

**Der Phage Φ 13 in den
Staphylococcus aureus-Stämmen
8325-4 und MW2c**

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

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

vorgelegt von

Szydło, Philippe Pierre

2016

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatterin:

Professor Dr. C. Wolz

2. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. K. Hamprecht

Meiner Familie

Abkürzungen

≈	ungefähr
α	Alpha
Abb.	Abbildung
<i>agr</i>	accessory gene regulator
AHT	Anhydrotetracyclinhydrochlorid
<i>aphA3</i>	3'-Aminoglykosid-Phosphotransterase Typ III, Kanamycinresistenzgen
<i>attB</i>	attachment site of bacteria = bakterielle Rekombinationsstelle
<i>attP</i>	attachment site of bacteriophage = virale Rekombinationsstelle
β	Beta (gr.)
bp	Basenpaare
c	cured (engl.) = geheilt; Verwendung hier für die Entfernung aller Bakteriophagen aus einem Bakterienstamm
CC	klonale Komplexe
<i>ci</i>	Gen das für den CI-like repressor codiert
CI	CI-like repressor
Δ	Delta (gr.), zeigt Veränderung an, z.B. am Genom
dest.	destilliert
DNA	deoxyribonucleic acid (engl.) = Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Erm	Erythromycin
Erm	Erythromycinresistenz
for	forward (engl.) = vorwärts

g	Gramm
<i>gyr</i>	Gyrase-Gen
Gyr	Gyrase, kodiert durch das Gen <i>gyr</i>
h	hora (lat.), Stunde
HCl	Salzsäure
<i>hly</i>	Hämolysin-Gen
Hly	β-Hämolysin, kodiert durch das Gen <i>hly</i>
<i>int</i>	Integrase-Gen
Int	Integrase, codiert durch <i>int</i>
Kana	Kanamycin;
^{Kana}	Kanamycinresistenz
KBE	koloniebildende Einheiten
kbp	Kilobasenpaare
λ	Lambda
m	Milli-
M	Mol
MH-Blut	Müller-Hinden-Blutagarplatten
MIC	minimal inhibitory concentration = Minimale Hemmkonzentration
min	minute (engl.) = Minute
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i> bzw. multiresistenter <i>S. aureus</i>
μ	Mikro-
η	Nano-
n	nano-
OD ₆₀₀	optical density = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm

Φ	Phi (gr.), Symbol für Phage
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
pH	potentia hydrogeni (lat.), pH-Wert
PVL	Panton-Valentin-Leukocidin
rev	reverse (engl.) = rückläufig
RNA	ribonucleic acid (engl.) = Ribonukleinsäure
s	Sekunde
σ	Sigma (gr.), Symbol für das Sigma-Gen
σ ^H	Sigma-Faktor H
<i>sak</i>	Staphylokinase-Gen
SAK	Staphylokinase, kodiert durch das Gen <i>sak</i>
SCC <i>mec</i>	staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
<i>sigH</i>	Sigma-Faktor H-Gen
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Strep	Streptomycin
Strep	Streptomycinresistenz
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-gepuffertes EDTA
TMP	Trimethoprim
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Tryptone Soya Agar
TSB	Tryptone Soya Broth
ÜNK	Übernachtkultur

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>S. aureus</i> und assoziierte Erkrankungen	1
1.1.1	Virulenzfaktoren	2
1.1.2	Resistenzmechanismen	2
1.2	<i>S. aureus</i> -Phagen	3
1.2.1	Lebenszyklus von $\Phi 13$	5
1.2.2	Nachweis der <i>attP</i> -Stellen	10
1.2.3	$\Phi 13$ -Genomorganisation	10
1.2.4	Genregulation	12
1.2.5	Die Stämme 8325 und MW2	13
1.3	Sigma-Faktoren und Sigma-Faktor σ^H	14
1.4	Ziele dieser Studie	15
2.	Material und Methoden	17
2.1	Chemikalien	17
2.2	Enzyme	18
2.3	Molekulargewichtsstandard	18
2.4	Materialien	18
2.5	Geräte und Programme	19
2.6	Medien und Stammlösungen	19
2.7	Bakterienstämme und Phagen	21
2.8.1	Anzucht der Bakterienstämme	22
2.8.2	Mischen der Bakterienstämme	22

2.8.3	Auswertung der Transferversuche und Berechnung der Transferrate	22
2.8.4	Kontrolle der Lysogene durch Darstellung des Hämolyseverhaltens und PFGE	24
2.8.5	Erstellen von Wachstumskurven	25
2.8.6	Einfrieren von Bakterien	25
2.8.7	Herstellung von spontanresistenten MW2cStrep-Stämmen und spontanresistenten 8325-4Φ13Strep-Stämmen	26
2.8.8	Überprüfung der neuen MW2cStrep- und 8325-4Strep-Stämme	26
2.8.9	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	26
	DNA-Isolierung für die PFGE	26
	Restriktionsverdau	27
	Gelelektrophorese	28
2.9	Northern Blots	28
2.9.1	Phageninduktion	28
2.9.2	RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung	29
2.9.3	RNA-Gelelektrophorese	30
2.9.4	Northern Blot	31
2.9.5	Herstellung spezifischer DIG-markierter Gensonden mittels PCR	31
2.9.6	Hybridisierung	34
2.9.7	Detektion	34
2.10.1	Absolute und relative quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	35
2.10.2	RNA-Isolation	35
2.10.3	Relative quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR)	36
2.10.4	DNA-Isolation	38
2.10.5	Absolute quantitative Real-time-PCR (qPCR)	38

2.11.1	Herstellen von σ^H -defizienten Mutanten mittels Transduktion	40
2.11.2	Lysatherstellung	40
2.11.3	Transduktion	41
2.11.4	Überprüfung der Transduktanten	41
2.11.5	Überprüfung der Wildtypen (WT) und Mutanten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese	42
	DNA-Isolation für Überprüfungs-PCR	42
	PCR	42
2.11.6	Gelelektrophorese	44
3.	Ergebnisse	45
3.1.1	Phagentransferexperimente mit dem resistenzmarkierten Phagen $\Phi 13_{KanA}$ und den resistenzmarkierten <i>S. aureus</i> - Stämmen 8325-4Tet, 8325-4Strep und MW2cStrep	46
3.1.2	Einflussfaktor Donor-Rezipienten-Verhältnis auf den Phagentransfer	47
3.1.2.1	Donor-Rezipienten-Verhältnis von 1:1	47
3.1.2.2	Donor-Rezipienten-Verhältnisse von 4:1 und 1:4	48
3.1.2.3	Einfluss der Wachstumsphase auf den Phagentransfer	49
3.1.3	Kontrolle der Transferanden durch Analyse des Hämolyseverhaltens und PFGE	50
3.1.4	Phagen-Transferversuch mit 8325-4 $\Phi 13_{Strep}$ als Rezipienten	53
3.1.4.1	Herstellung des Rezipientenstamms 8325-4Strep	53
3.1.4.2	Donor-Rezipienten-Verhältnis von 1:1	53
3.2	Northern Blot-Analyse ausgewählter lysogener und lytischer Gene von $\Phi 13$	54
3.2.1	Northern Blots	54
3.2.1.2	Stärke Aktivierung der lytischen Gene im Stamm MW2c $\Phi 13$	55

3.2.1.3	Stammspezifische Expression der lysogenen Gene	55
	Clr	56
	Int	57
	Orf C	57
3.2.2	Quantifizierung der Transkriptionsanalyse mittels relativer qRT-PCR und absoluter qPCR	60
3.2.2.1	8325-4 zeigt höhere <i>int</i> -Expression als MW2c	60
3.3	Einfluss des Sigma-Faktors σ^H auf die Phageninduktion	65
3.3.1.1	Transduktion der Erythromycin-Resistenzkassette in die Zielhintergrundstämme 8325-4 Φ 13KanA und MW2c Φ 13KanA	66
3.3.1.2	Überprüfung der σ^H -defizienten Transduktanden per PCR	67
3.3.1.3	σ^H -Einfluss auf die Transkription der <i>int</i> (Integrase)	68
3.3.1.4	σ^H -Einfluss auf die <i>int</i> -Expression und Phagenreplikation	69
4.	Diskussion	72
4.1	Transferversuche	72
	Einfluss des Donor-Rezipienten-Verhältnisses auf den Phagentransfer	72
	Einfluss der Wachstumsphase auf den Phagentransfer	72
	Stammspezifische Unterschiede im Transferverhalten	73
4.2.1	Northern Blot-Analyse der lytischen Gene	73
4.2.2	Aufklärung des lysogenen Moduls von Φ 13	73
	Stammspezifische Unterschiede in der Transkription	74
4.2.3	Quantifizierung der <i>int</i> -Expression mittels relativer qRT-PCR und absoluter qPCR	77
4.3	σ^H	77
4.4	Schlussfolgerungen	77

5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis	80
7.	Erklärung zum Eigenanteil	82
8.	Danksagung	83

1. Einleitung

1.1 *S. aureus* und assoziierte Erkrankungen

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein gram-positives Bakterium aus der Gruppe der Kokken und der Familie der *Micrococcae*. *S. aureus* wächst vorwiegend aerob, fakultativ auch anaerob. Der aus dem Griechischen und Lateinischen zusammengesetzte Name beschreibt ihre runde Form (gr. *kokkos*) und ihr häufiges Vorkommen in Trauben bzw. Haufen (gr. *staphyl*). Staphylokokken sind nicht-sporenbildend und unbegeißelt, somit unbeweglich, sie teilen sich jedoch in allen drei Richtungen des Raums. Die Bezeichnung *aureus* (lat. goldschimmernd) rührt von der goldgelben Farbe der Kolonien, wobei es auch porzellanweiße und graue Stämme gibt. Karotinoide wie Staphyloxanthin sind für die gelbe Färbung verantwortlich. Diese spielen eine wichtige Rolle für die Virulenz, u. a. durch ihre antioxidativen Eigenschaften, welche *S. aureus* vor dem oxidativen Burst neutrophiler Granulozyten schützen und ihnen einen Vorteil bei der Wundinfektion verschaffen [1].

Einerseits besiedelt *S. aureus* ca. 30% der Bevölkerung asymptomatisch, andererseits ist er in der Lage teils schwere Weichteilinfektionen sowie bei jungen gesunden Patienten letal verlaufende Erkrankungen wie Toxisches Schock Syndrom, Bakteriämien mit Sepsis und nekrotisierenden Pneumonien zu verursachen. Darüber hinaus ist *S. aureus* einer der Hauptverursacher von Lebensmittelvergiftungen durch seine Enterotoxine [2].

Klinisch ist die Unterscheidung zwischen koagulase-positiven Stämmen wie *S. aureus* und koagulase-negative Staphylokokken wichtig. Letztere gehören zur Haut- und Schleimhautflora des Menschen und wurden lange Zeit als apathogen eingestuft.

1.1.1 Virulenzfaktoren

S. aureus besitzt eine Vielzahl an zellwandassoziierten und sezernierten Pathogenitätsfaktoren, welche teilweise durch Bakteriophagen codiert werden wie z.B. Staphylokinase (SAK) und Panton-Valentine-Leukocidin (PVL).

Ein wichtiger zellwandassoziiertes Pathogenitätsfaktor ist z. B. die Koagulase. Koagulase ist ein Prothrombinaktivator, der über die Entstehung von Thrombin aus Prothrombin die Katalyse von Fibrin aus Fibrinogen bewirkt. Dies nutzt *S. aureus* zum Beginn der Invasion, um sich durch einen Fibrinwall vor dem Immunsystem des Wirtes zu schützen. In einer späteren Phase der Invasion sezerniert *S. aureus* SAK, um diese Fibrinschutzschicht zu lysieren und sich im Wirtsorganismus weiter ausbreiten zu können.

Zu den sezernierten Pathogenitätsfaktoren zählen beispielsweise Hämolsine (α , β , γ und δ), zahlreiche Enterotoxine, die Exfoliativtoxine A-C (ETA-C), das Toxic Shock Syndrom Toxin (TSST) sowie SAK und PVL.

1.1.2 Resistenzmechanismen

S. aureus hat bisher zeitnah nach Einführung von Antibiotika wie Penicillin G, Methicillin sowie Vancomycin und Linezolid Resistenzen gegen diese entwickelt und stellt so eine zunehmende Bedrohung dar [3-6]. Die Mechanismen, Entstehung und Ausbreitung der Resistenzen werden intensiv beforscht.

Es gibt vier Resistenzmechanismen: Inaktivierung des Antibiotikums, Veränderung der Zielstruktur, Modifikation der Antibiotikaaufnahme und aktiver Efflux des Antibiotikums.

Diese Mechanismen können intrinsisch sein bei bereits vorhandenen Genen, welche nach Induktion exprimiert werden z. B. die Fluorchinolonresistenz durch die NorA-Efflux-Pumpe oder über spontane Mutationen wie im Falle der *gyrA*- und *griA*-Gene entstehen. Darüberhinaus können Resistenzen über horizontalen Gentransfer durch Transduktion mittels Phagen, seltener durch Konjugation oder bei vorhandener Kompetenz durch Transformation erworben werden [7, 8]. Bisher galt *S. aureus* als nicht transformierbar, dies könnte unter Einfluss des alternativen Sigma-Faktors σ^H jedoch möglich sein [9].

Für *S. aureus* wurde gezeigt, dass die meisten Stämme wenigen klonalen Komplexen (CC) angehören, die Kerngenome - die Sequenzen der mittels MLST untersuchten sieben Haushaltsgene - sich also nur geringfügig voneinander unterscheiden und sich vor allem durch Mutationen und homologe Rekombination weiter entwickelt haben [10].

Hauptsächlich unterscheiden sich die Stämme durch mobile genetische Elemente wie Phagen, Pathogenitätsinseln oder Transposons voneinander [10].

1.2 *S. aureus*- Phagen

Bakteriophagen bzw. Phagen, sind Viren, die Bakterien und Archaeen infizieren. Sie sind auf ihren Wirt hoch spezialisiert und unterscheiden sich durch ihre Anpassungen an den Wirt sehr voneinander. Als Modellorganismus für die Phagenforschung dient der *E. coli*-Phage Lambda (λ). Der Lebenszyklus anderer Phagen hingegen ist teilweise noch recht unerforscht. Es wurde gezeigt, dass selbst bei gleicher Morphologie der Phagen Unterschiede im Lebenszyklus bestehen können [11].

Phagen wie anderen mobilen genetischen Elementen kommt eine grundlegende Bedeutung für die bakterielle Evolution zu [8]. Durch die Fähigkeit sowohl eigenes als auch fremdes Genmaterial durch vertikalen und horizontalen Gentransfer zu übertragen, spielen Bakteriophagen auch eine entscheidende Rolle für die Virulenzmodulation Ihrer Wirte. So können apathogene Keime durch Aufnahme eines Phagen hoch virulent werden wie im Falle von z. B. *Vibrio cholerae* [12], *Streptokokkus pyogenes* [13] und PVL-positiven CA-MRSA Stämmen.

Phagencodierte Virulenzfaktoren (VF) können u. a. Toxine wie das Cholera toxin aber auch extrazelluläre Enzyme wie SAK, CHIPS (chemotaxis inhibiting protein of *Staphylococcus aureus*) und SCIN (Staphylococcus Complement Inhibitor) sein.

Bei der positiven lysogenen Konversion codiert der Bakteriophage für einen Virulenzfaktor, den der Wirt nach der Integration des Phagen in sein Genom transkribieren kann. Bei der negativen lysogenen Konversion hingegen,

integriert der Phage in ein Gen und unterbricht dieses, sodass es nicht mehr transkribiert werden kann. $\Phi 13$ führt zu einer positiven Konversion für SAK und einer negativen Konversion von Hlb (codiert von *hIb*), sodass die Lysogene zwar SAK, aber nicht mehr Hlb synthetisieren können. Es wurde jedoch auch beobachtet, dass Phagen sich im Verlauf einer Infektion, wenn auch mit geringerer Frequenz, an alternativen Stellen im Wirtsgenom integrieren können, möglicherweise um dem Wirt einen Vorteil im Infektionsprozess zu verschaffen, wie im Falle der *hIb*-Wiederherstellung [14, 15].

Der Morphologie nach unterscheidet man zwischen Phagen mit Schwanzstücken, polyedrischen, filamentösen und pleomorphen Phagen. Alle *S. aureus*-Bakteriophagen gehören der Ordnung der *Caudovirales* an, also Phagen mit Schwanzstücken, welche sich aus drei Familien zusammensetzt: der größten Familie, den *Siphoviridae* mit langen nicht kontraktilen Schwanzstücken, *Myoviridae* mit kontraktilen Schwanzstücken und *Podoviridae* mit kurzen Schwanzstücken [16]. Das Phagengenom kann einzel- oder doppelsträngig, linear, zirkularisiert, segmentiert oder superhelikal sein und aus RNA oder DNA bestehen (Abbildung 1).

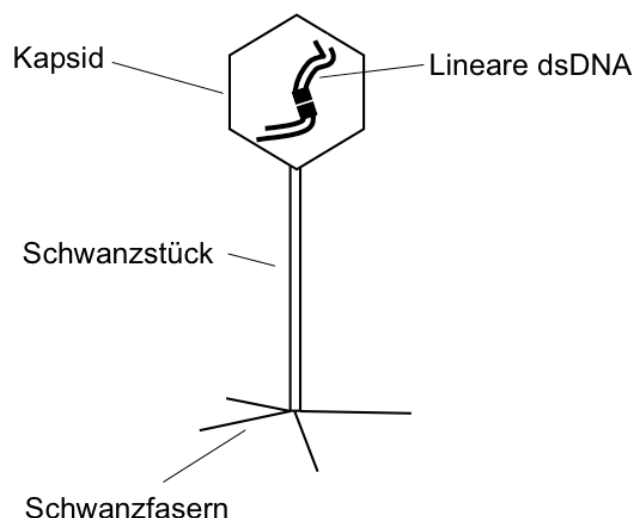


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Siphovirus mit linearer doppelsträngiger DNA (dsDNA) und Schwanzstück.

Die meisten *S. aureus*-Stämme tragen ein bis drei Prophagen in ihrem Genom und die meisten Phagen bewegen sich weitgehend innerhalb bestimmter klonaler Komplexe (CC) [17]. Neben der Einteilung nach Morphologie und Nukleinsäuretyp, kann man *S. aureus*-Phagen nach deren Integrasegruppen einteilen [17]. Dies bietet den Vorteil, dass sich anhand der Integrasegruppen der Integrationsort vorhersagen lässt. Darüber hinaus lässt sich von der Integrasegruppe auf die codierten Pathogenitätsfaktoren schließen [8].

Die meisten der untersuchten *S. aureus*-Phagen gehören der Sa3int-Gruppe an, innerhalb dieser es Phagen aus den unterschiedlichen Serogruppen Fa, Fb und A gibt. Phagen der Sa3int-Gruppe integrieren bevorzugt in *hly*.

Des Weiteren wird zwischen virulenten bzw. nicht-temperenten und temperenten Viren bzw. Bakteriophagen unterschieden (s.u.).

1.2.1 Lebenszyklus von $\Phi 13$

Der Lebenszyklus von $\Phi 13$ wird anhand des vergleichsweise gut erforschten Lebenszyklus des Phagen λ aus *Escherichia coli* veranschaulicht.

Der Phage $\Phi 13$ zählt zu den Siphoviridae der Serogruppe Fb. Sein ca. 42774 bp großes Genom besteht aus dsDNA und codiert für die Virulenzfaktoren Staphylokinase (SAK, codiert durch *sak*), Chemotaxis inhibierendes Protein (CHIPS, codiert durch *chp*) und Staphylokokken Komplement Inhibitor (SCIN, codiert durch *scn*). Die cos-site von $\Phi 13$ hat die Sequenz -CGGAGCAGA- [18]. $\Phi 13$ integriert bevorzugt in *hly*, kann jedoch wie λ , wenn auch mit einen geringeren Transferraten, gleichzeitig an anderen Stellen des Genoms integrieren [19]. Sa3int-Phagen, wie $\Phi 13$ sind von besonderer Bedeutung, da sie in ca. 90% der *S.aureus*-Stämme vorkommen [17].

Freie Phagen lagern sich an speziellen Oberflächenstrukturen ihrer Wirte an, auf die sie sich sehr spezialisiert haben (Abbildung 2). Sowohl die Interaktionspartner als auch die rezeptorvermittelten Prozesse sind in großen Teilen noch unbekannt. Für Siphoviridae konnte jedoch gezeigt werden, dass diese N-Acetylglucosamin (GlcNac) der Wandteichonsäuren (WT) als Rezeptor

benötigen [20]. Nach der Adsorption erfolgen die Permeation der Wirtsbakterienmembran und die Injektion des Erbguts in das Bakterienzytoplasma, z. B. über kontraktile Elemente im Phagenschwanz. Phagen wie λ , welche keine kontraktile Elemente besitzen, bedienen sich bereits gegebener Strukturen zur Überwindung der Wirtsmembran z. B. Porinen. Das im Phagenkopf noch linearisiert vorliegende Phagen-genom wird nach der Injektion in das Zytoplasma zirkularisiert, wodurch das Genom in seinen aktiven Zustand gebracht wird. Hierzu lagern sich die beiden Enden des Erbgutstrangs aneinander und werden durch die bakterielle Ligase miteinander verbunden. Bei *cos*-site-Phagen, wie z. B. λ und Φ 13 befinden sich an beiden Enden der dsDNA kurze einzelsträngige Überhänge, die *cos*-sites (*cos* = *cohesive*, Englisch: klebrig), welche komplementär zueinander sind und dadurch den Ringschluss durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken begünstigen, weshalb sie auch als *sticky ends* (Englisch: „klebrige Enden“) bezeichnet werden.

Nicht temperente bzw. virulente Phagen lassen sich nun durch die Wirtszelle replizieren und lysieren im Anschluss die Wirtszelle, um weitere Zellen zu infizieren. Das Ablesen und Replizieren des zirkularisierten Genoms erfolgt durch die bakterielle RNA-Polymerase zuerst nach dem bidirektionalen und anschließend nach dem „rolling circle“-Prinzip (Abbildung 3).

