren Mutante 1057*rsbUVW* keine signifikanten Unterschiede. Dafür konnte jedoch für die weniger empfindliche Mutante 1057*rsbUVWsigB* eine signifikante Hochregulierung im nicht durch Oxacillin induzierten Zustand gefunden werden, während auch hier im induzierten Zustand keine signifikanten Regulationsunterschiede detektierbar waren. Obwohl also aus *S. aureus* bekannt ist, dass der wichtigste Mechanismus der Resistenz gegenüber Oxacillin durch die Bildung des alternativen Penicillin bindenden Proteins PBP2a vermittelt, scheint dieser Mechanismus hier wider erwarten nicht zum Tragen zu kommen. Es muss also weitere noch unbekannte Mechanismen neben der Bildung von PBP2a geben, die hier zu dem gezeigten Resistenzverhalten führen.

Bei der Analyse der Induktion der Transkription von *mecA* durch Oxacillin (Tabelle 10) fällt auf, dass sowohl in 1057 als auch 1057*rsbUVW* und 1057*rsbUVWsigB* die Transkription von *mecA* durch Oxacillin induzierbar ist. In 1057*rsbUVWsigB* in der stationären Wachstumsphase ist der relative Transkriptionsunterschied von *mecA* in MH_{oxa} im Vergleich zu MH_{NaCl} mit 2,9 jedoch deutlich geringer als in der exponentiellen Wachstumsphase mit 23,5. Insgesamt ist 1057*rsbUVWsigB* hinsichtlich der Transkription von *mecA* zudem deutlich schwächer induzierbar als der Wildtyp, so dass dies die zuvor gemachten Beobachtungen hinsichtlich der relativen Transkriptionsunterschiede in Relation zum Wildtyp erklären kann. Möglicherweise ist im Vergleich bei 1057*rsbUVWsigB* die basale Transkription von *mecA* deutlich höher als bei 1057 und 1057*rsbUVW*, so dass das Maximum der Produktion bereits erreicht ist und sich durch Oxacillingabe nicht weiter steigern lässt. Auf die beobachtete Induktion von *mecA* scheint also σ^B einen Einfluss zu haben. Interessanterweise ist aber *mecA* an dem Shift von heterogener zu homogener Oxacillinresistenz nicht beteiligt! In der hierzu repräsentativ ausgewählten Mutante 1057*rsbUVW*, in der σ^B konstitutiv aktiviert ist, wurde kein signifikanter Transkriptionsunterschied für *mecA* im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Hinsichtlich der Induktion der *mecA* Transkription durch Oxacillin befindet sich 1057*rsbUVW* auf einem für die stationäre Phase vergleichbarem, für die exponentielle Phase geringerem Level. Auch aufgrund der Beobachtungen für 1057*rsbUVWsigB* kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass die Expressionsunterschiede der Oxacillinresistenz auf einer direkten σ^B -abhängigen Regulation der *mecA*

Transkription basieren.

5.3. Diskussion der Transkriptionsanalyse weiterer Gene

Wie bereits geschildert konnte somit zunächst noch keine hinreichende Erklärung für den Shift von heterogenem zu homogenem Resistenzverhalten gefunden werden. Daher wurden die Transkriptionsunterschiede weiterer Gene der Zellwandsynthese und anderer Stoffwechselwege, von denen ein Einfluss auf den Expressionsphänotyp der Oxacillinresistenz in Staphylokokken bekannt ist, zunächst in einem Screening untersucht. Hier sind bereits sowohl aus *S. aureus* als auch aus *S. epidermidis* einige Gene bekannt, denen gemeinsam ist, dass Ihre Inaktivierung die Oxacillin Resistenz reduziert (Tabelle 1 und 2). Das Screening lieferte in der Transkriptionsanalyse auffällige Werte für die Gene *femB*, *femD*, *fntA*, *fntC*, *pbp3*, *llm*, *vras* und *blaR*, so dass diese zur Bestätigung der Werte einer definitiven Analyse unterzogen wurden.

In *S. aureus* erfolgt die Entwicklung einer Antibiotikaresistenzbildung nur in Anwesenheit des Antibiotikums. Das hierfür vorhandene sensorische bzw. transduzierende System stellen der BlaR1 und der MecR1 Rezeptor dar. BlaR1 als integrales Rezeptorprotein besitzt dabei neben einer C-terminalen Zelloberflächen-Beta-Lactam Bindedomäne auch eine transmembrane Domäne und eine intrazelluläre Domäne mit Zink abhängiger Proteasen Aktivität. Kommt es zur Bindung des Beta-Lactams, führt dies zu einer Aktivierung der cytoplasmatischen Domäne mit proteolytischer Degradation eines Repressor Proteins, welches ansonsten die Transkription von *blaZ* welches für die Beta-Laktamase codiert, hemmen würde. (Hackbarth et al. 1994, Golemi-Kotra et al. 2003, Thumanu et al. 2006). Für die Mutante 1057*rsbUVWsigB* zeigt sich in Relation zum Wildtyp eine deutlich vermehrte Transkription von *blaR* zu beiden RNA Extraktionszeitpunkten ohne Oxacillineinfluss. Die Tatsache, dass σ^B hier inaktiv ist, scheint sich positiv auf die Transkription von *blaR* auszuwirken (Abbildung 11 und 12). Bei Zusatz von Oxacillin zum Nährmedium wird auch im Wildtyp *blaR* vermehrt transkribiert, so dass der relative Transkriptionsunterschied von 1057*rsbUVWsigB* in Relation zu 1057 für *blaR* in der exponentiellen Phase nur noch auf einem geringeren Niveau signifikant positiv messbar ist. In der stationären Phase unter Einfluss von Oxacillin besteht kein signifikanter Transkriptionsunterschied mehr zum Wildtyp (Abbildung 13 und 14). Die Transkription von *blaR* in 1057*rsbUVW* zeigt ohne Oxacillineinfluss keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Unter Oxacillineinfluss scheint die

konstitutive Aktivierung von σ^B in Relation zum Wildtyp zu einem negativem relativen Transkriptionsunterschied von *blaR* in der exponentiellen Phase zu führen. Das bedeutet dass *blaR* unter Oxacillineinfluss in der exponentiellen Phase in 1057 im Vergleich zu 1057*rsbUVW* vermehrt transkribiert wird. In der stationären Phase ist dieser Einfluss nicht nachweisbar. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass σ^B auch auf die beobachtete Induktion von *blaR* einen Einfluss zu haben scheint, aber *blaR* ebenfalls nicht an dem Shift des Expressionsphänotyps beteiligt zu sein scheint. BlaR1 und MecR1, als Repressor von *mecA*, scheinen strukturell als auch funktionell miteinander in Beziehung zu stehen (Thumanu et al. 2006). Daher decken sich diese Ergebnisse mit den Beobachtungen für *mecA*, auf dessen Induktion σ^B wie beschrieben ebenfalls einen Einfluss zu haben scheint.

