

Transkriptom- und Proteomanalytische Charakterisierung der Small-Colony-Variante von *Staphylococcus aureus*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer.nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Daniel Müller
aus
Frankfurt am Main

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Norbert Koch

2. Referent: Prof. Dr. Martin Krönke

Tag der Promotion: 16.01.2004

Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Krönke, daß er diese Arbeit betreute und die finanziellen Mittel bereitstellte, die für die Ausführung dieser Arbeit notwendig waren. Ferner möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Koch von der Universität Bonn für die externe Betreuung und die Übernahme des Referates.

Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei Herrn Dr. Krut für die ständige begleitende Betreuung bei den Laborarbeiten und die Anregungen, die er im Rahmen vieler Diskussionen zu dieser Arbeit gegeben hat. Ohne seinen Einsatz wäre diese Arbeit in der gegenwärtigen Form nicht denkbar.

Desweiteren gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Bernardo, der mich in die Proeomanalytik eingewiesen hat und mir bei Fragen in diesem Bereich stets mit viel Engagement zur Seite stand.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Seifert, Herrn Dr. Hüniger und Frau Dr. Schütt-Gerowitt dafür, daß sie klinisches Material zur Verfügung gestellt haben.

Frau Stefanik danke ich für die Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese.

Herrn Dr. von Eiff vom Institut für Mikrobiologie an der Universität Münster danke ich für die Durchführung der Auxotrophismus-Untersuchungen sowie dafür, daß er zwei klinische Stämme zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Dr. Klein und Frau Dr. Cleven danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch allen meinen Laborkollegen, die für ein sehr angenehmes Arbeitsklima gesorgt haben und sich stets bei etwaigen Fragen als hilfsbereit erwiesen.

Weiterhin möchte ich auch meiner Familie und meinem privaten Freundeskreis danken für die moralische Unterstützung und den schönen Ausgleich zum Laboralltag.

Abkürzungsverzeichnis

Aminoallyl-dUTP	Aminoallyldesoxyuridintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BLAST®	“Basic Local Alignment Search Tool”
BSA	Bovines Serum Albumin
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
kDa	Kilodalton
I	Intensität
IAA	Jodacetamid
IPG	Immobilisierte pH-Gradienten
LCV	“Large Colony Variant”
LB	Luria-Bertani (Nährmedium)
MALDI-TOF	“Matix Assisted Laser Desorption and Ionization-Time of Flight”
MHK	Minimale Hemmkonzentration
OD	Optische Dichte
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA”
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion
SCV	“Small Colony Variant”
SDS	“Sodium Dodecylsulfate”
SDS-PAGE	“Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamidgelelektrophoresis“
SSC	„Standard Saline Citrat“
TFA	Trifluoressigsäure
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolylgalactosid

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.2 Der SCV-Phänotyp	5
1.3 Metabolische Besonderheiten des SCV-Phänotyps	8
1.4 Virulenz der Small-Colony-Variante von <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.5 Transkriptomanalyse	13
1.6 Proteomanalyse	14
1.7 Ziel der Arbeit	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien und Biochemikalien	17
2.3 Oligonukleotide für die PCR	17
2.4 Grundlegende mikrobiologische Techniken	17
2.4.1 Bakterielle Kulturen	17
2.4.2 Reversionskontrollen	18
2.4.3 Wachstumskinetiken	18
2.4.4 Untersuchung der Auxotrophie	18
2.4.5 Bestimmung der Antibiotikaresistenzen	19
2.4.6 Überprüfung der genetischen Identität zwischen LCV und SCV	19
2.4.6.1 RAPD-PCR	19
2.4.6.2 PFGE	20
2.5 Molekularbiologische Techniken	20
2.5.1 Isolierung bakterieller, genomischer DNA	20
2.5.2 Isolierung bakterieller RNA	21
2.5.3 Entwicklung des DNA-Chips	21
2.5.3.1 Gensonden von <i>S. aureus</i> für den DNA-Chip	21
2.5.3.2 PCR	22
2.5.3.3 Klonierung der Gensonden in den Vektor pCR 2.1	22

2.5.3.4	Erstellung des DNA-Chips	23
2.5.4	Gewinnung einer fluoreszenzmarkierten cDNA aus genomischer DNA	23
2.5.5	Gewinnung einer fluoreszenzmarkierten cDNA aus RNA	23
2.5.6	Hybridisierung	24
2.5.7	Auswertung der DNA-Chips	25
2.5.8	RT-PCR	25
2.6	Proteinchemische Methoden	26
2.6.1	Gewinnung zytoplasmatischer Proteine	26
2.6.2	Gewinnung extrazellulärer Proteine	27
2.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
2.6.4	Eindimensionale SDS-PAGE	27
2.6.5	Zweidimensionale SDS-PAGE	28
2.6.6	Visualisierung der Proteine	29
2.6.6.1	Silberfärbung	30
2.6.6.2	Färbung mit Colloidal-Coomassie	30
2.6.7	Western-Blot	30
2.6.8	Proteinidentifikation mit MALDI-TOF	30
2.6.8.1	Vorbereitung der Probe für MALDI-TOF	31
2.6.8.2	MALDI-TOF-Spektrometrie und Auswertung	31
3.	Ergebnisse	33
3.1	Untersuchte <i>S. aureus</i> -Stämme	33
3.2	Genetische Identität der LCV- und SCV-Phänotypen	33
3.3	Charakterisierung der <i>S. aureus</i> -Stämme	35
3.4	Transkriptomanalytik	39
3.4.1	Etablierung des DNA-Chip für die Untersuchung der mRNA-Expression	41
3.4.2	mRNA-Expression	44
3.5	Virulenzfaktoren in Small-Colony-Varianten	49
3.5.1	Enterotoxine	51
3.5.2	Protein A	51
3.5.3	α -Toxin	52
3.6	Proteomanalyse	53

4. Diskussion	59
4.1 Genetische Identität von LCV und SCV verschiedener <i>S. aureus</i> -Stämme	59
4.2 Auxotrophie und Reversion	59
4.3 Metabolische Besonderheiten der Small-Colony-Varianten	60
4.4 Virulenzfaktoren und Globalregulatoren in der SCV	61
5. Zusammenfassung	65
6. Anhang	67
7. Literatur	69
8. Lebenslauf	77

1. Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*

Das Genus *Staphylococcus* gehört zur Familie der *Micrococcaceae*. Hierbei handelt es sich um Gram-positive, nicht sporenbildende, überwiegend fakultativ anaerobe, häufig katalasepositive Kokken, die meist unbeweglich sind. Derzeit sind etwa 30 *Staphylococcus*-Arten bekannt.

Der klinisch wichtigste Vertreter der Staphylokokken ist *Staphylococcus aureus*. Ihm kommt sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin erhebliche Bedeutung als Krankheitserreger zu. Er läßt sich aufgrund seiner Koagulase-Produktion, der Fähigkeit, Mannitol verwerten zu können, sowie der Anwesenheit von Protein A auf der Zelloberfläche von den anderen *Staphylococcus*-Spezies unterscheiden.

S. aureus zeichnet sich durch ein weites Spektrum akuter und chronisch verlaufender Infektionskrankungen aus. Dieses reicht von Abszessen und Furunkeln über Gastroenteritiden, Osteomyelitiden bis hin zu Endokarditiden, Arthritiden, Meningitiden, Pneumonien sowie dem akut lebensbedrohlichen Toxischen-Schock-Syndrom (Lowy, 1998). Osteomyelitiden und Arthritiden verlaufen häufig chronisch. Am chronischen Verlauf dieser Erkrankungen ist maßgeblich der Small-Colony-Variant-Phänotyp (SCV) von *S. aureus* beteiligt.

1.2 Der SCV-Phänotyp

Der SCV-Phänotyp von *S. aureus* wurde erstmals von Kolle beschrieben (Kolle *et al.*, 1913) und über seine Koloniegröße definiert. Diese beträgt etwa ein Zehntel von der einer normalen *S. aureus*-Kolonie (Proctor *et al.*, 1998). Small-Colony-Varianten treten spontan in ca. 1-2% aller *S. aureus*-Isolate auf. Sie zeigen häufig nur geringe Pigmentierung.

Klinische Relevanz besitzt der SCV-Phänotyp im Zusammenhang mit chronischen Infektionen. Patienten, die mit *S. aureus* infiziert waren und die erfolgreich mit Antibiotika therapiert wurden, zeigen nach beschwerdefreien Intervallen, die von einigen Monaten bis zu Jahrzehnten reichen können, oftmals erneut Symptome einer *S. aureus*-Infektion (Proctor *et al.*, 1994). In Isolaten, die von diesen Patienten stammen, finden sich häufig Small-Colony-Varianten von *S. aureus*.

Das Auftreten des SCV-Phänotyps wurde mehrfach bei chronisch verlaufenden Osteomyelitiden beschrieben (Proctor *et al.*, 1995, von Eiff *et al.*, 1997, von Eiff *et al.*, 1998). Desweiteren spielen

Small-Colony-Varianten von *S. aureus* eine Rolle bei Infektionen, die bei Patienten auftreten, die an Cystischer Fibrose leiden (Kahl *et al.*, 1998). Bei einem Patienten, der an der Hautkrankheit Morbus Darier litt, zeigte sich ebenfalls ein Auftreten der SCV von *S. aureus* (von Eiff *et al.*, 2001). Small-Colony-Varianten konnten auch bei einem AIDS-Patienten nachgewiesen werden, der an einem durch *S. aureus* verursachten Hüftabszeß erkrankt war. Diese zeigten eine hohe Antibiotika-Resistenz. Eine erfolgreiche Therapie ließ sich nicht durchführen, der Patient verstarb (Seifert *et al.*, 1999).

Small-Colony-Varianten von *S. aureus* fanden sich ferner in klinischen Isolaten von Patienten mit Pneumonien, diversen Abszessen, Arthritiden sowie als Begleiterscheinung einer *S. aureus*-Endokarditis nach Implantation künstlicher Herzklappen (Proctor *et al.*, 1995, Spearman, *et al.*, 1996).

Makroskopisch lassen sich zwei Arten des SCV-Phänotyps unterscheiden: Einige SCV-Stämme zeigen die sogenannte Spiegelei-Morphologie. Kolonien, die in dieser Form gewachsen sind, zeigen auf der Agarplatte durchscheinende Ränder, die ein kleines, erhabenes und pigmentiertes Zentrum umgeben. Andere zeigen Stecknadel-Morphologie. Diese sind etwa zehnfach kleiner und erscheinen als winzige, in sich homogene Punkte.

Bei Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop lassen sich zwischen dem SCV-Phänotyp und dem normal wachsenden *S. aureus* einige Unterschiede erkennen (Kahl *et al.*, 2003). Small-Colony-Varianten sind bis zu achtmal größer, wobei die Zellgröße erheblich variiert. Ferner zeigen sie einige unvollständige, über Kreuz verlaufende Zellwandansätze, die vermutlich auf Defekte in der Zellteilung zurückzuführen sind. Die Menge an Interzellulärflüssigkeit ist bei SCV-Phänotypen deutlich höher. Außerdem scheinen einige SCV-Zellen leer zu sein.

Bei Small-Colony-Varianten tritt häufig eine besondere Form der Auxotrophie auf, zumeist gegenüber Thiamin, Menadion, Häm, Thymidin sowie Kohlendioxid (Proctor *et al.*, 1995). Auxotrophe Organismen sind normalerweise nicht in der Lage, in Abwesenheit bestimmter für das Wachstum essentieller Substanzen zu wachsen, da eine Eigensynthese nicht möglich ist. SCV-Phänotypen zeigen dessen ungeachtet auch dann ein sehr langsames Wachstum, wenn die auxotrophe Substanz nicht zugesetzt wird, wachsen jedoch in Anwesenheit dieser Substanz mit für Staphylokokken normaler Geschwindigkeit.

Small-Colony-Varianten zeigen häufig das Phänomen der Reversion. Dies bedeutet, daß sich ohne äußere Beeinflussung aus dem SCV-Phänotyp wieder ein normal wachsender *S. aureus* bildet. Der Prozeß der Ausbildung des SCV-Phänotyps ist somit reversibel. Die Mechanismen, die für Bildung und Reversion der Small-Colony-Variante verantwortlich sind, sind unbekannt. Um chronische Erkrankungen, deren Ursache die Small-Colony-Variante von *S. aureus* darstellt,

in Zukunft effektiv therapieren zu können, ist es erforderlich, diese Mechanismen zu kennen und pharmakotherapeutisch zu beeinflussen.

Der SCV-Phänotyp zeigt im allgemeinen eine ungewöhnliche Form der Resistenz gegenüber Antibiotika, die als sog. „Phänotypische Resistenz“ bezeichnet wird (Proctor *et al.*, 1998). Diese Resistenz ist nicht genetisch kodiert. Sie kann gegenüber verschiedenen Antibiotika (z.B. Aminoglycosiden, Penicillinen und Fluorchinolonen) ausgebildet werden. Die Bildung einer resistenten SCV läßt sich durch Antibiotika induzieren. In vitro konnte Pelletier eine Induktion durch Methicillin nachweisen (Pelletier *et al.*, 1979), Mitsuyama beobachtete eine Induktion durch verschiedene Fluorchinolone (Mitsuyama *et al.*, 1997), Proctor konnte eine Induktion des SCV-Phänotyps durch Gentamycin beobachten (Proctor *et al.*, 1998). Hinsichtlich des Krankheitsbildes der Osteomyelitis wird der oftmals chronische Verlauf als Folge langjähriger Persistenz von *S. aureus* trotz Antibiotikatherapie beschrieben (Rolauffs *et al.*, 2002). Die Bildung der Small-Colony-Variante unter Antibiotikatherapie könnte somit einen Überlebensvorteil für *S. aureus* darstellen. Mechanismen, die dieser Induktion zugrundeliegen, konnten bislang nicht nachgewiesen werden.

Staphylokokken können von eukaryontischen Zellen internalisiert werden. Small-Colony-Varianten sind darüber hinaus in der Lage, intrazellulär zu persistieren. Dies konnte gezeigt werden für endotheliale Zellen (Kahl *et al.*, 1998) sowie für Keratinozyten (von Eiff *et al.*, 2001). Intrazellulär normalerweise wirksame Antibiotika sind für die Elimination von Staphylokokken, die von Zellen internalisiert wurden, hinsichtlich ihrer Wirkung mangelhaft (Krut *et al.*, zur Publikation eingereicht). Im Fall von SCV-Phänotypen ist die Wirkung infolge ihrer phänotypischen Resistenz noch geringer, eine Eradikation von *S. aureus* gelingt in der Regel nicht. Der chronische Verlauf einiger Krankheiten mit akut auftretenden Krankheitsschüben kann somit aus dem Zusammenspiel von intrazellulärer Persistenz und phänotypischer Resistenz erklärt werden.

Versuche von Vesga zeigten, daß das intrazelluläre Milieu endothelialer Zellen nach Internalisierung von Staphylokokken offensichtlich in der Lage ist, die Bildung des SCV-Phänotyps zu induzieren (Vesga *et al.*, 1996). Der Mechanismus, der dazu führt, konnte bislang nicht geklärt werden. Eine Hypothese zur Erklärung dieses Phänomens wurde von Proctor erstellt. Diese stützt sich auf Hinweise, daß Lantibiotika, antibiotisch wirksame Substanzen, die *S. aureus* selbst produziert, unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, die Bildung des SCV-Phänotyps zu induzieren. Lantibiotika sind ebenso wie Aminoglycoside positiv geladene Moleküle, die über aktiven Transport in die Bakterienzelle aufgenommen werden. Die Bildung des SCV-Phänotyps in der Zelle könnte demnach durch Kumulation von Lantibiotika im intrazellulären Milieu nach

Internalisierung der Staphylokokken hervorgerufen werden (Proctor *et al.*, 1994). Weitergehende Untersuchungen zur Bestätigung dieser Annahme existieren nicht. Die Bildung des SCV-Phänotyps kann durch weitere Faktoren induziert werden. So konnte Chuard die Induktion des SCV-Phänotyps an Polymeroberflächen zeigen (Chuard *et al.*, 1997).

1.3 Metabolische Besonderheiten des SCV-Phänotyps

1997 konnte eine *hemB*-defiziente Mutante von *S. aureus* isoliert werden. Das *hemB*-Gen kodiert für das Enzym δ -Aminolävulinsäuredehydratase. Infolge dieses genetischen Defektes ist bei der *hemB*-Mutante eine Häm-Biosynthese nicht mehr möglich. Die *hemB*-Mutante weist hinsichtlich Koloniegröße, Auxotrophie, Pigmentierung und Antibiotikaresistenz Eigenschaften eines SCV-Phänotyps auf (von Eiff *et al.*, 1997).