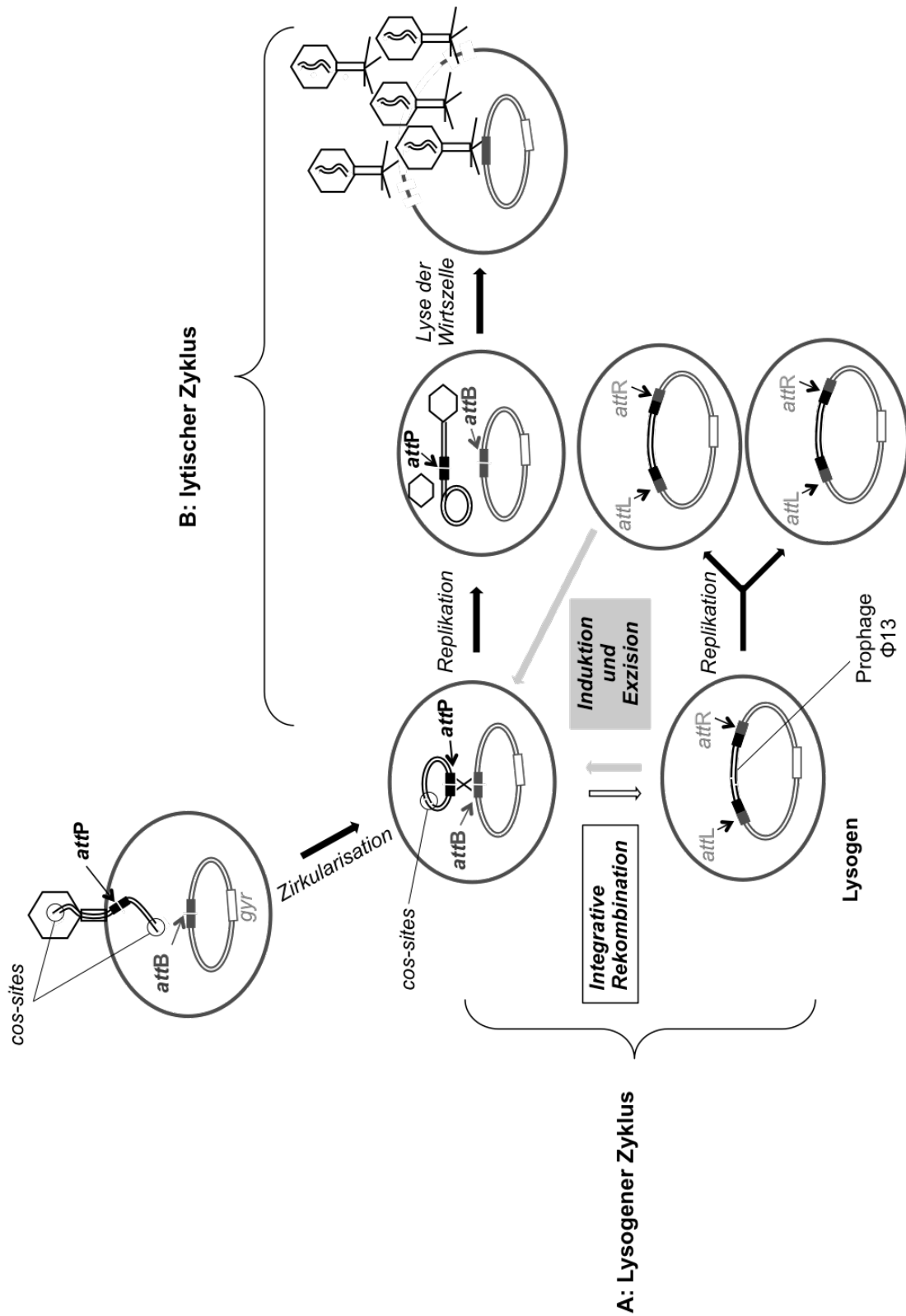


Abbildung 2: Lebenszyklus von des *S. aureus*-Phagen $\Phi 13$ anhand des Lebenszyklus des *E. coli*-Phagen λ . Erläuterungen siehe Text.

Temperente Phagen, wie $\Phi 13$ und die meisten *S. aureus*-Phagen haben die Möglichkeit sich z. B. über homologe, meist ortsspezifische Rekombination in das Wirtsgenom zu integrieren. Sie werden dann als Prophage und der den Phagen tragende Wirtstamm als Lysogen bezeichnet (Abbildung 2 und 4). So lange der Phage integriert ist, wird die Replikation seines Genoms unterdrückt.

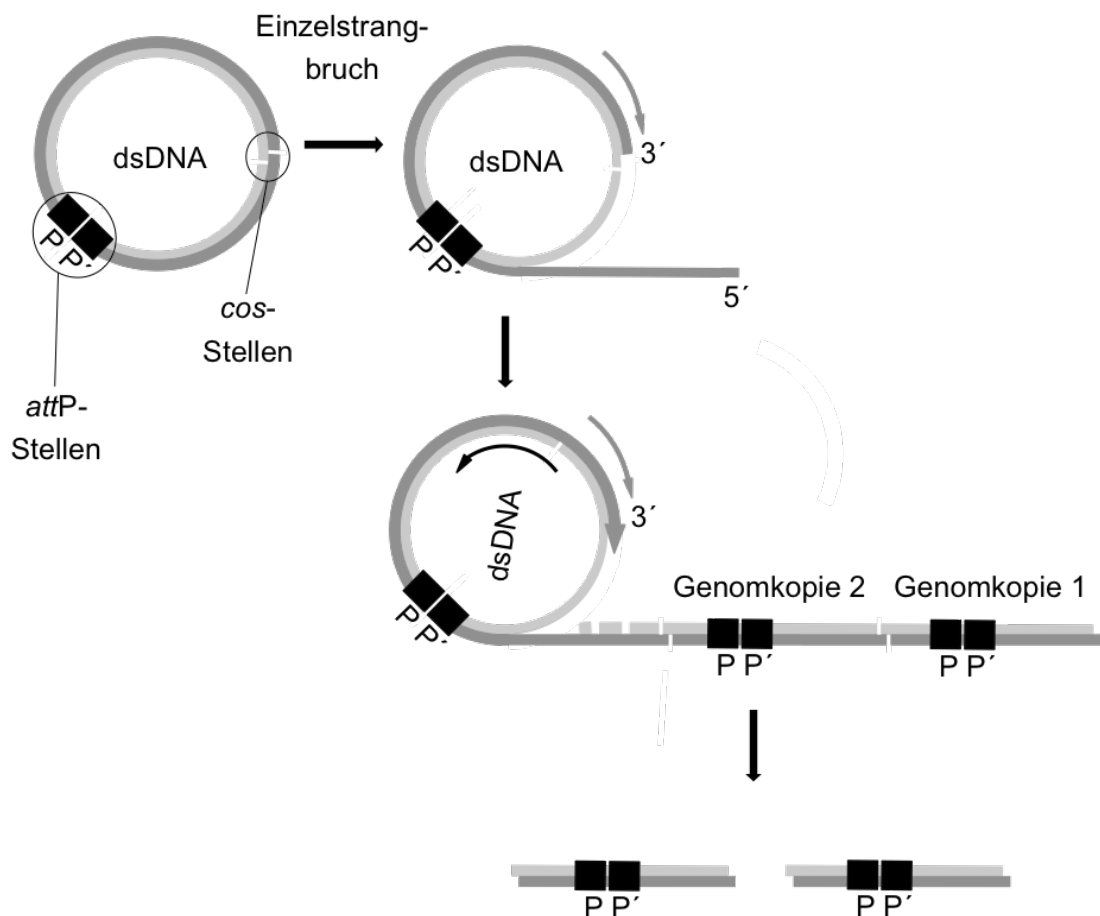


Abbildung 3: Prinzip der Rolling Circle-Replikation. Gezeigt ist das exzidierte, extrachromosomale Phagen-genom. Nach einem Einzelstrangbruch am Leitstrang wird am 3'-Ende die DNA kontinuierlich repliziert während das Genom sich dreht und der sich verlängernde Strang abgerollt wird. So entsteht das Concatemer, ein aus bis zu 8 aneinanderhängenden Genomen bestehendes DNA-Stück. Vor dem Einbau in die Phagenpartikel werden die einzelnen Genome von einander getrennt.

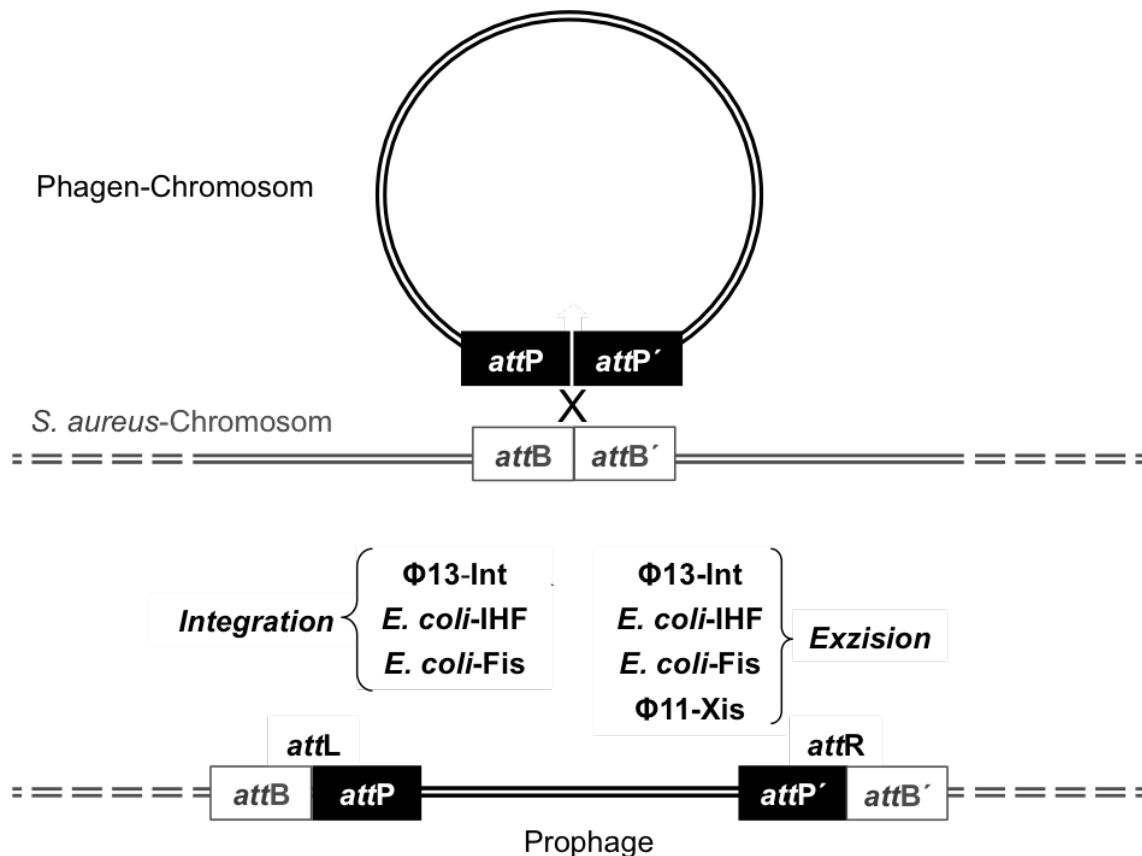


Abbildung 4: Ortsspezifische homologe Rekombination bzw. Integration und Exzision des Phagenchromosoms in und aus dem bakteriellen Wirtsgenom, ausgehend von der Lambda-Regulation. Die Integration erfolgt durch die phagencodierte Integrase (*int*) sowie den chromosomal codierten Integration Host Factor (IHF) und das Factor for Inversion Stimulation-Protein (Fis). Durch Aneinanderlagerung der *att*-Seiten (*att* = attachment) des Phagen (*attP*) und des Bakteriums (*attB*) entstehen die linke und rechte *att*-Seite *attL* bzw. *attR*. Für die Exzision aus dem Wirtsgenom wird zusätzlich die phagencodierte Exzisionase (*xis*) benötigt.

Teilt sich die Wirtszelle, wird der Prophage mit dem Wirtsgenom repliziert. Alternativ können temperente Phagen sich aus dem Wirtsgenom exzidieren, der Zyklus verläuft dann weiter wie bei nicht-temperenten Phagen. Die Exzision kann spontan oder nach Induktion, also auf äußere Reize auf die Wirtszelle durch Nährstoffmangel, UV-Strahlung, Zellgifte wie z. B. Mitomycin oder andere Stressoren, die zu Schäden am Wirtsgenom führen und das SOS-System aktivieren, erfolgen.

1.2.2 Nachweis der *attP*-Stellen

Zur Bestimmung der extrachromosomalen Phagengenome wurden Primer konzipiert, welche die *attP*-Stellen flankieren und nur zu den korrekten Transkripten führen, wenn die Elongation über beide *attP*-Stellen hinaus geht, was nur am zirkularisierten Genom oder Concatemer möglich ist (Abbildung 5).

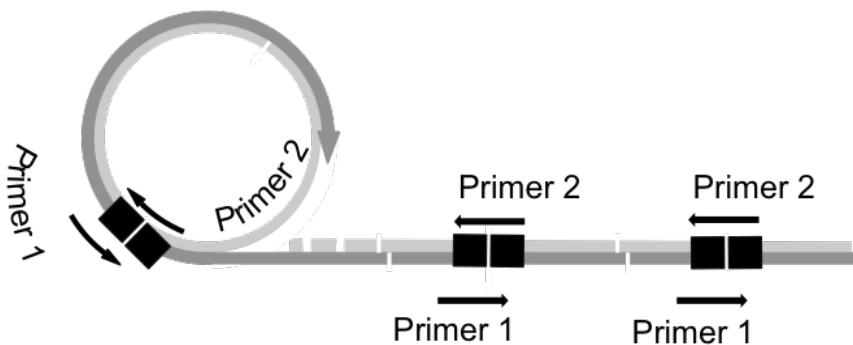


Abbildung 5: Nachweis der *attP*-Stellen. Zu sehen ist das aus dem Wirtsgenom exzidierte doppelsträngige DNA-Phagengenom und das entstehende Concatemer mit den *attP*-Stellen und den flankierenden Primern 1 und 2.

1.2.3 Φ 13-Genomorganisation

Nach landolo et al. [18] ist das Genom der drei 8325-Phagen Φ 11, Φ 12 und Φ 13 ähnlich wie in anderen Phagen in zwei funktionale Teile unterteilt, welche für die beiden entgegengesetzten Lebenszyklen, den lytischen und den lysogenen Zyklus, codieren. landolo teilte das Genom in 8 funktionale Module ein, von den eines für den lysogenen Zyklus und die anderen für den lytischen Weg benötigt werden Abbildung 15. Die Gene, die für die entgegengesetzten Lebenszyklen benötigt werden, werden interessanterweise auch in entgegengesetzter Richtung und vom jeweils anderen Strang transkribiert.

Im lysogenen Modul befinden sich bei Φ 13 die Gene für den CI-like repressor (*clr*) - in Anlehnung an den Lambda-Repressor CI -, die Φ 13-Integrase (*int*) und

Orf C (Open Reading Frame C) (*orf C*). Im linearisierten Zustand beginnt der lysogene Teil am 3' Ende von *attL* des Φ 13-Genoms.

Der CI-like repressor ist der Gegenspieler des Cro-Proteins und stabilisiert die Lysogenie. Er ist ein Dimer aus zwei identischen Untereinheiten und blockiert mit dem Cro-Protein entgegengesetzter Affinität drei Bindestellen womit die Transkription nahezu des gesamten lytischen Genomabschnitts im lysogenen Zustand verhindert wird. Zusätzlich verstärkt der CI-like repressor die Lysogenie noch weiter dadurch, dass er als Aktivator seiner eigenen Transkription fungiert, indem die Besetzung des *cro*-Promotors die Affinität der RNA-Polymerase zum eigenen Promotor erhöht. In der lytischen Phase wird die *cro*-blockierende Wirkung des CI-like repressors über eine Spaltung seiner beiden Untereinheiten voneinander aufgehoben. Diese erfolgt im Zuge der sogenannten SOS-Antwort. Bei dieser erhält das Protein RecA die Fähigkeit gewisse Proteine, wie z. B. den CI-like repressor, zu spalten. Folglich kann nun die RNA-Polymerase an den *cro*-Promotor binden und die für den lytischen Infektionsweg benötigten Gene transkribieren.

Die Φ 13-Integrase (codiert durch *int*) besitzt eine Doppelfunktion. Sie ist sowohl für die Integration des Bakteriophagen in das Wirtsgenom, als auch für die Exzision aus dem Genom in der lytischen Phase notwendig [18]. Daher wird diese im lysogenen, wie im lytischen Zyklus transkribiert. In Lambda spielt das Verhältnis zwischen Int und Xis bei der Entscheidung zwischen Lyse und Lysogenie eine Rolle. Dieses wird durch die unterschiedlichen Halbwertszeiten der beiden Proteine beeinflusst.

Orf C befindet sich an der Stelle im Genom an dem sich bei einigen anderen Phagen *xis* befindet, das für die Exzisionase Xis codiert und so wird für Φ 13 angenommen, dass Orf C eine Exzisionasefunktion hat [18]. Orf C wird interessanterweise in der Richtung wie die lytischen Gene transkribiert, obwohl es im lysogenen Modul liegt. Für die Lambda-Regulation werden für die Integration des Phagen in das Wirtsgenom in *E. coli* noch der bakteriell codierte IHF (Integration Host Factor) und das Fis-Protein (Factor for Inversion Stimulation-Protein) benötigt, welche u. a. für die Interaktion der zu

rekombinierenden Genstränge verantwortlich sind. Der IHF und das Fis-Protein sind in *S. aureus* noch nicht untersucht.

Das lytische Modul enthält die Gene für die Phagenpropagation, also Transkriptionsregulation, DNA-Replikation, die Kopf-, Schwanz- und Schwanzfaserproteine sowie für das Verpacken der Phagen-DNA in die bis dahin leeren Phagenpartikel und die anschließende Lyse der Wirtszelle. Darüber hinaus codiert $\Phi 13$ im lytischen Modul unter anderen noch die Pathogenitätsfaktoren SAK, CHIPS und SCIN.

1.2.4 Genregulation

Nach Injektion des linearisierten Phagengenoms in das Zytoplasma findet der Ringschluss statt und das Genom liegt in seinem aktiven Zustand vor. Nun erfolgt die Transkription der regulatorischen Proteine durch die bakterielle RNA-Polymerase.

Über eine regulatorische Kaskade entstehen in Lambda u. a. die Produkte der Gene *cII*, *cIII* und *cI* sowie *cro*, welche auch an der Entscheidung zwischen dem lytischen und dem lysogenen Infektionswegs beteiligt sind.

Bei dieser Entscheidung spielt der Transkriptionsfaktor CII eine zentrale Rolle. CII steht jedoch unter dem Einfluss bakterieller Proteasen und viraler Proteine mit protektiver Wirkung. So wird CII durch CIII stabilisiert, indem CIII den Abbau durch bakterielle Proteasen wie z. B. dem HflB-Protein (high frequency of lysogenization) verhindert. IHF, der auch für die Integration benötigt wird, stabilisiert CII ebenfalls. Ist die Konzentration an CII ausreichend hoch, wird die Transkription von *cI* und *int* ermöglicht. Durch CI wird dann die *cro*-Transkription verhindert und mit der Synthese der $\Phi 13$ -*int* Bedingungen für die Integration des Bakteriophagen geschaffen.

1.2.5 Die Stämme 8325 und MW2

Der Stamm NCTC 8325 (National Collection of Type Cultures), kurz 8325, wurde 1950 aus einem Abstrich eines cornealen Ulcus isoliert. Er trägt keine Antibiotikaresistenz. R. P. Novick entdeckte, dass im Genom von 8325 die drei Phagen $\Phi 11$, $\Phi 12$ und $\Phi 13$ integriert sind. Die 8325-Phagen $\Phi 11$ und $\Phi 12$ gehören zu der Sa5int- bzw. der Sa2int-Gruppe [17].

Aus 8325 wurden zahlreiche Abkömmlingen gewonnen, u. a. der von R. P. Novick durch UV-Strahlung von allen drei Phagen befreite Stamm 8325-4 [21]. Durch die intensive Beforschung des Ursprungsstamms sowie seiner Abkömmlinge, wurden diese zu den bestuntersuchtesten *S. aureus*-Stämmen, was auch dazu führte, dass das Genom des Ursprungstamms 8325, das erste vollständig sequenzierte bakterielle Genom war. 8325 ist *sigB*-defizient [22].

MW2 ist ein community-acquired MRSA (CA-MRSA), welcher 1998 in Nord Dakota, USA, bei einem 16 Monate alten Mädchen, welches zuvor keinen Kontakt zu Gesundheitsinstitutionen hatte, zu einem tödlichen Verlauf mit u. a. Septikämie führte, sodass Gesundheitsinstitutionen als potentieller Ansteckungsort nicht in Frage kamen. Namensgebend für den Stamm war dessen PFGE-Bandenmuster, welches den im mittleren Westen (Mid West) der USA häufig isolierten MRSA-Stämmen glich. Die Genomsequenzierung zeigte, dass dieser Stamm eine bis dahin unbekannte allelische Form der SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec) trug, welche dem Typen IVa zugeordnet wurde [23]. Das Genom enthielt zwei Prophagen, $\Phi Sa2mw$, welcher für PVL (*luk FS-PV*) codiert, und $\Phi Sa3mw$, welcher - wie $\Phi 13$ - SAK und SCIN vermittelt, nicht jedoch Chemotaxis inhibierendes Protein (CHIPS). Darüber hinaus enthält das $\Phi Sa3mw$ -Genom des Stamms noch die Gene für Enterotoxin K (*sek*), Q (*seq*) und A (*sea*). In vorangegangenen Arbeiten in der AG Wolz wurden die beiden Phagen aus dessen Genom entfernt [24]. Diese Abkömmlinge wurde als MW2c (für cured MW2) bezeichnet.

Für unsere Experimente wählten wir diese beiden Stämme, da sie beide sehr gut untersucht und deren Genome auch vollständig sequenziert sind. Sie tragen

Phagen aus denselben *int*-Gruppen, unterscheiden sich darüber hinaus jedoch sehr voneinander.

1.3 Sigma-Faktoren und Sigma-Faktor σ^H

Sigma-Faktoren sind bakterielle Proteine, welche eine entscheidende Rolle bei der Transkription spielen.

Sie bilden gemeinsam mit der Core-RNA-Polymerase (sog. Kernenzym), das aus zwei α -, β -, β' - und ω -Untereinheit besteht, die RNA-Polymerase (RNAP). Dieser Transkriptionskomplex aus Sigma-Faktor und Kernenzym wird auch als Holoenzym bezeichnet.

Die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA ist durch unspezifische Wechselwirkungen nicht fest und so stellen erst die Sigma-Faktoren die spezifische feste Bindung an die DNA sicher, welche für die tatsächliche Erkennung der -35- und -10-Region, sowie der Promotoren und die Initiation der Transkription von grundlegender Bedeutung ist.

Die einzelnen Sigma-Faktoren sind für die Erkennung und Transkription von Operons zuständig. Operons sind funktionale Gruppen von Genen, welche gemeinsam benötigt und daher gemeinsam transkribiert werden. Spezielle Umwelteinflüsse aktivieren die Sigma-Faktoren, gehemmt werden sie durch Anti-Sigma-Faktoren.

Man unterscheidet zwei Gruppen von Sigma-Faktoren voneinander. Einerseits die vegetativen sog. „housekeeping sigma factors“, welche für die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels notwendig sind und daher konstitutiv exprimiert werden. Zur Anpassung an verschiedene Umwelteinflüsse hingegen werden regulierende, sog. „alternative Sigma-Faktoren“ benötigt.

Bei Arten wie *E. coli* und *B. subtilis*, ist wesentlich mehr über deren Sigma-Faktoren, die Regulationsmechanismen und Funktion dieser bekannt. So hat *E. coli* 7 und *B. subtilis* 18 Sigmafaktoren.

Durch vergleichende Sequenzanalysen konnten bisher lediglich die vier Sigma-Faktoren σ^A , als housekeeping factor [25], und die alternativen

Sigma-Faktoren σ^B [22, 26] , σ^H [27] und σ^S [28] in *S. aureus* identifiziert werden. In *S. aureus* ist die Funktion von σ^B gut untersucht, die Rollen von σ^H und σ^S hingegen sind noch umstritten.

Wir interessierten uns für Sigma-Faktor σ^H , da berichtet wurde, dass dieser die Transkription der Gene *int* (Integrase) und *com* (Kompetenz) positiv beeinflusst, sodass über höhere mRNA-Spiegel an *int* und *com* ein lysogener Zustand stabilisiert wird [29]. Folglich wären bei σ^H -defizienten Stämmen niedrigere mRNA-Konzentrationen an *int* und *com* zu beobachten. Dies wiederum würde über die niedrigen *int*-Expression zu lytischem Verhalten von $\Phi 13$ und einer höheren Anzahl an nicht integrierten Phagengenomkopien führen.