Am auffälligsten sind die bei den durchgeführten Messungen erhaltenen Werte für *fmtA* in der σ^B inaktiven Mutante 1057*rsbUVWsigB*. Von FmtA ist bekannt, dass es als Zellmembranprotein das Level der Methicillinresistenz in *S. aureus* beeinflusst (Komatsuzawa et al. 1999). In 1057*rsbUVWsigB* lässt sich eine über 25-fache Hochregulation unter Anzucht ohne Oxacillin in der stationären und exponentiellen Phase in Relation zum Wildtyp erkennen. Auch unter dem Einfluss von Oxacillin wird *fmtA* in Relation zum Wildtyp noch signifikant erhöht zu beiden RNA Extraktionszeitpunkten transkribiert. Anscheinend führt das Ausschalten von σ^B zu einer deutlichen Steigerung der Transkription von *fmtA*. In zeitlichem Abstand zu dieser Arbeit wurde das Genprodukt FmtA von Xin Fan et al. 2007 in *S. aureus* als fünftes Penicillin bindendes Protein beschrieben, was eine ähnliche Bedeutung in *S. epidermidis* nahe legt, die es noch zu untersuchen gilt. Dies steht zunächst im Widerspruch zu den gemachten Beobachtungen, dass Gene, welche bei Inaktivierung zu verminderter Resistenz führen in einer Mutante mit verminderter Resistenz hoch reguliert sind. Es könnte jedoch dennoch als Erklärung der gemachten Beobachtungen dienen, wenn man davon ausgeht, dass das Ausschalten von σ^B bei Antibiotika Stress weitere Regulationskaskaden aktiviert. In jedem Fall legen die Beobachtungen aber nahe, dass die Beziehung zwischen *fmtA* und σ^B hinsichtlich ihres Einflusses auf das Resistenzverhalten noch genauer untersucht werden sollte. Von Interesse ist zudem, dass zwei Rollen von FmtA beim Wachstum von *S. aureus* postuliert wurden. In geringen Konzentrationen soll FmtA die Aktivität des major autolysin (AtlA) von *S. aureus* modulieren und in höheren

Konzentrationen an der Synthese des Zellwand Peptidoglycan mitwirken. Diese zwei Rollen von FmtA könnten zwei unterschiedliche Funktionen in An- und Abwesenheit von Zellwand Stress widerspiegeln (Qamar et al. 2012). Außerdem ist aus *S. aureus* bekannt, dass die Inaktivierung von Genen der Zellwandsynthese wie *murF* zu einer Steigerung der Transkription von *fmtA* führt (Sobral et al. 2007). Möglicherweise wird der Stress, der zu der beobachteten Steigerung der *fmtA* Transkription führt, hier durch die Inaktivierung von σ^B ausgelöst. Die Inaktivierung von *fmtA* hingegen führt in *S. aureus* zu verminderter Biofilmbildung (Boles et al. 2010). Erstaunlicher Weise ist in der weniger Biofilmbildenden Mutante *fmtA* nun jedoch erhöht. Der Stress durch die Inaktivierung von σ^B scheint hier im Bezug auf die Regulation den Ausschlag zu geben. Für 1057*rsbUVW* lässt sich in der exponentiellen Phase unter dem Einfluss von Oxacillin in Relation zum Wildtyp ein signifikant negativer Transkriptionsunterschied erkennen. Auch für *fmtA* scheint die konstitutive Aktivierung von σ^B in Relation zum Wildtyp unter Oxacillineinfluss zu einem negativem relativen Transkriptionsunterschied in der exponentiellen Phase zu führen. *FmtA* wird unter Oxacillineinfluss in der exponentiellen Phase in 1057 im Vergleich zu 1057*rsbUVW* vermehrt transkribiert. In der stationäre Phase lässt sich unter Oxacillin Einfluss kein signifikanter Unterschied feststellen. Daher ist davon auszugehen, dass σ^B auch auf die beobachtete Induktion von *fmtA* einen Einfluss zu haben scheint, aber auch *fmtA* nicht an dem Shift des Expressionsphänotyps beteiligt zu sein scheint.

Bei den Penicillinbindenden Proteinen lässt sich für *pbp3* in der Mutante 1057*rsbUVWsigB* bei exponentiellem Wachstum ohne Oxacillineinfluss eine vermehrte Transkription im Vergleich zum Wildtyp erkennen. Ansonsten weisen die für diese Mutante erhobenen Werte keinen signifikanten Transkriptionsunterschied auf. Da auch für die Mutante 1057*rsbUVW* nur bei exponentiellem Wachstum unter Oxacillin Einfluss ein negativer relativer Transkriptionsunterschied besteht, kann auch für *pbp3* nicht von einer Beteiligung am Shift des Expressionsphänotyps ausgegangen werden. Im Scening waren *pbp1* und *pbp2* nicht auffällig getestet worden. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass PBP3 sensitiver auf Methicillin reagiert als PBP1 oder PBP2 (Yoshida et al. 2012). Unter dem Einfluss der konstitutiven Aktivierung von σ^B scheint sich diese Tatsache im Vergleich zum Wildtyp hier in einer relativ verminderten Transkription widerzuspiegeln.

Auch *lrm* codiert für ein Protein mit membranständiger Lokalisation, dessen Ausschalten in Methicillin resistentem *S. aureus* zu einer verringerten Resistenz führt (De Lencastre et al. 1999, Makiet al. 1997). Eine signifikant vermehrte relative Transkription lässt sich für *lrm* in der Mutante 1057*rsbUVWsigB* bei Anzucht ohne Oxacillin erkennen. Unter Oxacillin bestehen diese Unterschiede zum Wildtyp nicht mehr. Hier scheint die Induktion der Transkription von *lrm* im Wildtyp durch Oxacillin den Unterschied, der ohne Oxacillinstress beobachtet wurde, auszugleichen. Interessanterweise lässt sich also auch für *lrm* beobachten, dass in der weniger resistenten Mutante 1057*rsbUVWsigB* mit *lrm* ein Gen ohne Oxacillinstress hochreguliert wird. Im Gegenzug wird *lrm* in 1057*rsbUVW* bei exponentiellem Wachstum unter Oxacillininduktion in Relation zum Wildtyp supprimiert, bzw. im Wildtyp im Vergleich die Transkription von *lrm* durch Oxacillin induziert. Daher ist auch hier davon auszugehen, dass σ^B auf die Regulation von *lrm* in einer bisher unbekanntem Art und Weise einen Einfluss zu haben scheint, aber auch *lrm* nicht an dem Shift des Expressionsphänotyps beteiligt zu sein scheint.