Small-Colony-Varianten zeigen Auxotrophie gegen einige Substanzen, darunter Häm und Menadion. Diese ist eine Folge von Defekten in der Häm- bzw. Menadion-Biosynthese. Häm und Menadion besitzen Bedeutung für die Energiegewinnung und somit für die ATP-Bildung der Bakterienzelle. Wird dieses nicht mehr oder nur in vermindertem Maße gebildet, so hat dies einige Konsequenzen: ATP ist notwendig, um einen elektrochemischen Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum aufzubauen. Dieser Gradient ist bedeutsam für die Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle. Die Verknappung des Angebotes an Aminosäuren führt zu einer verringerten Proteinsyntheserate und damit zu einem deutlich verlangsamten Wachstum. Ferner sollte mit der Energieverknappung eine verminderte Syntheserate von Exotoxinen einhergehen. Aminoglycosid-Antibiotika werden durch aktiven Transport, der durch den elektrochemischen Gradienten ermöglicht wird, in die Zelle aufgenommen. Bei Abnahme dieses Gradienten verringert sich auch die Aufnahmerate von Aminoglycoside in die Bakterienzelle; die Empfindlichkeit gegenüber Aminoglycosiden ist somit vermindert. Abb. 1.1 zeigt eine Übersicht über die metabolischen Prozesse, die im SCV-Phänotyp gegenüber dem normal wachsenden Phänotyp (nachfolgend als Large-Colony-Variant, LCV bezeichnet) verändert sind (Proctor *et al.*, 1994). Bislang konnte allerdings nicht geklärt werden, ob der Bildung der Small-Colony-Variante sowie der Reversion zu einem normal wachsenden *S. aureus* ein aktiv regulierter Prozeß oder ein zufällig auftretendes Ereignis (etwa durch mobile genetische Elemente oder Mutationen) zugrunde liegt.

Häm ist als Bestandteil der Cytochrome essentiell für die aerobe Energiegewinnung über die Atmungskette. Kann Häm nicht mehr synthetisiert werden, so ist nur noch anaerober Stoffwech-

sel möglich, über den sich allerdings wesentlich weniger Energie gewinnen läßt. Die Folge besteht in einer verminderten ATP-Produktion. Abb. 1.2 zeigt die Biosynthese von Häm sowie die an den einzelnen Schritten beteiligten Enzyme.

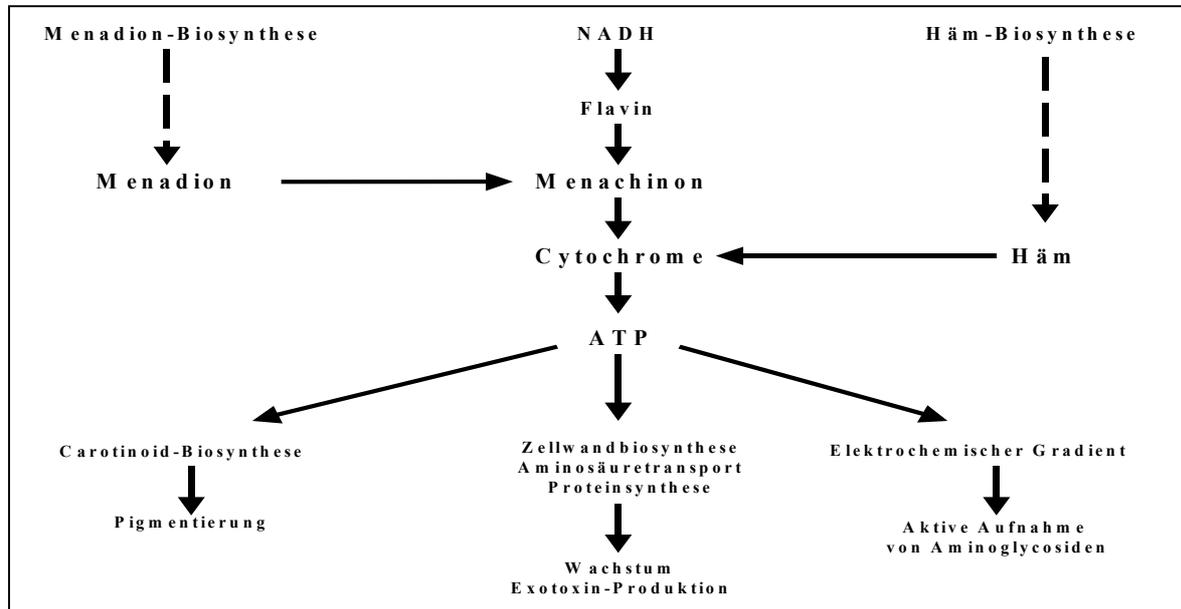


Abb.1.1: Einfluß der Menadion- und Hämbiosynthese auf Wachstum und Eigenschaften von *S. aureus*.

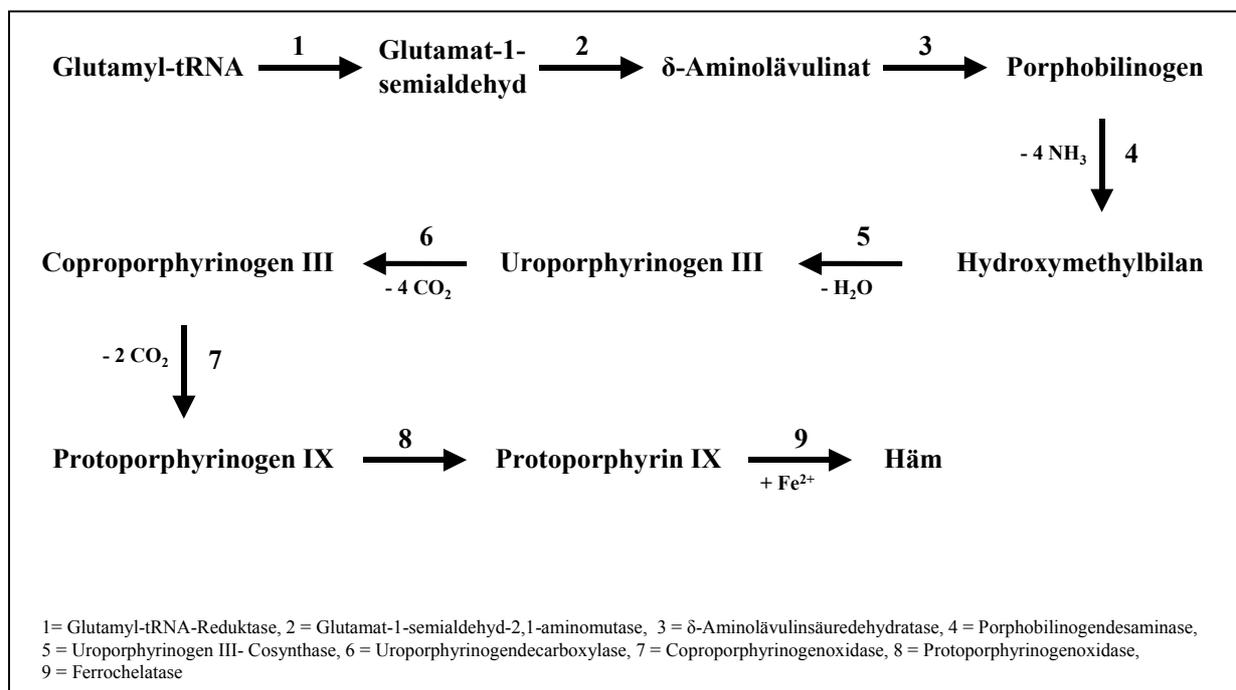


Abb.1.2: Schema der Häm-Biosynthese

Die Auswirkungen einer Menadion-Auxotrophie sind ähnlich denen einer Häm-Auxotrophie. Das aus Menadion (Vitamin K) gebildete Menachinon zeigt chemische Verwandtschaft zu

Ubichinon (Coenzym Q). Dieses wiederum dient dem Wasserstofftransport in der Atmungskette. Nach Proctor *et al.* erfüllt Menachinon bei *Staphylococcus aureus* eine ähnliche Funktion wie Ubichinon (Proctor *et al.*, 1994). In Abb. 1.3 ist die Biosynthese von Menachinon dargestellt.

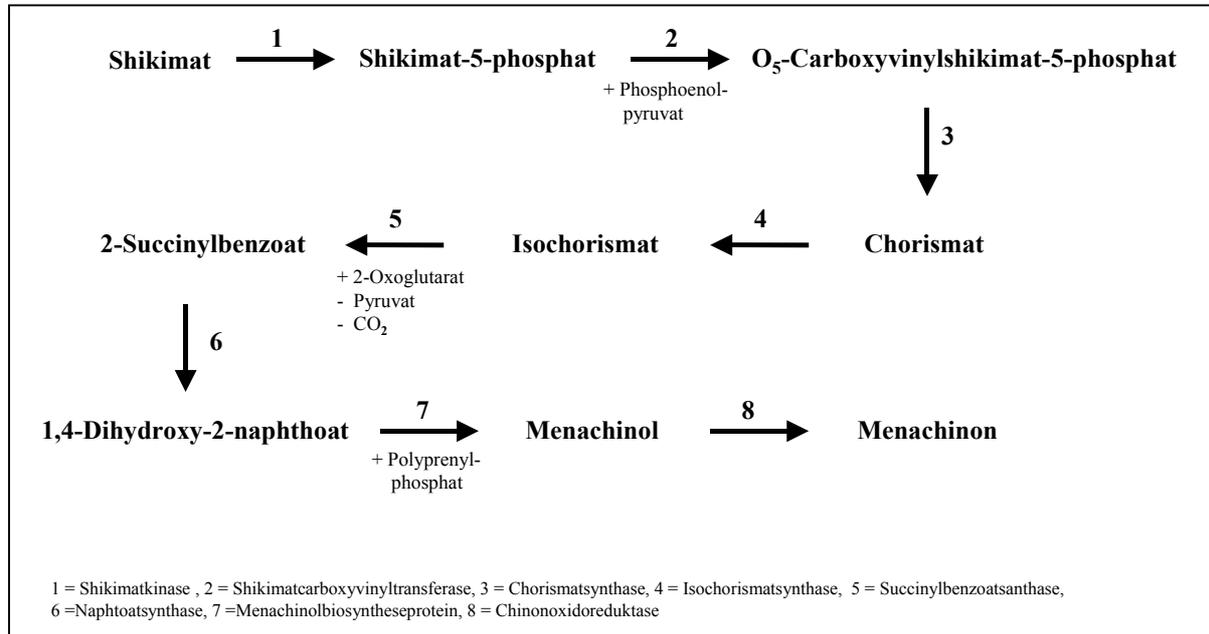


Abb.1.3: Schema der Menachinon-Biosynthese

1.4 Virulenz der Small-Colony-Variante von *Staphylococcus aureus*

Um im Wirtsorganismus überleben zu können, nutzt *S. aureus* eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen.

Zum Einen treten Virulenzfaktoren auf, die von einem einzelnen Gen kodiert sind. Zu diesen zählen diverse Enzyme (DNAsen, Lipasen, Proteasen, Koagulase, Staphylokinase), Exotoxine (α -, β -, γ -, δ -Toxin, Enterotoxine, Toxischer-Schock-Syndrom-Toxin) sowie bestimmte Oberflächenstrukturen (z.B. die antiphagozytisch wirksame Zellwandkomponente Protein A).

Zum Anderen zeigt *S. aureus* Virulenzeigenschaften, an deren Auftreten mehrere Gene beteiligt sind. In diesem Zusammenhang sind multifaktorielle Mechanismen zu nennen, die für die Adhäsion von *S. aureus* an Oberflächen, die Biofilmbildung, die Kapselbildung oder die Induktion von Apoptose in Wirtszellen von Bedeutung sind.

Die Frage nach der Virulenz der Small-Colony-Variante wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So geht Proctor von einer verminderten Virulenz der Small-Colony-Variante aus, die aus den Defekten bei der ATP-Gewinnung erklärt wird (Proctor *et al.*, 1994).

Zu einem anderen Ergebnis kam Jonsson (Jonsson *et al.*, 2003). Er untersuchte die oben erwähnte *hemB*-Mutante hinsichtlich ihrer Pathogenität. Die Untersuchung des Exotoxinmusters zeigte hier allerdings, daß die *hemB*-Mutante eine ca. 20-fach höhere Freisetzungsrate von Proteasen aufwies. Da Proteasen in der Lage sind, Gewebe zu zerstören, kann dies eine erhöhte Pathogenität zur Folge haben. *In vivo*-Untersuchungen im Mausmodell zeigten, daß sich nach intravenöser Injektion eines *S. aureus*-Inokulates eine septische Arthritis bei Verabreichung der *hemB*-Mutante häufiger entwickelte, als bei Verabreichung des korrespondierenden, nicht mutierten Stammes. Darüber hinaus zeigt die durch die *hemB*-Mutante verursachte Arthritis einen schwereren Verlauf. Die bakterielle Last in Niere und Gelenken ist bei der *hemB*-Mutante höher. Da jedoch die freigesetzte Menge von Exotoxinen vom ATP-Gehalt der Zelle und damit vom normalen Ablauf der Atmungskette abhängig ist, ein solcher aber bei Small-Colony-Varianten von *S. aureus* nicht gegeben ist, bleibt zu klären, warum sich trotz verminderter ATP-Bildung eine erhöhte Freisetzung von Exotoxinen zeigt.

Zum Verständnis der Virulenzeigenschaften der Small-Colony-Varianten von *S. aureus* ist es erforderlich, die Regulationsmechanismen der Virulenzfaktoren zu betrachten.

Die Expression der Virulenzgene von *S. aureus* wird durch einige Regulatorsysteme, etwa das *agr*-, *sar*-, *sigmaB*-, *sae*-, *arl*-, *mgr*- und *rot*-System kontrolliert. Von herausragender Bedeutung sind *agr* (accessory gene regulator) und *sar* (staphylococcal accessory regulator).

Das in Abb. 1.4 schematisch dargestellte *agr*-System stellt ein autoreglatives Quorum-sensing-System dar. Es besteht aus den vier Proteinen *agrA*, *agrB*, *agrC* und *agrD*, die als RNA II transkribiert werden. *AgrB* und *agrD* synthetisieren das autoinducing peptide (AIP), ein Oktapeptid, das als Quorum sensing-Molekül fungiert und von den Bakterien in den Extrazellulärraum sezerniert wird. Wenn die extrazelluläre Konzentration dieses Oktapeptids einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, wird die Histidinkinase *agrC* aktiviert, die wiederum über Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor *agrA* aktiviert. Dieser aktiviert die zwei im *agr*-Locus enthaltenen Promotoren P2 und P3. P2 induziert eine vermehrte Transkription von RNA II, P3 bewirkt eine Hochregulierung der Expression von RNA III, das seinerseits als Effektormolekül für die Hochregulierung der Produktion einiger Exotoxine (α - und β -Hämolysin, Toxischer-Schock-Syndrom-Toxin, Serinprotease V8, Nuklease und Enterotoxin B) und die Inhibierung der Produktion bestimmter Zelloberflächenproteine (Protein A, Coagulase und Fibronectin-bindendes Protein) in der spätlogarithmischen und stationären Wachstumsphase

fungiert. (Kornblum *et al.*, 1990, Novick *et al.*, 1995, Novick *et al.*, 1998). RNA III beinhaltet auch das δ -Hämolysin-Gen (*hld*), dessen Expression deswegen als direktes Maß der *agr*-Aktivität dienen kann (Novick *et al.*, 1993).