1.4 Ziele dieser Studie

In Vorarbeiten der AG Wolz wurde gezeigt, dass $\Phi 13$ eine unterschiedliche Induzierbarkeit und Transferrate in den Stämmen 8325-4 und MW2c hat [24]. Die Induzierbarkeit war interessanterweise nicht in der phagenfreien Variante seines natürlichen Wirtsstamms 8325-4, sondern im phagenfreien Stamm MW2c gesteigert. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob es stammspezifische Unterschiede im Lebenszyklus von $\Phi 13$ in den beiden Hintergrundstämmen 8325-4 und MW2c gibt und ob der Sigma-Faktor σ^H hierbei eine Rolle als bakterieller Faktor spielt. Daher wollten wir folgende Fragen beantworten:

- 1.) Unterscheidet sich das Transferverhalten von $\Phi 13$ in den beiden unterschiedlichen Hintergrundstämmen 8325-4 und MW2c?
- 2.) Welchen Einfluss haben das Phagendonor-Phagenrezipienten-Verhältnis und die Wachstumsphasen zum Mischzeitpunkt auf den Transferprozess?

Zur Beantwortung dieser Fragen führten wir Mischkulturexperimente durch und ermittelten die Transferrate.

- 3.) Wenn es Unterschiede im Transferverhalten gibt, lassen sich diese durch Analyse der Transkription und der genomischen DNA von $\Phi 13$ bestätigen? Zur Beantwortung dieser Frage führten wir Northern Blot-Analysen sowie relative

und absolute quantitative PCRs durch, um spezifisch die Transkription von Genen, welche essentiell für den lytischen und lysogenen Zyklus sind zu untersuchen.

4.) Spielt der Sigma-Faktor σ^H eine Rolle bei möglichen Unterschieden in der genetischen Regulation?

Um diese Fragestellung zu untersuchen, klonierten wir Stämme, welche anstatt des σ^H -Gens eine Erythromycin B-Resistenzkassette trugen und analysierten durch qRT-PCR die *int*-Expression und durch qPCR bzw. *attP*-Stellenbestimmung die Phagenreplikation.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Agarose, 1% DNA	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose, 1 % Seakam GTG	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose, 2 % low melting point	Biozym, Hess. Oldendorf
Anhydrotetracyclinhydrochlorat (AHT)	IBA, Göttingen
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Brij 58	Serva, Heidelberg
BSA	Roche, Mannheim
Chloroform	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CSPD	Roche, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche, Mannheim
EDTA	Merk, Darmstadt
EGTA	Merk, Darmstadt
Ethanol 99%	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formaldehyd, 37 %	AppliChem, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Ambion, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Mitomycin C	Sigma, München
Natriumcitrat, 1 mM, pH 6,4	Ambion, Wiesbaden
Nukleasefreies Wasser (NFW)	Ambion, Wiesbaden
NucleoSpin Extract II-Kit	Macherey-Nagel, Düren
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche, Mannheim

QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
SuRE / Cut Buffer A	Roche, Mannheim
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Enzyme

Lysostaphin	Ambi Products, USA
Polymerase, <i>Taq</i> Hot Star	Qiagen, Hilden
Polymerase, High Fidelity	Qiagen, Hilden
Proteinase K	Sigma, München
<i>Sma</i> I	Roche, Mannheim

2.3 Molekulargewichtsstandard

0,5 – 10 kbp RNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp DNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp + Längenmarker, Col	Fermetas, St. Leon-Roth <i>S. aureus</i> -Stamm Col

2.4 Materialien

96-Well-Platte	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Blotvorrichtung	Turbo Blotter, Whatman, UK
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Falcons	Omnilab, Bremen
Filterpapier	Turbo Blotter, Whatman, UK
Gußkammern	Biorad, München
Nylonmembran	Pall Corporation, USA
Röntgenfilme	Agfa, Mortsel, B

Röntgenfilmentwickler „Curix 60“	Agfa, Mortsels, B
Saranfolie	Dow Chemical, USA
Zirconiumsilizium-Kügelchen	Roth, Karlsruhe

2.5 Geräte und Programme

Dark Hood DH 30/32	Biostep, Burkhardtsdorf
Parafilm	Bemis Company, USA
PCR-LightCycler-Gerät	Roche, Mannheim
Photometer, Ultrospec 2100 pro UK	Amersham, Buckinghamshire,
Photometer	Milton Roy, USA
Photometer, Pharmacia LKB Ultrospec III	Apeldoorn, NL
Fastprep-Schüttler	MP Biomedicals, USA
Zentrifuge 3 K 10	Sigma, Osterode
Zentrifuge 3 K 30	Sigma, Osterode

2.6 Medien und Stammlösungen

Blue juice	50 % Glycerin, 1 mM EDTA pH 8,0 und 0,25 % Bromphenolblau
CaCl ₂ -TSA-Platten	500 ml TSA autolavieren und sterilfiltrierte 2,5 ml 100 mM CaCl ₂ hinzugeben. Anschließend in Petrischalen ausgießen
CYPG	10 g Casamino acid (Säure), 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl mit dest. H ₂ O auf 935 ml auffüllen und autoklavieren, sterilfiltrierte Glukose und 1,5 M Glycerolphosphat zugeben.
Einfriermedium	TSB und Glycerin im Verhältnis 3:1
Lysepuffer (DNA)	50 ml TE (pH 8), 500 µl Triton, 250 µl Tween 20

Lysepuffer (PFGE)	6 mM Tris, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5 % Brij 58, 0,2 % Natriumdesoxycholat, 0,5 % Laurylsarcosin mit dest. H ₂ O auffüllen (pH 7,6), anschließen autoklavieren
10 x MOPS	40,5 g MOPS, 4,1 g NaAc, 20 ml EDTA (0,5 m, pH 8), 4 ml NaOH (10 N), 1 l RNA-Wasser
Natriumzitat	1 mM (pH 6,4)
1 x PBS	7 mM Na ₂ HPO ₄ , 3 mM NaH ₂ PO ₄ , 130 mM NaCl (pH 7,4)
Phagenpuffer	1 mM MgSO ₄ , 4 mM CaCl ₂ , 50 mM Tris (pH 7,4), NaCl 5,9 g/l, autoklavierte Gelatine 1 g/l, Ampuwa
Phagen-Top-Agar	0,75 g Camino Acid, 0,75 g Hefeextrakt, 1,48 g NaCl, 1,88 g Agar
Proteolysepuffer	0,25 M EDTA, 20 mM EGTA, 1 % Laurylsarcosin (pH 9,0)
50 x TAE	2 M Tris-HCl, 1 M Essigsäure, 0,5 M EDTA (pH 8,2)
10 x TE	10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)
Transferpuffer	175,5 g NaCl, 0,32 g NaOH, 0,63 g Laurylsarcosin, NFW
TSA	15 g Agar auf 1 l TSB
TSA-Top-Agar	7,5 g Agar, 30 g TSB auf 1 l
TSA-CaCl ₂	15 g TSB, 7,5 g Agar, 250 µl CaCl ₂
TSB	30 g TSB auf 1 l
Waschlösung	10 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl pH 7,5

2.7 Bakterienstämme und Phagen

Tabelle 1: Verwendete *S. aureus*-Stämme und Phagen

	Stamm	Herkunft	Hlb
Hlb- Phagen- freie Stämme	8325-4	Novick [21]	+
	(NCTC8325)	Diese Arbeit	+
	8325-4Strep	C. Wirtz*	
	8325-4Tet		+
	(= 8325-4 Δ geh::pCL84(<i>tet</i> ^r)	C. Wirtz*	+
	MW2c	C. Wirtz*	+
	MW2cStrep	Diese Arbeit	+
	Newman, Δ sigH (= Newman, Δ sig:: <i>ermB</i>)	Geschenk von Thomas Bischoff	
Hlb- Lysogene	8325-4 Φ 13	C. Goerke [30]	-
	8325-4 Φ 13KanA (= 8325-4 Φ 13end:: <i>aphA3</i> ¹)	C. Goerke [30]	-
	8325-4 Φ 13KanA, Δ sigH (= 8325-4 Φ 13end:: <i>aphA3</i> ¹ , Δ sig:: <i>ermB</i>)	Diese Arbeit	-
	MW2c Φ 13	C. Wirtz*	-
	MW2c Φ 13KanA (= MW2c Φ 13end:: <i>aphA3</i> ¹)	Wirtz, Witte et al 2009 [31]	-
	MW2c Φ 13KanA, Δ sigH (= MW2c Φ 13end:: <i>aphA3</i> ¹ , Δ sigH:: <i>ermB</i>)	Diese Arbeit	-
Phagen	Φ 13	Novick [21]	
	Φ 13KanA (= Φ 13end:: <i>aphA3</i> ¹)	C. Goerke	
	Φ 80 α ²		

* Dissertation von Dr. Christiane Wirtz

¹ *aphA3*: Kanamycinresistenzgen

² für Transduktion

2.8.1 Anzucht der Bakterienstämme

Die zuvor bei -70 °C eingefrorenen Reinkulturen wurden auf MH-Blutplatten ausgestrichen und anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Von diesen MH-Blutplatten wurden am Folgetag Über-Nacht-Kulturen (ÜNK) in 5 ml TSB bei 37 °C und 220 UpM hergestellt. Dem TSB wurde entsprechend der Stammresistenzen jeweils Kanamycin (50 µg/ml), Streptomycin (500 µg/ml) bzw. Tetracyclin (5 µg/ml) zugesetzt.

Für die Tagkulturen wurden 10 ml TSB mit der *S. aureus*-ÜNK auf eine $OD_{600} = 0,05$ angeimpft und für die Versuche mit den Donor-Rezipienten-Verhältnissen von 1:1, 1:4 und 4:1 bis zur frühexponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,7$) bei 37 °C und 220 UpM angezogen. Diese wurde nach ca. 2 h erreicht.

Für die Versuche zur Untersuchung des Einflusses der Wachstumsphase wurden die Tagkulturen auf eine $OD_{600} = 0,05$ angeimpft und bis zur spätexponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1,5$) bzw. postexponentiellen Phase, nach ca. 14 h, bei 37 °C und 220 UpM angezogen.

2.8.2 Mischen der Bakterienstämme

Mischen der wie unter 2.8.1.1 beschrieben angezogenen Donor- und Rezipientenstämmen in den für den jeweiligen Versuch entsprechenden Verhältnissen von 1:1, 1:4 bzw. 4:1 und anschließende Ko-Kultivierung.

Bei den Transferversuchen mit dem Rezipientenstamm 8325-4Tet, wurde nach 3,5 h Ko-Kultivierung eine Induktion der Tetracyclinresistenz mit subinhibitorischem AHT (0,2 µg/ml AHT) durchgeführt. Ohne Induktion sind deutlich weniger Kolonien auf Tetracyclin-Selektionsplatten nachweisbar. Dies ist von grundlegender Bedeutung für die Interpretation der Transferraten.

2.8.3 Auswertung der Transferversuche und Berechnung der Transferrate

Serielle Verdünnungen der Mischkulturen wurden auf MH-Blutplatten, sowie auf Einzel- und Doppelselektivplatten ausplattiert. Nach 24 h, 37 °C wurden die

Koloniebildenden Einheiten (KBE) ausgezählt. Exemplarisch ist die Auszählung eines Transferversuchs in (Abbildung 6) dargestellt.

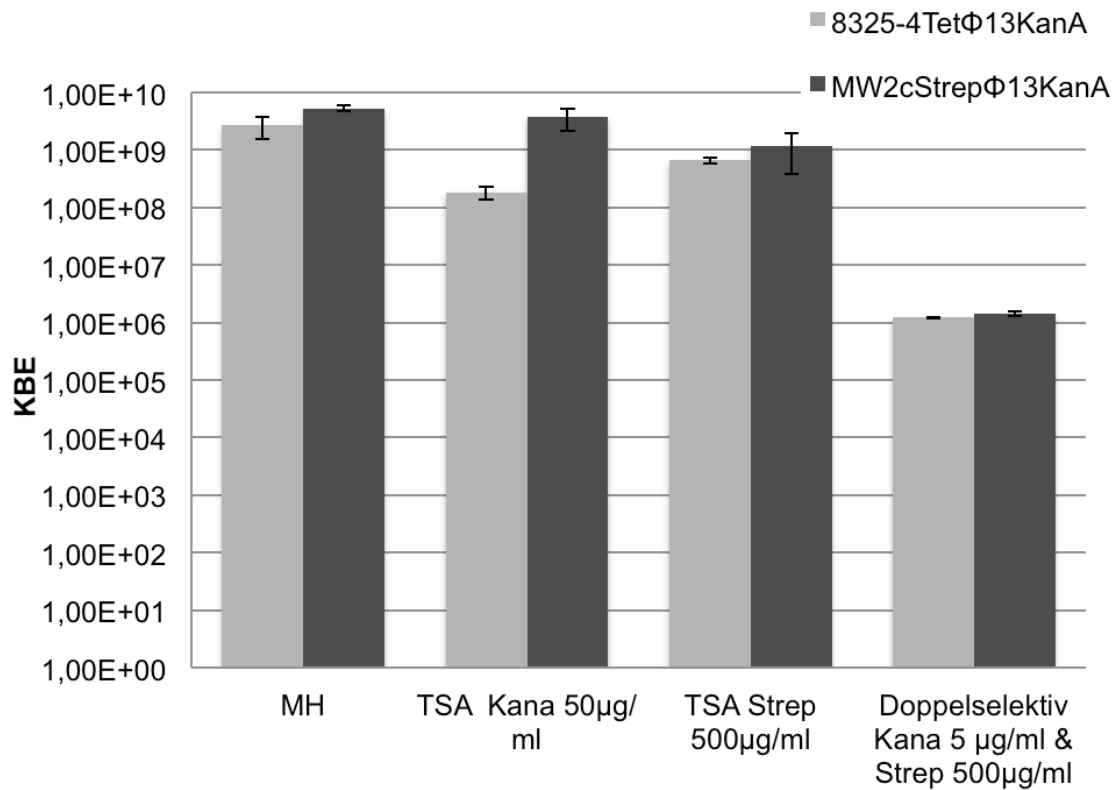


Abbildung 6: KBE-Bestimmung (Koloniebildende Einheiten) auf den Einzel- und Doppelselektivplatten nach Ko-Kultur von 8325-4Φ13KanA bzw. MW2cΦ13KanA im Verhältnis 1:1 mit dem jeweiligen Rezipientenstamm 8325-4Strep bzw. MW2cStrep für 4 h.

Als Maß für den Phagentransfer wurde nach Ko-Inkubation von Donor- und Rezipientenstämmen der Anteil der entstandenen doppelresistenten Transferanden (8325-4TetΦ13KanA, 8325-4StrepΦ13KanA und MW2cStrepΦ13KanA) bestimmt. Diese wurden auf Doppelselektivantibiotikaplatten isoliert. Da die Stämme in geringem Ausmaß Spontanresistenzen gegen die Antibiotika entwickelten, wurden auch die Donor- und Rezipientenstämme auf Doppelselektionsplatten getestet. Die

Spontanresistenzrate wurde von der Transferrate subtrahiert. Die Transferraten, wurden wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} & \text{Transferrate} \\ = & \frac{\text{KBE auf Doppelselektivplatten} - \text{KBE des Donors auf Rezipientenselektivplatten}}{\text{KBE auf Rezipientenselektivplatten}} \\ = & \frac{\text{Transferanden} - \text{Spontanresistente}}{\text{Rezipienten}} \end{aligned}$$

Darüber hinaus plattierten wir zur Kontrolle die Mischkulturen auch auf Einzelselektivplatten aus. Die Summe der KBE auf den Einzelselektivplatten, sollte ungefähr der KBE auf unselektionierten Blutplatten entsprechen.

2.8.4 Kontrolle der Lysogene durch Darstellung des Hämolyseverhaltens und PFGE

Falls es bei dem Phagentransfer zur spezifischen Integration in *hIb* kam, sollten sich die Transferanden im Hämolyseverhalten von den Hlb-positiven Rezipientenstämmen auf Blutagarplatten unterscheiden. Hlb ist auf Blutplatten vor allem nach Inkubation bei 4 °C erkennbar, daher die Bezeichnung „kalte Hämolyse“. In Abbildung 7 ist die Hlb-Konversion deutlich zu erkennen: der phagenfreie Stamm 8325-4 (Delysogen) produziert mehrere Hämolsine. Hlb ist typischerweise für die äußere Hämolysezone, die sich durch Inkubation bei 4 °C verstärkt, verantwortlich. In den Stämmen 8325 und MW2 ist *hIb* durch Phagenintegration unterbrochen. Sie sind Hlb-negativ, erkennbar an dem fehlenden, äußeren Hämolysehof.

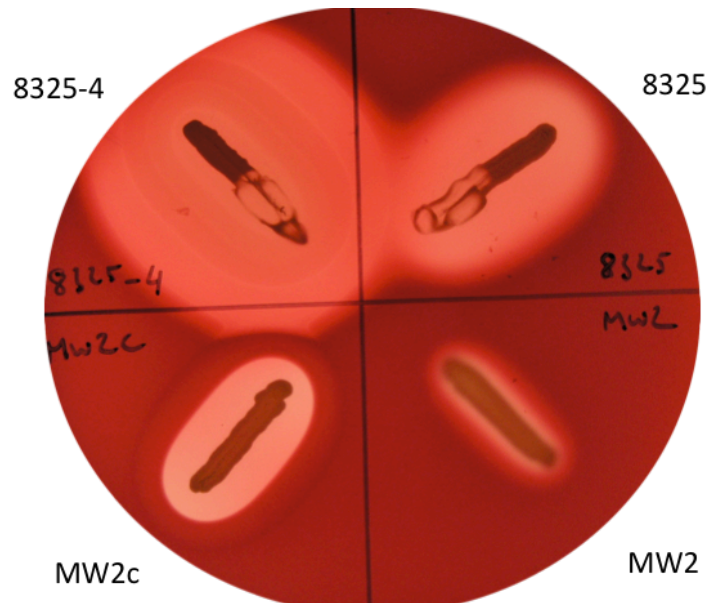


Abbildung 7: Hämolyseverhalten von lysogenen und delysogenen Stämmen auf Blutagarplatten. 8325-4 und MW2c sind Hlb-positiv, da in diesen Stämmen alle Phagen entfernt wurden. In 8325 und MW2 ist *hlb* durch Integration eines Phagen unterbrochen (Hlb-negativ). Deutlich zu erkennen ist auch das deutlich unterschiedliche Lyseverhalten beider Ursprungsstämme. Dieses resultiert aus den unterschiedlichen Hämolytinen, welche 8325-4 und MW2c synthetisieren.

Die erfolgreiche Integration von Φ 13KanA in das *hlb*-Gen der Transferanden wurde durch Analyse des Hämolyseverhaltens und exemplarisch auch durch PFGE überprüft. Diese Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.4. zu sehen.

2.8.5 Erstellen von Wachstumskurven

Die zu untersuchenden Stämme wurden wie unter 2.8 beschrieben angezogen und die OD_{600} der Flüssigkulturen in regelmäßigen Intervallen bestimmt.

2.8.6 Einfrieren von Bakterien

Einige Kolonien wurden von den entsprechenden TSA-Selektiv-Platten gepickt, in 1 ml Einfriermedium gelöst und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.8.7 Herstellung von spontanresistenten MW2cStrep-Stämmen und spontanresistenten 8325-4Φ13Strep-Stämmen

Für die ÜNK wurde TSB mit den zuvor bei -70 °C eingefrorenen 8325-4Φ13- bzw. MW2c-Kolonien angeimpft. Am darauffolgenden Tag wurden die ÜNK auf TSA-Platten, welche 100 µg/ml Streptomycin enthalten ausplattiert und anschließend bei 37 °C für 24 h bebrütet. Danach wurden mehreren Kolonien von den 100 µg/ml-Streptomycin gepickt und auf 500 µg/ml Streptomycin-Platten ausplattiert.

2.8.8 Überprüfung der neuen MW2cStrep- und 8325-4Strep-Stämme

Die neu gewonnenen MW2cStrep Stämme wurden zur Kontrolle auf MH-Blut-Platten ausgestrichen. Diese zeigten eine kalte Hämolyse, somit waren die Stämme korrekt Hlb-positiv.

Zusätzlich wurden wie unter 2.8.1 beschrieben Wachstumskurven angefertigt. Die Stämme zeigten hier normales Wachstum.

2.8.9 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Es wurden PFGEs durchgeführt, um sicherzustellen, dass der Phagentransfer stattgefunden hatte und um zu sehen, ob die Phagen an den richtigen Stellen in den Wirtsgenomen integriert waren.

DNA-Isolierung für die PFGE

Für die Isolierung der chromosomalen DNA wurden 5 ml TSB mit einer Öse der gewünschten Stämme angeimpft und als ÜNK bei 37 °C und 220 UpM bebrütet. Am Folgetag wurde die ÜNK auf eine der $OD_{600} = 0,5$ verdünnt, es wurde 1 ml entnommen und für 3 Minuten bei 10.000 g, 4 °C zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Waschlösung gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 100 µl Waschlösung (10 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl pH 7,5) resuspendiert und bis auf 55 °C erwärmt. Gleichzeitig wurden 100 µl 2 % low melting point Agarose (in TE, pH 8,0) auf 55 °C erwärmt, mit der

Probe vermischt und in vorgefertigte Gußkammern zum Aushärten pipettiert. Nach 30 Minuten Kühlung bei 4 °C wurden die erhärteten Agaroseblöckchen in 1 ml Lysepuffer mit jeweils 5 µl Lysostaphin überführt.

Die anschließende Inkubation erfolgte bei 4 °C unter leichtem Schütteln über Nacht. Nachfolgend wurde der Lysepuffer entfernt und durch 1 ml

Proteolysepuffer mit 50 µl Proteinase K ersetzt. Nun folgte eine erneute

Inkubation der Agaroseblöckchen über Nacht in einem Wasserbad bei 55 °C.

Zum Abschluß wurden die Blöckchen fünf Mal für jeweils mindestens zwei Stunden mit 1 ml TE, pH 8,0 bei 4 °C unter Schütteln gewaschen. Entweder wurden die Proben direkt im Restriktionsverdau weiter bearbeitet oder in 0,5 M EDTA bei 4 °C aufbewahrt. Zum Entfernen des EDTA wurden die Blöckchen mit TE gewaschen.

Restriktionsverdau

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

Tabelle 1: Ansatz für den Restriktionsverdau (200 µl)

Reagenz	Menge
Probe	100 µl
BSA (200 mg/ml)	1 µl
SuRE / Cut Buffer A	20 µl
Nukleasefreies H ₂ O (NFW)	78 µl
<i>Sma</i> I (10 U/µl)	1 µl

Die verwendete Restriktionsendonuklease *Sma* I erkennt die folgende DNA-Sequenz CCC|GGG.

Nach der Inkubation bei 27° C über Nacht wurde der Verdau mit 500 µl TE gestoppt. Die Proben wurden anschließend direkt zur Elektrophorese eingesetzt.

Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in einem 1 % Agarosegel (Seakam GTG in 0,5 x TBE) mit 0,5 x TBE als Laufpuffer durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard wurden in den äußersten Taschen jeweils Col (*Sma* I verdaute DNA des sequenzierten *S. aureus* Stamm Col) eingesetzt. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 200 V mit Pulszeiten von 1 bis 45 Sekunden für 24 Stunden bei 12 °C. Anschließend wurde das Gel in 0,5 x TBE und 0,5 g/ml Ethidiumbromid für 30 Minuten gefärbt und auf einem Transilluminator digital abfotografiert.