Die untersuchten *fem* Gene *femB* und *femD*, welche durch Ihren Einfluss auf den Zellwandmetabolismus eine Rolle bei der Peptidoglycan Biosynthese spielen, verhalten sich in der Analyse sehr ähnlich. In der Mutante 1057*rsbUVW* weisen sie ohne Oxacillineinfluss keine signifikanten Transkriptionsunterschiede auf. Unter Oxacillineinfluss ist auch bei beiden wie schon zuvor für die übrigen untersuchten Gene beschrieben ein verminderter relativer Transkriptionsunterschied zu messen. Auch hier scheint die Ursache für dieses Verhalten am ehesten in der konstitutiven Aktivierung von σ^B zu liegen. In der stationären Phase unter Oxacillineinfluss zeigt *femD* eine grenzwertig vermehrte relative Transkription. In der Mutante 1057*rsbUVWsigB* sind beide *fem* Gene mit Ausnahme von *femB* in der stationären Phase unter Oxacillineinfluss signifikant vermehrt transkribiert in Relation zum Wildtyp 1057. Auch für *femB* und *femD* steht dies im scheinbaren Widerspruch, da sie für die vollständige Resistenzbildung erforderlich sein sollen und 1057*rsbUVWsigB* ein vermindertes Resistenzverhalten zeigt (Berger-Bächli et al. 2002). Daher ist davon auszugehen dass die Inaktivierung von σ^B auch hier einen Einfluss zu haben scheint. Für *femB* und *femD* kann jedoch nicht von einer

Beteiligung am Shift des Expressionsphänotypes ausgegangen werden.

Bei *FmtC* handelt es sich um ein Membran assoziiertes Protein. Die Inaktivierung von *fmtC* führt zu einer verminderten negativen Ladung der Membranoberfläche durch verminderte Modifikation von Phosphatidylglycerol mit L-lysine. Dadurch bedeutet eine Inaktivierung von *fmtC* eine verstärkte Bindung von antimikrobiellen Peptiden an das Bakterium und führt zu verminderter Resistenz (Midorikawa et al. 2003, Peschel et al. 2001). Für *fmtC* lässt sich in der Mutante 1057*rsbUVW* nicht wie für die übrigen Gene beschrieben bei exponentiellem Wachstum unter Oxacillineinfluss ein negativer relativer Transkriptionsunterschied messen. Ohne Oxacillin Einfluss ist in der exponentiellen Phase ein positiver relativer Transkriptionsunterschied zu messen. In der stationären Phase bestehen keine Transkriptionsunterschiede zum Wildtyp. Für die Mutante 1057*rsbUVWsigB* mit fehlender σ^B Aktivität findet sich zudem eine relativ vermehrte Transkription von *fmtC* außer in der exponentiellen Phase unter Oxacillineinfluss. Es ist also auch hier von einem Einfluss von σ^B auf die Transkription auszugehen, wenngleich der Einfluss auf *fmtC* geringer als auf die anderen untersuchten Gene zu sein scheint. Für *fmtC* kann ebenfalls nicht von einer Beteiligung am Shift des Expressionsphänotypes ausgegangen werden.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine verstärkte Transkription der untersuchten Genorte, wie in 1057*rsbUVWsigB* beobachtet, auf keinen Fall zu einer verstärkten Resistenz beiträgt. Man könnte sogar im Gegenteil spekulieren, dass die Dysregulation einen Beitrag zur verminderten Resistenz leistet. Die beobachteten Transkriptionsunterschiede deuten gleichzeitig darauf hin, dass für die verstärkte Resistenz, wie sie für 1057*rsbUVW* dargestellt wurde, eine vermehrte Transkription keiner der untersuchten Genorte (inklusive der im Screening ausgeschiedenen Genorte) notwendig ist. Da von den untersuchten Gene keines identifiziert werden konnte, welches für den beobachteten phänotypischen Shift von heterogenem zu homogenem Resistenzverhalten verantwortlich gemacht werden kann, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass der zuvor beschriebene Unterschied der Expression der Oxacillinresistenz auf mindestens einen bisher unbekanntes Genort zurückzuführen ist.

6. Zusammenfassung

Für *S. epidermidis* hängt die Expression der Oxacillinresistenz wesentlich von der Aktivität des alternativen sigma-Faktors σ^B ab. Durch Ausschaltung des Anti-sigma Faktors *rsbW* lässt sich mit dieser Arbeit erstmalig eine homogene Expression der Oxacillin Resistenz herbeiführen. Somit wurde ein Gen für *S. epidermidis* identifiziert, welches bei Inaktivierung in der Lage ist, einen Wechsel von heterogener zu homogener Oxacillinresistenz zu verursachen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieser phänotypische Shift von heterogener zu homogener Oxacillinresistenz unabhängig von der Regulation von *mecA* besteht, welches für das alternative Penicillin bindende Protein, das so genannte PBP2a oder auch PBP2' codiert. Auf die beobachtete Induktion der Transkription von *mecA* scheint jedoch σ^B einen Einfluss zu haben. Die Inaktivierung von σ^B führt zu einer verminderten Induktion der *mecA* Transkription durch Oxacillin.

Durch Ausschalten des alternativen sigma-Faktors werden die Gene *pbp3*, *llm*, *vras*, *blaR*, *femB*, *femD*, *fmtA* und *fmtC*, welche das Resistenzverhalten von *S. epidermidis* beeinflussen, vermehrt exprimiert. Dies trägt jedoch nicht zu einer verstärkten Resistenz bei. Für die verstärkte Resistenz, wie sie für 1057*rsbUVW* dargestellt wurde, ist keine vermehrte Transkription der untersuchten Gene notwendig. Besonders auffällig waren die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse für das Gen *fmtA*, welches 2007 von Xin Fan et al. in *S. aureus* als fünftes Penicillin bindendes Protein beschrieben wurde. Die Inaktivierung des alternativen sigma-Faktors σ^B führt zu einer ausgeprägten Steigerung der Expression von *fmtA*, so dass von einer besonderen Bedeutung hinsichtlich des Resistenzverhaltens ausgegangen werden muss, wenngleich hier kein direkter Einfluss auf die Oxacillinresistenz nachgewiesen werden konnte. Die Beziehung von *fmtA* und σ^B innerhalb der Regulationsmechanismen des Resistenzverhaltens sollte daher genauer untersucht werden. Vom alternativen sigma-Faktor σ^B scheint auch hinsichtlich der Induktion der Transkription der untersuchten Gene ein Einfluss auszugehen. Von den untersuchten Genen einschließlich *fmtA* scheint jedoch keines in der Lage zu sein, den erstmalig beobachteten Wechsel im Resistenzverhalten von heterogen zu homogen herbeizuführen. Daher ist davon auszugehen, dass hier ursächlich ein bisher unbekannter Genort vermutet werden kann.