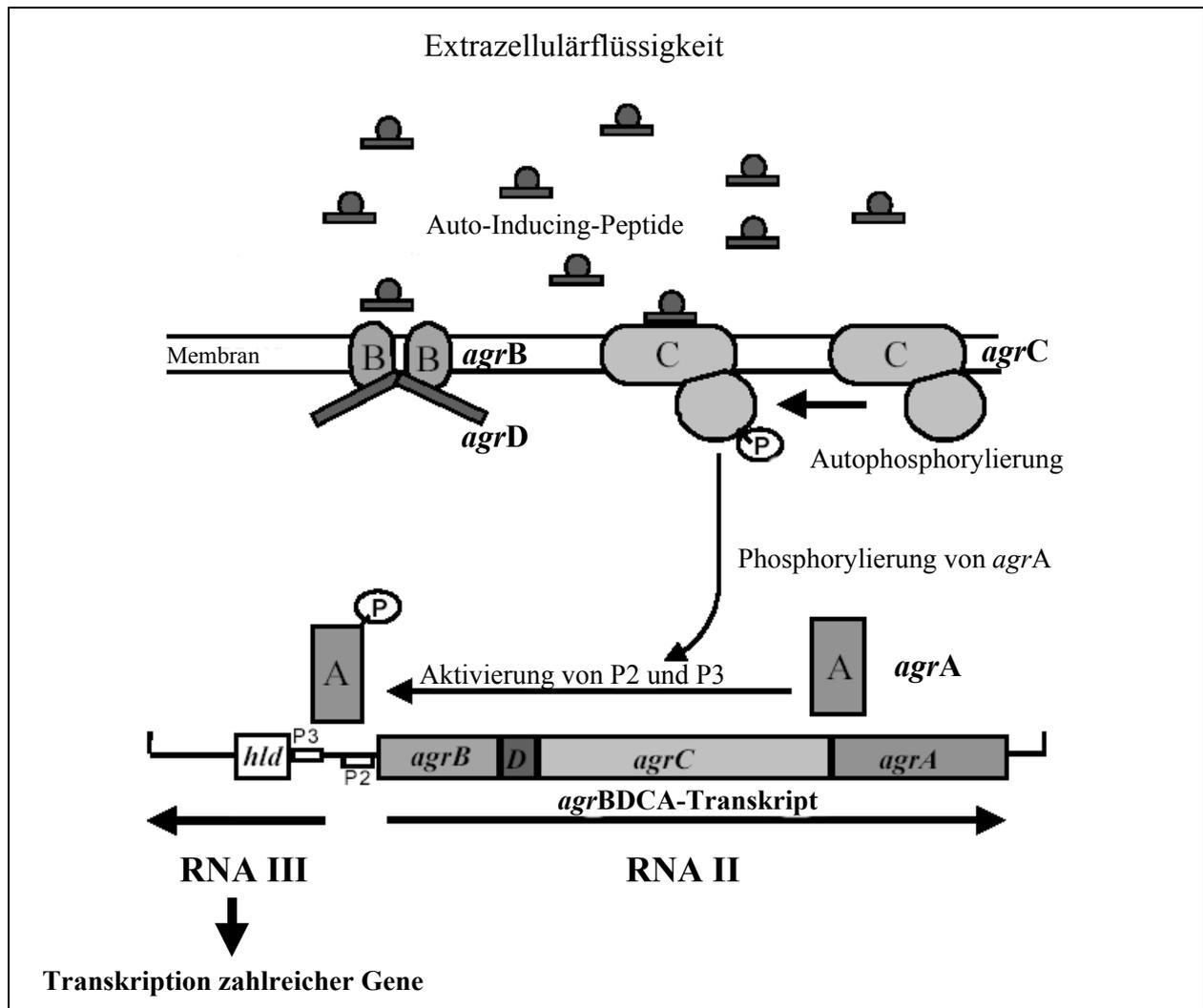


Abb.1.4: Schematische Darstellung des *agr*-Systems (bearbeitet nach E. Morfeldt, 1996)

Das *sar*-System besteht aus den drei überlappenden Transkripten *sarA*, *sarB* und *sarC*. *SarA* kann direkt die Toxinproduktion aktivieren, indem es an Promotor-Regionen von Genen bindet, die für Exotoxine und Zelloberflächenproteinen (Collagen-Adhäsion, Fibronectin-bindendes Protein, diverse Proteasen) kodieren. Darüber hinaus kann es auch indirekt die Toxinproduktion durch Bindung an die *agr*-Promotoren P2 und P3 beeinflussen (Cheung *et al.*, 1997, Chien *et al.*, 1998).

Die beiden Globalregulatorsysteme *agr* und *sar* dienen nicht nur der Steuerung der Produktion von Exotoxinen und Zelloberflächenproteinen. Eine Beteiligung beider Systeme an der

Internalisierung von *S. aureus* durch Zellen und der darauf folgenden Apoptose konnte nachgewiesen werden (Wesson *et al.*, 1998). Darüber hinaus wird die Expression einer großen Anzahl weiterer, meist metabolischer Gene, die nicht, oder zumindest nicht direkt mit der Virulenz von *S. aureus* in Verbindung gebracht werden können, durch *agr* und *sar* beeinflusst (Dunman *et al.*, 2001).

Bislang wurde nicht untersucht, ob die Regulatorsysteme *agr* und *sar* auch im Zusammenhang mit den Virulenzeigenschaften der Small-Colony-Varianten von *S. aureus* relevant sind. Erkenntnisse hierzu könnten wesentlich zum Verständnis der Virulenz des SCV-Phänotyps beitragen.

1.5 Transkriptomanalyse

Die Unterschiede zwischen Small-Colony-Varianten und normal wachsendem *S. aureus* sind zahlreich. Es ist davon auszugehen, daß eine große Anzahl verschiedener Gene am Zustandekommen dieses Phänotyps beteiligt ist. Das Verständnis von Ausbildung und Eigenschaften des SCV-Phänotyps wird durch die Kenntnis der Unterschiede der Transkription erleichtert. Für eine Analyse dieses Umfanges bietet sich eine Transkriptom-analytische Untersuchung mit Hilfe eines DNA-Chips an.

Unter dem Transkriptom versteht man die von einem Organismus unter bestimmten Bedingungen exprimierten Gene sowie deren Expressionsniveau. Im Gegensatz zum Genom, das eine statische Größe darstellt, wird das Transkriptom durch äußere und innere Faktoren beeinflusst. So stellt es eine dynamische Verbindung zwischen dem Genom und dem physischen Erscheinungsbild eines Organismus dar (Velculescu *et al.*, 1997). Mit Hilfe der Transkriptomanalyse läßt sich die Genexpression zweier Organismen vergleichen.

Die Transkriptomanalyse mittels DNA-Chip basiert auf folgendem Prinzip: Kurze, spezifische Fragmente der zu untersuchenden Gene werden mittels PCR aus dem zu untersuchenden Organismus gewonnen. Diese werden an definierter Stelle auf einen chemisch oberflächenbehandelten Objektträger aufgebracht und irreversibel verankert. Der so konstruierte DNA-Chip kann für die Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden.

1.6 Proteomanalyse

Während die Transkriptomanalytik lediglich Rückschlüsse auf die Genexpression zulässt, vermag die Proteomanalyse Aussagen in Hinblick auf die gebildeten Proteine zu treffen. In Zellen finden sich wesentlich mehr Proteine als Gene, da Proteine in Folge von posttranslationalen Modifikationen und Fragmentierungen in mehreren Isoformen auftreten können.

Unter dem Proteom versteht man die quantitative Darstellung des gesamten Proteinexpressionsmusters eines Organismus unter genau definierten Bedingungen (Wilkins, 1995).

Bei der Proteomanalyse können Proteinexpressionsmuster zweier Organismen verglichen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Proteinexpressionsmuster des SCV-Phänotyps mit dem des normal wachsenden *S. aureus* verglichen.

Transkriptomanalyse und Proteomanalyse ergänzen sich gut. Eine Kombination beider Techniken wurde erfolgreich von Hecker *et al.* (2000) angewandt, er untersuchte bis dahin unbekannte Regulone in *Bacillus subtilis*.

1.7 Ziel der Arbeit

Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellte Theorie, die das Phänomen des Auftretens von Small-Colony-Varianten als Folge von Defekten in Enzymen der Atmungskette zu erklären versucht, scheint nicht hinreichend zu sein, um die Vielzahl an Unterschieden zwischen verschiedenen Stämmen, die zur Ausbildung dieses Phänotyps befähigt sind zu erklären. Das Phänomen der Reversion kann durch diese Theorie ebenso wenig erklärt werden, wie die teilweise zu beobachtende erhöhte Expression von Virulenzfaktoren oder die unterschiedlichen Resistenzeigenschaften.

Ziel dieser Arbeit sollte sein, verschiedene Stämme, die zur Ausbildung des SCV-Phänotyps befähigt sind, mittels molekularbiologischer und proteinchemischer Methoden zu untersuchen, um Informationen über funktionelle Unterschiede und Hinweise auf zugrundeliegende Mechanismen zu gewinnen.

Transkriptom sowie Proteom der Small-Colony-Variante waren mit denen des normal wachsenden *S. aureus* zu vergleichen.

Es sollte untersucht werden, ob und gegebenenfalls an welcher Stelle der Atmungskette sich die Gen- bzw. Proteinexpression des SCV-Phänotyps von der des normal wachsenden *S. aureus* unterscheidet. Um die Vielzahl der zu analysierenden Gene effizient Transkriptom-analytisch

untersuchen zu können, wurde ein DNA-Chip-System konstruiert, mit dessen Hilfe mRNA-Expressionsprofile erstellt wurden. Hier festgestellte Unterschiede waren mittels RT-PCR zu verifizieren. Die Untersuchung des Proteoms wurde mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese durchgeführt.

Ferner sollten anhand von Untersuchungen der Produktion von Exoproteinen Aussagen über die mögliche Virulenz von Small-Colony-Varianten getroffen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Gerätename	Firma
PCR-Maschine	Thermocycler T 3	Biometra, Göttingen
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Langenselbold
Zentrifuge	RC 5 C plus	Sorvall, Langenselbold
Laborwaage	Sartorius laboratory	Sartorius, Göttingen
Feinwaage	Sartorius analytic	Sartorius, Göttingen
Speed-Vac	Bachofer Vacuum concentrator	Bachofer, Reutlingen
DNA-Chipscanner	GeneTAC LS 4	Genomic Solutions, Ann Arbor, USA
Hybridisationsstation	GeneTAC Hybridization-Station	Genomic Solutions, Ann Arbor, USA
Isoelektrisches Fokussier- gerät	Multiphor II	Amersham, Freiburg
Elektrophoresekammer	Protean II xi cell (18 cm x 18 cm)	BioRad, München
Stromquelle	Power Pac 3000	BioRad, München
Elektrophoresekammern	Mini - Protean II (7.3 cm x 10.1 cm)	BioRad, München
Elektrophoresekammern	ETTAN Dalt II-System	Amersham, Freiburg
Entwickler	Curix 60	Agfa, Köln
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, München
Inkubationsschrank	Innova 4230	New Brunswick Scientific
UV-Vis-Spektrometer	Lambda 40	Perkin Elmer, Rodgau
Lyophilisator	Finn-Aqua	Sohlberg GmbH
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Dokumentationssystem	Geldoc 2000	BioRad, München
Sonifier	Branson Digital 250	Bachofer, Reutlingen
Gerät für quantitative PCR	GeneAmp 5700 Sequence Detector	PE Applied Biosystems, Darmstadt

2.2 Chemikalien und Biochemikalien

Aminoallyl-dUTP, Ampicillin, Bromphenolblau, Dithiothreitol, Glycerin, und PMSF (Sigma-Aldrich, München); Cy3-monoreaktiver Ester, Cy5-monoreaktiver Ester, Ficoll-Paque und Protein-Größenstandard „rainbow-ladder“ (Amersham-Pharmacia, Freiburg); DEPC, EDTA-Dinatriumsalz, Essigsäure, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat, Trichloressigsäure und Tris (Merck, Darmstadt); Agar-Agar, bovines Serumalbumin BSA und Tween 80 (Serva, Heidelberg); Agarose (Seakem; Biozym, Oldendorf), Bacto-Trypton (Difco, Augsburg), Ethanol (Riedel de Haen, Seelze), Methanol (Riedel de Haen, Seelze), Ethidiumbromid (BioRad, München), Hefe-Extrakt (Difco, Augsburg), DNA-Größenstandard „1 kb plus ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe), x-Gal (Böhringer).

Alle weiteren Chemikalien wurden in höchster erhaltlicher Qualität von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Bio-Rad (München), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden) sowie Sigma-Aldrich (München) bezogen.

2.3 Oligonukleotide für die PCR

Die verwendeten Oligonukleotide (nachfolgend als PCR-Primer bezeichnet) wurden durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und in entsalztem Zustand geliefert (siehe Anhang). Für das Primerdesign wurde die Software Vector NTI (Informax, Frederick, USA) angewandt. Die Primerkonzeption erfolgte unter weitgehender Vermeidung palindromischer Sequenzbereiche. Die verwandten Primerpaare besaßen eine Schmelztemperatur von $T = 55 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Primerlänge lag bei mindestens 17 Nukleotiden.

2.4 Grundlegende mikrobiologische Techniken

2.4.1 Bakterielle Kulturen

Die *Staphylococcus aureus*-Stämme OK, SCH, 12805 und HS, die in den Untersuchungen Verwendung fanden, stammen aus mikrobiologischem Material, das aus Patienten isoliert wurde (klinische Isolate). Hiervon fand mehrfache Subklonierung auf Blutagar statt, um die einzelnen

Stämme genetisch homogen zu erhalten. Die beiden Stämme CE I und CE II wurden freundlicherweise von Herrn Christof von Eiff (Institut für Mikrobiologie an der Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

Flüssigkulturen wurden in Luria-Bertani-Medium (LB) bis zur gewünschten $OD_{[540]}$ bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 220 min^{-1} kultiviert.

2.4.2 Reversionskontrollen

Da Small-Colony-Varianten die Tendenz zeigen, zum LCV-Phänotyp zu revertieren, war bei der Ernte zu überprüfen, ob Reversion stattgefunden hat. Dies geschah, indem von der Flüssigkultur ein Abstrich auf Blutagar vorgenommen wurde. Dieser wurde 18 h lang bei 37 °C inkubiert. Hat Reversion stattgefunden, zeigten sich große Kolonien auf der Platte. In diesem Fall wurde das Material als phänotypische Mischkultur betrachtet und verworfen.

2.4.3 Wachstumskinetiken

Um die unterschiedlichen Teilungsraten von LCV und SCV quantitativ zu erfassen, waren Wachstumskinetiken zu erstellen. Hierzu wurde *S. aureus* über Nacht auf einer Blutagarplatte kultiviert. Am nächsten Tag wurde LB-Medium mit Kolonien aus dieser Platte beimpft und bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von $\nu = 220 \text{ min}^{-1}$ inkubiert. Bei Erreichen eines $OD_{[540]}$ -Wertes von ca. 0,02 wurde im Abstand von 30 min die Optische Dichte gemessen.

2.4.4 Untersuchung der Auxotrophie

Ein wesentliches Merkmal des SCV-Phänotyps ist das Auftreten von Auxotrophie. Die Auxotrophie der Stämme OK, HS, SCH und 12805 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Christof von Eiff (Universität Münster) bestimmt. Darüber hinaus wurde die Auxotrophie des Stammes OK während des Wachstums bestimmt, indem man die Small-Colony-Variante in LB-Medium bis zu $OD_{[540]} = 0,150$ wachsen ließ, Menadion ($c = 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) zusetzte und das weitere Wachstum beobachtete. Zum Zeitpunkt der Menadionzugabe sowie im Abstand von 1 h wurden Reversionskontrollen (s. Kap. 2.4.2) durchgeführt.

2.4.5 Bestimmung der Antibiotikaresistenzen

LCV- und SCV-Phänotyp zeigen unterschiedliches Resistenzverhalten gegenüber verschiedenen Antibiotika. Um beide Phänotypen verschiedener Stämme in dieser Hinsicht zu charakterisieren, mußten die MHK-Werte verschiedener Antibiotika ermittelt werden. Dies geschah mittels E-Test[®] (AB Biodisk, Solna, Schweden) nach den Angaben des Herstellers. Alle vorliegenden Stämme wurden auf Gentamycin-Resistenz untersucht. Die Stämme OK, SCH und 12805 wurden zusätzlich auf Ampicillin-, Ciprofloxacin- und Vancomycin-Resistenz untersucht.

2.4.6 Überprüfung der genetischen Identität zwischen LCV und SCV

Zur Überprüfung der genetischen Identität der LCV/SCV-Paare wurden zwei Standardmethoden verwendet: Die Random Amplified Polymorphic DNA-Analyse (RAPD) und die Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Der Stamm HS wurde im Zusammenhang mit dem Auftreten von SCV-Phänotypen bei einem AIDS-Patienten beschrieben. Im diesem Zusammenhang wurde eine Charakterisierung vorgenommen. Dabei wurde die Identität beider Phänotypen mittels PFGE überprüft (Seifert *et al.* 1999).

Die Stämme CE I und CE II wurden bezogen von Herrn von Eiff vom Institut für Mikrobiologie an der Universität Münster. Dort wurde die genetische Identität mittels PFGE überprüft.

2.4.6.1 RAPD-PCR

Bei der RAPD-PCR wird unter Verwendung kurzer definierter Primer eine PCR durchgeführt, bei der jeweils kurze Bereiche der genomischen DNA des Isolates amplifiziert werden. Man erhält bei anschließender Auftrennung auf Agarosegel ein jeweils für einen Stamm charakteristisches Bandenmuster.

Für die Stämme OK, SCH und 12805 wurde die genetische Identität von LCV und SCV unter Verwendung eines Fertig-PCR-Systems (Ready To Go RAPD Analysis Beads[®], Amersham-Pharmacia, Freiburg) nach den Anleitungen des Herstellers überprüft.

- Primer für RAPD-PCR:**
1. 5'-d[GGTGCGGGAA]-3'
 2. 5'-d[AAGAGCCCGT]-3'
 3. 5'-d[AACGCGCAAC]-3'

Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegele (1%) elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.6.2 PFGE

Bei der PFGE wird die genomische DNA des Isolates unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen fragmentiert. Die erhaltenen Fragmente werden anschließend auf Agarosegel getrennt. Man erhält ein für einen Stamm spezifisches Bandenmuster.