2.9 Northern Blots

2.9.1 Phageninduktion

Zur Gewinnung der RNA der zu untersuchenden Stämme wurden diese in 10 ml TSB wie unter 2.8.1.1 (Anzucht der Bakterienstämme) bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Jeder Probe wurden nun 300 ng/ml Mitomycin zur Induktion der Phagen hinzugegeben.

Pro Stamm wurden drei Proben hergestellt: zwei induzierte Proben wurden 30 Minuten (t1) bzw. 120 Minuten (t2) nach der Induktion geerntet, eine nicht induzierte Probe wurde nach 120 Minuten geerntet. Nach Überführung aller Proben in jeweils ein Plastikzentrifugenröhrchen, wurden diese bei 5000 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das gewonnen Pellet wurde in 1 ml Trizol (Invitrogen) resuspendiert, der Überstand wurde verworfen. Die Suspension wurde daraufhin in zuvor bis zur 0,5 ml-Markierung mit Zirconiumsilizia-Kügelchen (Roth) gefüllte Screw cups überführt und im Schüttler (Fastprep) zwei Mal bei 6500 UpM für jeweils 20 Sekunden geschüttelt. Die Proben konnten dann bei -20 °C eingefroren oder gleich weiter verarbeitet werden, wofür sie dann auf Eis gelagert wurden.

2.9.2 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Die folgenden Schritte erfolgten in einem RNA-Labor, in dem eigens zur Verarbeitung von RNA vorgesehenen Labor unter einem Abzug und unter Verwendung von Handschuhen.

Im Fall von zuvor eingefrorenen Pellets wurden diese zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut. Die zuvor gewonnenen Proben wurden jeweils mit 200 μ l Chloroform versetzt und für 30-60 Sekunden gemischt, es folgten 3 Minuten Inkubation bei RT. Nachfolgend wurden die Proben bei 12000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und der so gewonnene Überstand - ca. 600 μ l wässrige Phase - mit 1,5 μ l Isopropanol gefüllte RNA-Gefäße überführt und nach gründlichem Mischen für ca. 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben bei 12000 g und 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde mit RNA-Spitzen abgesogen und die Pellets mit 500 μ l 70 % Ethanol gewaschen und erneut bei 7500 g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und jedes Pellet für 30-60 Minuten im offenen Gefäß unter dem Abzug getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden mit 50 μ l Natriumcitrat (1 mM, pH 6,4, Ambion) versetzt, für 10 Minuten im vorgeheizten Heizblock bei 55 °C inkubiert und anschließend im Vortexer für 3-4 Minuten gemischt. Nun konnten die Proben bei -20 °C bzw. -80 °C eingefroren oder direkt weiter verarbeitet werden. Sofern die Proben zuvor eingefroren waren mussten diese auf Eis aufgetaut werden.

Für die RNA-Konzentrationsbestimmung der Proben wurden 2 μ l der Proben mit 398 μ l Ampuwa verdünnt und in Quarzglas-Küvetten überführt. Die Messung erfolgte im „Ultrospec 2100 pro“-Photometer (Amersham Bioscience) bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm. Später sollten 2 μ g RNA pro Geltasche pipettiert werden, diese Menge musste mit der Anzahl der in einem Gel zu untersuchenden Proben multipliziert werden. Anhand der zuvor photometrisch gemessenen RNA-Konzentration der Proben wurde berechnet welches Probenvolumen für 2 μ g RNA benötigt wird. Aufgrund der in der Regel unterschiedlichen RNA-Konzentrationen der Proben, wurden auch

unterschiedliche Volumina benötigt. Daher wurden, orientierend an der Probe mit der geringsten RNA-Konzentration und somit dem größten benötigten Volumen, alle Proben mit nukleasefreiem Wasser (NFW) bis auf ein Volumen von 2 µl aufgefüllt.

2.9.3 RNA-Gelelektrophorese

Zur Herstellung der Formaldehydgelte wurden pro Gel 0,8 g Agarose mit 68 ml nukleasefreiem Wasser vermischt und in der Mikrowelle bei 440 Watt für 2-3 Minuten erwärmt und zum Schmelzen gebracht. Nach kurzem Abkühlen wurden zuerst 8 ml 10 x HOPS und dann 4 ml 37 %iges Formaldehyd hinzugegeben, gründlich gemischt und in eine Gelkammer mit Platzhalterkämmen für die zu entstehenden Aufnahmeetaschen gegossen.

Der Probenpuffer wurde durch Mischen von 750 µl deionisiertem Formamid, 150 µl 10 x MOPS, 262 µl 37 %igem Formaldehyd und 5 µl Ethidiumbromid hergestellt. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet.

Das für 2 µg an RNA benötigte Volumen wurde aus den Proben in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und mit NFW auf ein Volumen von 2 µl aufgefüllt, mit der dreifachen Menge, in diesem Fall 6 µl, an Probenpuffer versetzt, im Vortexer gemischt und im auf 65 °C vorgeheizten Heizblock für 15 Minuten denaturiert. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt waren, wurde jeder Probe ein Volumen an Blue Juice hinzugefügt, das ungefähr einem Sechstel einer Probe, bestehend aus RNA und NFW entsprach, hier also (2 µl RNA + 6 µl NFW) : 6 = 1,3 µl. Diese Mischung wurde kurz bei 12000 UpM zentrifugiert.

Zur Größenbestimmung wurde ein Größenmarker (0,5 – 10 kbp RNA-Ladder, Invitrogen) mitgeführt, pro Geltasche waren dies 1,5 µl, mit welchen wie mit den RNA-Proben verfahren wurde.

Nun folgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben bei 65 Volt. Nach ca. 2 Stunden wurde der Vorgang gestoppt und das Gel auf Saranfolie unter UV-Licht digital fotografiert.

2.9.4 Northern Blot

Das Elektrophoresegel wurde für 30 Minuten in NFW unter Schütteln gespült. Um eine freie Zugänglichkeit für die spätere Detektion der durch die Gelelektrophorese aufgetrennten RNA-Moleküle zu ermöglichen, wurden diese mittels Northern Blot aus dem Gel auf eine Nylonmembran übertragen. Bei diesem Verfahren nutzt man die Kapillarkapillareffekte von Filterpapier aus, der einen gerichteten Sog erzeugt. Der Aufbau bestand aus einer Vorrichtung (Turbo Blotter, Whatman, UK), in welche zunächst Filterpapiere und darauf eine Nylonmembran (Pall Corporation, USA) positioniert wurden. Das Gel wurde mit den Taschenöffnungen so auf die Membran gelegt, sodass die glatte Fläche zur Nylonmembran und die Taschen weg von dieser zeigten, hierbei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftbläschen zwischen dem Gel und der Nylonmembran befanden. Über die Membran wurden weitere Filterpapiere gelegt, wobei sich die beiden Enden des obersten Filterpapiers im Transferpuffer befanden. Die Herstellung des Transferpuffers erfolgte aus einer Mischung von 175,5 g NaCl, 0,32 g NaOH sowie 0,63 g Laurylsarcosin, welche mit NFW auf 1 Liter aufgefüllt wurde. Nach Abdeckung des Aufbaus mit Saranfolie, wurde der gesamte Aufbau zur Verstärkung des Kapillareffektes mit einem Gewicht beschwert und 2,5 Stunden laufen gelassen.

Anschließend wurde die Nylonmembran in 1 x Phosphatpuffer unter Schütteln für 5 Minuten gewaschen und die RNA durch beidseitiges Crosslinken mit 125 J an die Membran gebunden. Der Erfolg der Übertragung wurde durch Sichtbarmachen der 23S und 16S rRNA Banden mittels UV-Licht überprüft.

2.9.5 Herstellung spezifischer DIG-markierter Gensonden mittels PCR

Für die Hybridisierung der Northern Blots wurden mit Digoxigenin markierte Sonden hergestellt (PCR DIG Probe Synthesis Kit, ROCHE). Es wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Oligos und DNA des *S. aureus*-Stamms 8325 als Template verwendet.

Tabelle 2: Oligonukleotide zur Herstellung DIG-markierter Sonden

Name	Länge	Oligosequenz
phi13antDIG-for	20	AAAGAAAATGGAGAAATCGC
phi13antDIG-rev	18	TTTGCCTGTTACTTTTGG
phi13clDIG-for	24	TCATACTTCGGATTTAGAGATACC
phi13clDIG-rev	25	CGAAACCTTATCAAAAGAACTAGG
phi13croDIG-for	18	CGGTAAAGTTGGTTGGAA
phi13croDIG-rev	18	ATTGGAGTGGCGTTGATT
DIGphi13int-rev	19	TTAGAACAAGCGTGAAGC
Sa3int-rev	20	TTATTGACTCTACAGGCTGA
phi13terDIG-for	19	GACCCTAAAACAAACCAGC
phi13terDIG-rev	18	TGATTCTAAAAGCGGCAT
phi13sieDIG-for	20	CGCTTCTTCTTACAGGAGTT
phi13sieDIG-rev	18	GAAATCGCTACCAGCTGA
phi13sakDIG-for	21	TGTAGTCCCAGGTTTAATAGG
phi13sakDIG-rev	18	CGCGAGTTATTTTGAACC

Alle Oligos wurden für die Stock-Lösung zu einer Endkonzentration von pmol/μl in NFW gelöst und bei – 20 °C aufbewahrt. Für die tatsächliche PCR wurden in 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen 1:10-Verdünnungen mit 10 μl der Stock-Lösung und 90 μl NFW hergestellt. Die PCR wurde mit dem unten aufgeführten PCR-Mix durchgeführt, dieser wurde stets in einer Kühthalterung gelagert und die *Taq* DNA- Polymerase High Fidelity wurde erst direkt vor der Inkubation hinzugegeben und ein sog. Heißstart durchgeführt.

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

Reagenz	Menge
Nukleasefreies Wasser	32,25 µl
10 x Reaktionspuffer	5 µl
MgCl ₂	4 µl
PCR-Mix (Dig-markiert)	2,5 µl
NTPs	2,5 µl
Primer rev	1 µl
Primer for	1 µl
<i>Taq</i> DNA- Polymerase	0,75 µl
DNA	1 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde für die Amplifikation verwendet:

Tabelle 4: Temperaturprofil zur Herstellung DIG-markierter Gensonden

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

Nach erfolgter Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und zur Größenbestimmung mit dem molekularen Gewichtsmarker „0,5-10 kbp RNA Ladder“ (Invitrogen) verglichen.

Die Aufreinigung erfolgte mit dem „NucleoSpin Extract II-Kit (Macherey-Nagel), entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

Nach der Reinigung wurden die Sonden mit 50 µl PCR-Wasser verdünnt und bei – 20 °C aufbewahrt.

2.9.6 Hybridisierung

Zunächst wurden die Northern Blots in Glaszylindern in 10 ml Hybridisierungspuffer „High-SDS“ für 30 Minuten bei 64 °C vorhybridisiert. Dieser musste zuvor bei 100 °C unter Rühren für ca. 60 Minuten erwärmt werden. Die tatsächliche Hybridisierung erfolgte über Nacht mit 5 µl der DIG-markierten Sonden, welche zuvor in 10 ml High-SDS gelöst wurden. Nach 20 Minuten der Vorinkubation wurden die Falcons mit den Sonden zur Denaturierung für 10 Minuten in 100 °C warmem Wasserbad erwärmt. Nach erfolgter Vorinkubation wurde der „High-SDS“-Puffer aus den Glaszylindern geleert und die in „High-SDS“-Puffer gelösten Sonden hineingegeben.

2.9.7 Detektion

Am Folgetag wurden die Sonden aus den Glaszylindern wieder zurück in die Falcons überführt. Diese wurden bei – 20 °C aufbewahrt und konnten nach erneuter Denaturierung wiederverwendet werden.

Nun schlossen sich mehrere Waschschritte an, während welcher sich die Glaszylinder in einem speziellen Ofen permanent um ihre Längsachse drehen: zweimaliges Waschen mit 10 ml 2 x SSC gemischt mit 0,1 % SDS für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur sowie zweimaliges Waschen mit 10 ml 0,2 x SSC gemischt mit 0,1 % SDS für jeweils 15 Minuten bei 64° C im zuvor aufgewärmten Ofen.

Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, es wurde das „DIG Wash and Block Buffer Set ROCHE“ verwendet:

Zu Beginn Waschen der Northern Blots für eine Minuten im Ofen in einem Schluck Waschpuffer und anschließendes Blocken dieser mittels 10 ml Blockierungslösung aus dem Set für 30 Minuten. Anschließend erfolgte für exakt 30 Minuten die Inkubation mit 1 µl Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP), welcher in 10 ml Blockierungslösung gelöst worden war. Dem schloss sich

zweimaliges Waschen mit 10 ml Waschpuffer für jeweils 15 Minuten an, woraufhin die Northern Blots für 2 Minuten in 1 ml Detektionspuffer zur Vordetektion inkubiert wurden. Nun erfolgte die Detektion in 1 ml Detektionspuffer gelöstem 10 µl CSPD für 5 Minuten. Danach wurde die Membran luftblasenfrei in Saranfolie eingeschlagen und auf ein bis zwei Röntgenfilme aufgelegt. Zur Aktivierung des CSPD wurde die Filmkassette für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einer Belichtungszeit von 30 Minuten bis 12 Stunden wurde der Film im Röntgenfilmentwickler „Curix 60“ (Agfa) entwickelt und digital abfotografiert.

2.10.1 Absolute und relative quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Mittels LightCycler untersuchten wir zwei unterschiedliche Fragestellungen.

Einerseits untersuchten wir RNA und DNA der Proben, welche wir in den Northern Blots aufgearbeitet haben. Ziel war es hier, die Ergebnisse der Northern Blots für die Integrase (*int*) zu verifizieren, dazu untersuchten wir die Transkription der Gene *int* und *gyr* und setzten diese ins Verhältnis zur Phagenreplikation pro Zelle, wozu wir *attP*-Stellen und *gyr*-Kopien pro Zelle nachwiesen. Hierzu wurden die Phagen wie oben beschrieben induziert, es wurden nicht induzierte und induzierte Proben analysiert.

Die zweite Frage beschäftigte sich mit dem Einfluss des Sigma-Faktors σ^H auf *int* und die Phagenreplikation (*attP*-Stellen-Nachweis). Hierzu wurden Proben zu den $OD_{600} = 0,2, 0,4$ und $0,5$ isoliert und die enthaltene RNA untersucht. Wir untersuchten die Expression von *int* und *gyr* und bestimmten wieder die *attP*-Stellen pro *gyr*-Kopie.

2.10.2 RNA-Isolation

Die RNA wurde zuerst wie oben unter „2.9.2 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung“ für die Northern Blots beschrieben isoliert. Anschließend wurde die Verdauung von DNA in den Proben durchgeführt,

sodass keine Wechselwirkungen mit DNA stattfanden. Hierzu wurde pro Probe das Volumen, das 5 µg RNA enthielt in einem Reaktionsgefäß mit NFW auf ein Gesamtvolumen auf 50 µl aufgefüllt. Zu diesen wurden im nächsten Schritt jeweils 8 µl des unten stehenden Mastermixes hinzugegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert.

Tabelle 5: Mastermix zur Verdauung von DNA in RNA-Proben

Reagenz	Volumen
DNase	2 µl
RNAsin	1 µl
Inkubationspuffer (ROCHE)	5 µl

Der DNA-Verdauungsprozess wurde durch Zugabe von 8 µl DNase-Inaktivierungsreagenz pro Probe gestoppt. Die Proben wurden anschließend bei RT für 2-3 Minuten geschüttelt und danach mit 10000 UpM bei RT für 1 Minute zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und eingefroren oder gleich per PCR weiter untersucht. Für die LightCycler-PCR wurden 1:10-Verdünnungen aus 1 µl RNA und 9 µl NFW hergestellt.

2.10.3 Relative quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR)

Im Falle von zuvor eingefrorenen Proben wurden diese vor dem Verdünnen auf Eis aufgetaut und in einem Verhältnis von 1:10 mit NFW verdünnt. Von jeder Probe wurden Doppelwerte bestimmt. Es wurden die unten aufgeführten Reagenzien, Oligosequenzen und Temperaturprofile im LightCycler verwendet:

Tabelle 6: QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit für die relative qRT-PCR (Qiagen)

Reagenz	Menge
2 x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix	5,0 µl
Primer for	1,0 µl
Primer rev	1,0 µl
QuantiFast RT Enzym Mix	0,1 µl
NFW	1,9 µl
RNA	1,0 µl

Tabelle 7: RNA-Primer für die relative qRT-PCR

Name	Länge	Oligosequenz
gyr297	24	TTAGTGTGGGAAATTGTCGATAAT
gyr574	23	AGTCTTGTGACAATGCGTTTACA
Φ13intLC-for2	18	GCACCACTGACACGACAA
Φ13intLC-rev2	18	ACGGTGCTATTCGGTCAG

Tabelle 8: Temperaturprofil der SYBR Green qRT-PCR zur RNA-Amplifikation

Temperatur	Zeit	Zyklen	Funktion
50°C	10 min	1	Reverse Transkription
95°C	5 min	1	Denaturierung
95°C	10 s	40	Quantifikation
55°C	10 s		
72°C	30 s		

Mit den erhobenen Daten wurden relative Quantifizierungen der Expression der $\Phi 13int$ (virale $\Phi 13$ -Integrase) im Verhältnis zur *gyr*-Expression berechnet, da diese konstitutiv exprimiert wird.

2.10.4 DNA-Isolation

Zur Isolation der chromosomalen DNA wurden 2 ml der Flüssigkulturen aus denen wir auch die RNA isolierten in Zentrifugenplastikröhrchen überführt und für 3 Minuten bei 10000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 1 ml TE resuspendiert und in verschraubbare Reaktionsgefäße („Screw-cups“) überführt, welche zuvor bis zur 0,5 ml-Markierung mit Zirconium-Silicia-Kügelchen befüllt worden waren. Diese Proben wurden nun im Schüttler zwei Mal mit 6500 UpM für jeweils 20 Sekunden geschüttelt. Die Reaktionsgefäße wurden im Anschluss für 2 Minuten in kochendem Wasser erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Der so gewonnene Überstand konnte nun bei -20 °C aufbewahrt oder direkt weiter verarbeitet werden.

2.10.5 Absolute quantitative Real-time-PCR (qPCR)

Die zu untersuchenden Proben wurden in einem Verhältnis von 1:100 mit NFW verdünnt. Im Falle von zuvor eingefrorenen Proben wurden diese vor dem Verdünnen auf Eis aufgetaut. Von jeder Probe wurden Doppelwerte bestimmt. Es wurden die unten aufgeführten Reagenzien, Temperaturprofile und Oligosequenzen verwendet:

Tabelle 9: QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) für die quantitative PCR (qPCR)

Reagenz	Menge
2 x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	5,0 µl
Primer rev	1,0 µl
Primer for	1,0 µl
NFW	2,0 µl
DNA	1,0 µl

Tabelle 10: DNA-Primer für die qRT-PCR

Name	Länge	Oligosequenz
gyr297	24	TTAGTGTGGGAAATTGTCGATAAT
gyr574	23	AGTCTTGTGACAATGCGTTTACA
circleΦ13-for	24	TCTAGCTTTTGGGGTGTACATTCC
circleΦ13-rev	22	GCTTTGAAATCAGCCTGTAGAG

Tabelle 11: Temperaturprofil der SYBR Green qPCR zur DNA-Amplifikation

Temperatur	Zeit	Zyklen	Funktion
95°C	5 min	1	Denaturierung
95°C	10 min	40	PCR
55°C	10 min		
72°C	30 min		

Es erfolgte eine absolute quantitative Bestimmung der Gensequenz *circleΦ13* (*attP*) und des Gens *gyr* (Gyrase). Hierzu wurden in der Arbeitsgruppe absolute

Standards hergestellt, mit denen die absolute Kopienanzahl der Gene in unseren Proben bestimmt wurde.

2.11.1 Herstellen von σ^H -defizienten Mutanten mittels Transduktion

Um den Einfluss von σ^H auf die Integraseexpression von $\Phi 13$ zu untersuchen stellten wir mittels Transduktion die σ^H -defizienten Mutanten 8325-4 $\Phi 13$, $\Delta\sigma^H$ und MW2c $\Phi 13$, $\Delta\sigma^H$. Hierzu wurde das durch eine Erythromycin B-Resistenzkassette ersetzte σ^H aus dem Stamm Newman, $\Delta\sigma^H$ in die Zielstämme 8325-4 $\Phi 13$ und MW2c $\Phi 13$ transduziert.

2.11.2 Lysatherstellung

Ausstreichen des Stamms Newman, $\Delta\sigma^H$ auf einer TSA-Platte, welche 10 $\mu\text{g/ml}$ Erythromycin enthält und anschließendes Bebrüten dieser bei 37 °C im Brutofen über Nacht.

Aufschmelzen von TSA-Top-Agar und Abkühlen dieses auf 48 °C. Entnehmen eines ca. 3 mm langen Streifens der über Nacht gewachsenen Bakterien von der TSA-Platte und suspendieren dieses in 0,5 ml Phagenpuffer bis zum Entstehen einer leichten Trübung. Anschließend Zugabe von 850 μl $\Phi 80\alpha$ -Lysat zu den im Phagenpuffer suspendierten Bakterien. $\Phi 80\alpha$ ist ein transduzierender, sog. „head-full“-Phage, der nicht die eigene, zuvor vom Wirt replizierte DNA, sondern auf die Größe des eigenen Genoms zerschnittene Genomstücke der Wirts-DNA in den Phagenkopf verpackt. Bei einem Teil der zufällig verpackten DNA handelt es sich um den gewünschten Genomabschnitt, nämlich das durch eine Erythromycinresistenzkassette ersetzte σ^H .

Mischen der in Phagenpuffer aufgelösten Bakterien und Phagen mit 4 ml TSA-Top-Agar und Verteilen der Mischung auf eine TSA-100 mM- CaCl_2 -Platte durch Schwenken. Im Anschluss Inkubation der Platte bei 37 °C für ca. 6 Stunden. Gleichzeitig wurde eine Kontrolle ohne Phagen nach der gleichen Vorgehensweise hergestellt.

Nach erfolgter Inkubation, Gabe von 3ml TSB auf die Platten, Ablösen der obersten Schicht mit Hilfe einer Stangenpipette und Zerkleinern dieser Schicht in möglichst kleine Stücke. Überführen des Gemisches aus Agar-Schicht und Medium in einen Falcon sowie Mischen dieses mittels Auf-und-Ab-Ziehen in der Pipette bis zum Entstehen einer homogenen Masse. Die Proben werden nun für 10 Minuten in einem Wasserbad bei 40-50 °C in den Falkons mittels der Pipette gemischt. Daraufhin Zentrifugation der Proben mit 5000 g für 10 Minuten bei 4 °C, Sterilfiltrieren des Überstandes mittels eines 0,22 µm-Filters und Lagerung des Lysats bei 4-8 °C.

2.11.3 Transduktion

Suspension einiger Kolonien der Zielstämme 8325-4Φ13, MW2cΦ13, 8325-4Φ13KanA und MW2cΦ13KanA jeweils in 600 µl Phagenpuffer. Jeweils 200 µl der Suspension wurden mit 10 µl Lysat und 100 µl Lysat versetzt, die Kontrolle enthielt kein Lysat. Anschließende Inkubation der Suspensionen bei 37 °C für 10 Minuten. Nach Zugabe von 3,4 ml bei 48°C aufgeschmolzenem Phagen-Top-Agar und zweimaligem Invertieren, Verteilen des Agars durch Schwenken auf einer 10 µg/ml Erythromycin-TSA-Platte und Inkubation dieser bei 37 °C für 1-2 Tage. Picken von phagenfrei erscheinenden Bakterienkolonien und Anfertigen eines 3-Ösen-Ausstrichs auf 10 µg/ml Erythromycin-TSA-Platten. Wiederholen dieses Vorgangs bis nur noch phagenfreie Bakterienkolonien, also ohne erkennbare Lyse, wachsen.