7. Literaturverzeichnis

- Alouf JE, Müller-Alouf H** (2003) Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* 292:429-440
- Berger-Bächli B, Tschierske M** (1998) Role of *fem* factors in methicillin resistance. *Drug Resist Updat.* 1:325-335
- Berger-Bächli B, Rohrer S** (2002) Factors influencing methicillin resistance in *staphylococci*. *Arch Microbiol.* 178:165-171
- Boles BR, Thoendel M, Roth AJ, Horswill AR** (2010) Identification of genes involved in polysaccharide-independent *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *PLoS One.* 5:e10146
- Bond R, Loeffler A** (2012) What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J. Small Anim. Pract.* 53:147-154
- Boyle-Vavra S, Yin S, Daum RS** (2006) The *VraS/VraR* two-component regulatory system required for oxacillin resistance in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 262:163-171
- Bradford R, Manan RA, Garland SM, Daley AJ, Deighton MA** (2012) Coagulase-negative *staphylococci* in low birth weight infants: environmental factors affecting biofilm production in *Staphylococcus epidermidis*. *Curr. Microbiol.* 62:850-854
- Chambers HF** (1997) Methicillin resistance in *staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:781-791
- Chambers HF** (1999) Penicillin-binding protein-mediated resistance in *pneumococci* and *staphylococci*. *J. Infect Dis.* 179:353-359
- Conlon KM, Humphreys H, O'Gara JP** (2002) Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 216:171-177
- Debabov DV, Heaton MP, Zhang Q, Stewart KD, Lambalot RH, Neuhaus FC** (1996) The D-Alanyl carrier protein in *Lactobacillus casei*: cloning, sequencing, and expression of *dltC*. *J. Bacteriol.* 178:3869-3876
- Deighton MA, Balkau B** (1990) Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J. Clin. Microbiol.* 28:2442-2447
- De Lencastre H, Wu SW, Pinho MG, Ludovice AM, Filipe S, Gardete S, Sobral R, Gill S, Chung M, Tomasz A** (1999) Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. *Microb. Drug Resist.* 5:163-175
- Dominguez-de Villota E, Algora-Weber A, Millán I, Rubio JJ, Galdos P, Mosquera JM** (1987) Early evaluation of coagulase negative *staphylococcus* in blood samples of intensive care unit patients. A clinically uncertain judgement. *Intensive Care Med.* 13:390-394
- Fan X, Liu Y, Smith D, Konermann L, Siu KW, Golemi-Kotra D** (2007) Diversity of penicillin-binding proteins. Resistance factor FmtA of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 282:35143-35152
- Frebourg NB, Lefebvre S, Baert S, Lemeland JF** (2000) PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Clin Microbiol.* 38:877-880
- Fitzpatrick F, Humphreys H, Smyth E, Kennedy CA, O'Gara JP** (2002) Environmental regulation of biofilm formation in intensive care unit isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Infect.* 52:212-218
- Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S** (2004) The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 279:40802-40806
- Fujimura T, Murakami K** (2008) *Staphylococcus aureus* clinical isolate with high-level methicillin resistance with an *lytH* mutation caused by IS1182 insertion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:643-647

- Galdbart JO, Allignet J, Tung HS, Ryden C, El Solh N.** (2000) Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J. Infect. Dis.* 182:351-355
- Garitty GM, Bell JA, Lilburn TG** (2004) Taxonomic Outline of the Prokaryotes, *Bergey's Manual of the Systematic Bacteriology* Second Edition
- Gerke C, Kraft A, Süßmuth R, Schweitzer O, and Götz F** (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273:18586-18593
- Gertz S, Engelmann S, Schmid R, Ohlsen K, Hacker J, Hecker M** (1999) Regulation of σ^B - dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol. Gen. Genet.* 261:558-566
- Giachino P, Engelmann S, Bischoff M** (2001) σ^B activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183:1843-1852
- Golemi-Kotra D, Cha JY, Meroueh SO, Vakulenko SB, Mobashery S** (2003) Resistance to beta-lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 278:18419-18425
- Gustafson J, Strassle A, Hachler H, Kayser FH, Berger-Bächi B** (1994) The *femC* locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon. *J. Bacteriol.* 176:1460-1467
- Hackbarth CJ, Miick C, Chambers HF** (1994) Altered production of penicillin-binding protein 2a can affect phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2568-2571
- Han WS, Yoon YJ, Park CW, Park SH, Nam OO, Rhee I** (2012) *Staphylococcus aureus* pericardial abscess presenting as severe sepsis and septic shock after acupuncture therapy. *Korean Circ. J.* 42:501-503
- Herwaldt LA, Hollis RJ, Boyken LD, Pfaller MA** (1992) Molecular epidemiology of coagulase-negative *staphylococci* isolated from immunocompromised patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 13:86-92
- Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK** (National Healthcare Safety Network Team) Participating National Healthcare Safety Network Facilities (2008) NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29:996-1011
- Huebner J, Goldmann DA** (1999) Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu. Rev. Med.* 50:223-236
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC)** (2009) Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4961-4967
- Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K** (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist. Updat.* 6:41-52
- Jolly L, Wu S, van Heijenoort J, de Lencastre H, Mengin-Lecreulx D, Tomasz A** (1997) The *femR315* gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* 179:5321-5325
- Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K** (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* 230:13-18
- Kloos WE, Bannerman TL** (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative *staphylococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:117-140
- Kloos WE, Ballard DN, Webster JA, Hubner RJ, Tomasz A, Couto I, Sloan GL, Dehart HP, Fiedler F, Schubert K, de Lencastre H, Sanches IS, Heath HE, Leblanc PA, Ljungh A** (1997) Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:313-323