Für die Stämme OK, HS, CE I und CE II wurde die genetische Identität von LCV und SCV unter Verwendung von Fertigreagenzien (GenePath[®] Reagenziensystem, Gruppe 1, BioRad, München) überprüft.

Zum Aufschluß der Bakterien diente eine Lysozym-/Lysostaphinlösung (25 mg/ml bzw. 2 mg/ml). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zum Restriktionsverdau der genomischen DNA diente die Restriktionsendonuklease *Sma*I (5 U/ μ l), Verdau erfolgte über Nacht bei 25 °C. Die Laufbedingungen wurden gewählt wie folgt: Pulszeit 5-30 s, Spannung 6 V/cm, Dauer 20 h, Temperatur 14 °C.

2.5 Molekularbiologische Techniken

2.5.1 Isolierung genomischer, bakterieller DNA

S. aureus wurde wie in Kap. 2.4.1 beschrieben kultiviert. Soweit SCV-Phänotypen betroffen waren, wurde zum Zeitpunkt der Ernte eine Reversionskontrolle durchgeführt (s. Kap. 2.4.2). Zur Ernte wurde 10 min lang bei 4 °C mit 1700 \times g zentrifugiert. Aus dem bakteriellen Sediment wurde genomische DNA mittels eines DNA-Extraktionssystems (DNeasy Tissue Kit[®], Qiagen, Hilden) gewonnen. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden die Bakterien durch

Lysostaphin (Konzentration im Lysepuffer = 200 µg/ml, Inkubationszeit 30 min unter leichtem Schütteln) aufgeschlossen.

2.5.2 Isolierung bakterieller RNA

Kultivierung, Ernte und Reversionskontrolle erfolgten wie in Kap. 2.5.1 beschrieben. Aus den bakteriellen Sedimenten wurde unter Anwendung eines Gesamt-RNA-Isolationssystems (RNeasy Mini Kit[®], Qiagen, Hilden) Gesamt-RNA gewonnen. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde zur Lyse der Bakterien eine Lysostaphinlösung eingesetzt. Die Konzentration im Reaktionsansatz betrug 200 µg/ml, die enzymatische Reaktion erfolgte 10 min lang bei 37 °C unter leichtem Schütteln.

2.5.3 Entwicklung des DNA-Chips

2.5.3.1 Gensonden von *S. aureus* für den DNA-Chip

Der erste Schritt bei der Konstruktion eines DNA-Chips besteht in der Auswahl der Gene, die mit dem DNA-Chip erfaßt werden sollen. In der vorliegenden Arbeit wurden Regulatorgene ausgewählt, desweiteren Gene, die für Toxine, Antibiotikaresistenzen, Streßproteine, Lantibiotika sowie Enzyme der Menadion- und Hämbiosynthese kodieren. Zum Zeitpunkt der Erstellung des DNA-Chips waren nicht alle Gene von *S. aureus* identifiziert. Im Falle von Genen, deren Untersuchung beabsichtigt war, die in *S. aureus* aber noch nicht identifiziert werden konnten, wurden diese Gene über Homologievergleich mit bekannten Genen anderer bakterieller Organismen gewonnen. Dies geschah unter Anwendung des BLAST[®]-Systems, das im Internet unter www.ncbi.nlm.nih.gov zur Verfügung steht. Die ausgewählten Gene und die zur Herstellung der Gensonden benutzten PCR-Primer sind in Anhang 1 aufgeführt.

2.5.3.2 PCR

Die PCR zur Gewinnung der Gensonden wurde durchgeführt unter Anwendung eines PCR-Fertigsystems (puRe Tac Ready-To-Go Beads[®], Amersham Pharmacia, Freiburg).

PCR-Protokoll:	1.	94 °C,	120 s
	2.	94 °C,	30 s
	3.	55 °C,	45 s
	4.	72 °C,	60 s, Schritte 2 bis 4 insgesamt 35 mal
	5.	72 °C,	600 s

Anschließend wurden die Reaktionsprodukte durch ein Agarosegel (1%) nach Fragmentlänge aufgetrennt. Erschienen hier nicht die gewünschten DNA-Banden, so wurde die PCR wiederholt, allerdings wurde Schritt 3 bei 50 °C durchgeführt. Die DNA-Fragmente wurden mittels eines Gelextraktionssystemes (Gel Extraction Kit[®], Qiagen, Hilden) aus dem Gel gewonnen und aufgereinigt.

2.5.3.3 Klonierung der Gensonden in den Vektor pCR 2.1

Die Ligation von PCR-Fragmenten und Transformation in *Escherichia coli* wurde durchgeführt mittels eines Kloniersystems (TOPO TA Cloning Kits[®], Invitrogen, Karlsruhe) nach den Anweisungen des Herstellers. Die Plasmid-Reinigung aus *E. coli* wurde durchgeführt mit Hilfe eines Plasmidgewinnungssystems (QIAprep Spin Miniprep-Kit[®], Qiagen, Hilden). Anschließend wurde die gewonnene Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* I (Invitrogen) verdaut. Das Reaktionsprodukt wurde durch Agarosegel (1%) aufgetrennt und über die Fragmentlänge überprüft. Zusätzlich wurde zur Kontrolle die erhaltene DNA sequenziert und mit der gewünschten Sequenz verglichen.

2.5.3.4 Erstellung des DNA-Chip

Der DNA-Chip wurde von der Firma GeneScan (Freiburg) erstellt. Die Genfragmente wurden im Plasmid geliefert und unter Verwendung von Primern flankierender Sequenzen des Inserts durch PCR amplifiziert. Insgesamt wurden 155 PCR-Produkte auf Corning CMT[®] Hydrophob-Rohlinge (Corning Incorporated Life Sciences, Acton, USA) aufgetragen. Die Rohlinge waren laut Angabe des Herstellers aminosilanbeschichtet. Als Negativkontrolle wurde Arabidopsis-DNA eingesetzt.

2.5.4 Gewinnung einer fluoreszenzmarkierten cDNA aus genomischer DNA

Die Fluoreszenzmarkierung der cDNA erfolgte indirekt. Genomische DNA wurde durch Sonifikation (3 x 10 s, dazwischen 20 s Pause, 12% der Maximalamplitude, auf Eis) fragmentiert. Anschließend wurde unter Anwendung eines Fertigreagensystems (BioPrime DNA-labelling System-Kit[®], Invitrogen) eine cDNA synthetisiert. Als Primer dienten die mit dem Reagenssystem gelieferten Random-Hexamere. Um die gewonnene cDNA zu markieren, wurde dem Reaktionsgemisch Amino-Allyl-dUTP zugesetzt. Aus dem Reaktionsgemisch wurde die synthetisierte cDNA unter Verwendung eines PCR-Reinigungssystems (MiniElute PCR Purification Kit[®], Qiagen, Hilden) extrahiert und aufgereinigt. Die aufgereinigte cDNA wurde lyophilisiert und das erhaltene Sediment in 0,1 M Bicarbonatlösung (pH = 9,0) aufgenommen, mit Cy 3- bzw. Cy 5-Farbstoff versetzt und für die Kopplung 1 h unter Ausschluß von Licht inkubiert. Zur Verhinderung einer späteren Fluoreszenzlöschung wurde die Reaktionslösung anschließend mit Hydroxylaminlösung (c = 1,33 M) versetzt und 15 min unter Ausschluß von Licht inkubiert. Es folgte Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit[®] (Qiagen). Dem Eluat wurden 10 µg Lachsperma-DNA sowie 50 µg polyA zugesetzt. Die Probe wurde anschließend lyophilisiert.

2.5.5 Gewinnung einer fluoreszenzmarkierten cDNA aus RNA

Die Gewinnung der RNA erfolgte wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben. Aus dieser konnte eine markierte cDNA durch reverse Transkription gewonnen werden.

Zum Einsatz kam ein Fertigreagenziensystem (Label Star[®] Array Kit, Qiagen, Hilden). Als Primer dienten Random-Hexamere. Als Markierungsnukleotid wurde hier Cy3- bzw. Cy5-dCTP (Amersham, Freiburg) zugesetzt (direkte Markierung). Die Reagenzien zur Aufreinigung sind im Kit enthalten. Das Eluat der Aufreinigung wurde mit 10 µg Salmon Sperm DNA sowie 50 µg polyA versetzt und anschließend lyophilisiert.

2.5.6 Hybridisierung

Prähybridisierungslösung:	Formamid (25%, V/V) 5 x SSC SDS (0,1%) Rinderserumalbumin (10 mg/ml)
Hybridisierungslösung:	Formamid (25%, V/V) 5 x SSC SDS (0,1%)
Waschlösung 1:	2 x SSC SDS (0,1%)
Waschlösung 2:	0,1 x SSC SDS (0,1%)
Waschlösung 3:	0,1 x SSC

Für die Hybridisierung wurden die markierten cDNA-Lyophilisate in jeweils 100 µl Hybridisierungslösung gelöst.

Die Hybridisierungsreaktion wurde unter Anwendung der GeneTAC[®] Hybridization-Station (Genomic Solutions, Ann Arbor, USA) wie folgt durchgeführt: Die DNA-Chips wurden mit dest. Wasser 1 min lang bei 42 °C gewaschen und anschließend getrocknet. Es folgte die Prähybridisierung unter Anwendung von je 100 µl Prähybridisierungslösung über einen Zeitraum

von 1 h bei 42 °C. Die DNA-Chips wurden bei 42 °C mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Die cDNA-haltige Hybridisierungslösung wurde zwecks Denaturierung 3 min lang auf 90 °C erhitzt und unmittelbar danach in die Hybridisierungskammer eingespritzt, es folgte die Hybridisierungsreaktion bei 42 °C über einen Zeitraum von 19 h. Danach wurden die DNA-Chips gewaschen, 2 min mit Waschlösung 1 bei 42 °C, anschließend 2 min mit Waschlösung 2 bei 23 °C und zuletzt 2 min mit Waschlösung 3 bei 23 °C.

2.5.7 Auswertung der DNA-Chips

Die DNA-Chips wurden mit dem GeneTAC LS 4[®] Arrayscanner (Genomic Solutions, Ann Arbor, USA) gescannt. Das Ergebnis wurde mit der Software TIGR Spotfinder[®] (The Institute of Genomic Research, TIGR, Rockville, USA) ausgewertet.

2.5.8 RT - PCR

Die RT-PCR wurde durchgeführt, um Ergebnisse der DNA-Chip-Analyse mit einer weiteren molekularbiologischen Methode zu verifizieren.

RNA-Gewinnung erfolgte wie in Kap. 2.5.2 beschrieben. Bevor die RT-PCR durchgeführt werden konnte, mußten Reste genomischer DNA rückstandsfrei entfernt werden. Dies wurde durch Verdau mit RNase-freier DNase erreicht; eingesetzt wurde hierfür ein Fertigreagenziensystem (RNase free DNase Set[®], Qiagen, Hilden). Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde das Eluat nochmals dem DNase-Verdau unterzogen. Auf diese Weise ließen sich DNA-Rückstände restlos entfernen. Unter Anwendung eines Fertigreagenziensystems für eine reverse Transkription (SuperScript[®] First Strand Synthesis System, Invitrogen, Karlsruhe) wurden 5 µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Diese wurde für die Durchführung einer quantitativen PCR eingesetzt.

Mittels quantitativer PCR wurde die Transkription von δ -Hämolysin (*hld*, als Sonde für das *agr*-System) und α -Hämolysin (*hla*) untersucht. Die Primerkonzentration betrug 300 nM. Die Länge der amplifizierten Fragmente bei einer RT-PCR sollte nicht länger als 250 bp sein. Das Primerpaar für *hla* lieferte ein Fragment mit einer Länge von 113 bp, das Primerpaar für *hld* lieferte ein Fragment mit einer Länge von 104 bp. Die Durchführung der quantitativen PCR erfolgte unter

Anwendung eines Fertigreagensystems (SYBR green[®] Kit, PE Applied Biosystems, Foster, Kalifornien) nach dem Herstellerprotokoll mit Hilfe des Gerätes GeneAmp 5700 Sequence Detector[®] (Perkin Elmer).

***hla*-Primer :** sense: 5'-d[ATGAAAACACGTATAGTCGC]-3'
antisense: 3'-d[TCTGTAGTACCGGTTTTAAT]-5'

***hld*-Primer :** sense: 5'-d[TTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTGATTTC]-3'
antisense: 3'-d[TAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGATAA]-5'

2.6 Proteinchemische Methoden

Zur Gewinnung bakterieller Proteine wurde *S. aureus* in LB-Medium bei 37 °C und Schütteln mit einer Frequenz von 220 min⁻¹ kultiviert. Bei Erreichen einer OD_[540] = 0,3 wurde mittels Zentrifugation geerntet (30 min, 12000 ×g, 4 °C). Soweit SCV-Phänotypen betroffen waren, wurde zum Zeitpunkt der Ernte eine Reversionskontrolle (s. Kap. 2.4.2) durchgeführt.

Aus dem bei der Zentrifugation entstehenden bakteriellen Sediment wurden zytoplasmatischer Proteine gewonnen. Aus dem Überstand konnten extrazelluläre Proteine gewonnen werden.

2.6.1 Gewinnung zytoplasmatischer Proteine

Waschpuffer: Tris/HCl (10 mM)
EDTA (1 mM)
pH 7,5

Lysepuffer: Tris/HCl (10 mM)
Phenylmethylsulfonylfluorid (24,5 mg/100ml)
Lysostaphin (3,3 µg/ml)
pH 7,5

Die bei der Zentrifugation (Kap. 2.6) entstandenen bakteriellen Sedimente wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die bakteriellen Zellwände lysiert, indem man sie mit

Lysispuffer 10 min lang auf Eis inkubierte (kein Schütteln). Die enzymatisch lysierten Proben wurden unter Anwendung der French Press aufgeschlossen. Die Proben wurden 3 x 1 min lang bei einem Druck von 1000 psi inkubiert, danach wurde das Druckventil langsam geöffnet. Die erhaltene Lösung wurde anschließend 60 min lang bei 20000 $\times g$ und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand enthielt die zytoplasmatischen Proteine.

2.6.2 Gewinnung extrazellulärer Proteine

Nach der in Kap. 2.6 beschriebenen Zentrifugation wurde der Überstand an LB-Medium zwecks Präzipitation der Proteine mit Trichloressigsäure versetzt, die Endkonzentration betrug 10%. Die Präzipitation wurde über 12 h bei einer Temperatur von 4 °C durchgeführt. Die entstandene Suspension wurde bei 12000 $\times g$ zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde verworfen. Das bei der Zentrifugation entstehende Sediment wurde zweimal mit Ethanol (96%) (T = -70 °C) und einmal mit Ethanol (70%) (T= -30 °C) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das gereinigte Sediment getrocknet und in 8 M Harnstofflösung (Raumtemperatur, 20 min, 1400 min^{-1}) gelöst. Die unlöslichen Rückstände wurden bei 20000 $\times g$ und Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand enthielt die extrazellulären Proteine.

2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BioRad DC[®]-Reagenz bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach den Angaben des Herstellers in einer Mikrotiterplatte durchgeführt, die Auswertung erfolgte photometrisch bei $\lambda = 750 \text{ nm}$. Als Standard diente eine Kalibriergerade, die aus Vermessung einer Verdünnungsreihe von BSA erstellt wurde.

2.6.4 Eindimensionale SDS-PAGE

Die Trennung extrazellulärer Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE mit 10% Polyacrylamidgelen nach der von Schägger und Jagow beschriebenen Methode (Schägger *et al.*, 1987). Als apparatives System diente das Protean II[®] Electrophoresis System (BioRad).

Die aufgetragene Proteinmenge betrug jeweils 20 µg, die Visualisierung erfolgte mittels Silberfärbung (s. Kap. 2.6.6.1).

2.6.5 Zweidimensionale SDS-PAGE

Fokussierlösung:	Lösung (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff)	5,00 ml
	CHAPS	0,05 g
	Pharmalyte [®] 3-10	26,00 µl
	DTT	30,00 mg

Äquibrierungslösung:	Harnstoff	36,00 g
	Glycerin (30%)	34,80 ml
	SDS (4%)	4,00 g
	50 mM Tris/HCl pH 6,8	10,00 ml
	mit bidest. Wasser auf 50 ml auffüllen	

Das Prinzip der 2-D-Gelelektrophorese besteht darin, daß Proteine nach zwei verschiedenen Parametern aufgetrennt werden. Die erste Dimension besteht in einer isoelektrischen Fokussierung, bei der die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt werden. Die zweite Dimension bildet eine SDS-PAGE, bei der die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden.