2.11.4 Überprüfung der Transduktanten

Um die Transduktanten zu überprüfen wurden sowohl die Erythromycin-Resistenzkassette in den Mutanten 8325-4Φ13, ΔsigH und MW2cΦ13, ΔsigH, als auch σ^H durch PCR in den beiden WT 8325-4Φ13 und MW2cΦ13 nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Mutanten auf MH-Blut-Platten ausgestrichen, um zu überprüfen ob Φ13 weiterhin integriert war und deren Hämolyseverhalten mit dem der WT verglichen.

2.11.5 Überprüfung der Wildtypen (WT) und Mutanten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese

DNA-Isolation für Überprüfungs-PCR

Zur Isolierung der DNA wurden einige Bakterienkolonien der gewünschten Stämme in 1 ml 1 x TE in Reaktionsgefäßen resuspendiert. Nach Zentrifugieren der Suspension bei 10000 RPM bei 4 °C für 3 Minuten wurde der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend wurden die Pellets in 100 µl TE resuspendiert, es wurden 3 µl Lysostaphin hinzugegeben und die Suspension anschließend für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert bis diese klar war. Nun wurden 400 µl Proteolysepuffer und 10 µl Proteinase K hinzugegeben, es folgte eine Inkubation des Reaktionsgefäßes mit der Suspension in einem 55 °C warmen Wasserbad für 60 Minuten sowie eine darauffolgende Inkubation im Heizblock bei 95 °C für 10 Minuten. Für die anschließende PCR wurden Verdünnungen im Verhältnis von 1:10 mit NFW bis zu einem Gesamtvolumen von 100 µl hergestellt.

PCR

Das Pipettieren des Mastermixes erfolgte in einer Sterilbank, pro Probe wurde der unten stehende 25 µl-Ansatz gewählt. Da beim Pipettieren stets geringe Mengen des Mastermixes an den Pipettenspitzen verbleiben, wurde dieser stets für 2 Proben mehr als tatsächlich benötigt hergestellt. Die Reagenzien wurden im Kühlblock aufbewahrt und, mit Ausnahme der Taq-Polymerase, vor dem Gebrauch gevortext.

Zum Nachweis der $_{Erm}B$ -Resistenzkassette in den Mutanten und σ^H in den WT wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Oligos verwendet. Als Positivkontrolle wurde DNA des Stamms 8325-4Φ13 verwendet.

Tabelle 12: Oligonukleotide zur Herstellung von Primern

Name	Länge	Oligosequenz
ermBDIG-for	18	ATTGGAACAGGTAAAGGG
ermBDIG-rev	18	TTGCTCATAAGTAACGGTA
sigHDIG-for	22	ATGATTTGACAACACTCAAGACAG
sigHDIG-rev	22	CGGCTTATATTGTTTCACACATT

Tabelle 13: Mastermix für „hot start“-PCR

Reagenz	Menge
NFW	16,25 µl
10 x Reaktionspuffer	2,50 µl
NTPs	2,00 µl
MgCl ₂	1,00 µl
Primer for	1,00 µl
Primer rev	1,00 µl
HotStar <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,25 µl
DNA-Template	1,00 µl

Tabelle 15: Temperaturprofil der PCR zur Amplifikation

Temperatur	Zeit	Zyklen	Funktion
95 °C	15 min	1	Denaturierung
95 °C	1 min	35	Annealing
43 – 46 C	30 s		
72 °C	1 min		
72 °C	10 min	1	Verlängerung

2.11.6 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Gele mit 1% DNA-Agarose hergestellt, diese wurde in 1 x TAE aufgelöst. In Abhängigkeit der Gelgröße wurden 0,4 g DNA-Agarose für ein kleines Gel und 0,7 g dieser für ein großes Gel jeweils in 40 ml bzw. 70 ml 1 x TAE gelöst. Nach ca. 5 Minuten wurden entsprechend der Größe 4 µl bzw. 7 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel direkt im Anschluss in eine Gusskammer gegossen. Nun wurden in der Anzahl der zu untersuchenden Proben 3 µl BlueJuice auf ein Stück Parafilm vorgelegt, im nächsten Schritt mit 5 µl Probe durch auf- und abpipettieren vermischt und jeweils eine Probe in eine Tasche des Gels pipettiert. Zur Größenbestimmung wurden 3 µl eines „100 bp +-“-Längenmarkers (Fermetas) mitgeführt. Entsprechend der Gelgröße wurde eine Spannung von 80-90 V bei einem kleinen Gel und 120-130 Volt bei einem großen Gel angelegt, als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Nachdem die Proben das Gel durchlaufen hatten wurde das Gel unter UV-Licht „Dark Hood DH 30/32“ fotografiert.

3. Ergebnisse

3.1.1. Phagentransferexperimente mit dem resistenzmarkierten Phagen Φ 13KanA und den resistenzmarkierten *S. aureus*- Stämmen 8325-4Tet, 8325-4Strep und MW2cStrep

Prinzip der Transferexperimente

Für die Detektion des Phagentransfers wurden resistente Rezipienten- und Donorstämme konstruiert. Dabei wurde einerseits der Phage in den lysogenen Donorstämmen durch Einbringen einer KanA-Resistenzkassette verändert. Der mutierte Phage wurde als Φ 13KanA bezeichnet. Phagenfreie Rezipientenstämme (Delysogene) wurden durch Tetracyclin- bzw. Streptomycin-Resistenzgene markiert. Es sollte der Transfer des resistenzmarkierten Phagen aus dem Donorstamm in den phagenfreien Rezipientenstamm (Delysogen) untersucht werden. Bei erfolgreichem Transfer, verfügt der Phagenrezipientenstamm sowohl über die bereits zuvor eingebrachte, als auch die durch den Phagen vermittelte Resistenz. Das Prinzip der Selektionsexperimente ist beispielhaft in Abbildung 8 dargestellt.

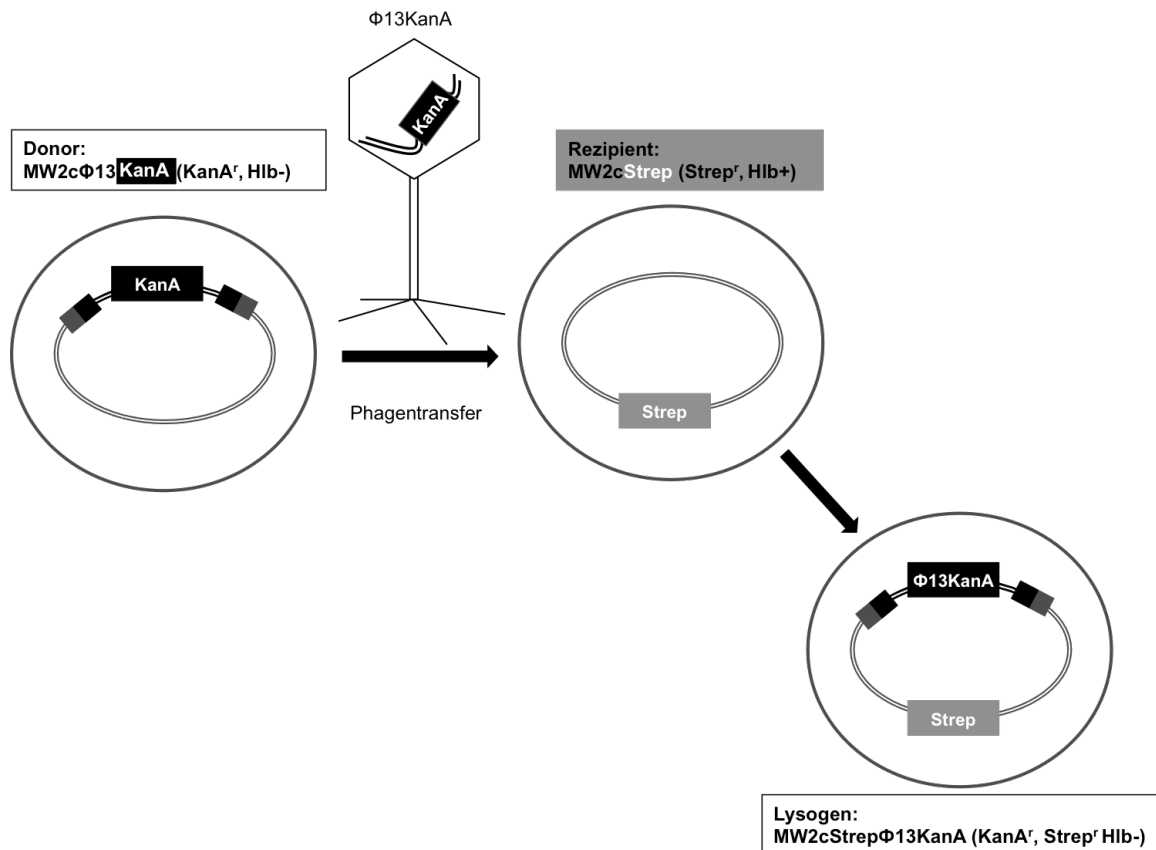


Abbildung 8: Prinzip der Phagen-Transferversuche. Erläuterungen siehe Text.

Hier transduziert $\Phi 13\text{KanA}$ aus dem Lysogen MW2c $\Phi 13\text{KanA}$ in den Phagenrezipientenstamm MW2cStrep (Delysogen), welcher nun als Lysogen gegen Kanamycin und Streptomycin resistent ist. Da $\Phi 13\text{KanA}$ spezifisch in *hIb* (kodiert für Hämolysin B) integriert, sind die lysogenisierten Empfängerstämme nicht mehr in der Lage Hämolysin B (Hlb) zu synthetisieren.

Ziel war es die Transferraten des Phagen $\Phi 13\text{KanA}$ in den zwei verschiedenen phagenfreien *S. aureus* Stämmen, 8325-4 und MW2c zu untersuchen. Als Phagendonorstämme dienten die Lysogene 8325-4 $\Phi 13\text{KanA}$ und MW2c $\Phi 13\text{KanA}$. Die Phagenrezipientenstämme 8325-4Tet, 8325-4Strep und MW2cStrep waren resistent gegen Tetracyclin bzw. Streptomycin. 8325-4Tet wurde durch chromosomale Integration des Plasmids pCL84, welches eine *tetK*-Resistenzkassette enthält, generiert. Die beiden streptomycinresistenten

Rezipientenstämme, 8325-4Strep und MW2cStrep, wurden durch Inkubation auf Streptomycinplatten selektioniert.

3.1.2 Einflussfaktor Donor-Rezipienten-Verhältnis auf den Phagentransfer

3.1.2.1 Donor-Rezipienten-Verhältnis von 1:1

Die Donorstämme 8325-4 Φ 13KanA und MW2c Φ 13KanA wurden nach Anzucht bis zur $OD_{600} = 0,7$ (exponentielle Wachstumsphase) im Verhältnis 1:1 mit dem jeweiligen Rezipientenstamm 8325-4Tet bzw. MW2cStrep gemischt und für 4 h ko-kultiviert. In beiden Experimenten konnte ein Phagentransfer beobachtet werden. Dabei war im MW2c-Hintergrund die Transferrate fast doppelt so hoch als im 8325-4 Hintergrund (0,24 % versus 0,13 %)(Abbildung 9).

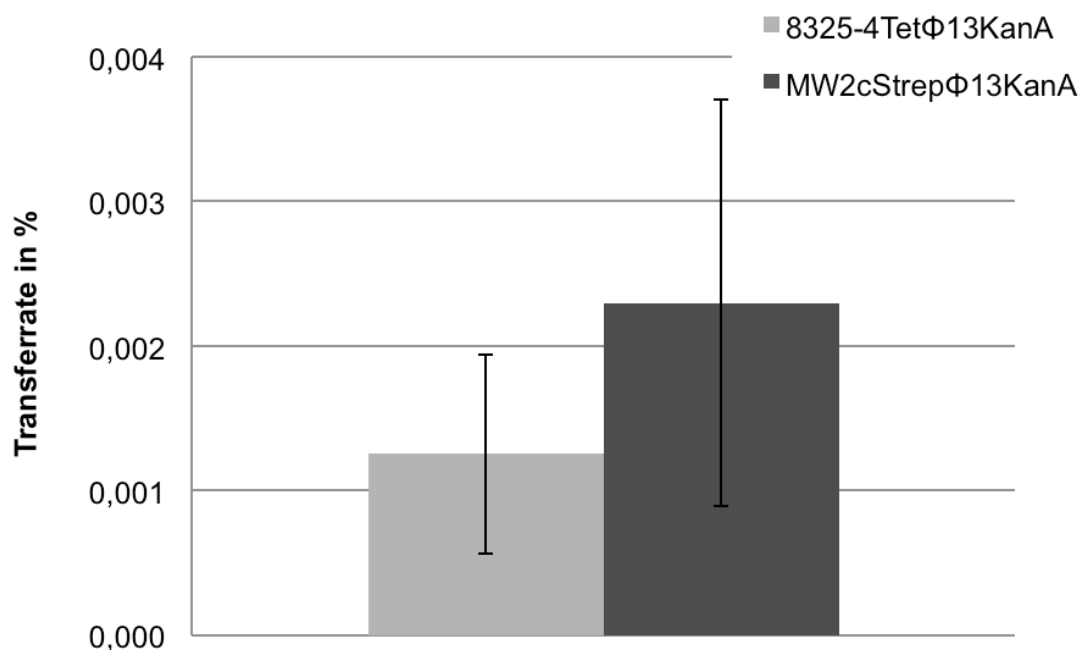


Abbildung 9: Transferraten bei einem Donor-Rezipienten-Mischverhältnis von 1:1. Donor und Rezipienten wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,7$) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 4 h ko-kultiviert. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden zwei Versuche ausgewertet (+/- Standardabweichung).

3.1.2.2 Donor-Rezipienten-Verhältnisse von 4:1 und 1:4

Um herauszufinden, welchen Einfluss das Donor-Rezipienten-Verhältnis auf die Transferrate hat, wurden Donor und Rezipienten in verschiedenen Verhältnissen ko-kultiviert. In der ersten Versuchsanordnung inkubierten wir die Donorstämme 8325-4 Φ 13 bzw. MW2c Φ 13 im Verhältnis 4:1 mit dem jeweiligen Rezipientenstamm 8325-4Tet bzw. MW2cStrep. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Transferrate nach MW2c 17-mal höher ist als nach 8325-4. Die Transferrate betrug für den 8325-4-Hintergrund 0,029% und für den MW2c-Hintergrund 0,492% (Abbildung 10). Wurde der Donor- und Rezipientenstämme jeweils im Verhältnis von 1:4 ko-kultiviert war die Transferrate bei beiden Stämmen niedriger als beim Mischverhältnis von 4:1. Wieder war die Transferrate nach MW2c höher als nach 8325-4. Im 8325-4-Hintergrund ergab sich eine Transferrate von 0,018%, im MW2c-Hintergrund lag diese bei 0,326%.

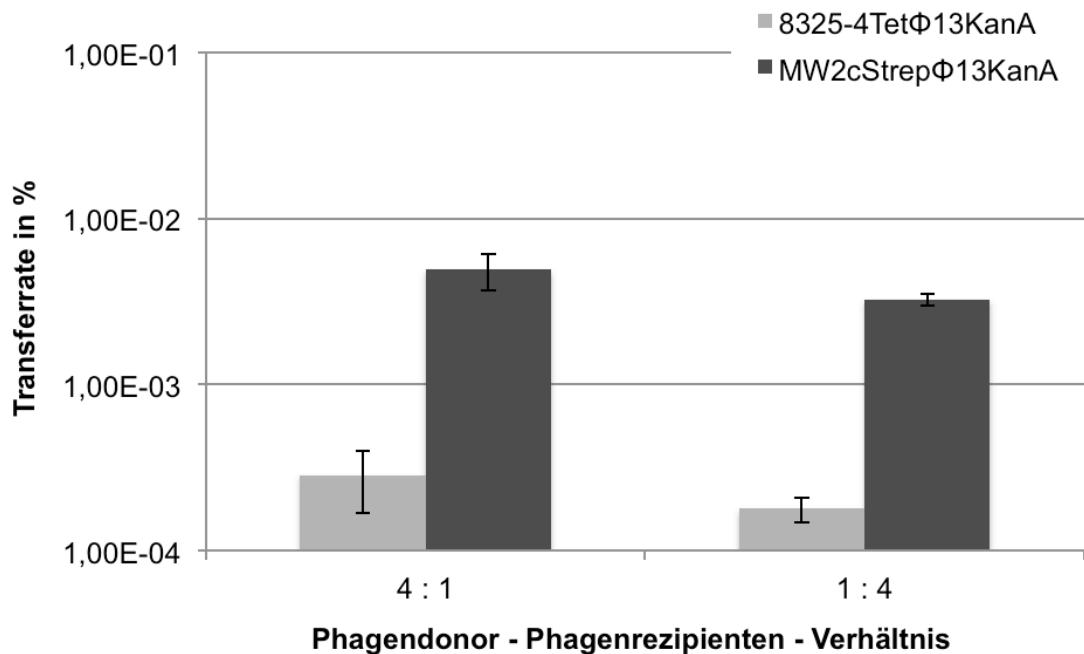


Abbildung 10: Transferraten bei einem Donor-Rezipienten-Mischverhältnis von 4:1 und 1:4. Donor und Rezipienten wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,7$) in einem Verhältnis von 4:1 bzw. 1:4 gemischt und 4 h ko-kultiviert. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden zwei Versuche ausgewertet (+/- Standardabweichung).

3.1.2.3 Einfluss der Wachstumsphase auf den Phagentransfer

Es sollte untersucht werden, ob die Wachstumsphase einen Einfluss auf die Phagentransferrate hat. Die Versuchsdurchführung blieb unverändert zum Ausgangsversuch mit einem Mischverhältnis von 1:1, lediglich die Wachstumsphase der Ausgangsstämme vor Ko-Kultur wurde variiert, die Ko-Inkubation betrug wieder 4 h.

Wurden die Donor- und Rezipientenstämme zunächst bis zur spät-exponentiellen Phase angezogen, konnten Transferanden isoliert werden. Wiederum wurden für das MW2c-Stammpaar höhere Transferraten als für die 8325-4-Stämme gefunden (Transferrate MW2c von 0,0884% versus 8325-4 von 0,0046 %) (Abbildung 11). Bei Ko-Kultur von Bakterien aus der stationären Phase waren deutlich weniger bzw. gar keine Transferanden mehr isolierbar.

Für das MW2c-Stammpaar konnte nur noch eine Transferrate von 0,0005% beobachtet werden; im Stamm 8325-4 waren keine Transferanden mehr nachweisbar.

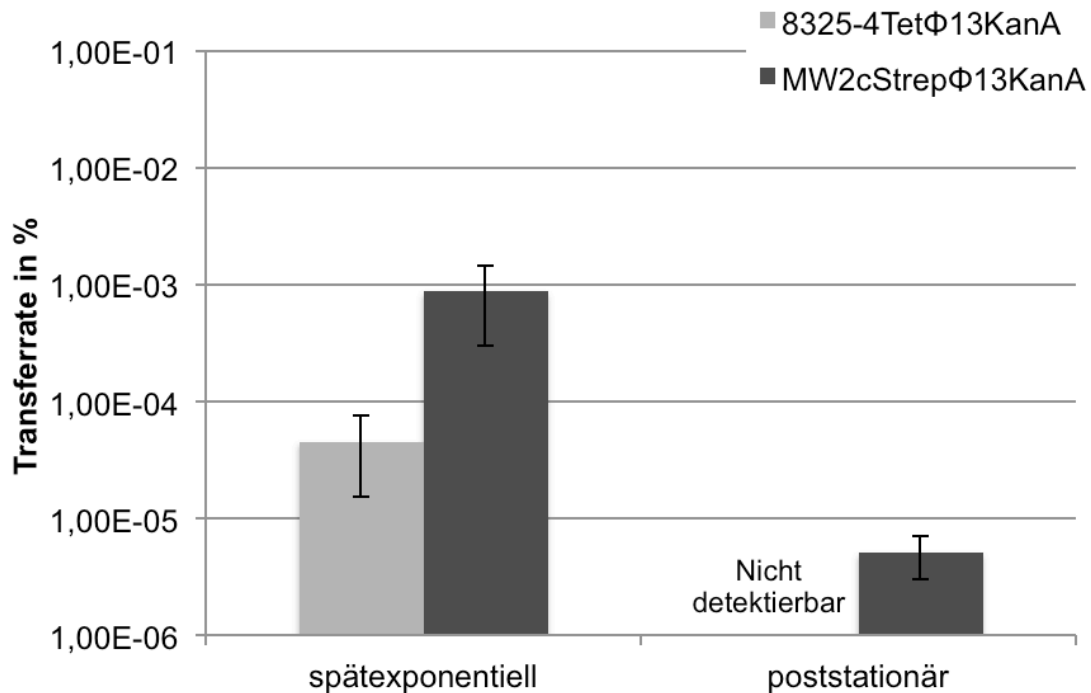


Abbildung 11: Transferraten nach Ko-kultur von Bakterien aus der spät-exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Transferraten bei einem Donor-Rezipienten-Mischverhältnis von 1:1. Donor und Rezipienten wurden aus der post-exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1,5$) bzw. stationären Phase (14 h) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 4 h ko-kultiviert. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden zwei Versuche ausgewertet (+/- Standardabweichung).

3.1.3 Kontrolle der Transferanden durch Analyse des Hämolyseverhaltens und PFGE

Um zu verifizieren, dass bei den Lysogenen der Phage in *hIb* integrierte, wurden diese auf HIb-Hämolyse und durch PFGE exemplarisch überprüft. Hierzu wurden die doppelresistenten Transferanden auf Müller-Hinton-Blut-

Agar-Platten (MH-Blut-Platten) ausgestrichen. Alle Transferanten zeigten das erwartete Hämolyseverhalten (Hlb-negativ) (siehe Abbildung 12).

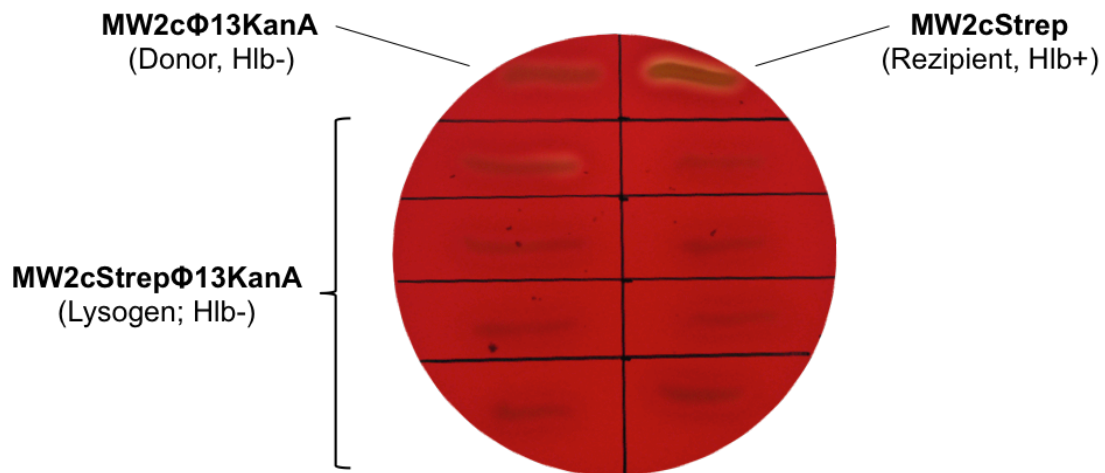


Abbildung 12: Überprüfung des Hämolyseverhaltens der Transferanten MW2cStrepΦ13KanA. Die 8 gepickten Transferanten sind Hlb-negativ. Zum Vergleich wurden der Hlb-negative Donorstamm MW2cΦ13KanA und der Hlb-positive Rezipientenstamm MW2cStrep ausgestrichen.