- Knobloch JKM, Bartscht K, Sabottke A, Rohde H, Feucht HH, Mack D** (2001) Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* 183:2624-2633
- Knobloch JKM, von Osten H, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D** (2002) Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 191:107-114
- Knobloch JKM, Horstkotte MA, Rohde H, Kaulfers PM, Mack D** (2002) Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 49:683-687
- Knobloch JKM, Horstkotte MA, Rohde H, Mack D** (2002) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 191:101-106
- Knobloch JKM, Jäger S, Huck J, Horstkotte MA, Mack D** (2005) *mecA* Is Not Involved in the σ^B -Dependent Switch of the Expression Phenotype of Methicillin Resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1216-1219
- Knobloch JKM, Jäger S, Horstkotte MA, Rohde H, Dobinsky S, Mack D** (2004) RsbU dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor σ^B by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect. Immun.* 72:3838-3848
- Koksai F, Yasar H, Samasti M** (2009) Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative *staphylococcus* strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiol. Res.* 164:404-410
- Komatsuzawa H, Ohta K, Labischinski H, Sugai M, Suginaka H** (1999) Characterization of *fmtA*, a gene that modulates the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2121-2125
- Komatsuzawa H, Choi GH, Fujiwara T, Huang Y, Ohta K, Sugai M, Suginaka H** (2000) Identification of a *fmtA*-like gene that has similarity to other PBPs and beta-lactamases in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 188:35-39
- Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Thomas A** (2007) Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. Rheinbach
- Łeski TA, Tomasz A** (2005) Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP2, PBP4, and PBP2A. *J. Bacteriol.* 187:1815-1824
- Maki H, Murakami K** (1997) Formation of potent hybrid promoters of the mutant *llm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179:6944-6948
- Mack D, Siemssen N, Laufs R.** (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect. Immun.* 60:2048-2057
- Mack D, Haeder M, Siemssen N, Laufs R** (1996) Association of biofilm production of coagulase-negative *staphylococci* with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J. Infect. Dis.* 174:881-884
- Mack D, Becker P, Chatterjee I, Dobinsky S, Knobloch JK, Peters G, Rohde H** (2004) Herrmann M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int. J. Med. Microbiol.* 294:203-212
- Madiraju MV, Brunner DP, Wilkinson BJ** (1987) Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1727-1733
- May JJ, Finking R, Wiegeshoff F, Weber TT, Bandur N, Koert U, Marahiel MA** (2005) Inhibition of the D-alanine:D-alanyl carrier protein ligase from *Bacillus subtilis* increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall. *FEBS J.* 272:2993-3003

- Midorikawa K, Ouhara K, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Fujiwara T, Yamazaki K, Sayama K, Taubman MA, Kurihara H, Hashimoto K, Sugai M** (2003) *Staphylococcus aureus* susceptibility to innate antimicrobial peptides, beta-defensins and CAP18, expressed by human keratinocytes. *Infect. Immun.* 71:3730-3739
- Niemeyer DM, Pucci MJ, Thanassi JA, Sharma VK, Archer GL** (1996) Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 178:5464-5471
- Neely AN, Maley MP** (2000) Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. *J. Clin. Microbiol.* 38:724-726
- Navratna V, Nadig S, Sood Varun, Prasad K, Arakere G, Gopal B** (2010) Molecular Basis for the Role of *Staphylococcus aureus* Penicillin Binding Protein 4 in Antimicrobial Resistance. *J. Bacteriol.* 192:134-144
- O'Gara JP** (2007) *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270:179-88
- Ornelas-Soares A, de Lencastre H, de Jonge BL, Tomasz A** (1994) Reduced methicillin resistance in a new *Staphylococcus aureus* transposon mutant that incorporates muramyl dipeptides into the cell wall peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 269:27246-27250
- Otto M** (2012) Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.* 34:201-214
- Otto M** (2012) Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64:175-188
- Parisi JT** (1985) Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiol. Rev.* 49:126-139
- Pereira SF, Henriques AO, Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz A** (2007) Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 3525-3531
- Peschel A, Otto M, Jack RW, Kalbacher H, Jung G, Götz F** (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* 274:8405-8410
- Peschel A, Jack RW, Otto M, Collins LV, Staubitz P, Nicholson G, Kalbacher H, Nieuwenhuizen WF, Jung G, Tarkowski A, van Kessel KP, and van Strijp JA** (2001) *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J. Exp. Med.* 193:1067-1076
- Piette A, Verschraegen G** (2009) Role of coagulase-negative *staphylococci* in human disease. *Vet. Microbiol.* 134:45-54
- Qamar A, Golemi-Kotra D** (2012) Dual Roles of FmtA in *staphylococcus aureus* Cell Wall Biosynthesis and Autolysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:3797-3805
- Raad I, Alrahwan A, Rolston K** (1998) *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. *Clin Infect Dis.* 26:1182-1187
- Rachid S, Cho S, Ohlsen K, Hacker J, Ziebuhr W** (2000) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor sigB. *Adv. Exp. Med. Biol.* 485:159-166
- Ramadurai L, Jayaswal RK** (1997) Molecular cloning, sequencing, and expression of *lytM*, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179:3625-3631
- Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JK, Heilmann C, Herrmann M, Mack D** (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol. Microbiol.* 55:1883-95
- Roychoudhury S, Dotzlaef JE, Ghag S, Yeh WK** (1994) Purification, properties, and kinetics of enzymatic acylation with beta-lactams of soluble penicillin-binding protein 2a. A major factor in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 269:12067-12073

- Rupp ME, Archer GL** (1994) Coagulase-negative *staphylococci*: pathogens associated with medical progress. Clin. Infect. Dis. 19:231-243
- Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D** (1999) Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. Infect. Immun. 67:2627-2632
- Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D** (1999) Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. Infect. Immun. 67:2656-2659
- Rupp ME, Fey PD, Heilmann C, Götz F** (2001) Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. J. Infect. Dis. 183:1038-1042
- Ryffel C, Strässle A, Kayser FH, Berger-Bächi B** (1994) Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 38:724-728
- Schleifer KH** (1986) Micrococcaceae, Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore
- Senn MM, Bischoff M, von Eiff C, Berger-Bächi B** (2005) sigmaB activity in a *Staphylococcus aureus* hemB mutant. J. Bacteriol. 187:7397-7406
- Seral C, Sáenz Y, Algarate S, Duran E, Luque P, Torres C, Castillo FJ** (2011) Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. Int. J. Med. Microbiol. 301:354-358
- Sharma P, Lahiri KK, Kapila K** (2011) Conventional and molecular characterization of coagulase-negative *staphylococcus* in hospital isolates. Indian J. Pathol. Microbiol. 54:85-89
- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M** (2009) Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. J. Med. Microbiol. 58:1067-1073
- Sobral RG, Ludovice AM, Gardete S, Tabei K, De Lencastre H, Tomasz A** (2003) Normally functioning murF is essential for the optimal expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Microb. Drug Resist. 9:231-241
- Sobral RG, Jones AE, Des Etages SG, Dougherty TJ, Peitzsch RM, Gaasterland T, Ludovice AM, de Lencastre H, Tomasz A** (2007) Extensive and genome-wide changes in the transcription profile of *Staphylococcus aureus* induced by modulating the transcription of the cell wall synthesis gene murF. J. Bacteriol. 189:2376-2391
- Stranden AM, Ehlert K, Labischinski H, Berger-Bächi B** (1997) Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a femAB null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 179:9-16
- Sydnor ERM, Perl TM** (2011) Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. Clin. Microbiol. Rev. 24:141-173
- Thibodeau E, Boucher H, Denofrio D, Pham DT, Snyderman D** (2012) First report of a left ventricular assist device infection caused by *Staphylococcus schleiferi* subspecies coagulans: a coagulase-positive organism. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 74:68-69
- Thumanu K, Cha J, Fisher JF, Perrins R, Mobashery S, Wharton C** (2006) Discrete steps in sensing of beta-lactam antibiotics by the BlaR1 protein of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:10630-10635
- Ubukata K., Nonoguchi R., Matsushashi M., Konno M.** 1989 Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant S. aureus-specific penicillin-binding protein. J Bacteriol.; 171:2882-5
- Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokai-Kun JF** (2003) Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. Antimicrob. Agents Chemother. 47:3407-3414