Die isoelektrische Fokussierung wurde durchgeführt wie von Görg *et al.* (1988) beschrieben. Lyophilisierte Proteine wurden in Fokussierlösung gelöst und auf die IPG-Gelstreifen aufgetragen. Für die Fokussierung wurden Immobiline IPG-Strips[®], 18 cm, pH 4-7 (Amersham, Freiburg) eingesetzt.

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit dem Multiphor[®]II-Gerät (Amersham) durchgeführt. Fokussiert wurde mit insgesamt 58 kVh nach folgendem Programm:

1. Stufe:	500 V	1 mA 5 W	500 Vh
2. Stufe:	500 V	1 mA 5 W	2 500 Vh
3. Stufe:	3 500 V	1 mA 5 W	10 000 Vh
4. Stufe:	3 500 V	1 mA 5 W	45 000 Vh

Bevor die SDS-PAGE durchgeführt werden konnte, mußten die IPG-Streifen äquilibriert werden. Dies war notwendig, um die nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennten Proteine mit SDS zu beladen und so einen optimalen Proteintransfer zu erzielen. Die IPG-Streifen wurden zweimal 15 min lang mit Äquilibrungslösung versetzt. Der Äquilibrungslösung des ersten Schrittes wurde zusätzlich DTT (65 mM) als reduzierendes Agens zugesetzt. Der des zweiten Schrittes wurde als methylierendes Agens Jodacetamid (135 mM) zugesetzt.

Für die Durchführung der zweiten Dimension wurden Fertiggele eingesetzt. Zum Einsatz kamen Ettan Dalt Gele 12.5 (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden), die technische Durchführung erfolgte im Ettan Dalt II-Gerät.

Die benötigten Puffer und Reagenzien wurden vom Hersteller geliefert. Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden luftblasenfrei auf das Polyacrylamidgel aufgelegt und mit Agarose fixiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte während eines Zeitraumes von 14 h bei einer Temperatur von 24 °C. Während dieser Zeit wurde die elektrische Leistung bei konstant 5 W pro Gel gehalten.

2.6.6 Visualisierung der Proteine

Die auf den Gelen aufgetrennten Proteine können mit zwei verschiedenen Methoden visualisiert werden. Je nach Verwendungszweck bedient man sich entweder der Färbung mit Silber oder mit Coomassie-blue-Farbstoff. Für analytische Zwecke färbt man mit Silber, will man im präparativen Maßstab arbeiten und die Proteine anschließend identifizieren, wird für die Visualisierung Colloidal-Coomassie-Farbstoff angewandt.

2.6.6.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde durchgeführt wie von Neuhoff *et al.* (1990) beschrieben. Allerdings wurde als Stopplösung des Entwicklungsprozesses Essigsäure (5%) eingesetzt.

2.6.6.2 Färbung mit Colloidal-Coomassie

Für die Färbung mit Colloidal-Coomassie wurde ein Fertigreagensatz (Colloidal Blue Staining Kit[®], Invitrogen, Paisley) verwandt. Die Färbeprozedur erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.6.7 Western-Blot

Die Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt wie von Towbin *et al.* (1979) beschrieben.

Als Antikörper dienten polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen Enterotoxin A, Enterotoxin B und α -Toxin sowie ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Protein A. Alle Antikörper wurden bei Sigma (München) bezogen.

Alle Antikörper wurden im Verhältnis 1 : 2000 verdünnt.

Für die Entwicklung wurden ein Fertigreagensatz (ECL[®] Western Blotting Detection Reagents, Amersham, Freiburg) verwandt; mit diesem wurde auch der Zweitantikörper geliefert.

2.6.8 Proteinidentifikation mittels MALDI-TOF

Die Identifikation der Proteine aus zweidimensionalen Gelen erfolgte mit MALDI-TOF-Analyse. Hierfür wurden die Proteinspots aus dem Gel ausgeschnitten und dreimal mit bidest. Wasser (HPLC-grade) sowie einmal mit 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung gewaschen. Jeder Waschschrift erfolgte 5 min auf Eis im Ultraschallbad, danach 10 min unter Schütteln mit einer Frequenz von 1400 min⁻¹. Es folgte eine Reduzierung mit Dithiotreitol (65 mM, 30 min) und danach Alkylierung mit Jodacetamid (135 mM, 60 min). Danach wurden die Proben mit 100% Acetonitril, mit 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung und schließlich nochmals mit 100%

Acetonitril gewaschen (Waschen erfolgt, wie oben beschrieben). Die Proben wurden im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die getrockneten Gelfragmente wurden mit 30 µl Ammoniumbicarbonat-Lösung, die 25 µg/ml Trypsin enthält, rehydratisiert und über Nacht bei 37 °C verdaut. Das Reaktionsprodukt wurde 5 min lang bei 4 °C und 1000 ×g zentrifugiert. Die bei dem Verdau entstandenen Proteinfragmente wurden danach in mehreren Schritten mit 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung, mit 0,1%iger Trifluoressigsäurelösung (TFA), mit einer 3:2-Mischung aus Acetonitril und TFA-Lösung und am Ende mit reinem Acetonitril aus den Gelstückchen extrahiert. Nach jedem Extraktionsschritt wurden die Lösungen gesammelt und im Vakuumkonzentrator getrocknet. Das entstehende Sediment wurde in 0,1%iger TFA-Lösung gelöst.

2.6.8.1 Vorbereitung der Probe für MALDI-TOF

Als Matrix diene Cyanohydroxymizsäure, diese wurde in einer 1:1-Mischung aus Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure gelöst. Auf den Probenträger wurden jeweils 2 µl Probe sowie 1 µl Matrixlösung pipettiert.

2.6.8.2 MALDI-TOF-Spektrometrie und Auswertung

Die MALDI Massenspektren wurden mit dem Bruker Reflex IV Mass Spektrometer (Bruker-Daltonik, Leipzig) aufgenommen. Die Validierung aller gewonnenen Daten wurde durchgeführt unter Verwendung der XMASS 5.15 sowie der BioTools 2.0 Postanalysis Software. Die MALDI-MS-Spektren wurden kalibriert unter Verwendung des Peptide Calibration Standard von Bruker. Alternativ wurde nachkalibriert unter Verwendung der Signale für Trypsin-Autolysefragmente mit $[M+H]^+$ -Werten von 842,51 und 2211,10 (interne Kalibrierung).

Peptide Calibration Standard

Peptid	[M + H]⁺ monoisotopisch	[M + H]⁺ durchschnittlich
Angiotensin II	1046,5420	1047,20
Angiotensin I	1296,6853	1297,51
Substanz P	1347,7361	1348,66
Bombesin	1619,8230	1620,88
ACTH clip 1-17	2093,0868	2094,96
ACTH clip 18-39	2465,1990	2466,73
Somatostatin 28	3147,4714	3149,61

Die Spektren wurden ausgewertet mit Hilfe des Mascot-Programmes; dieses wird im Internet von der Firma Matrix Science Inc. (London) zur Verfügung gestellt (<http://www.matrixscience.com>).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchte *S. aureus*-Stämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sechs verschiedenen, Small-Colony-Varianten bildenden *S. aureus*-Stämme OK, HS, SCH, 12805, CE I und CE II untersucht. Die Stämme OK, HS, SCH und 12805 stammten aus klinischen, mikrobiologischen Isolaten; die Stämme CE I und CE II wurden freundlicherweise von Herrn Christof von Eiff vom Mikrobiologischen Institut der Universität Münster zur Verfügung gestellt.

3.2 Genetische Identität der LCV- und SCV-Phänotypen

Zunächst war die genetische Identität beider Phänotypen der Stämme OK, 12805, SCH, HS, CE I und CE II sicherzustellen.

Die genetische Identität beider Phänotypen wurde bei den Stämmen OK und HS mittels PFGE überprüft. Abb.3.1 zeigt das Resultat der PFGE-Untersuchung des Stammes OK. Die Bandenmuster von LCV und SCV im Agarosegel sind identisch. Ähnliche Ergebnisse ergab auch die Untersuchung des Stammes HS (Seifert *et al.*, 1999).

Die genetische Identität der Stämme OK, SCH und 12805 wurde mittels RAPD-PCR nachgewiesen (Abb.3.1). Auftrennung der RAPD-PCR-Produkte im Agarosegel zeigte für LCV und SCV dieser drei Stämme jeweils identische Bandenmuster. Die Stämme CE I und CE II wurden von Herrn von Eiff vom Institut für Mikrobiologie an der Universität Münster zur Verfügung gestellt. Die genetische Identität beider Phänotypen dieser Stämme wurde ebenfalls mittels RAPD-PCR überprüft (Abb.3.1). Auch hier wurden bei der Auswertung für LCV und SCV jeweils identische Bandenmuster im Agarosegel festgestellt.

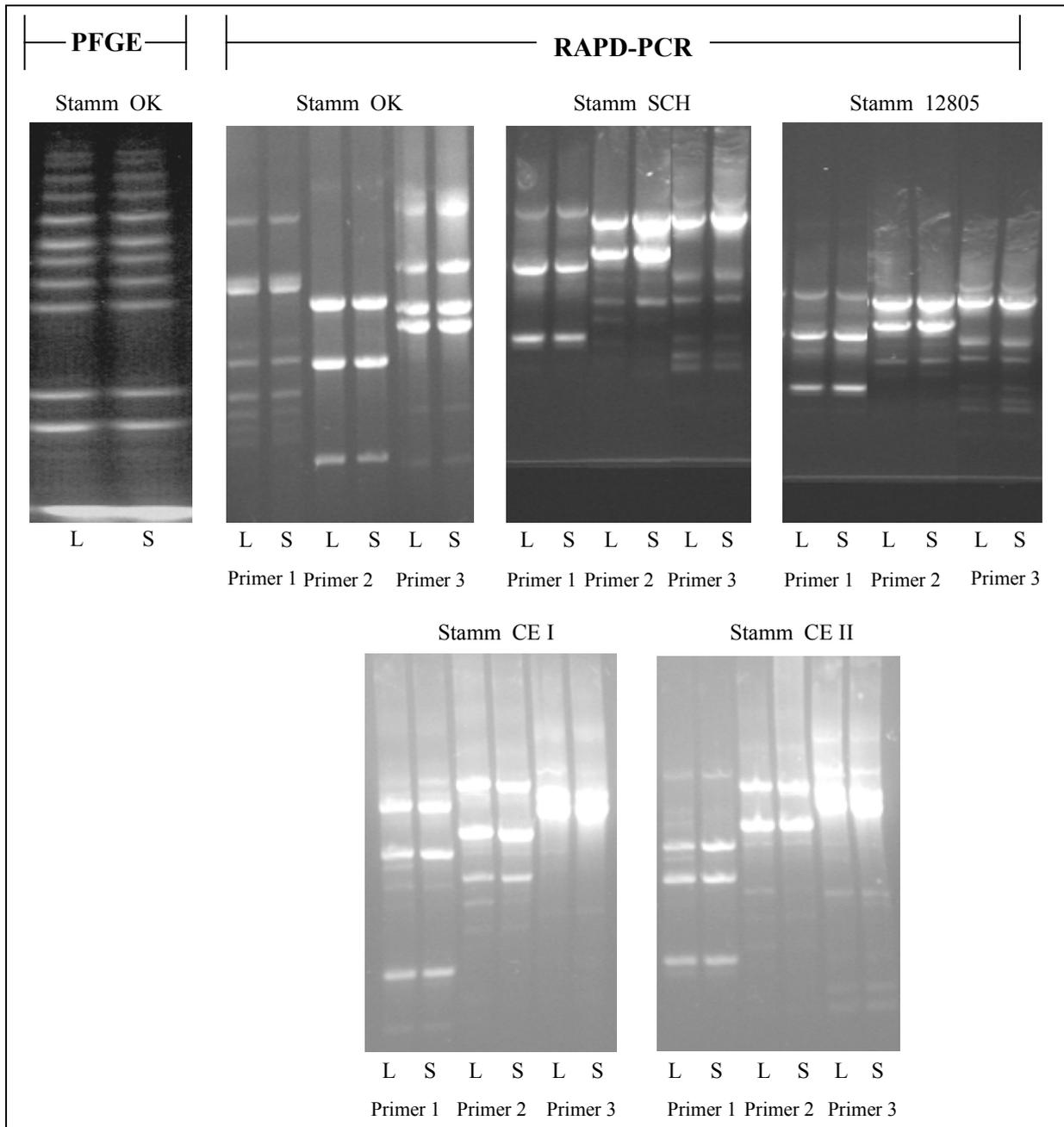


Abb. 3.1: Genetische Identität der LCV/SCV-Paare der Stämme OK, SCH, 12805, CE I und CE II. LCV/SCV-Paare wurden kultiviert bis OD = 0,3. Nach Ernte wurde genomische DNA gewonnen. Mit dieser wurde eine RAPD-PCR mit drei verschiedenen Primern bzw. eine PFGE (Restriktionsverdau mit *Sma*I) durchgeführt.

3.3 Charakterisierung der *S. aureus*-Stämme

Ein wesentliches Merkmal der Small-Colony-Variante von *S. aureus* besteht in einer signifikant reduzierten Proliferationsrate. Um diese graphisch darzustellen, wurden Wachstumskinetiken von vier als repräsentativ zu bewertenden Stämmen erstellt.

Abb.3.3 zeigt die Wachstumskinetik der LCV- und SCV-Phänotypen der Stämme OK, HS, CE I und CE II.

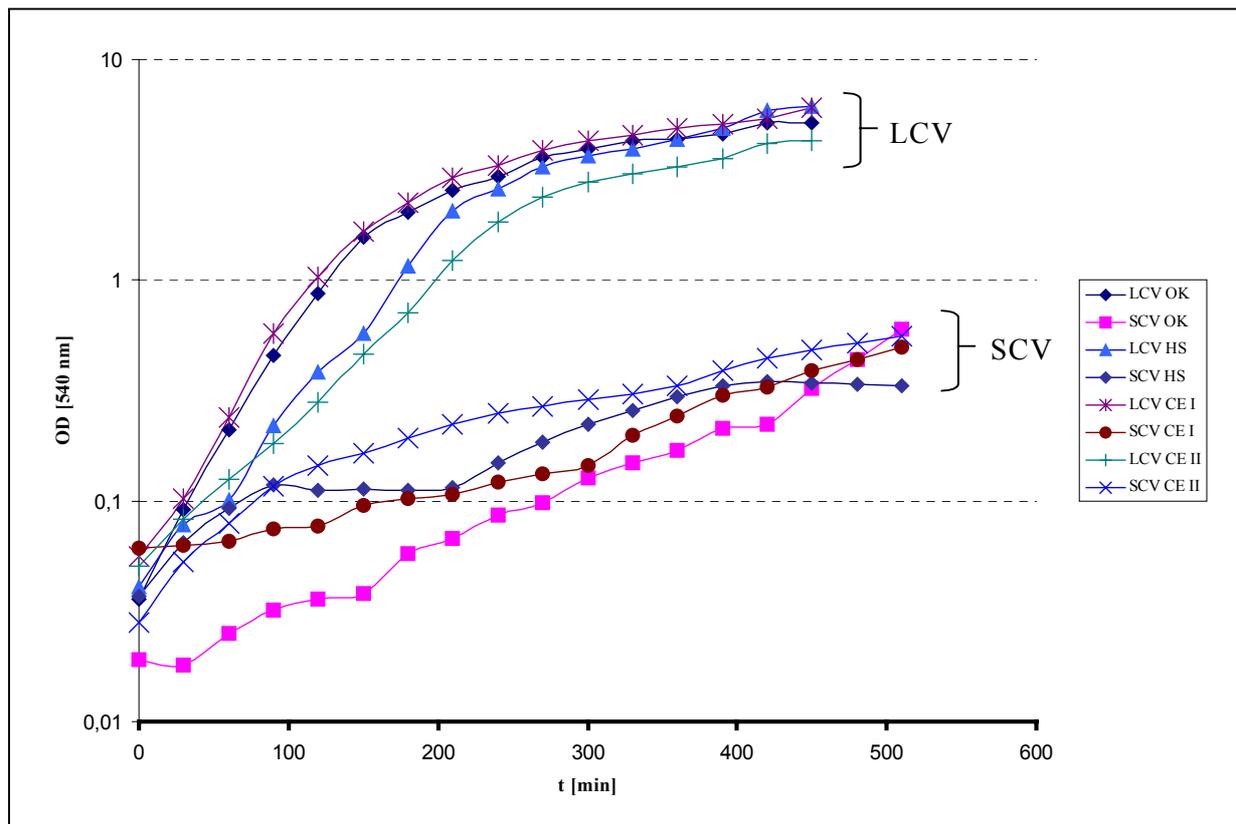


Abb. 3.3: Wachstum von LCV/SCV-Paaren.

Beide Phänotypen der untersuchten Stämme wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Im Abstand von 30 min wurden die OD-Werte gemessen und bei den SCV-Phänotypen Reversionskontrollen durchgeführt.