Darüber hinaus wurden die Transferanten durch PFGE kontrolliert. Durch Phagenintegration in *hly* kommt es zu einer Veränderung des PFGE-Bandenmusters. In Abb. 7 sind die *Sma*I-Restriktionsmuster vom Donorstamm MW2cΦ13KanA, dem Rezipientenstamm MW2cStrep und 6 Lysogenen dargestellt.

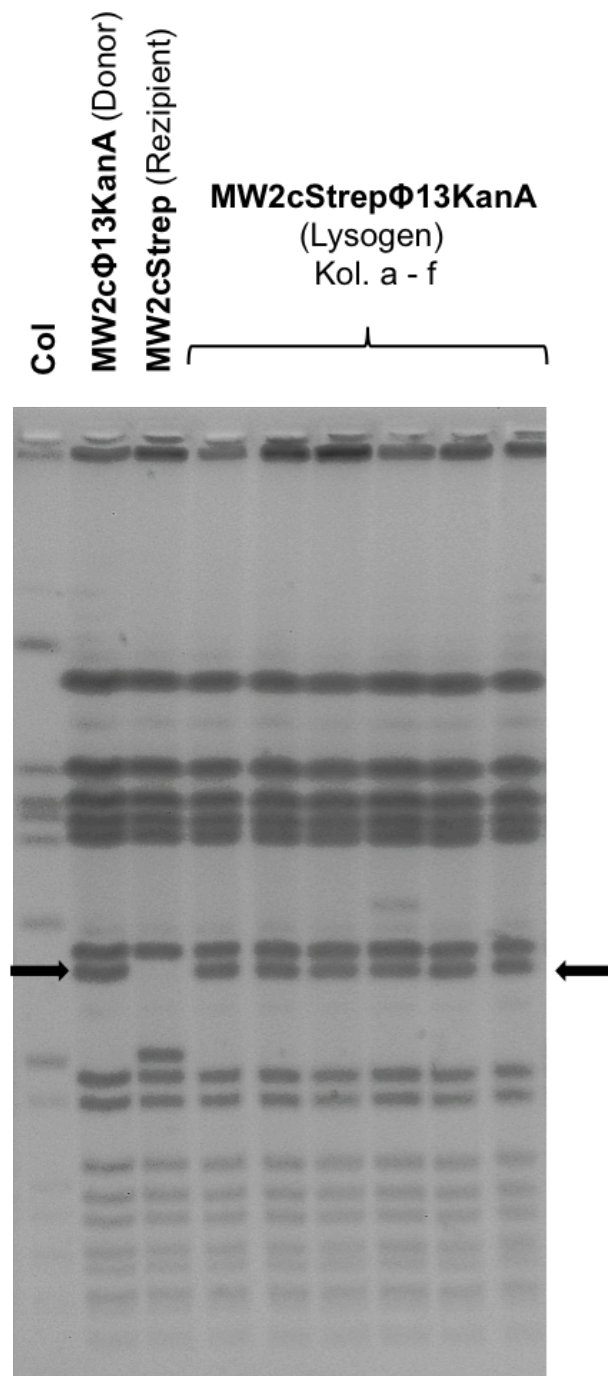


Abbildung 13: Nachweis der Phagenintegration in Transferanden durch PFGE. DNA der Stämme MW2cΦKanA, MW2cStrep und von 6 Transferandenkolonien wurde mit SmaI verdaut und die Fragmente durch PFGE aufgetrennt. Die Integration von Φ13KanA ist durch die Größenveränderung der angezeigten Bande erkennbar (schwarzer Pfeil). Alle Transferanden (MW2cStrepΦ13KanA) zeigten das gleiche Bandenmuster wie der Donorstamm MW2cΦ13KanA.

3.1.4 Phagen-Transferversuch mit 8325-4 Φ 13Strep als Rezipienten

Für die bisherigen Transferversuche war der Rezipienten-Stamm 8325-4 durch Tetracyclin-Resistenz, der MW2c-Rezipientenstamm jedoch durch Streptomycin-Resistenz markiert. Um auszuschließen, dass die beobachteten stammspezifischen Unterschiede durch die unterschiedliche Antibiotikaselektion bedingt sind, sollte ein Streptomycin-resistenter 8325-4-Rezipientenstamm verwendet werden.

3.1.4.1 Herstellung des Rezipientenstamms 8325-4Strep

Den neuen Rezipientenstamm 8325-4Strep, gewannen wir durch Selektion von spontanresistenten Kolonien. Hierzu wurde der Stamm 8325-4 in TSB bis zu einer OD = 0,7 angezogen und dann auf TSA-Streptomycinplatten (100 μ g/ml) ausplattiert und 37°C bebrütet. Resistente Kolonien wurden subkultiviert und auf Hämolyseverhalten und Streptomycinresistenz (500 μ g/ml) untersucht. Alle gepickten Kolonien waren korrekt Hlb-positiv, wie der Ausgangsstamm 8325-4 und zeigten eine deutliche Streptomycinresistenz.

3.1.4.2 Donor-Rezipienten-Verhältnis von 1:1

Die Transferversuche wurden wie unter 3.1.2.1 beschrieben durchgeführt. Hier konnte erneut gezeigt werden, dass die Transferrate in 8325-4-Hintergrund deutlich niedriger ist als im MW2-Hintergrund (Abbildung 14).

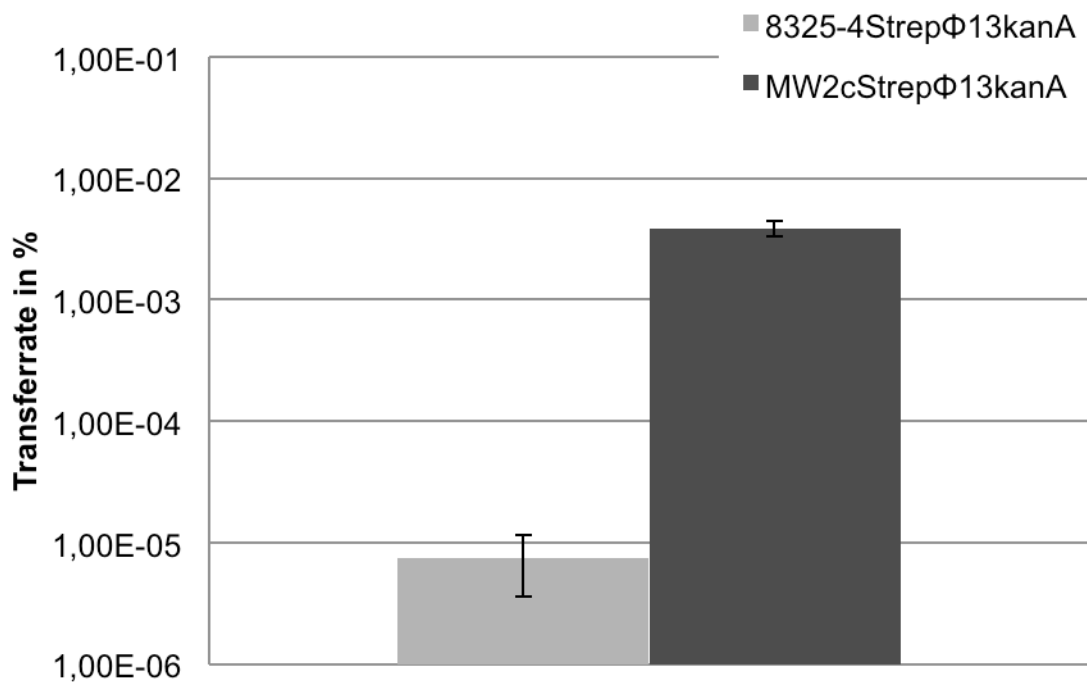


Abbildung 14: Transferraten bei einem Donor-Rezipienten-Mischverhältnis von 1:1. Donor und Rezipienten wurden aus der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,7$) in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 4 h ko-kultiviert. In beiden Experimenten wurden Streptomycin-resistente Rezipienten verwendet. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden zwei Versuche ausgewertet (+/- Standardabweichung).

3.2 Northern Blot-Analyse ausgewählter lysogener und lytischer Gene von $\Phi 13$

3.2.1 Northern Blots

Mithilfe von DNA-Sonden sollte die Genexpression von sieben phagencodierten Genen nach Mitomycininduktion untersucht werden. Ziel war es Unterschiede in der Genexpression zu finden, die mit den beobachteten stammspezifischen Unterschieden der Transferraten korrelieren. Für das lysogene Modul wurden die Gene *clr* (CI-like repressor), *int* (Integrase) und *orf C* (Open reading frame

C), für typische Gene des lytischen Zyklus *cro* (Control of repressors and other genes), *ant* (Anti-repressor), *ter* (Terminase) und *sak* (Staphylokinase) ausgewählt. Nach Anzucht der Stämme 8325-4Φ13 und MW2cΦ13 zu einer OD₆₀₀=0,7 wurden die Phagen mit 300 ng/ml Mitomycin induziert. Nach weiterer Inkubation für 0,5 h (t1) bzw. 2h (t2) wurden die Bakterien pelletiert und die RNA isoliert. Zusätzlich wurde nach 2 Stunden eine nicht-induzierte Kontrolle (K0) pro Stamm geerntet. 5 µg Gesamt-RNA wurden jeweils im Agarosegel aufgetragen, geblottet und mit entsprechenden Gensonden hybridisiert.

3.2.1.2 Stärke Aktivierung der lytischen Gene im Stamm MW2cΦ13

Die Northern Blot-Analyse zeigte, dass alle von uns untersuchten lytischen Gene *cro* (ORF ca.224 bp, von 3307 bp bis 3531 bp), *ant* (ORF 749 bp, von 4429 bp bis 5178 bp), *ter* (ORF 1694 bp, von 17554 bp bis 19248 bp) und *sak* (ORF 491 bp, von 38467 bp bis 38958 bp) im Stamm MW2c stärker transkribiert werden als im 8325-4 Hintergrund (Abbildung 15).

Dies korreliert mit den Ergebnissen der vorangegangenen Transferversuche, in welchen Φ13 in MW2c eine höhere Mobilität zeigt. In MW2c kommt es zu starker Induktion aller Gene bereits 0,5 h nach Mitomycinbehandlung. Durch die Hybridisierung wird deutlich, dass die lytischen Gene in Operons organisiert sind, da die Transkripte sehr viel größer sind als der jeweils untersuchte ORF (z.B. *sak* nur ca. 491 kb), es sind jedoch mehrere *sak*-Transkripte nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass *sak* in einem Operon mit den benachbarten Genen co-transkribiert wird. Die *sak*-Transkripte könnten durch unterschiedliche Promotoren oder durch Prozessierung eines nativen Transkripts entstehen.

3.2.1.3 Stammspezifische Expression der lysogenen Gene

Das lysogene Modul beinhaltet drei annotierte Gene: *clr*, *orf C* und *int*. Die Transkriptionsanalyse durch Northernhybridisierung ergab ein komplexes Transkriptionsmuster, wobei die Gene wahrscheinlich zum Teil ko-transkribiert werden.

Clr

Mit den Sonden für den *clr* (ORF 614 bp, von 1204 bp bis 1818 bp) waren drei Transkripte mit ca. 1,3 kbp (T1), 2,1 kbp (T2) und 4,8 kbp (T3) detektierbar (Abbildung 15).

Die Transkription des ca. 1,3 kbp großen Transkripts (T1) ist in 8325-4Φ13 0,5 h nach Inkubation etwas prominenter als nach 2 h. In MW2cΦ13 hingegen steigt die Transkription zwischen 0,5 h und 2 h deutlich an. Im Vergleich zu 8325-4Φ13 ist sie auch wesentlich höher.

Das ca. 2,1 kbp große Transkript (T2) wird sowohl in 8325-4Φ13, als auch in MW2cΦ13 nach 0,5 h deutlich stärker transkribiert als nach 2 h. Obwohl der Clr nach dem Lambda-Modell den gesamten lytischen Genomteil blockiert, wird dieser in MW2cΦ13 0,5 h nach der Induktion fast gleichstark wie in 8325-4Φ13 exprimiert. Nach 2 h fällt die Transkription in beiden Stämmen deutlich ab, diese ist in MW2cΦ13 fast nicht mehr nachweisbar. Dieses Transkript entspricht wahrscheinlich dem 2,1 kbp großen Transkript, welches auch im *orf C*-Northern Blot zu sehen ist. Die nicht induzierten Kontrollen zeigen interessanterweise nur in MW2cΦ13 eine leichte Bande bei ca. 2,1 kbp.

Das ca. 4,8 kbp große Transkript (T3) ist nur nach 0,5 h in 8325-4Φ13 zu sehen. Eine ähnliche Transkriptgröße wird durch die *int*-Sonde detektiert.

Int

Der *int*-Northern Blot zeigt Banden bei ca. 1,5 kbp (T6), 2,5 kbp (T5) und 4,8 kbp (T3). Dies ist überraschend, da das *int*-Gen nur 1038 bps (ORF 1038 bp, von 59 bp bis 1096 bp) groß ist. Die nicht induzierten Kontrollen weisen keine Banden auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Annahme, dass *int* sowohl für die Integration als auch Exzision notwendig ist und während der Lysogenie nur geringfügig exprimiert wird [18].

Das kleinste ca. 1,5 kbp große Transkript ist in 8325-4Φ13 in beiden induzierten Proben in geringen Mengen vorhanden. In MW2cΦ13 hingegen steigt die Transkription nach 2 h deutlich an.

Das 2,5 kbp große Transkript ist in 8325-4Φ13 nach 0,5 h stärker als nach 2 h zu sehen. In MW2cΦ13 sind nach 2 h wesentlich größere Transkriptmengen vorhanden als nach 0,5 h.

Beiden Stämmen ist gemeinsam, dass sich die Transkriptmengen des ca. 4,8 kbp großen Transkripts (T3) zwischen den zwei Probezeitpunkten verringern.

Orf C (ORF 615 bp, von 1204 bp – 1818 bp)

Dieser Northern Blot wird hier zuletzt besprochen, da er zwar im lysogenen Modul liegt, laut landolo jedoch vermutlich für eine Exzisionase kodiert und somit funktionell gesehen zu den lytischen Genen zählt [18].

Im *orf C*-Northern Blot (ORF 615 bp, von 1204 bp – 1818 bp) sind zwei Transkripte bei ca. 0,8 (T4) und 2,1 kbp (T2) zu sehen.

Das 0,8 kbp große Transkript (T4) ist in 8325-4Φ13 kaum zu sehen, in MW2cΦ13 hingegen ist die Transkription deutlich gesteigert und nimmt zwischen 0,5 und 2 h deutlich zu.

Das ca. 2,1 kbp große Transkript (T2) wird in beiden Stämmen nur geringen Mengen transkribiert, in 8325-4Φ13 schwächer als in MW2cΦ13 mit einer Expressionsabnahme zwischen 0,5 und 2 h. Das Transkript ist nach 2 h in

MW2cΦ13 nicht mehr zu sehen. Es handelt sich hierbei um das gleiche 2,1 kbp große Transkript, das im *clr*-Blot zu sehen ist.

Zusammenfassend konnte durch die Transkriptanalyse gezeigt werden, dass sich das Transkriptionsmuster zwischen 8325-4 und MW2c deutlich unterscheidet. Da jedoch in MW2c mehr Phagen induziert werden, ist ein Teil der Effekte wahrscheinlich durch das Vorliegen mehrerer Phagenkopien pro Zelle bedingt. Dies wird im folgenden „multi-copy-Effekt“ bezeichnet.

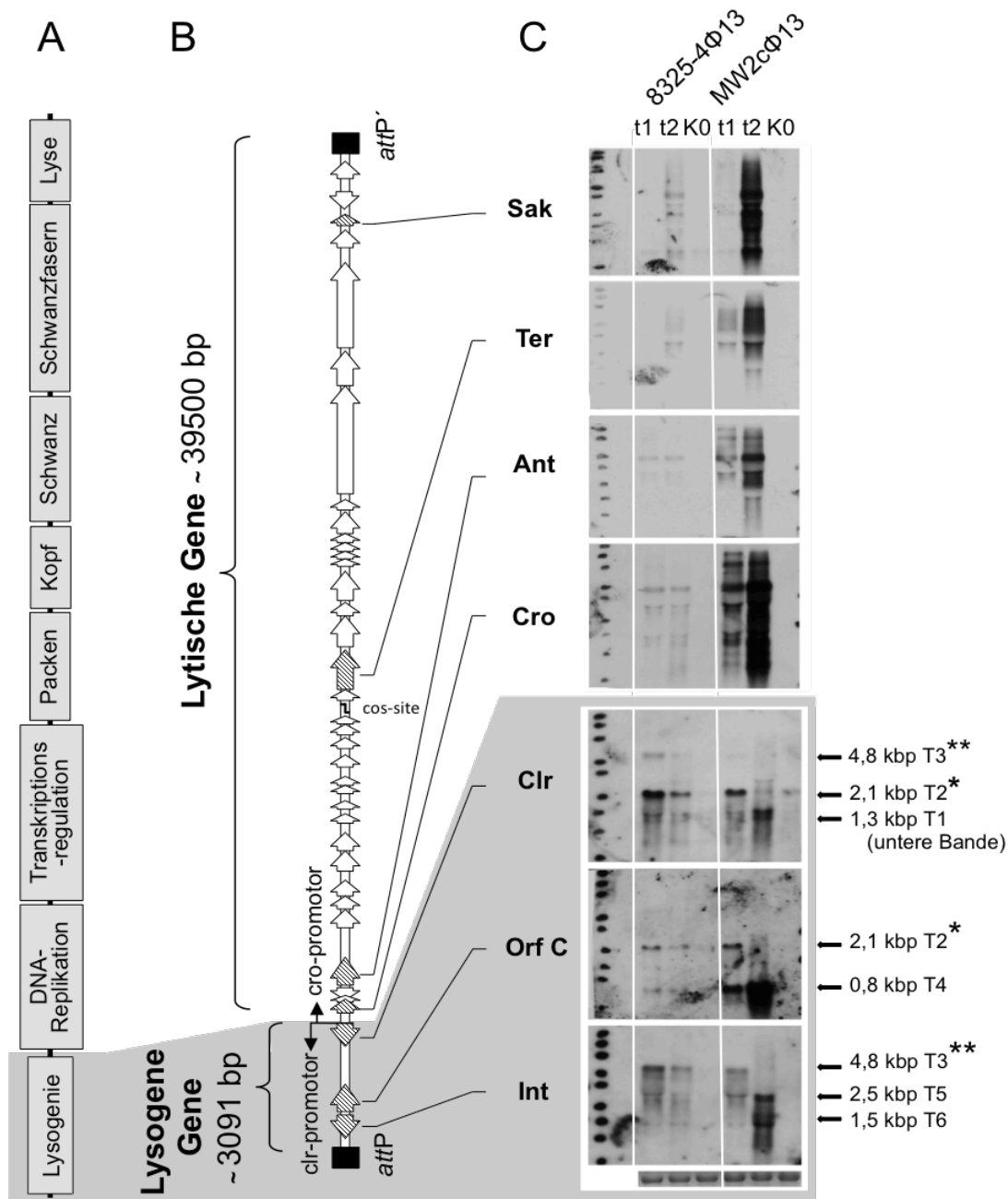


Abbildung 15: A: Anordnung der Gene in *S. aureus*-Phagen in funktionalen Gruppen nach landolo [18]. B: Schematische Darstellung des $\Phi 13$ -Genoms mit den untersuchten Genen (gestreifte Pfeile), benannt nach Proteinen Int (*integrase*), Orf C (*open reading frame C*), Clr (*cl-like repressor*), Cro (*control of repressors and other genes*), Ant (*anti-repressor*), Ter (*terminase*) und Sak (*staphylokinase*). C: Northern Blot-Analyse der untersuchten Phagengenenexpression mit und ohne Mitomycininduktion. Inkubation mit Mitomycin für 30 Minuten (t1) und 2h (t2) sowie nicht induzierte Kontrolle nach 2h. * bzw. ** - bei T1 bzw. T3 handelt es sich vermutlich um dasselbe Transkript, welches in beiden Blots zu sehen ist.

3.2.2 Quantifizierung der Transkriptionsanalyse mittels relativer qRT-PCR und absoluter qPCR

Ziel der folgenden Untersuchung war die Quantifizierung der in der Northern Blot-Analyse sichtbaren Unterschiede und die Frage nach einem „multi-copy-Effekt“ zu beantworten.

Hierzu untersuchten wir die Transkriptkonzentration der Φ 13-Integrase (*int*), welche im lysogenen Modul liegt.

Im ersten Schritt führten wir eine RNA-Quantifizierung von *int* mittels relativer qRT-PCR durch. Die Bezugsgröße war ein absoluter *gyr*-Standard, da *gyr* ein house-keeping-Gen ist und vom Wirtsbakterium konstitutiv exprimiert wird.

Anschließend führten wir zur DNA-Quantifizierung eine absolute qPCR durch. Zur Zellzahlbestimmung wurde die Anzahl der *gyr*-Genkopien bestimmt, die Anzahl der Φ 13-Kopien wurde per Circle-LC durchgeführt. Mit diesem Verfahren werden neugebildete *attP*-Stellen wie oben beschrieben nachgewiesen (Abbildung 5).

Im dritten Schritt berechneten wir die Genexpression von *int* im Verhältnis zur *gyr*-Expression pro Φ 13-Genomkopie pro Wirtszelle.

3.2.2.1 8325-4 zeigt höhere *int*-Expression als MW2c

Auf RNA-Ebene zeigte sich für die *int*-Expression pro *gyr* ein unterschiedliches Bild für die beiden Stämme. In 8325-4 scheint die Expression 0,5 h nach der Induktion am höchsten, fällt nach einer weiteren halben Stunde ab und steigt wieder etwas 2 h nach der Induktion. In MW2c hingegen steigt die Expression nach Induktion kontinuierlich sehr stark an (Abbildung 16). Gemeinsam ist den beiden Stämmen, dass die *int*-Expression nach der Mitomycininduktion zunimmt. In den nicht induzierten Kontrollen ist die Expression sehr gering und sinkt zwischen den beiden Messungen.

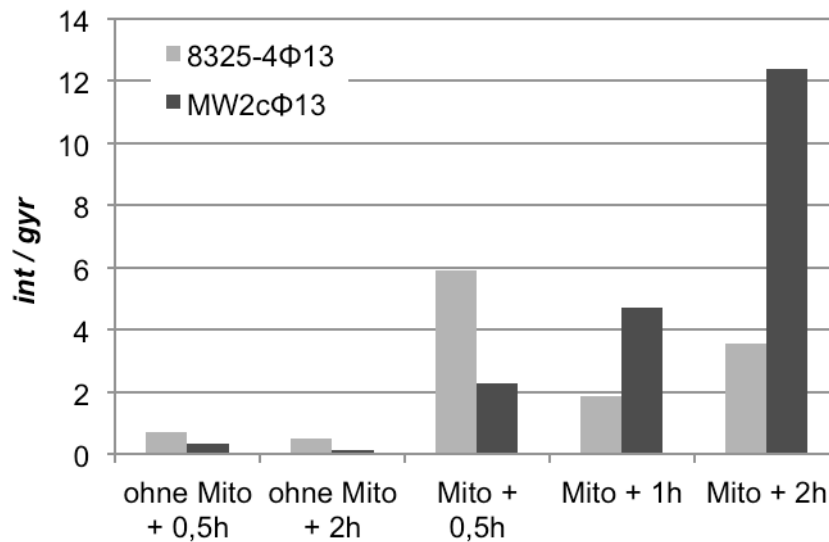


Abbildung 16: *int*-Expression im Verhältnis *gyr*-Expression in den beiden Stämmen 8325-4 und MW2c. Nicht induzierte Proben in der exponentiellen Phase und nach 2 Stunden, induzierte Proben nach 0,5 h, 1 h und 2 h.