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

Yin S, Daum RS, Boyle-Vavra S (2006) VraSR two-component regulatory system and its role in induction of *pbp2* and *vraSR* expression by cell wall antimicrobials in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:336-343

Yoshida H, Kawai F, Obayashi E, Akashi S, Roper DI, Tame JR, Park SY (2012) Crystal structures of penicillin-binding protein 3 (PBP3) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the apo and cefotaxime-bound forms. *J. Mol. Biol.* 423:351-364

Ziebuhr W, Heilmann C, Götz F, Meyer P, Wilms K, Straube E, Hacker J (1997) Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect. Immun.* 65:890-896

Ziebuhr W (2001) *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: emerging pathogens in nosocomial infections. *Contrib. Microbiol.* 8:102–107

Ziebuhr W, Hennig S, Eckart M, Kränzler H, Batzilla C, Kozitskaya S (2006) Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 28:14-20

8. Anhang

Tabelle 16: Erreichte RNA Konzentrationen (zu Methoden 3.3.2)

Anzucht-medium	Versuch	Inkubationszeit	RNA Konzentrationen in µg/ml für <i>S. epidermidis</i> Stamm / Mutante		
			1057	1057 <i>rsbUVW</i>	1057 <i>rsbUVWsigB</i>
MH _{Oxa}	V 1	9h	1035	3270	495
	V 2	9h	555	3269	444
	V 3	9h	2526	1473	708
	V 4	17h	1053	612	879
	V 5	17h	648	690	573
	V 6	17h	564	612	675
MH _{NaCl}	V 7	9h	3108	1656	687
	V 8	9h	2493	3465	549
	V 9	9h	2901	2319	813
	V 10	17h	927	417	705
	V 11	17h	891	519	207
	V 12	17h	573	609	246

Tabelle 17: Ct Werte der Transkriptionsanalyse (zu Ergebnisse 4.3.3)

Anzucht in MH _{Oxa} 9h		RNA aus Versuch V 1 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>	
1057	21,8	22,7	21,6	21,9	19	
1057	21,4	22,5	21,4	21,7	18,9	
1057	21,3	22,3	21,3	21,8	19	
1057 <i>rsbUVW</i>	22	24,5	23,6	23,1	20	
1057 <i>rsbUVW</i>	22,2	24,7	23,4	23,2	20,1	
1057 <i>rsbUVW</i>	22	24,8	23,4	23,1	20,1	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25,1	26,4	25,8	22,5	20	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25,3	26,5	25,7	22,9	20,2	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25,2	26,3	25,8	22,7	20,4	

Anzucht in MH _{Oxa} 9h		RNA aus Versuch V 1 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fntA</i>	<i>fntC</i>	
1057	20,3	18,7	23,2	19,4	21,7	
1057	19,9	18,7	22,6	19,1	21,5	
1057	19,9	19,2	22,4	19,2	21,4	
1057 <i>rsbUVW</i>	22,2	21,4	25,3	22,7	23,7	
1057 <i>rsbUVW</i>	22	21,2	25,2	22,7	23,8	
1057 <i>rsbUVW</i>	22	21,3	25,4	22,9	24,2	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,6	21,7	25,2	20,2	24,4	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,7	22	24,8	20,2	24,3	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,6	21,5	24,8	20,4	24,9	

Anzucht in MH _{Oxa} 9h		RNA aus Versuch V 2 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>
1057	22,5	22,8	18,9	20,8	17,3
1057	22,2	22,7	18,6	20,6	17,3
1057	22	22,6	18,7	20,3	17,5
1057 <i>rsbUVW</i>	22,5	25	21,5	23,6	21
1057 <i>rsbUVW</i>	22,3	25	22	23,4	21
1057 <i>rsbUVW</i>	22,4	25,3	21,5	23,5	21,3
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,1	23	19,3	20,2	16,9
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,2	23,2	19,4	20,3	16,7
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,2	23,2	19,5	20,3	16,6

Anzucht in MH _{Oxa} 9h		RNA aus Versuch V 2 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>
1057	22,6	19	23,3	18,8	24,4
1057	22,1	18,8	23,2	18,6	24
1057	22,3	18,8	23,7	19	24
1057 <i>rsbUVW</i>	21,8	21	25,1	22,6	24,7
1057 <i>rsbUVW</i>	22	21,1	26,4	21,9	24,8
1057 <i>rsbUVW</i>	21,7	20,8	25,9	22,7	24,9
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,3	19,6	23,7	18	24,3
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,5	19,6	23,9	18,1	24,3
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,4	19,6	24,3	18,2	24,6

Anzucht in MH _{Oxa} 9h		RNA aus Versuch V 3 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>
1057	26,2	26,1	23,3	24,4	21,7
1057	25,6	25,9	23	24,1	21,7
1057	25,6	26	23,1	24,2	21,7
1057 <i>rsbUVW</i>	24,1	24,7	21,9	23,2	20,4
1057 <i>rsbUVW</i>	23,9	24,7	21,7	23,2	20,6
1057 <i>rsbUVW</i>	23,9	24,8	21,8	23,5	20,7
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	22,7	21,3	17,7	18,9	15,2
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	22,9	21,6	18,1	19,1	15,3
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	22,8	21,4	17,5	19,3	15,7

Anzucht in MH _{Oxa} 9h		RNA aus Versuch V 3 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>
1057	24,5	22,7	25,6	23,3	24,4
1057	24,4	22,7	25,5	23	23,8
1057	24,1	22,7	25,6	23,2	24,7
1057 <i>rsbUVW</i>	23	21,5	24,7	22,2	23,6
1057 <i>rsbUVW</i>	22,8	21,6	24,8	22,2	23,9
1057 <i>rsbUVW</i>	23,1	21,4	24,8	22,2	23,2
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,6	19,5	23,7	18,5	23,1
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,4	19,5	23,7	18,7	23,1
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,5	19,5	24	18,5	23