Die exponentielle Phase des Wachstums endete bei den LCV-Phänotypen bei einer optischen Dichte von ca. 2. Abweichend hiervon weisen SCV-Phänotypen kaum eine exponentielle Wachstumsphase auf. Das Wachstum der SCV-Population des Stammes HS stagnierte bei einer optischen Dichte von ca. 0,3.

Small-Colony-Varianten von *S. aureus* besitzen häufig die Fähigkeit, zum normal wachsenden LCV-Phänotyp zu revertieren. Revertanten, die sich einmal in einer Kultur gebildet haben, überwachsen den SCV-Phänotyp; nach einiger Zeit zeigt die Kultur die für einen normal

wachsenden *S. aureus* typische Wachstumskinetik. Um die Reversionshäufigkeit zu untersuchen, wurden sechs Flüssigkulturen der SCV des Stammes OK über einen Zeitraum von ca. 16 h kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden in regelmäßigen Abständen Messungen der $OD_{[540]}$ -Werte und Reversionskontrollen durchgeführt. Erste Revertanten konnten bei den durchgeführten Reversionskontrollen jeweils bei unterschiedlichen $OD_{[540]}$ -Werten festgestellt werden. Bei einem Ansatz wurden erste Revertanten bereits bei einer $OD_{[540]}$ von 0,3 detektiert. Drei weitere Ansätze zeigten erste Revertanten bei $OD_{[540]}$ -Werten zwischen 0,5 und 0,6. Bei zwei Ansätzen wurden Revertanten sichtbar bei einem $OD_{[540]}$ -Wert von ca. 0,7.

Eine wesentliche Eigenschaft von Small-Colony-Varianten ist ihre Auxotrophie für verschiedene Substanzen. Die Stämme OK, SCH, 12805, HS, CE I und CE II wurden auf Thiamin-, Menadion-, Häm- und Thymidin-Auxotrophie untersucht. Für die Small-Colony-Varianten der Stämme OK, SCH, CE I und CE II konnte Menadion-Auxotrophie nachgewiesen werden. Für die Small-Colony-Variante des Stammes HS wurde eine kombinierte Auxotrophie für Menadion und Thymidin nachgewiesen. Für die Small-Colony-Variante des Stammes 12805 konnte keine eindeutige Auxotrophie für eine der genannten Substanzen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Abb.3.4 zeigt die Auswirkungen der Menadion-Zugabe auf die Wachstumskinetik des Menadion-auxotrophen *S. aureus*-Stammes OK. Zwei SCV-Flüssigkulturen wurden inkubiert, bei Erreichen eines $OD_{[540]}$ -Wertes von 0,15 wurde einer Kultur Menadion zugesetzt (schwarzer Pfeil). Nach Zugabe von Menadion wurde ein exponentielles Wachstum der Kultur festgestellt. Um sicherzustellen, daß keine Reversion stattgefunden hat, wurden alle 30 min Reversionskontrollen durchgeführt.

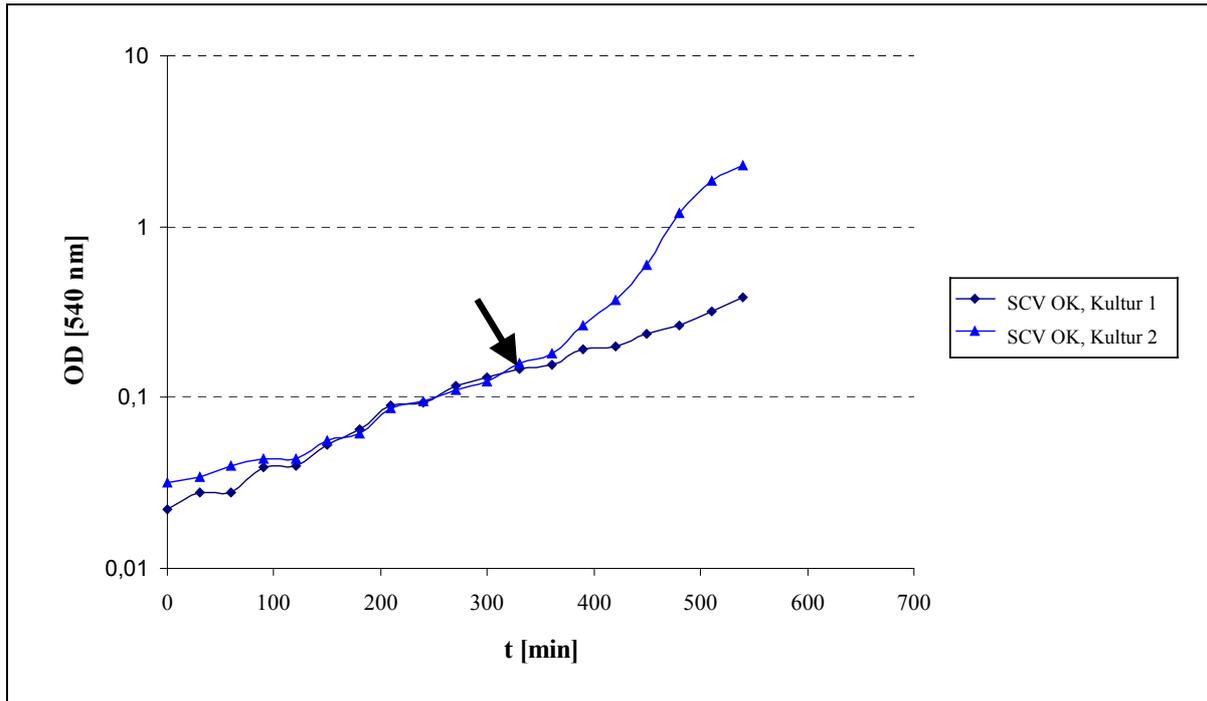


Abb. 3.4: Auxotrophie des SCV-Phänotyps des Stammes OK.

Zwei Flüssigkulturen des SCV-Phänotyps wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Zu Kultur 2 wurde während des Wachstums Menadion zugesetzt (Pfeil), die Menadion-Konzentration im LB-Medium betrug 1 µg/ml. Zu Ansatz 1 wurde kein Menadion zugesetzt.

In der Literatur finden sich zahlreiche Aussagen über eine signifikant erhöhte Antibiotika-Resistenz von Small-Colony-Varianten. Besonders häufig tritt bei Small-Colony-Varianten eine erhöhte Aminoglycosid-Resistenz auf. Da die Aminoglycosid-Resistenz mit den metabolischen Besonderheiten der Small-Colony-Variante erklärt wird, wurden die MHK-Werte von Gentamycin jeweils bei LCV und SCV der Stämme OK, SCH, 12805, HS, CE I und CE II ermittelt.

Die Bestimmung der MHK-Werte wurde mittels E-Test[®] durchgeführt. Bei MHK-Werten ≥ 1 µg/ml gilt ein *S. aureus*-Stamm als intermediär resistent, bei MHK-Werten ≥ 8 µg/ml gilt ein *S. aureus*-Stamm als resistent.

Abb. 3.5 zeigt die jeweiligen minimalen Gentamycin-Hemmkonzentrationen beider Phänotypen der sechs untersuchten Stämme. Die Daten für Stamm HS stimmen mit den Literaturwerten überein (Seifert *et al.*, 1999).

Stamm	LCV OK	SCV OK	LCV SCH	SCV SCH	LCV 12805	SCV 12805	LCV HS	SCV HS	LCV CE I	SCV CE I	LCV CE II	SCV CE II
MHK ($\mu\text{g/ml}$)	2,0	8,0	0,064	0,064	0,25	0,25	3,0	500	1,0	4,0	0,25	8,0
Resistenz	I	R	S	S	S	S	I	R	I	I	S	R

Abb. 3.5: Gentamycinresistenz bei LCV/SCV-Paaren. Die Bestimmung der MHK-Werte erfolgte mittels E-Test. I bedeutet intermediäre Resistenz, R bedeutet Resistenz, S bedeutet Sensibilität für Gentamycin. In der SCV des Stammes HS ist das Transposon Tn 4001 vorhanden.

Bemerkenswert ist die erhebliche Diskrepanz, die sich zwischen den unterschiedlichen Stämmen zeigt. Bei den Stämmen SCH und 12805 wurde zwischen beiden Phänotypen kein Unterschied in den MHK-Werten festgestellt, beide Stämme sind Gentamycin-sensibel. Für die Stämme OK und CE I wurden in den Small-Colony-Varianten MHK-Werte ermittelt, die verglichen mit dem LCV-Phänotyp ca. vierfach höher waren. Für die Small-Colony-Variante des Stammes CE II wurde ein verglichen mit der LCV ca. 32-fach höherer MHK-Wert bestimmt. Für die Small-Colony-Variante des Stammes HS wurde eine MHK ermittelt, die über 160-fach höher war, als die der LCV. Die LCV der Stämme CE I, OK und HS sowie der SCV-Phänotyp des Stammes CE I ist intermediär Gentamycin-resistent. Die SCV-Phänotypen der Stämme OK, HS und CE II sind Gentamycin-resistent.

Die DNA der Stämme OK, HS, CE I und CE II wurde mittels PCR auf Aminoglycosid-Resistenzgene untersucht. Die Stämme OK, CE I und CE II besaßen weder im LCV- noch im SCV-Phänotyp die typischen Aminoglycosid-Resistenzgene *aacA* (6'-Aminoglycosid-N-Acetyltransferase), *aphA* und *aphD* (2''-Aminoglycosid-Phosphotransferase). In der Small-Colony-Variante des Stammes HS konnte das Transposon Tn 4001 nachgewiesen werden. Dieses beinhaltet die Resistenzgene *aacA* und *aphD* (Daten nicht gezeigt).

In der Literatur finden sich ferner Aussagen über unterschiedliche Resistenzen beider Phänotypen gegenüber anderen Antibiotika wie etwa Chinolonen (Mitsuyama *et al.*, 1997) oder Penicillinen (Proctor *et al.*, 1998). Weitere bedeutsame Antibiotikaklassen wurden repräsentativ getestet (Abb. 3.6). Hinsichtlich der Resistenz gegen die Antibiotika Ampicillin, Vancomycin und Ciprofloxacin zeigten sich bei den Stämmen OK, SCH und 12805 keine signifikanten phänotypischen Unterschiede. Beide Phänotypen der untersuchten Stämme waren sensibel.

Stamm	LCV OK	SCV OK	LCV SCH	SCV SCH	LCV 12805	SCV 12805
MHK Ampicillin (µg/ml)	0,75	0,75	0,016	0,016	0,023	0,023
MHK Vancomycin (µg/ml)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0
Hemmhofgröße Ciprofloxacin (mm)	14	14	18	18	15	15

Abb. 3.6: Resistenz von LCV/SCV-Paaren gegenüber Ampicillin, Vancomycin und Ciprofloxacin.

Die Werte für Vancomycin und Ampicillin wurden mittels E-Test bestimmt. Für die Bestimmung der Resistenz gegen Ciprofloxacin stand kein E-Test zur Verfügung. Deswegen wurde die Hemmhofgröße im Agardiffusionstest bestimmt. Da sich kein Unterschied zeigte, erübrigt sich eine Umrechnung in MHK-Werte.

Die Charakterisierung der verwendeten Isolate zeigt, daß die von den untersuchten Stämmen gebildeten SCV-Phänotypen die Merkmale eines langsamen Wachstums, der Auxotrophie sowie der Möglichkeit einer Reversion zu normal wachsendem *S. aureus* aufweisen. Die Gentamycin-Resistenz beider Phänotypen unterscheidet sich jedoch nicht bei allen Stämmen. Die Verhältnisse der MHK-Werte beider Phänotypen unterscheiden sich in den untersuchten Stämmen erheblich.

3.4 Transkriptomanalytik

Um die Transkription beider Phänotypen von *S. aureus* unter identischen Bedingungen zu vergleichen, war ein DNA-Chip entworfen und konstruiert worden (siehe Kap. 2.5.3).

Will man die Genexpression zweier Phänotypen eines Organismus vergleichen, so muß man zuerst zwei Ansätze unter identischen Bedingungen kultivieren. Nach Ernte kann die RNA beider Ansätze isoliert werden. In einer reversen Transkriptionsreaktion wird die RNA in eine fluoreszenzmarkierte cDNA umgeschrieben. Die markierte cDNA wird einer Hybridisierungsreaktion mit den DNA-Fragmenten auf dem Objektträger unterzogen. Nach den anschließenden Waschschrinen kann das Ergebnis der Hybridisierung ausgewertet werden. Dies geschieht, indem man mittels Laser die Fluoreszenz der cDNA anregt und diese photometrisch erfaßt. Es läßt sich erkennen, an welchen Genfragmenten in welchem Ausmaß Hybridisierung stattgefunden hat.

Die Auswahl der mit dem DNA-Chip zu untersuchenden Gene orientierte sich daran, welche Gene oder Gengruppen in der Literatur im Zusammenhang mit Bildung bzw. Eigenschaften der Small-Colony-Variante diskutiert werden.

Zunächst waren einige metabolische Gene zu untersuchen, von denen eine Beteiligung an der Ausbildung des SCV-Phänotyps vermutet wird. Vorzugsweise werden Gene diskutiert, die für Enzyme der Häm- und Menadionbiosynthese kodieren. Die an der Häm- und Menachinon-synthese beteiligten Enzyme, die mit dem DNA-Chip untersucht werden können, sind zusammen mit ihren Genbezeichnungen sowie den dazugehörigen EC-Nummern in Anhang 2 aufgelistet.

Störungen des normalen Stoffwechselweges mit dem Resultat verminderter Energiegewinnung könnten sich auf die Bakterien als Streß auswirken. Deswegen wurden auch einige Streßgene zur Beobachtung ausgewählt. Das Gen *ctaA* etwa spielt eine Rolle bei der Reaktion auf Streß infolge einer Verknappung des Nährstoffangebotes (Clements *et al.*, 1999).

Zusätzlich wurden die globalen Regulatorsysteme „accessory gene regulator“ (*agr*), „staphylococcal accessory regulator“ (*sar*) und *sigmaB* mit dem DNA-Chip untersucht.

Um die Expression von Virulenzfaktoren in Small-Colony-Varianten von *S. aureus* zu untersuchen, wurden einige Exoprotein- und Oberflächenstrukturgene für den DNA-Chip ausgewählt.

Außerdem sollten verschiedene Gene, die für Antibiotikaresistenzen kodieren, untersucht werden. An der Resistenz gegen Antibiotika sind auch andere Mechanismen, wie z.B. ABC-Transporter beteiligt, aus diesem Grund wurden auch die für diese kodierenden Gene mit dem DNA-Chip untersucht. Schließlich war mit dem DNA-Chip auch die Expression von Genen, die für die Bildung oder Modifikation von Lantibiotika bei *S. aureus* kodieren, zu untersuchen.

Anhang 1 zeigt eine vollständige Auflistung aller Gene, die mit dem erstellten DNA-Chip erfaßt werden sollten.

Die Methoden zur Gewinnung einer mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markierten cDNA aus genomischer DNA sowie der Hybridisierung des DNA-Chips mit dieser cDNA waren bereits im Hause etabliert worden. Diese Methoden waren nun an die Anforderungen anzupassen, die sich aus der Verwendung von Gesamt-RNA als Matrize für eine reverse Transkription, mittels derer die markierte cDNA synthetisiert wurde, ergaben. Zunächst mußte die Reproduzierbarkeit der Methode sichergestellt werden. Eine cDNA, die mittels reverser Transkription aus RNA-Präparationen identischer Kulturen gewonnen wurde, mußte nach Hybridisierung mit dem DNA-Chip die gleichen Signale zeigen. Danach sollten genetisch bekannte Unterschiede auch auf RNA-Ebene gezeigt werden. Zuletzt war zu überprüfen, ob unterschiedliche Genexpression, die auf eine unterschiedliche Wachstumsdichte zurückzuführen ist, mit dem DNA-Chip erfaßt werden konnte.

3.4.1 Etablierung des DNA-Chips für die Untersuchung der mRNA-Expression

Zuerst wurde die Reproduzierbarkeit der Methode überprüft. Zwei identische RNA-Präparationen wurden durch reverse Transkription in eine mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 bzw. Cy5 markierte cDNA überführt. Der DNA-Chip wurde mit dieser cDNA hybridisiert. Die bei der Auswertung mit dem Scanner erhaltenen Fluoreszenzsignale wurden verglichen. Wie in Abb. 3.7 zu erkennen ist, zeigen sich zwischen den Fluoreszenzsignalen der cDNA beider identischer Kulturen keine signifikanten Abweichungen. Somit konnte gezeigt werden, daß die Methode reproduzierbare Ergebnisse lieferte.