Um den möglichen Einfluss eines „multi-copy-effect“ aus den bisherigen Zahlen herauszurechnen, führten wir, wie oben beschrieben, Circle-LC zum Nachweis der *attP*-Stellen durch. Es zeigte sich sehr deutlich, dass in beiden Stämmen die Φ 13-Replikation nach Induktion massiv zunimmt. Diese ist in Mw2c wesentlich höher als in 8325-4 (Abbildungen 17 bis 19). Folglich ist die in den Northern Blots verstärkt erscheinende Transkription zumindest teilweise auf den „multi-copy-Effekt“, also eine verstärkte Phagenreplikation zurückzuführen. In den nicht induzierten Proben ist ein geringes Maß an Spontaninduktion zu sehen.

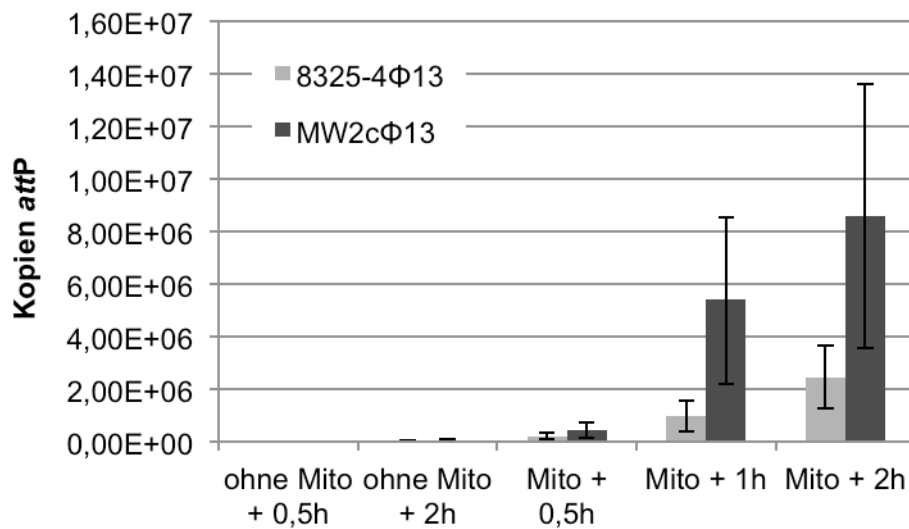


Abbildung 17: Φ13-attP-Stellennachweis in den Stämmen 8325-4 und MW2c. Nicht induzierte Proben in der exponentiellen Phase und nach 2 Stunden, induzierte Proben nach 0,5 h, 1 h und 2 h. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden zwei Versuche ausgewertet (+/- Standardabweichung).

Die Untersuchung der *gyr*-Kopien zeigt in den nicht induzierten Proben zwischen den beiden Messpunkten einen starken Anstieg (Abbildung 18) und ein, im Vergleich zu den induzierten Proben, stärkeres Wachstum. Der Anstieg ist in den nicht induzierten Stämmen höher als in den induzierten, da die Mitomycininduktion eine Wachstumshemmung verursacht.

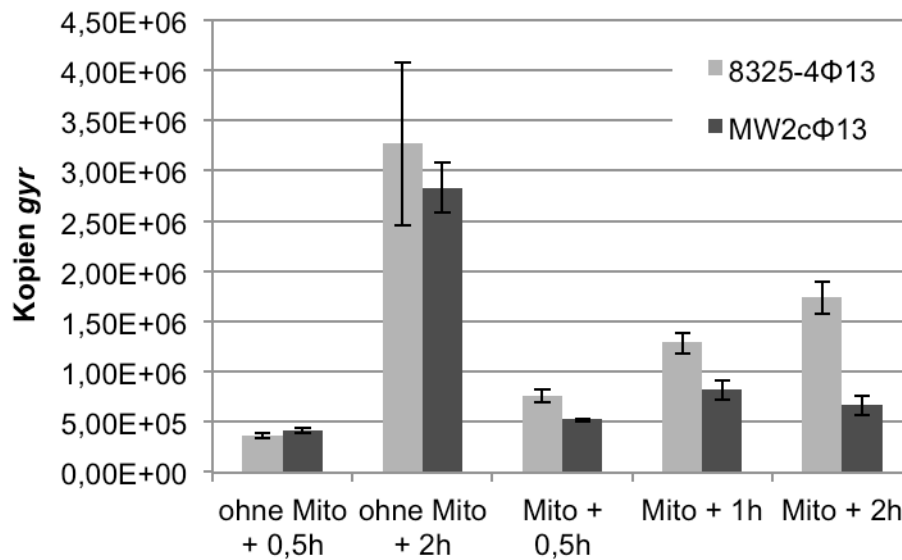


Abbildung 18: Bestimmung der *gyr*-Kopien in den Stämmen 8325-4 und MW2c. Nicht induzierte Proben in der exponentiellen Phase und nach 2 Stunden, induzierte Proben nach 0,5 h, 1 h und 2 h. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden zwei Versuche ausgewertet (+/- Standardabweichung).

Nach Berechnung der *attP*-Stellen pro *gyr*-Kopien und somit pro Zelle, zeigt sich weiterhin eine wesentlich stärkere Replikation von Φ13 in MW2c (Abbildung 19).

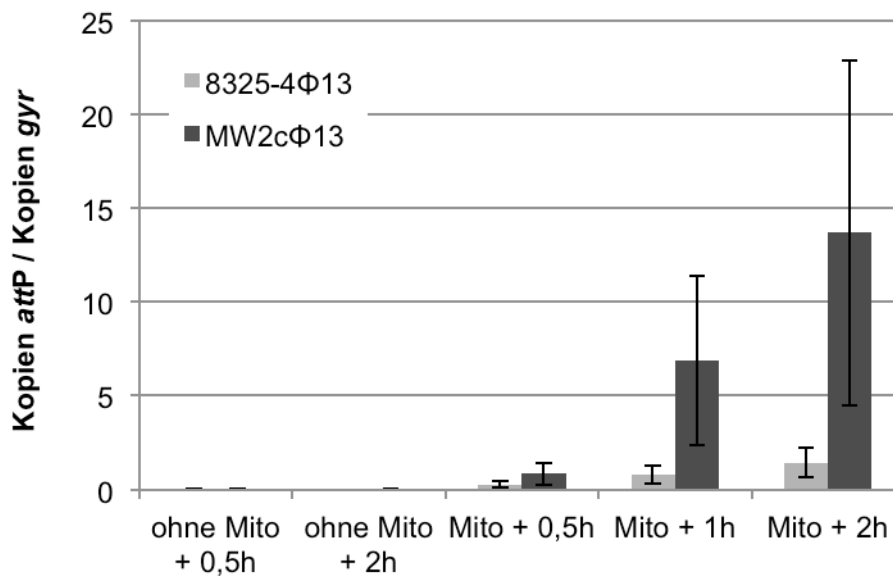


Abbildung 19: Φ13-attP-Stellennachweis pro *gyr*-Kopie und somit pro Zelle in den Stämmen 8325-4 und MW2c. Nicht induzierte Proben in der exponentiellen Phase und nach 2 Stunden, induzierte Proben nach 0,5 h, 1 h und 2 h. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden zwei Versuche ausgewertet (+/- Standardabweichung).

Nach Berechnung der Genexpression pro Phagengenom und pro Zelle zeigte sich letztendlich, dass die *int*-Expression in 8325-4 von Beginn an sowohl in den Kontrollen, wie in den induzierten Proben höher ist als in MW2c (Abbildung 20). Gemeinsam ist den beiden Hintergrundstämmen, dass die *int*-Expression von einem hohen Level 0,5 h nach der Induktion stetig abnimmt. Dieses Ergebnis stützt unsere bisherige Annahme, dass sich Φ13 in 8325-4 lysogener verhält als in MW2c und deckt sich mit den Ergebnissen der Transferversuche.

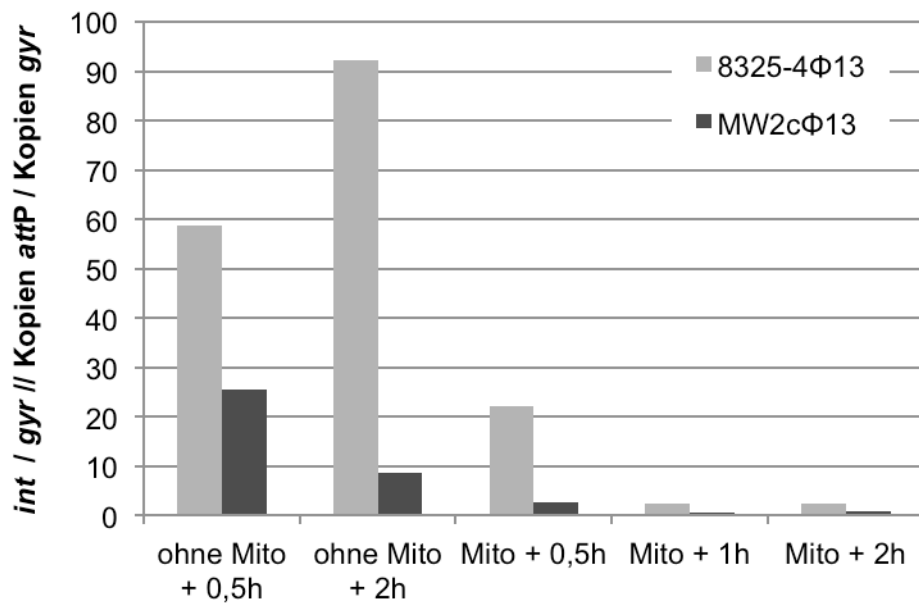


Abbildung 20: *int*-Expression (RNA) im Verhältnis zur *gyr*-Expression (RNA) pro *attP*-Stelle (DNA) pro *gyr*-Genkopie (DNA) in den beiden Stämmen 8325-4 und MW2c. Nicht induzierte Proben in der exponentiellen Phase und nach 2 Stunden, induzierte Proben nach 0,5 h, 1 h und 2 h.

3.3 Einfluss des Sigma-Faktors σ^H auf die Phageninduktion

Die Versuche zur genetischen Regulation von $\Phi 13$ zeigten deutliche Unterschiede in der Expression der lytischen und lysogenen Gene. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Integrase (*int*), da sie sowohl für die Integration, als auch die Exzision des Phagen notwendig ist und in den Northern Blots nach MMC-Induktion ein deutlicher Expressionsunterschied in den beiden Hintergrundstämmen gezeigt wurde. Um eine mögliche Ursache für die stammspezifischen Unterschiede der *int*-Expression in den beiden verschiedenen Hintergrundstämmen zu finden, suchten wir nach einem bakteriellen Faktor, der diese Unterschiede erklären würde.

Hierzu untersuchten wir den Einfluss des Sigma-Faktors σ^H auf die Integraseexpression und $\Phi 13$ -Induktion, da für σ^H berichtet wurde, dass dieser die Transkription des Integrase- (*int*) und Kompetenzgens (*com*) positiv beeinflusst, sodass über höhere mRNA-Spiegel an *int* und *com* die Lysogenie

stabilisiert wird [29]. Folglich müssten bei σ^H -defizienten Stämmen niedrigere mRNA-Konzentrationen an *int* im Vergleich zu den Wildtypen (WT) zu beobachten sein. Dies wiederum würde über die niedrigen *int*-Konzentrationen zu lytischem Verhalten von $\Phi 13$ und einer höheren Anzahl an nicht integrierten Phagenkopien führen, deren *attP*-Stellen durch Circle-LC nachweisbar wären.

Sollte σ^H für die stammspezifischen Unterschiede verantwortlich sein, so sollte es zwischen den σ^H -defizienten Mutanten beider Stämme keine Unterschiede geben.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, konstruierten wir Stämme, in denen σ^H durch eine Erythromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde und bestimmten anhand relativer qRT-PCR die *int*-Expression. Zusätzlich wurde mittels absoluter qPCR („Circle-LC“) die Anzahl der freien Phagenkopien bestimmt. Hierfür wiesen wir die *attP*-Stellen in den Phagengenomen nach, welche sich ausschließlich in zirkulär vorliegenden, also exzidierten, Phagen nachweisen lassen (Abbildung 5).

3.3.1.1 Transduktion der Erythromycin-Resistenzkassette in die Zielhintergrundstämme 8325-4 $\Phi 13$ KanA und MW2c $\Phi 13$ KanA

Zur Untersuchung unserer Fragestellung stellten wir mithilfe des transduzierenden „head-full“-Phagen $\Phi 80\alpha$ die σ^H -defizienten Austauschmutanten 8325-4 $\Phi 13$, $\Delta\sigma^H$ und MW2c $\Phi 13$, $\Delta\sigma^H$ bzw. 8325-4 $\Phi 13$ KanA, $\Delta\sigma^H$ und MW2c $\Phi 13$ KanA, $\Delta\sigma^H$ her. Die Mutanten trugen eine Erythromycin B-Resistenzkassette, welche aus dem Stamm Newman, $\Delta\sigma^H$ in die Zielstämme 8325-4 $\Phi 13$, MW2c $\Phi 13$, 8325-4 $\Phi 13$ KanA und MW2c $\Phi 13$ KanA transduziert wurde.

3.3.1.2 Überprüfung der σ^H -defizienten Transduktanden per PCR

Nach erfolgreicher Transduktion überprüften wir im ersten Schritt die neuen Stämme 8325-4 Φ 13, Δ sigH und MW2c Φ 13, Δ sigH durch PCR auf das Vorhandensein der transduzierten $E_{rm}B$ -Resistenzkassette. Diese konnte in allen Proben als 585bp große Bande detektiert werden. Das Ergebnis ist für 8325-4 Φ 13, Δ sigH und für MW2c Φ 13, Δ sigH in Abbildung 21 dargestellt.

Im zweiten Schritt stellten wir σ^H in den beiden WT 8325-4 Φ 13 und MW2c Φ 13 und den beiden Austauschmutanten 8325-4 Φ 13, Δ sigH und MW2c Φ 13, Δ sigH dar (Abbildung 22:). σ^H ließ sich hier in den beiden WT (8325-4 Φ 13 = Bande 1 und MW2c Φ 13 = Bande 3) darstellen. In den beiden Austauschmutanten (8325-4 Φ 13, Δ sigH = Bande 2 und MW2c Φ 13, Δ sigH = Bande 4) hingegen, ließ sich das Gen nicht darstellen, womit bewiesen wurde, dass die beiden Austauschmutanten σ^H -defizient sind.

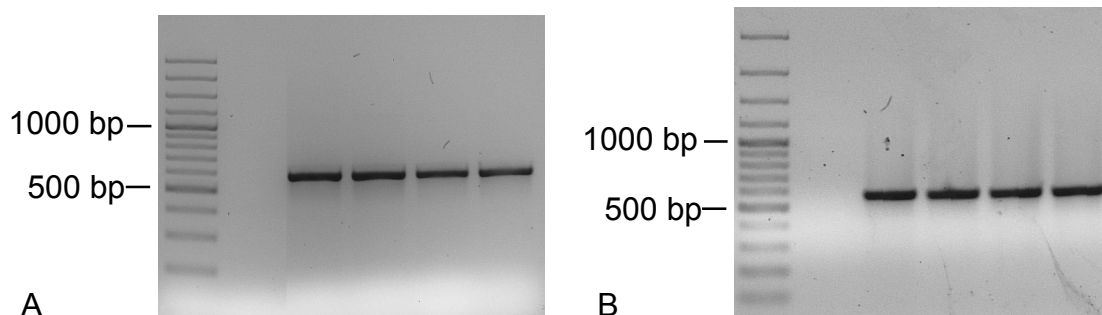


Abbildung 21: PCR zum Nachweis der aus dem Stamm Newman, Δ sigH transduzierten 585bp großen $E_{rm}B$ -Resistenzkassette in 8325-4 Φ 13KanA, Δ sigH (A) und MW2c Φ 13KanA, Δ sigH (B). Von Links nach Rechts: Standard (100bp ladder), Wasserprobe (PCR-Mix ohne DNA), Kol A-D 8325-4 Φ 13KanA, Δ sigH (A) bzw. MW2c Φ 13KanA, Δ sigH (B) mit der 585bp großen $E_{rm}B$ -Bande.

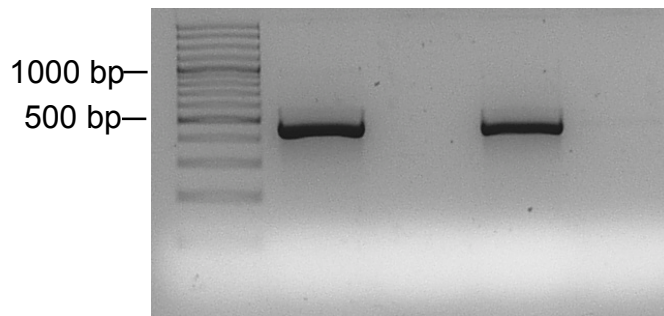


Abbildung 22: PCR zur Detektion von *sigH* in den Wildtypen 8325-4 Φ 13KanA und MW2c Φ 13KanA sowie den Austauschmutanten 8325-4 Φ 13KanA, Δ *sigH* und MW2c Φ 13KanA, Δ *sigH*. Von Links nach Rechts: Standard (100bp ladder), 8325-4 Φ 13KanA, 8325-4 Φ 13KanA, Δ *sigH*, MW2c Φ 13KanA, MW2c Φ 13KanA, Δ *sigH*-Transferanden mit der 464bp großen *sigH*-Bande.

Im dritten Schritt überprüften wir das Vorhandensein von Φ 13KanA in den Mutanten durch Ausstreichen dieser auf MH-Blut-Platten und TSA-Kanamycin-Platten. Hier zeigten alle Mutanten dasselbe Hlb-Verhalten wie die WT.

3.3.1.3 σ^H -Einfluss auf die Transkription der *int* (Integrase)

Um den Einfluss des Faktors σ^H auf die *int* darzustellen, führten wir relative quantitative RT-PCRs durch. Hierbei diente *gyr* (Gyrase) als Bezugsgröße, da diese konstitutiv exprimiert wird und für diese ein absoluter Standard vorhanden ist.

Die Stämme 8325-4 Φ 13KanA, 8325-4 Φ 13KanA, Δ *sigH*, MW2c Φ 13KanA und MW2c Φ 13KanA, Δ *sigH* wurden als Flüssigkulturen jeweils bei einer $OD_{600} = 0,2$ und $0,4$ geerntet, um nicht nur stammspezifische Unterschiede, sondern ggf. falls auch eine Verlaufstendenz zu beobachten.

Es zeigten sich zwar Unterschiede zwischen den WT und den Mutanten, jedoch widersprachen die Ergebnisse denen der Veröffentlichung [29] dahingehend,

dass die Expression der *int* in den Mutanten teilweise verstärkt statt verringert war. Diese Ergebnisse sind nicht dargestellt.

3.3.1.4 σ^H -Einfluss auf die *int*-Expression und Phagenreplikation

Für den Sigma-Faktor σ^H wurde angenommen, dass dieser die Lysogenie über Beeinflussung der viralen $\Phi 13$ -Integrase (*int*) stabilisiert. Um dies zu untersuchen, inkubierten wir die Stämme 8325-4 $\Phi 13$ KanA, 8325-4 $\Phi 13$ KanA, Δ sigH, MW2c $\Phi 13$ KanA und MW2c $\Phi 13$ KanA, Δ sigH bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ in Flüssigkulturen. Durch relative qRT-PCR wurde die *int*-Expression im Verhältnis zur *gyr*-Expression bestimmt. Die neu gebildeten *attP*-Stellen wurden absolut durch qPCR pro *gyr*-Kopie, somit pro Zelle, bestimmt.

Die LC zeigten in beiden Stämmen für die *int* tendenzielle Unterschiede sowohl zwischen WT und Mutante, als auch zwischen den beiden WT. Jedoch war die *int*-mRNA-Konzentration wie bereits in den vorangegangenen Untersuchungen in den σ^H -defizienten Mutanten höher. Dies stellt einen Widerspruch zu den Ergebnissen von Tao et al. dar (Abbildung 23).

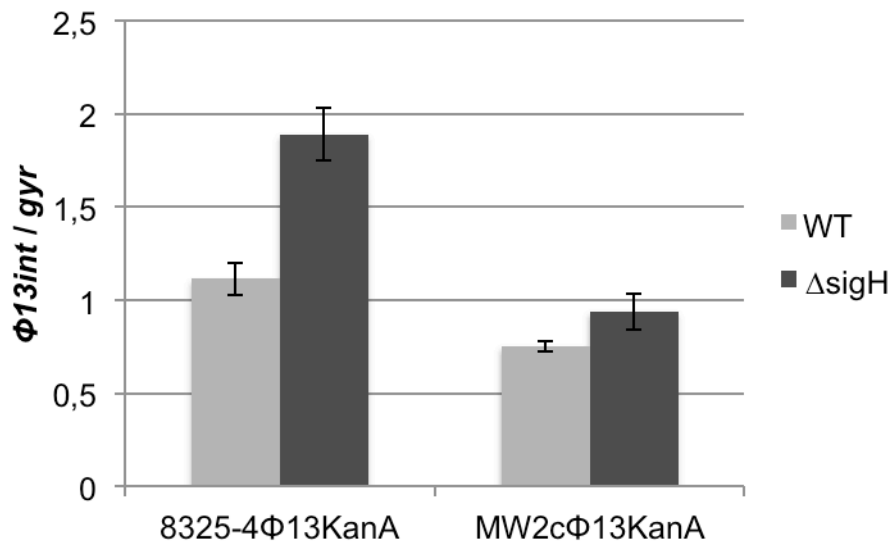


Abbildung 23: *int*-Expression im Verhältnis zur *gyr*-Expression in den WT 8325-4Φ13KanA und MW2cΦ13KanA, sowie den σ^H-defizienten Mutanten 8325-4Φ13KanA, ΔsigH und MW2cΦ13KanA, ΔsigH. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden zwei unabhängige Versuche ausgewertet (+/- Standardabweichung).

Bei der *attP*-Stellen-Bestimmung aus den gleichen Proben zeigten sich zwischen den beiden WT 8325-4Φ13KanA und MW2cΦ13KanA keine relevanten Unterschiede.

Zwischen WT und σ^H-Mutante zeigte sich in 8325-4Φ13KanA, ΔsigH eine erhöhte Anzahl an neu geformten *attP*-Stellen. Ebenso ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Mutanten zu sehen. Diese in der σ^H-defizienten Mutante höhere Anzahl an neugeformten *attP*-Stellen stimmt mit der Aussage der Veröffentlichung von Tao et al. überein (Abbildung 24), sodass zu vermuten ist, dass σ^H einen Einfluss auf die Phagenreplikation bzw. Lysogeniestabilisierung hat.