Anzucht in MH _{Oxa} 17h		RNA aus Versuch V 4 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>
1057	22,4	23	20,3	20,2	18,9
1057	22	23	20,1	20	18,8
1057	21,8	22,9	20,1	20,1	18,8
1057 <i>rsbUVW</i>	23	23,8	20,7	20,4	19,5
1057 <i>rsbUVW</i>	22,9	23,4	20,6	20,3	19,6
1057 <i>rsbUVW</i>	23,1	23,5	20,5	20,3	19,6
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,9	25,2	22,2	22	20,6
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,8	25,1	22,3	22	20,8
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,9	25,1	22,6	22	20,8

Anzucht in MH _{Oxa} 17h		RNA aus Versuch V 4 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>
1057	22,2	20,4	24,7	21,3	24
1057	22	20,2	24,5	21,2	23,7
1057	21,8	20,2	24,6	21,1	23,7
1057 <i>rsbUVW</i>	22,9	20,4	25,2	20,8	24,3
1057 <i>rsbUVW</i>	22,8	20,2	25,1	21	24,4
1057 <i>rsbUVW</i>	22,9	20,4	25,2	20,8	24,5
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,4	21,4	25	20,4	24,3
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,2	21,3	25	20,4	24,4
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,2	21,4	25,1	20,3	24,5

Anzucht in MH _{Oxa} 17h		RNA aus Versuch V 5 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>	
1057	22,5	23,9	21	21,2	20,8	
1057	22,3	23,5	20,9	21	20,5	
1057	22,1	23,4	20,9	21,1	20,6	
1057 <i>rsbUVW</i>	24,2	24	22	20,9	20	
1057 <i>rsbUVW</i>	23,9	24	21,9	20,7	20,2	
1057 <i>rsbUVW</i>	24	24	21,9	20,9	20,2	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,9	24,7	23,2	23,4	23,3	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,8	24,8	23,4	23,3	23,3	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,9	24,8	23,4	23,5	23,5	

Anzucht in MH _{Oxa} 17h		RNA aus Versuch V 5 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>	
1057	21,4	19,5	24,3	21,5	23,6	
1057	21,1	19,5	24,2	21	23,2	
1057	21,1	19,5	24,4	21,2	23,1	
1057 <i>rsbUVW</i>	24,2	21,6	24,7	22,8	25,2	
1057 <i>rsbUVW</i>	23,9	21,4	24,7	22,9	25,2	
1057 <i>rsbUVW</i>	23,8	21,6	24,8	22,8	25,4	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	22,9	22,9	23,3	22,7	23	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23	22,9	23,3	22,7	23,1	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,1	22,9	23,6	22,8	23,3	

Anzucht in MH _{Oxa} 17h		RNA aus Versuch V 6 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>	
1057	27,3	27,7	25,1	23,8	23,4	
1057	27	27,4	24,9	23,6	23,1	
1057	26,9	27,4	24,9	23,7	23,2	
1057 <i>rsbUVW</i>	26,8	25,7	24,1	23,1	21,7	
1057 <i>rsbUVW</i>	26,9	25,8	23,9	23	22	
1057 <i>rsbUVW</i>	26,9	25,8	24	23	21,9	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,9	24,3	21,8	22,2	21,4	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,9	24,5	21,7	22,3	21,5	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,9	24,3	21,7	22,4	21,6	

Anzucht in MH _{Oxa} 17h		RNA aus Versuch V 6 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>
1057	26,5	24,2	27,1	24,1	26,4
1057	26,1	24	27	23,9	26,2
1057	26,1	24	27,1	23,9	26
1057 <i>rsbUVW</i>	25,3	23,3	25,9	23,3	25,2
1057 <i>rsbUVW</i>	25,2	23,2	26	23,3	25,4
1057 <i>rsbUVW</i>	25,1	23,4	26,1	23,2	25,2
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,4	22,6	24,2	21,7	23,6
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,6	22,6	24,4	21,9	23,7
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,7	22,6	24,6	21,6	23,8

Anzucht in MH _{NaCl} 9h		RNA aus Versuch V 7 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>
1057	25,3	26,2	24,6	25,3	27,4
1057	25,2	25,9	24,3	25	27,3
1057	25,1	25,8	24,5	25,3	27,3
1057 <i>rsbUVW</i>	26,1	26,6	24,7	25,3	27,6
1057 <i>rsbUVW</i>	25,9	26,3	24,6	25	28,1
1057 <i>rsbUVW</i>	26,1	26,7	24,7	25,3	28,1
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,8	23,7	21,4	21,7	22,4
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,7	23,8	21,2	21,8	21,7
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25	23,6	21,8	21,9	21,7

Anzucht in MH _{NaCl} 9h		RNA aus Versuch V 7 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>
1057	24,5	26,7	23,5	23,7	24,5
1057	25	27,4	23,1	23,9	24,5
1057	24,6	27,3	23,3	24,2	24,6
1057 <i>rsbUVW</i>	25,1	27,6	23	23,7	24,1
1057 <i>rsbUVW</i>	25,5	28,2	23,1	24,1	24,4
1057 <i>rsbUVW</i>	25,6	28,3	23,5	24,2	24,7
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,9	24,8	21,2	19,1	22,8
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25	25,2	21,9	19	23,5
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,9	25,2	21,4	19,3	23,9

Anzucht in MH _{NaCl} 9h		RNA aus Versuch V 8 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>	
1057	26,4	28,7	25,5	26,7	28,2	
1057	26	28,4	25,3	26,5	27,9	
1057	26,1	28,4	25,4	26,7	28,1	
1057 <i>rsbUVW</i>	26,4	28,2	25,2	26,6	27,9	
1057 <i>rsbUVW</i>	26,3	28,2	25	26,5	28,1	
1057 <i>rsbUVW</i>	26,4	28,4	25,1	26,7	28,3	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,8	26,9	23,9	24,7	23,8	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,7	27,2	24	24,8	24,1	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,7	26,8	23,7	24,6	24,1	

Anzucht in MH _{NaCl} 9h		RNA aus Versuch V 8 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>	
1057	27,8	25,3	28,6	25,2	26	
1057	27,2	25	27,9	25,1	25,8	
1057	27,1	25,1	28,1	25,3	25,7	
1057 <i>rsbUVW</i>	27	24,3	27,7	25,1	24,7	
1057 <i>rsbUVW</i>	27,3	24,2	27,7	25,1	24,9	
1057 <i>rsbUVW</i>	27	24,4	27,6	25,2	24,9	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25,9	23,2	26,7	20,7	25,5	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	26	23,3	26,9	20,8	25,5	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25,8	23,3	27	20,8	25,7	