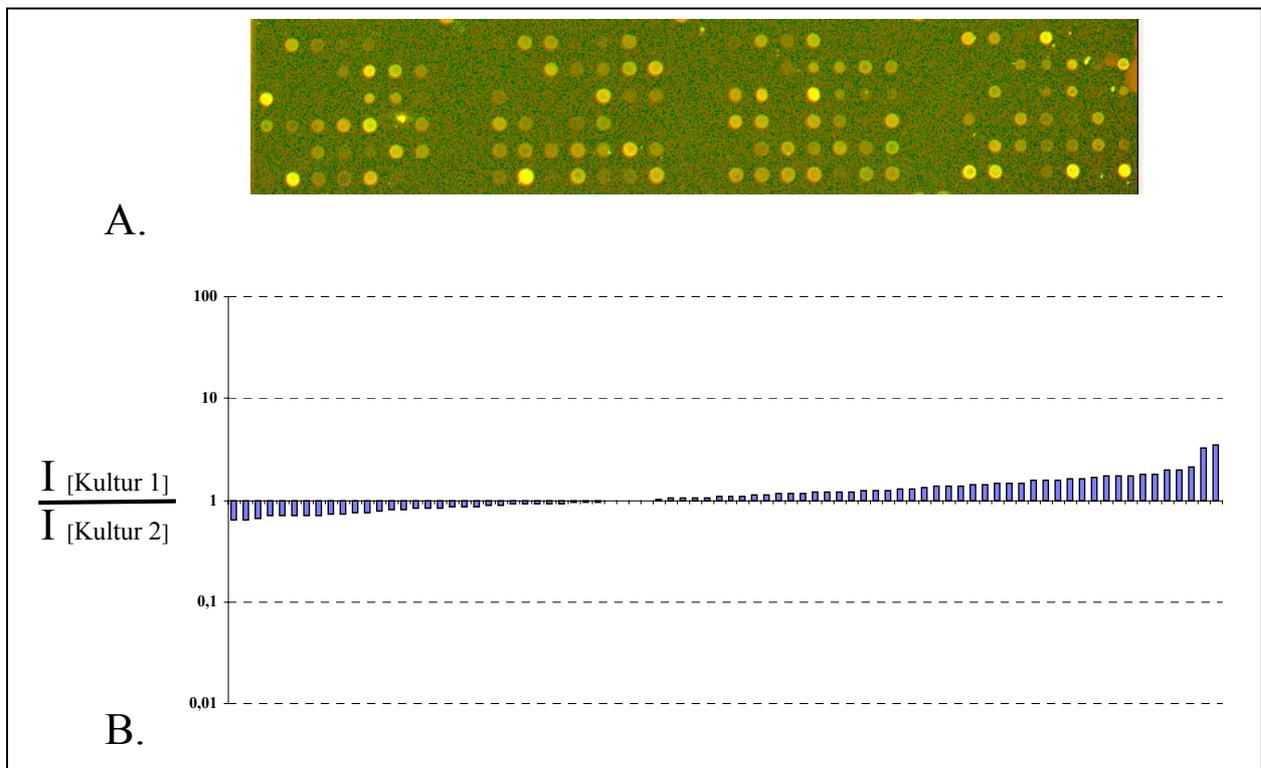


Abb. 3.7: Reproduzierbarkeit einer mRNA-Expressionsuntersuchung mittels DNA-Chip.

Zwei identische Kulturen der LCV des Stammes SCH wurden in LB-Medium bei 37 °C inkubiert, bei Erreichen einer OD von 0,3 geerntet und die RNA gewonnen. Die RNA der Kultur 1 wurde in eine Cy3-, die der Kultur 2 in eine Cy5- markierte cDNA umgeschrieben und mit dem DNA-Chip hybridisiert. **A.:** Darstellung des DNA-Chips. Gene, die nur in Kultur 1 exprimiert werden, verursachen rote Signale, Gene, die nur in Kultur 2 exprimiert werden, verursachen grüne Signale. Gene, deren Expressionsniveau in beiden Kulturen identisch ist, verursachen gelbe Signale. Letzteres ist bei allen erfaßten Genen der Fall. **B.:** Darstellung der normalisierten Intensitätsverhältnisse der Signale. Balken nach unten: Dominantes Signal in Kultur 2, Balken nach oben: Dominantes Signal in Kultur 1. Bei Verhältnissen >10 und <0,1 wäre von einem signifikanten Unterschied in der Expression auszugehen. Da sich keine Abweichungen ergeben, wurden der Übersichtlichkeit wegen die Genbezeichnungen nicht den Signalen zugeordnet.

Nachfolgend wurden zwei genetisch verschiedene Stämme (V 3559 und V 1391) Transkriptom-analytisch untersucht. Genetische Unterschiede dieser Stämme wurden durch Hybridisierung des DNA-Chips mit aus genomischer DNA gewonnener, fluoreszenzmarkierter cDNA ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die Gene *cna*, *ermC*, *norA* und *sec* wurden bei der DNA-Hybridisierung nur in Stamm V 3559 identifiziert, die Gene *ermA*, *spc* und *fib* wurden nur in V 1391 identifiziert.

Die Genexpression beider Stämme wurde verglichen. Abb. 3.8 zeigt die Signale der aus Gesamt-RNA mittels reverser Transkription gewonnenen, fluoreszenzmarkierten cDNA aus den Stämmen V 3559 und V 1391.

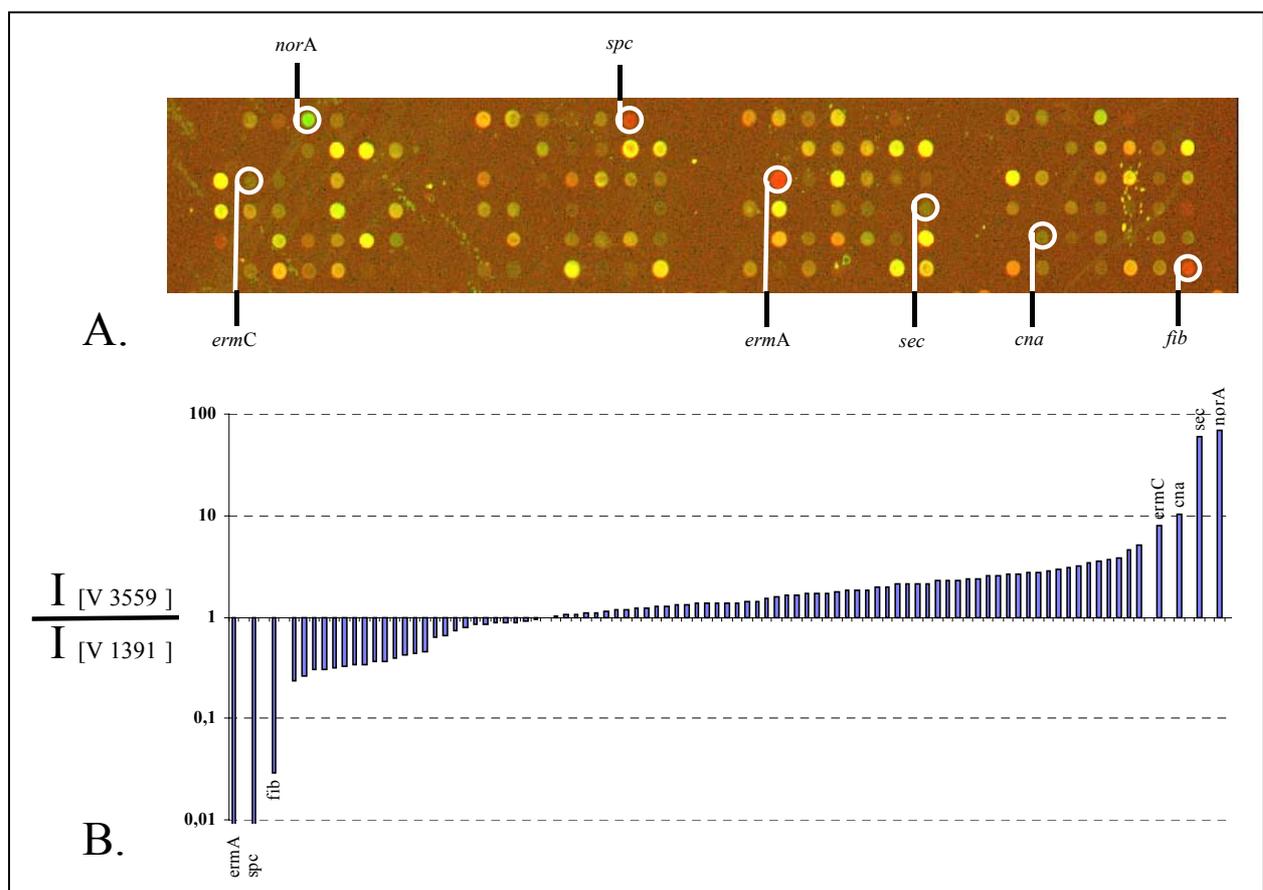


Abb. 3.8: Überprüfung der Erfassbarkeit unterschiedlicher mRNA-Expression mit Hilfe des DNA-Chips.

Untersucht wurden die *S. aureus*-Stämme V 3559 und V 1391, von denen spezifische genetische Unterschiede bekannt sind. Beide Stämme wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei Erreichen einer OD von 0,3 geerntet. RNA wurde gewonnen. Durch reverse Transkription wurde eine Cy3 (V 3559)- bzw. Cy5 (V 1391)-markierte cDNA synthetisiert, die mit dem DNA-Chip hybridisiert wurde. **A.:** Darstellung des DNA-Chips. Gene, die nur in V 1391 exprimiert werden, verursachen rote Signale, Gene, die nur in V 3559 exprimiert werden, verursachen grüne Signale. Gene, deren Expressionsniveau in beiden Stämmen identisch ist, verursachen gelbe Signale. Gene, die unterschiedlich exprimiert werden, sind bezeichnet. **B.:** Darstellung der normalisierten Intensitätsverhältnisse der Signale. Balken nach unten: Dominantes Signal in V 1391, Balken nach oben: Dominantes Signal in V 3559. Bei Verhältnissen >10 und <0,1 kann von einem signifikanten Unterschied in der Expression ausgegangen werden. Der Übersichtlichkeit der Darstellung wegen sind nur Genbezeichnungen solcher Signale zugeordnet worden.

Signale für die Gene *ermC*, *norA*, *sec* und *cna* erschienen nur bei Stamm V 3559, Signale für die Gene *spc*, *fib* und *ermA* erschienen nur bei Stamm V 1391. Die Ergebnisse der Transkriptom-analytischen Untersuchung deckten sich somit mit denen, die aus der Hybridisierung des DNA-Chips mit aus genomischer DNA gewonnener cDNA resultierten.

Um festzustellen, ob Expressionsunterschiede auch erfaßt werden konnten, wenn Gene in beiden untersuchten Proben vorhanden waren, aber in Abhängigkeit von der Wachstumsphase in unterschiedlichem Maße exprimiert wurden, wurde die Genexpression von Stamm KN 813 bei $OD_{[540]} = 0,3$ mit der bei $OD_{[540]} = 1,2$ verglichen. Bei $OD_{[540]} = 1,2$ erreichte das Wachstum die post-exponentielle Phase. Entsprechend wurden Gene, die für Exotoxine kodieren, stärker exprimiert. In Abb. 3.9 ist zu sehen, daß die Gene *hlg* (γ -Hämolysin), *hld* (δ -Hämolysin), *sak* (Staphylokinase) sowie *tst* (Toxic-Shock-Syndrome-Toxin) bei $OD_{[540]} = 1,2$ vermehrt exprimiert wurden. Bei $OD_{[540]} = 0,3$ war dagegen das Expressionsniveau der Gene *clfB* (clumping factor B) und *eta* (exfoliatives Toxin A) erhöht. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen (Kornblum *et al.*, 1990, Dunman *et al.*, 2001).

Es konnte gezeigt werden, daß mit dieser Methode Expressionsunterschiede reproduzierbar untersucht werden können.

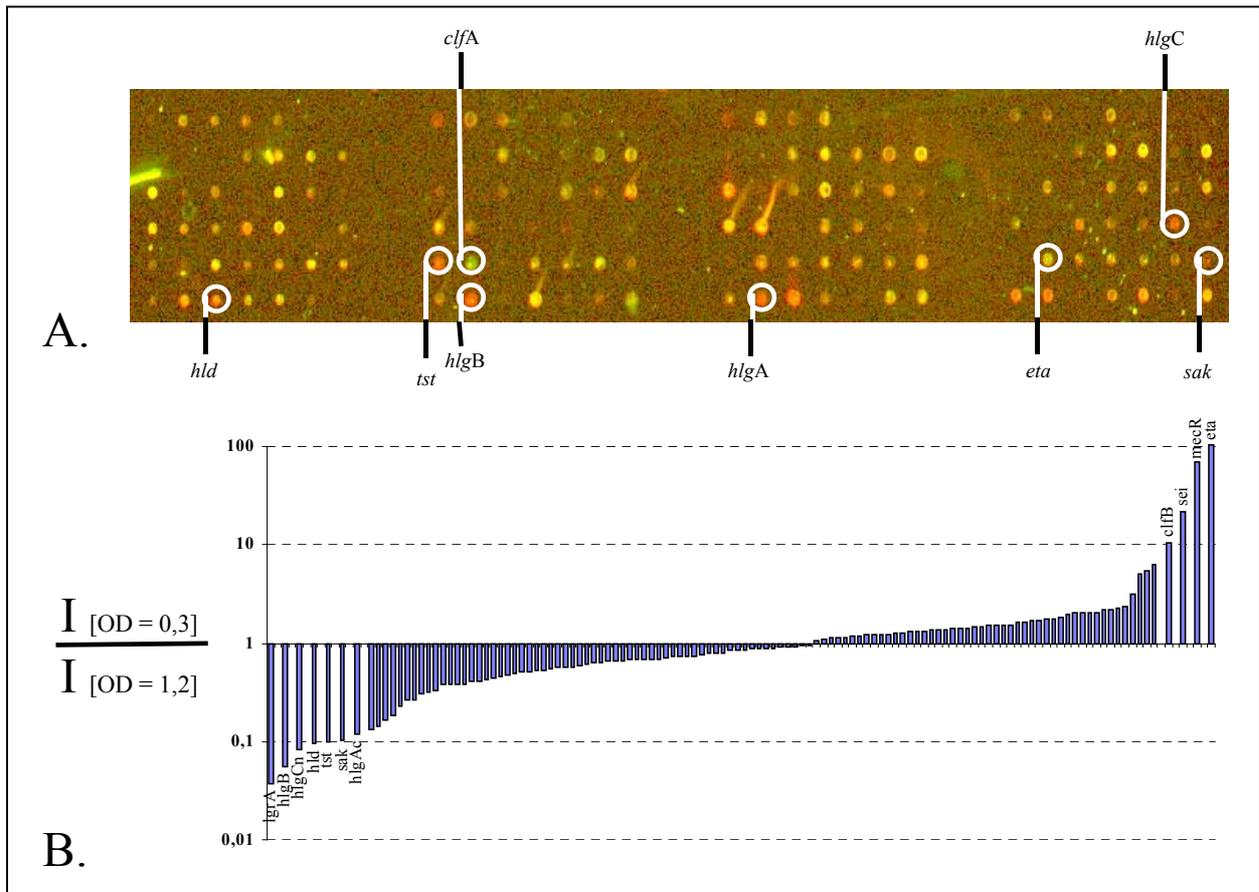


Abb. 3.9: Überprüfung der Erfassbarkeit unterschiedlicher mRNA-Expression mit Hilfe des DNA-Chips.

Untersucht wurde Stamm KN 813, verglichen wurde die mRNA-Expression bei zwei verschiedenen OD-Werten. *S. aureus* wurde in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei Erreichen einer OD von 0,3 bzw. 1,2 geerntet. RNA wurde extrahiert. Diese wurde in eine Cy3 (OD=0,3)- bzw. Cy5 (OD=1,2)- markierte cDNA umgeschrieben und mit dem DNA-Chip hybridisiert. **A.:** Darstellung des DNA-Chips. Gene, die vorzugsweise bei OD = 1,2 exprimiert werden, verursachen rote Signale. Gene, die vorzugsweise bei OD = 0,3 exprimiert werden, verursachen grüne Signale. Gene, deren Expressionsniveau bei beiden OD-Werten identisch ist, verursachen gelbe Signale. Gene, die unterschiedlich exprimiert werden, sind bezeichnet. **B.:** Darstellung der normalisierten Intensitätsverhältnisse der Signale. Balken nach unten: Dominantes Signal bei OD = 1,2, Balken nach oben: Dominantes Signal bei OD = 0,3. Bei Verhältnissen >10 und <0,1 kann von einem signifikanten Unterschied in der Expression ausgegangen werden. Der Übersichtlichkeit der Darstellung wegen sind nur diese Gensignale beschriftet.