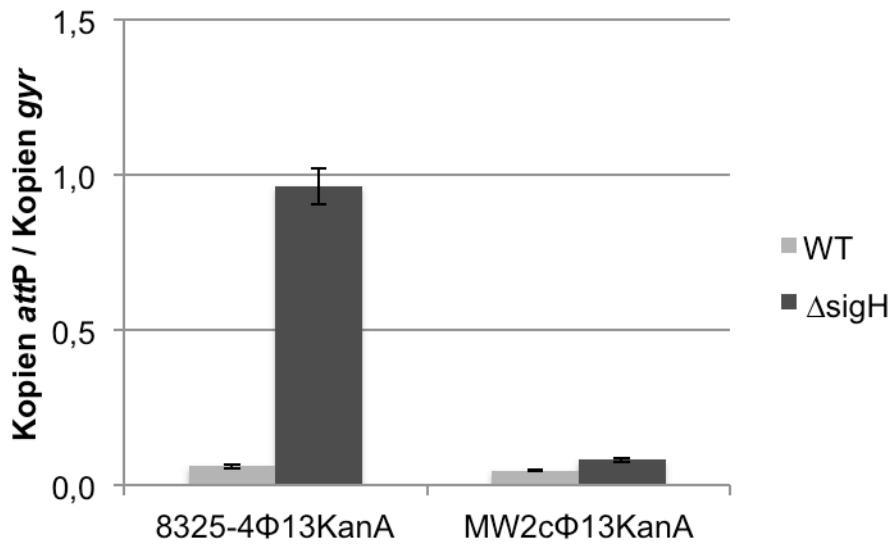


Abbildung 24: Rate extrachromosomaler Phagengenomkopien (*attP*) pro *gyr*-Kopie bzw. pro Zelle in den WT 8325-4Φ13KanA und MW2cΦ13KanA, sowie den σ^H -defizienten Mutanten 8325-4Φ13KanA, Δ sigH und MW2cΦ13KanA, Δ sigH. Zur Berechnung der Mittelwerte wurden zwei Versuche ausgewertet (+/- Standardabweichung).

4. Diskussion

4.1 Transferversuche

Der Transfer von Phagen ist für die Evolution und Anpassung von *S. aureus* an unterschiedliche Wirte von großer Bedeutung. Kürzlich konnte in einem Schweinemodel gezeigt werden, dass es während der Ko-Kolonisation zu horizontalem Gentransfer von mobilen genetischen Elementen wie z. B. Phagen kam [32].

Die Bedingungen, die einen solchen Transfer begünstigen sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher nur unzureichend verstanden. In dieser Arbeit wurde der Phagentransfer unter Laborbedingungen untersucht.

Einfluss des Donor-Rezipienten-Verhältnisses auf den Phagentransfer

Im Stamm 8325-4 wurde bei einem Verhältnis von 1:1 eine Transferrate von 0,13% festgestellt. Die hier beobachtete Transferrate ist deutlich höher als die vorangegangener Versuche der Arbeitsgruppe. Allerdings ist die Vergleichbarkeit zu diesen Versuchen eingeschränkt, da die Ko-Inkubation in den vorherigen Versuchen lediglich 2 h betrug und nach der AHT-Zugabe keine weitere Inkubation erfolgte. Dies könnte die höheren Transferraten in unseren Versuchen erklären. Vergleicht man die Transferraten bei einem Donor-Rezipienten-Verhältnis von 4:1 mit dem von 1:4 so zeigen sich keine relevanten Unterschiede. Allerdings zeigte sich, dass die Transferraten in MW2c höher waren als in 8325-4.

Einfluss der Wachstumsphase auf den Phagentransfer

Bei der Variation der Wachstumsphasen konnten wir zeigen, dass die Transferraten in der exponentiellen Wachstumsphase am höchsten sind und diese in der späteren Wachstumsphasen stark abfallen bzw. in 8325-4 teilweise kein Transfer mehr nachweisbar ist. Möglicherweise spielt das reduzierte Nährstoffangebot hierbei eine Rolle [33]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein aktiver Metabolismus für den Phagentransfer notwendig ist. Unklar

bleibt, ob für einen optimalen Transfer sowohl Rezipient als auch Donor aus der exponentiellen Wachstumsphase stammen müssen. Hierzu könnten noch Transferexperimente mit Variationen der Wachstumsphasen von Donor und Rezipient sowie unterschiedlichen Bakteriendichten in den Flüssigkulturen zum Mischzeitpunkt durchgeführt werden.

Stammspezifische Unterschiede im Transferverhalten

In unseren Transferversuchen konnten wir deutliche stammspezifische Unterschiede im Lebenszyklus von $\Phi 13$ aufzeigen, die Transferrate von $\Phi 13$ war in allen Versuchen in MW2c höher als in 8325-4. Zur weiteren Untersuchung führten wir Transkriptionsanalysen mittels Northern Blot und LightCycler durch.

4.2.1 Northern Blot-Analyse der lytischen Gene

In den Northern Blot-Analysen konnten wir zeigen, dass die Transkription der lytischen Gene in MW2c nach Induktion im Vergleich zu 8325-4 deutlich ansteigt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den höheren Transferraten in MW2c und zeigt, dass $\Phi 13$ in MW2c lytischer ist als in 8325-4.

4.2.2 Aufklärung des lysogenen Moduls von $\Phi 13$

Für die Transkription der lysogenen Gene hingegen ergab sich ein komplexes Transkriptionsmuster, vermutlich handelt es sich um sechs Transkripte (T1 - T6) (Abb. 25). Die Transkriptlängen und -lagen wurden aus den Hybridisierungsdaten und der Genomannotation deduziert. Diese putativen Transkripte sollen hier zusammenfassend diskutiert werden.

Von *clr*-Promotor ausgehend entstehen die drei Transkripte T1-3. Das kürzeste ca. 1,3 kbp große Transkript T1 wird vermutlich vom *clr*-Promotor bis an *orf c* reichend transkribiert.

Die Transkription des ca. 2,1 kbp großen Transkripts T2 beginnt ebenfalls am *clr*-Promotor und schließt *orf C* ein. Das Transkript ließ sich auch mit der *orf C*-

Sonde detektieren. Folglich findet eine Ko-Transkription von *clr* und *orf C* statt, was sich mit anderen Versuchen der Arbeitsgruppe deckt. Auffällig ist, dass dieses Transkript 2 h nach Mitomycininduktion kaum noch zu sehen ist, wohingegen eine deutliche Expressionszunahme für das kürzere 1,3 kbp große Transkript zu beobachten ist. Inwieweit hierbei ein interner Promoter aktiviert wurde bleibt ungeklärt.

Das dritte ca. 4,8 kbp große Transkript T3, welches auch durch die *int*-Sonde nachweisbar ist, ist größer als der gesamte lysogene Genomabschnitt. Dies weist auf ein matures Transkript hin, welches über *clr*, *orf C*, *int* und die *attP*-Stelle hinausgeht. Dies ist möglich, da das genetisch aktive Genom zirkularisiert vorliegt. Die transkribierte Region würde in diesem Falle bis zu dem Gen *scn* reichen.

Mit der *int*-Sonde ließen sich die drei Transkripte T3, T5 und T6 nachweisen. Interessant ist die Größe der Transkripte, da diese größer sind als das 1038 bp große *int*-Gen.

Die Transkription der beiden Transkripte T5 und T6 beginnt wahrscheinlich an *int* und reicht in beiden Fällen über die *attP*-Stelle hinaus. Äußerst interessant ist, dass dieses Transkript in MW2cΦ13 nach 2 h völlig verschwindet und gleichzeitig die Transkription der beiden kürzeren Transkripte stark ansteigt.

Bei dem ca. 0,8 kbp großen Transkript T4 handelt sich hierbei um das anti-sense-Transkript des *orf c* das monocystronisch von einem eigenen Promotor transkribiert wird. Dies konnte in anderen Arbeiten der AG Wolz gezeigt werden. Die Transkription ist in MW2c wesentlich höher als in 8325-4 und steigt im zeitlichen Verlauf deutlich.. Da für *orf c*, eine Exzisionase-Funktion angenommen wird, welche für den lytischen Zyklus benötigt wird, passt dieses Ergebnis auch zu den höheren Transferraten von MW2c.

Stammspezifische Unterschiede in der Transkription

Insgesamt zeigt sich in MW2c eine stärkere Expression der Transkripte T1, T4 und T6. Die stärkere Expression einzelner lysogenen Transkripte in MW2c im

Vergleich zu 8325-4 nach Induktion ist wahrscheinlich durch multi-copy-Effekte bedingt, da in MW2c mehr Phagen induziert wurden.

Die Transkriptionsunterschiede und die somit in beiden Stämmen unterschiedliche Regulation der Transkription des lysogenen Moduls bleiben unklar. In weiterführenden Versuchen könnte mit replikationsdefizienten Phagen die Transkriptionsregulation des lysogenen Moduls weiterführend untersucht werden.

Weitere mögliche Schritte wären Versuche mit RNA-Sonden oder RNA-Sequenzierungen, um die Größe und Lage der postulierten Transkripte zu bestätigen, da Transkriptionsstart und –ende der Transkripte durch die hier durchgeführte Analyse hypothetisch bleibt.

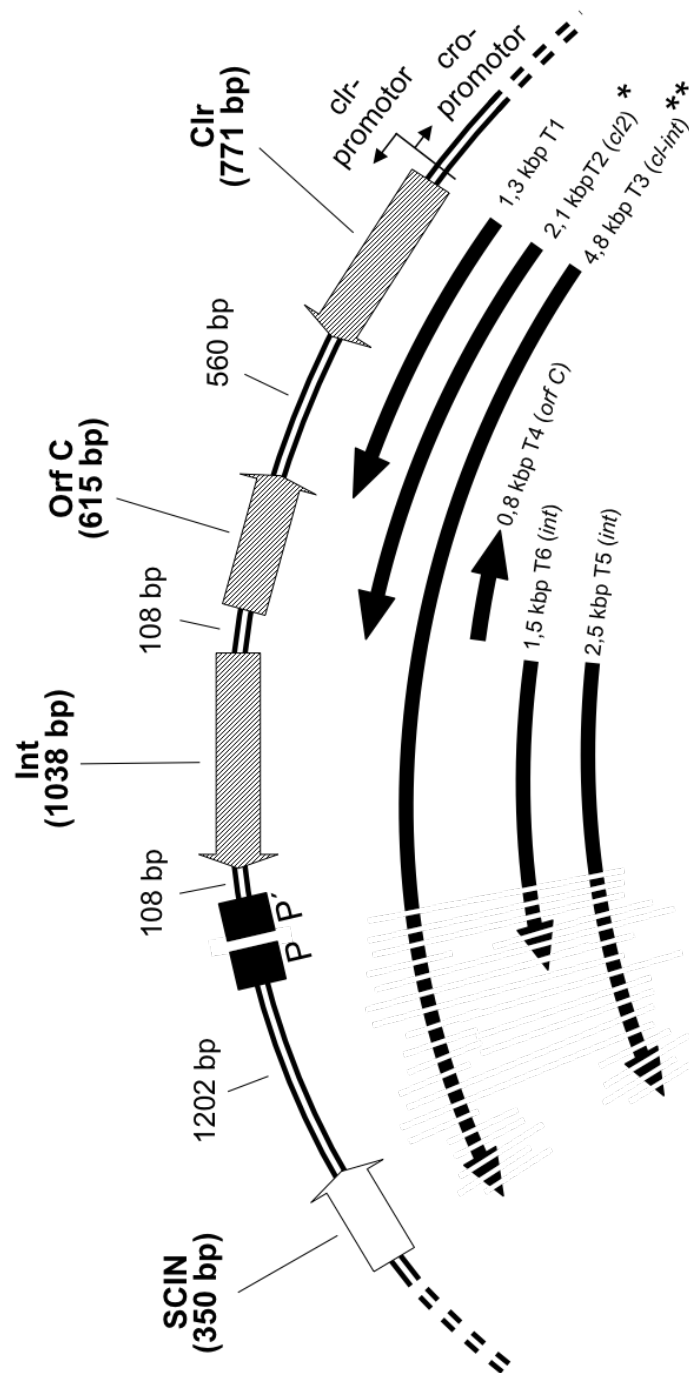


Abb. 25: Darstellung der möglichen Transkripte T1-6 (schwarze Pfeile) mit den angenommenen Größen sowie eines Ausschnitts aus dem zirkularisierten $\Phi 13$ -Genom mit dem lysogenen Genomteil, welcher durch die Zirkularisation an das Ende des lytischen Genomteils angrenzt. Gestreifte Pfeile = untersuchte Gene, gestrichelte Pfeilspitzen = über die attP-Stellen hinausgehende Transkription. Die Bezeichnungen und Markierungen * bzw. ** stimmen mit Abb.15 überein.

4.2.3 Quantifizierung der *int*-Expression mittels relativer qRT-PCR und absoluter qPCR

Durch die Quantifizierung der *int*-Expression zeigten wir, dass diese in 8325-4 höher ist in MW2c. Dieses Ergebnis deckt sich mit unserer Annahme, dass $\Phi 13$ sich in 8325-4 lysogener verhält als in MW2c. Darüber hinaus korreliert dieses Ergebnis mit den geringeren Transferraten von $\Phi 13$ in 8325-4.

4.3 σ^H

Für den Sigma-Faktor σ^H wurde berichtet, dass dieser die Lysogenie über die positive Beeinflussung der *int*-Transkription stabilisiert [29]. In unseren Versuchen untersuchten wir den Einfluss des Sigma-Faktors σ^H auf die *int*-Expression, um herauszufinden, ob dieser als bakterieller Faktor für das unterschiedliche Verhalten von $\Phi 13$ in den beiden Stämmen verantwortlich sein könnte.

Zusammenfassend ist für σ^H zu sagen, dass wir zwar keinen Einfluss auf die *int*-expression, jedoch auf die Phagenreplikation beobachten konnten. Somit bleibt der Einflussmechanismus von σ^H auf die Phagenreplikation weiterhin zu klären. Hierzu könnten Folgeversuche mit σ^H -defizienten Stämmen und mit Stämmen durchgeführt werden in denen σ^H überexprimiert wird.

4.4 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend konnten wir sowohl in den Transferversuchen wie den Northern Blot-Analysen und den LightCyclern stammspezifische Unterschiede im Lebenszyklus von $\Phi 13$ in 8325-4 und MW2c zeigen. Die Transferraten waren in MW2c höher und dazu korrelierend zeigten die entsprechenden Blots eine stärkere Transkription der lytischen Gene. In 8325-4 war die Transferrate geringer als in MW2c und die Northern Blots zeigten eine stärkere Transkription des lysogenen Moduls als in MW2c. In den LightCycler konnten wir damit korrelierend zeigen, dass die *int*-Transkription in 8325-4 höher ist als in MW2c.

Bisher wurden solche Bakterien-Phagen-Interferenzen wenig beschrieben. Für *E. coli* wurde beschrieben, dass bakterielle Faktoren wie IHF und Fis den Lebenszyklus von Lambda beeinflussen können. Ob ähnliche Faktoren in *S. aureus* beteiligt sind und, ob es hierbei stammspezifische Unterschiede gibt bleibt zu untersuchen. Solche Studien können helfen die Evolution und Wirtsanpassungsstrategien von *S. aureus* besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Staphylococcus aureus zeichnet sich durch eine Vielzahl von Virulenzfaktoren und Resistenzdeterminanten aus. Viele dieser Faktoren sind auf Bakteriophagen kodiert. Die meisten humanen *S. aureus*-Isolate tragen einen Phagen, der neben der Staphylokinase noch andere immunmodulatorische Gene besitzt. Dieser Phage spielt wahrscheinlich für die Anpassung an den Menschen eine besondere Rolle, da dieser in tieradaptierten *S. aureus*-Stämmen sehr selten nachweisbar ist. Ziel dieser Arbeit war es die Mobilisierbarkeit eines solchen Phagens ($\Phi 13$) zu untersuchen. Insbesondere sollte geklärt werden, inwieweit das bakterielle Wirtsgenom den Phagenzyklus beeinflusst. Hierzu wurde das Transferverhalten eines durch Kanamycinresistenz markierten $\Phi 13$ -Abkömmlings in den beiden phagenfreien Stämmen 8325-4 und MW2c bestimmt. Die Expression der Phagengene wurde durch Northern Blot-Analyse und qPCR untersucht. Dabei zeigte sich in allen Versuchen eine erhöhte Transferrate in MW2c im Vergleich zu 8325-4. Dies korrelierte mit der erhöhten Phagenkopienzahl (qPCR) und der verstärkten Transkription der lytischen Phagengene in MW2c. Durch Transkriptanalysen konnte eine Hypothese zu Lage und Größe der lysogenen Gene von $\Phi 13$ entwickelt werden. Die Rolle des Sigma-Faktors σ^H konnte nicht abschließend geklärt werden. Der Einfluss auf die Integrase ließ sich nicht bestätigen. Über einen noch unbekanntem Mechanismus könnte σ^H die Phageninduktion beeinflussen, da in unseren Proben mehr Phagenkopien in den σ^H -defizienten Mutanten nachgewiesen wurden als in den WT der beiden Stämme.

Abschließend ist festzuhalten, dass wir stammspezifische Unterschiede im Lebenszyklus von $\Phi 13$ in den beiden Stämmen 8325-4 und MW2c zeigen konnten. Die Transkriptionsregulation ist unklar und bedarf weiterer Aufklärung.

6. Literaturverzeichnis

1. Liu, G.Y., et al., *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med*, 2005. **202**(2): p. 209-15.
2. Le Loir, Y., F. Baron, and M. Gautier, *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, 2003. **2**(1): p. 63-76.
3. Peacock, S.J. and G.K. Paterson, *Mechanisms of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem*, 2015. **84**: p. 577-601.
4. Locke, J.B., et al., *Linezolid-resistant Staphylococcus aureus* strain 1128105, the first known clinical isolate possessing the *cfr* multidrug resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. **58**(11): p. 6592-8.
5. Hiramatsu, K., *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance*. *Lancet Infect Dis*, 2001. **1**(3): p. 147-55.
6. Tsiodras, S., et al., *Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 2001. **358**(9277): p. 207-8.
7. Berger-Bachi, B., *Resistance mechanisms of gram-positive bacteria*. *Int J Med Microbiol*, 2002. **292**(1): p. 27-35.
8. Xia, G. and C. Wolz, *Phages of Staphylococcus aureus and their impact on host evolution*. *Infect Genet Evol*, 2014. **21**: p. 593-601.
9. Morikawa, K., et al., *Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog*, 2012. **8**(11): p. e1003003.
10. Feil, E.J., et al., *How clonal is Staphylococcus aureus?* *J Bacteriol*, 2003. **185**(11): p. 3307-16.
11. Bertin, A., M. de Frutos, and L. Letellier, *Bacteriophage-host interactions leading to genome internalization*. *Curr Opin Microbiol*, 2011. **14**(4): p. 492-6.
12. Waldor, M.K. and J.J. Mekalanos, *Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin*. *Science*, 1996. **272**(5270): p. 1910-4.
13. Ferretti, J.J., et al., *Complete genome sequence of an M1 strain of Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(8): p. 4658-63.
14. Dickhaus, H., et al., *A flexible registration framework for multimodal image data*. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2004. **3**: p. 1755-8.
15. Goerke, C., et al., *Extensive phage dynamics in Staphylococcus aureus contributes to adaptation to the human host during infection*. *Mol Microbiol*, 2006. **61**(6): p. 1673-85.
16. Ackermann, H.W., *Bacteriophage observations and evolution*. *Research in Microbiology*, 2003. **154**(4): p. 245-251.
17. Goerke, C., et al., *Diversity of prophages in dominant Staphylococcus aureus clonal lineages*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(11): p. 3462-8.
18. landolo, J.J., et al., *Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of Staphylococcus aureus 8325*. *Gene*, 2002. **289**(1-2): p. 109-18.

19. Sobral, R.G., et al., *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, 2007. **189**(6): p. 2376-91.
20. Xia, G., et al., *Wall teichoic Acid-dependent adsorption of staphylococcal siphovirus and myovirus*. J Bacteriol, 2011. **193**(15): p. 4006-9.
21. Novick, R., *Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in Staphylococcus aureus*. Virology, 1967. **33**(1): p. 155-66.
22. Kullik, I., P. Giachino, and T. Fuchs, *Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in Staphylococcus aureus reveals its function as a global regulator of virulence genes*. J Bacteriol, 1998. **180**(18): p. 4814-20.
23. Baba, T., et al., *Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA*. Lancet, 2002. **359**(9320): p. 1819-27.
24. Wirtz, C., *The life cycle of specific Staphylococcus aureus bacteriophages, their interaction with the bacterial host and the contribution to the virulence potential of S. aureus*, in Fakultät für Biologie. 2010, Eberhard Karls Universität Tübingen: Tübingen. p. 120.
25. Deora, R. and T.K. Misra, *Characterization of the primary sigma factor of Staphylococcus aureus*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21828-34.
26. Pane-Farre, J., et al., *The sigmaB regulon in Staphylococcus aureus and its regulation*. Int J Med Microbiol, 2006. **296**(4-5): p. 237-58.
27. Morikawa, K., et al., *A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes*. Genes Cells, 2003. **8**(8): p. 699-712.
28. Shaw, L.N., et al., *Identification and characterization of sigma, a novel component of the Staphylococcus aureus stress and virulence responses*. PLoS ONE, 2008. **3**(12): p. e3844.
29. Tao, L., X. Wu, and B. Sun, *Alternative sigma factor sigmaH modulates prophage integration and excision in Staphylococcus aureus*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000888.
30. Goerke, C., J. Koller, and C. Wolz, *Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(1): p. 171-7.
31. Wirtz, C., et al., *Transcription of the phage-encoded Panton-Valentine leukocidin of Staphylococcus aureus is dependent on the phage life-cycle and on the host background*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 11): p. 3491-9.
32. McCarthy, A.J., et al., *Extensive horizontal gene transfer during Staphylococcus aureus co-colonization in vivo*. Genome Biol Evol, 2014. **6**(10): p. 2697-708.
33. Echols, H., *Developmental pathways for the temperate phage: lysis vs lysogeny*. Annu Rev Genet, 1972. **6**(0): p. 157-90.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene unter Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Christiane Wolz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit

Frau Prof. Dr. rer. nat. Christiane Wolz und Frau Dr. Christiane Goerke.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Vittoria Bisanzio und Isabell Samp von mir eigenständig durchgeführt. Die Pulsfeldgelelektrophoresen (PFGE) wurden durch Isabell Samp durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau Prof. Dr. rer. nat. Christiane Wolz verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 5.09.2016

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Christiane Wolz und Frau Dr. Christiane Goerke für die Überlassung des Themas, für das Erlernen des selbstständigen wissenschaftlichen Arbeitens sowie für die außerordentliche Betreuung während der Zeit im Labor als auch dem anschließenden Schreiben. Frau Prof. Dr. rer. nat. Christiane Wolz danke ich ausgesprochen für Ihre beispiellose Geduld, Unterstützung, konstruktive Kritik und Motivation.

Ebenso danke ich Frau Vittoria Bisanzio sehr für ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft und Unterstützung während der gesamten Zeit. Frau Isabell Samp danke ich für die Durchführung der Pulsfeldgelelektrophoresen.

Beim gesamten Team der AG Wolz möchte ich mich für die familiäre, konstruktive und unkomplizierte Atmosphäre bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Thomas Bischoff für die Überlassung des Stamms Newman, Δ sigH.

Meinen Freunden danke ich für Ihre permanente Unterstützung und Aufmunterung.

Nicht zuletzt danke ich von ganzem Herzen meiner gesamten Familie für deren grenzenlosen Rückhalt, die Ermöglichung des Studiums sowie meiner Forschungstätigkeit.