Anzucht in MH _{NaCl} 9h		RNA aus Versuch V 9 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>	
1057	21,6	23,9	24,8	23,7	23,7	
1057	21,2	23,8	24,8	23,7	23,5	
1057	20,9	23,7	24,9	23,7	23,4	
1057 <i>rsbUVW</i>	28	29,9	32,3	29,7	29,7	
1057 <i>rsbUVW</i>	28,2	29,9	32,3	29,5	29,7	
1057 <i>rsbUVW</i>	28,2	30	32,7	29,7	29,9	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,8	24,3	24,7	23,2	22	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25	24,1	24,6	23,2	22	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25	23,8	24,6	23,1	22,3	

Anzucht in MH _{NaCl} 9h		RNA aus Versuch V 9 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>	
1057	21,4	19,4	25	21,5	23	
1057	21,2	19,2	25,5	21,4	23,6	
1057	21,1	19,6	25,4	21,8	23,4	
1057 <i>rsbUVW</i>	26,7	24,5	28,7	26,1	26,5	
1057 <i>rsbUVW</i>	26,7	24,2	29	25,7	26,7	
1057 <i>rsbUVW</i>	27	24,3	29	26,1	26,9	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,7	19,3	24,8	18,9	23,2	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	23,8	19	24,7	19,1	23,2	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	24,4	19	24,6	18,8	23	

Anzucht in MH _{NaCl} 17h		RNA aus Versuch V 10 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>	
1057	23,1	24,1	22,1	22,1	24,2	
1057	23,2	23,9	22,1	21,7	23,8	
1057	23,2	24	22,1	21,8	23,9	
1057 <i>rsbUVW</i>	24,2	24,3	22	20,7	22,2	
1057 <i>rsbUVW</i>	24,2	24,1	21,9	20,6	22,5	
1057 <i>rsbUVW</i>	24,2	24,2	21,9	20,7	22,5	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	26	25,6	22,8	22,7	22,3	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	26	25,7	22,8	22,7	22,3	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	26,1	25,6	22,8	22,5	22,5	

Anzucht in MH _{NaCl} 17h		RNA aus Versuch V 10 (Tabelle 15)				
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen					
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>	
1057	22,8	21,9	24,7	23,1	24,5	
1057	22,5	21,9	24,5	23	24,5	
1057	22,7	21,8	24,7	22,9	24,3	
1057 <i>rsbUVW</i>	23,7	21,6	25,3	21,8	24,8	
1057 <i>rsbUVW</i>	23,8	21,6	25,2	21,6	24,8	
1057 <i>rsbUVW</i>	23,8	21,6	25,4	21,8	24,9	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25,4	22,7	25,9	21,2	24,8	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25,6	N/A	25,9	21,3	24,8	
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	25,5	22,8	26	20,9	24,9	

Anzucht in MH _{NaCl} 17h		RNA aus Versuch V 11 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>LLm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>
1057	25,7	26,4	23,7	24,1	25,9
1057	25,3	26,3	23,4	23,5	25,9
1057	25,3	26,4	23,6	23,6	25,7
1057 <i>rsbUVW</i>	23,3	24,7	22	21	21,9
1057 <i>rsbUVW</i>	23,4	24,6	21,9	20,8	22,2
1057 <i>rsbUVW</i>	23,5	24,8	21,9	21,1	22,2
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	26,9	26,8	23,1	23,4	22,5
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	27	27	23,1	23,6	22,6
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	27	26,9	23,1	23,5	22,6

Anzucht in MH _{NaCl} 17h		RNA aus Versuch V 11 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>
1057	27,1	25,6	27,3	26,2	26,2
1057	26,7	25,5	27,2	25,9	25,8
1057	26,6	25,4	27,1	26,1	25,7
1057 <i>rsbUVW</i>	24,8	23,3	26,2	23	26,2
1057 <i>rsbUVW</i>	24,7	23,3	26,1	22,9	25,6
1057 <i>rsbUVW</i>	24,9	23,4	26,2	23,2	25,6
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	28,6	24,7	26,8	23,1	27,1
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	28,6	24,7	26,9	23,1	27,1
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	29,1	24,7	27,3	23	27,4

Anzucht in MH _{NaCl} 17h		RNA aus Versuch V 12 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>pbp3</i>	<i>llm</i>	<i>vras</i>	<i>blaR</i>
1057	25,4	25,4	24,1	23,2	24,3
1057	25,1	25,2	23,7	22,7	24,2
1057	25	25,7	23,8	22,9	24
1057 <i>rsbUVW</i>	24,4	25,8	24,8	22,9	24,3
1057 <i>rsbUVW</i>	24,8	25,7	24,8	22,6	24,6
1057 <i>rsbUVW</i>	24,6	26,1	24,8	22,8	24,4
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	29,1	28	26,4	25,2	24,4
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	29,3	28,2	26,5	25,2	24,5
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	29,5	27,8	26,5	25,3	24,6

Anzucht in MH _{NaCl} 17h		RNA aus Versuch V 12 (Tabelle 15)			
Stamm / Mutante	Ct Werte für Gen				
	<i>gyrB</i>	<i>femB</i>	<i>femD</i>	<i>fmtA</i>	<i>fmtC</i>
1057	26,4	24,3	27,6	24,8	27,9
1057	26	24,2	27,4	24,6	27,8
1057	26,2	24,3	27,5	24,8	27,7
1057 <i>rsbUVW</i>	24	23,3	27,2	23,8	26,5
1057 <i>rsbUVW</i>	23,9	23,4	27	23,8	26,4
1057 <i>rsbUVW</i>	23,9	23,3	26,9	23,7	26,7
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	29,8	25,1	27,7	23,5	27,3
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	29,7	25,1	27,9	23,8	27,8
1057 <i>rsbUVWSigB</i>	29,7	25,2	28	23,8	27,7

9. Danksagungen

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang für die freundliche Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Mein großer Dank gilt auch Prof. Dr. Johannes Knobloch für die ausdauernde und aufmunternde Begleitung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit und einen stets offenen und humorvollen Wissensaustausch.

Abschließend danke ich meinen Eltern für die stetige liebevolle Unterstützung.

10. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Jörn Christian Huck
Geburtsdatum	23.06.1980
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Akademischer Werdegang

Seit 09/2008	Assistenzarzt in der Weiterbildung in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKSH, Campus Kiel
05.10.2010	Approbation als Zahnarzt
2006 - 2010	Studium der Zahnmedizin, Christian- Albrecht Universität zu Kiel
22.06.2006	Approbation als Arzt
2003 – 2005	Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am UKE, Hamburg
1999 – 2006	Studium der Humanmedizin, Hamburg
1990 – 1999	Privates kath. Gymnasium Sophie-Barat-Schule, Hamburg

Veröffentlichung

Knobloch JK, Jäger S, Huck J, Horstkotte MA, Mack D. 2005 mecA is not involved in the sigmaB-dependent switch of the expression phenotype of methicillin resistance in Staphylococcus epidermidis. Antimicrob Agents Chemother.; 49:1216-9