3.4.2 mRNA-Expression

Um Aufschlüsse darüber erhalten, welche Mechanismen zur Bildung SCV-Phänotyps führen, bzw. durch welche molekularbiologischen Besonderheiten sich Small-Colony-Varianten auszeichnen, wurde die Genexpression beider Phänotypen unter konstanten Bedingungen (Wachstum bis zu einer $OD_{[540]}$ von 0,3 in LB-Medium bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 220 min^{-1}) mit Hilfe des DNA-Chips untersucht.

Abb. 3.10 zeigt das Resultat des Vergleiches der Transkription von LCV und SCV des Stammes OK.

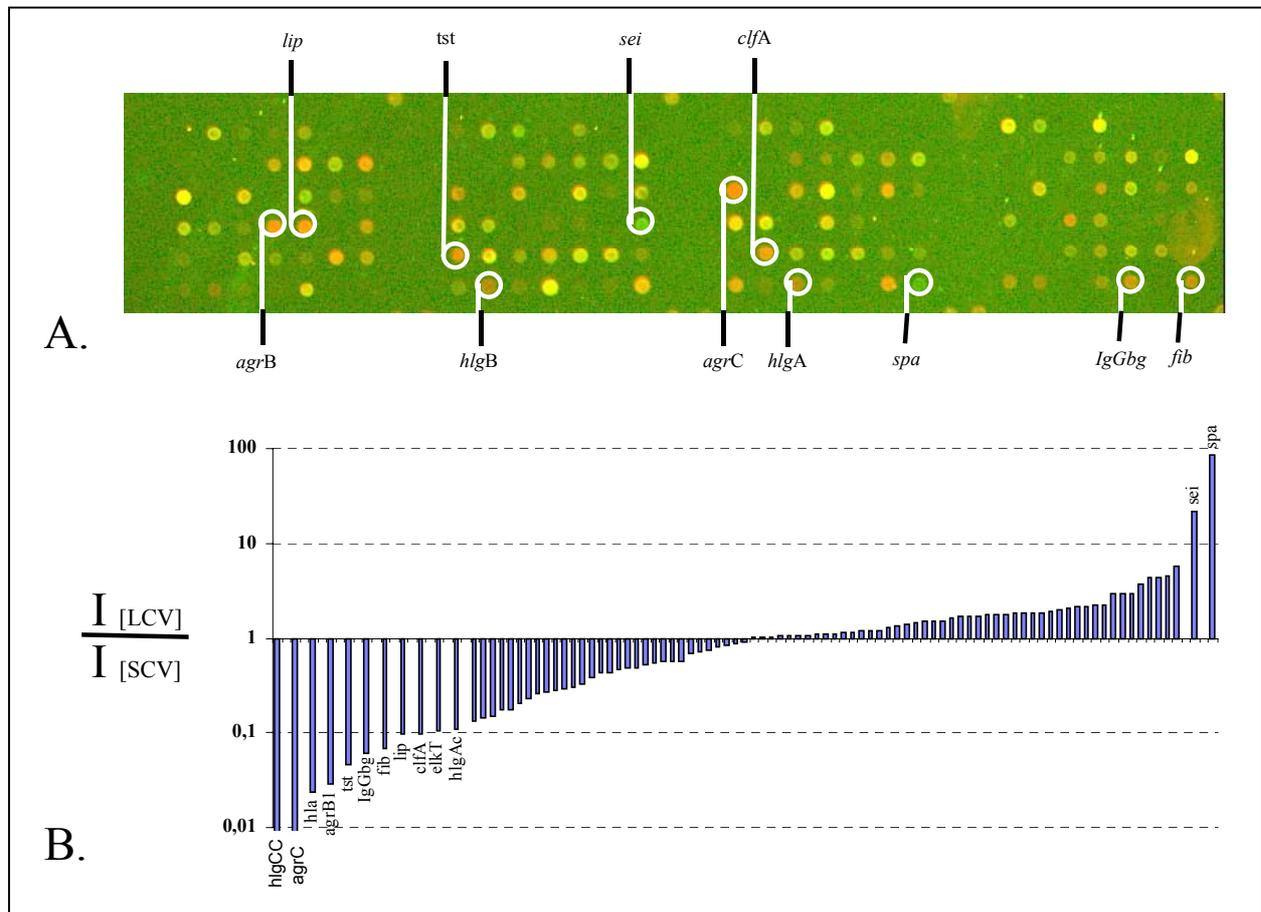


Abb. 3.10: Untersuchung des LCV/SCV-Paares des Stammes OK auf mRNA-Expression mittels DNA-Chip.

S. aureus wurde in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei Erreichen einer OD von 0,3 geerntet. RNA wurde gewonnen. Diese wurde durch reverse Transkription in eine Cy3 (LCV)- bzw. Cy5 (SCV)-markierte cDNA umgeschrieben und mit dem DNA-Chip hybridisiert. **A.:** Darstellung des DNA-Chips. Gene, die vorzugsweise in der SCV exprimiert werden, verursachen rote Signale. Gene, die vorzugsweise in der LCV exprimiert werden, verursachen grüne Signale. Gene, deren Expressionsniveau in beiden Phänotypen identisch ist, verursachen gelbe Signale. Gene, die unterschiedlich exprimiert werden, sind bezeichnet. **B.:** Darstellung der normalisierten Intensitätsverhältnisse der Signale. Balken nach unten: Dominantes Signal in der SCV, Balken nach oben: Dominantes Signal in der LCV. Bei Verhältnissen >10 und <0,1 kann von einem signifikanten Unterschied in der Expression ausgegangen werden. Der Übersichtlichkeit der Darstellung wegen sind nur diese Gensignale beschriftet.

Mit der Transkriptom-analytischen Untersuchung konnte gezeigt werden, daß einige Toxingene in der Small-Colony-Variante ein verglichen mit der isogenen Large-Colony-Variante erhöhtes Transkriptionsniveau aufweisen. Hierzu zählen die Exotoxine *hla* (α -Hämolyysin), *hlg* (γ -Hämolyysin), *lip* (Lipase) sowie *tst* (Toxischer-Schock-Syndrom-Toxin), aber auch Gene, die für bestimmte Oberflächenstrukturen kodieren, etwa *clfA* (clumping factor A), *fib* (Fibronectin-bindendes Protein) und *IgGbg* (IgG-bindendes Protein). In der LCV hingegen war das Transkriptionsniveau von *sei* (Enterotoxin I) und *spa* (Protein A) verglichen mit der Small-Colony-Variante erhöht. Damit einhergehend konnte ein Unterschied in der Transkription der Gene des Globalregu-

latorsystems *agr* festgestellt werden. Das *agr*-Transkriptionsniveau der SCV war verglichen mit dem der LCV erhöht. Die Transkription der zuvor genannten Toxingene wird durch das *agr*-System reguliert (Kornblum *et al.*, 1990, Novick *et al.*, 1993, McDowell *et al.*, 2001).

In der Transkriptom-analytischen Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied in der Transkription der Gene, die im Zusammenhang mit der Biosynthese von Menadion und Häm stehen, festgestellt werden. Ebenso wenig konnten signifikante Unterschiede in der Transkription von Streßgenen, Resistenzgenen oder Genen, die für Lantibiotika kodieren beobachtet werden.

Um die in diesem Experiment beobachteten Unterschiede in der Transkription zu bestätigen und zu quantifizieren, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Untersucht wurden die Stämme OK (Abb. 3.11), 12805 (Abb. 3.12) und CE I (Abb. 3.13). Als Marker für die RNA-III-Expression und damit direkt für die Aktivität des *agr*-Systems diente δ -Hämolyisin (*hld*). Repräsentativ für die Expression der *agr*-abhängigen Toxingene wurde die Expression von α -Hämolyisin (*hla*) untersucht.

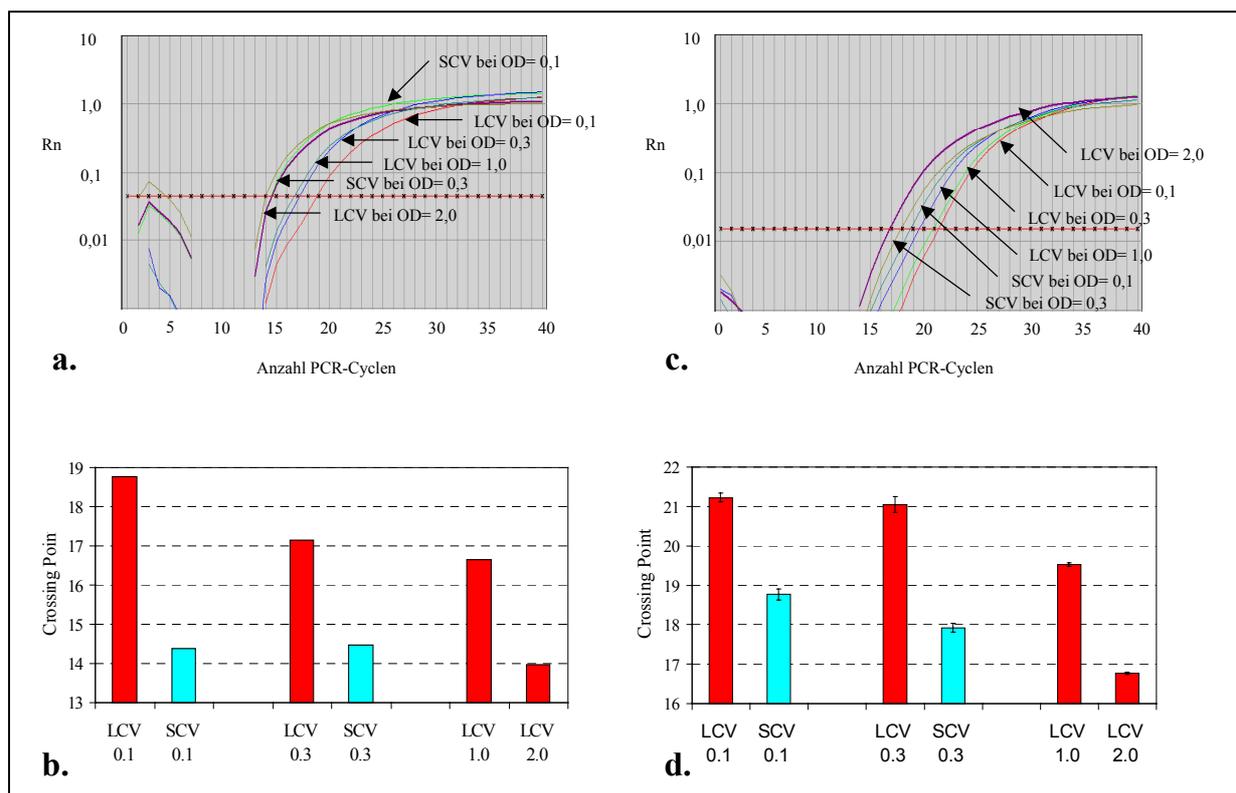


Abb. 3.11: RT-PCR zur Bestimmung der Expressionsniveaus von *hld* und *hla* in Stamm OK.

S. aureus wurde in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei unterschiedlichen OD-Werten geerntet. DNA-freie RNA wurde gewonnen. Diese wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde quantitativ verdaut, die cDNA einer quantitativen PCR unterzogen.

a. und **b.:** Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig waren, bis ein Signal von *hld* erschien (**a.:** Aufzeichnung des Gerätes, **b.:** Graphische Auswertung der erhaltenen Daten); **c.** und **d.:** Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig waren, bis ein Signal von *hla* erschien (**c.:** Aufzeichnung des Gerätes, **d.:** Graphische Auswertung der erhaltenen Daten).

Der Vergleich der *hld*-Transkription beider Phänotypen des Stammes OK ergab bei einer $OD_{[540]}$ von 0,1 in der RT-PCR, daß der Crossing Point SCV vier PCR-Cyclen vor dem Crossing Point der LCV lag. Bei einer $OD_{[540]}$ von ca. 0,3 entsprach der Crossing Point in der SCV ungefähr dem, der bei einer $OD_{[540]}$ von 0,1 ermittelt wurde. Die LCV transkribierte bei einer $OD_{[540]}$ von ca. 0,3 etwas mehr *hld* als bei einer $OD_{[540]}$ von 0,1. Der Crossing Point lag bei der SCV ca. 2,5 PCR-Cyclen vor dem der LCV. Zum Vergleich wurde die Transkription von *hld* in der LCV bei einer $OD_{[540]}$ von 1,0 bzw. 2,0 herangezogen. Der Crossing Point der SCV bei $OD_{[540]} = 0,3$ entsprach etwa dem Wert, der bei einer LCV knapp unter $OD_{[540]} = 2,0$ ermittelt wurde.

Der Vergleich mit der Transkription von *hla* lieferte ein ähnliches Bild: Hier lag bei $OD_{[540]} = 0,1$ der Crossing Point der SCV ca. zwei Cyclen vor dem der LCV. Bei $OD_{[540]} = 0,3$ wurde der Unterschied noch deutlicher, hier lag der Crossing Point der SCV ca. drei Cyclen vor dem der LCV. In der SCV lag der Crossing Point bei $OD_{[540]} = 0,3$ knapp einen Cyclen vor dem, der bei $OD_{[540]} = 0,1$ ermittelt wurde. Die LCV zeigte ein vergleichbares Transkriptionsniveau erst bei $OD_{[540]}$ -Werten, die deutlich höher als 1,0 waren.

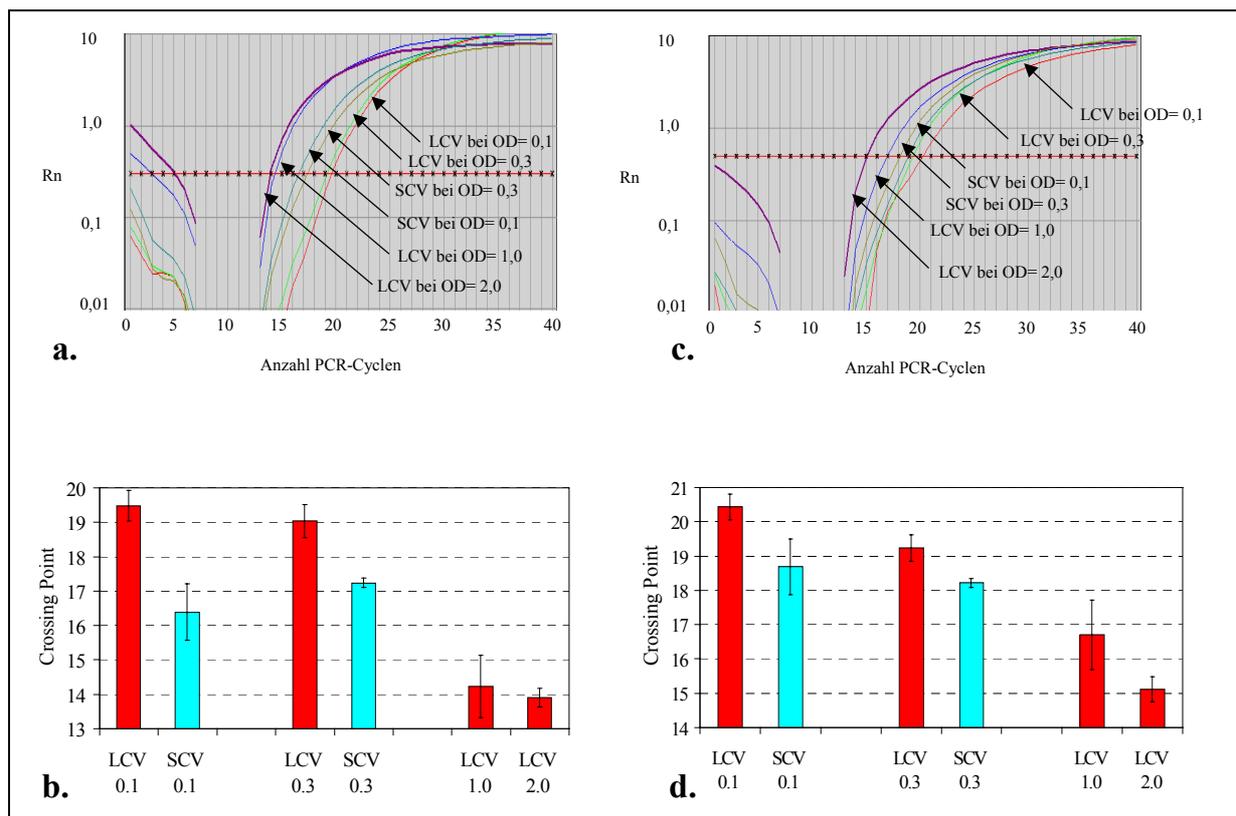


Abb. 3.12: RT-PCR zur Bestimmung der Expressionsniveaus von *hld* und *hla* in Stamm 12805.

S. aureus wurde in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei unterschiedlichen OD-Werten geerntet. DNA-freie RNA wurde gewonnen. Diese wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde quantitativ verdaut, die cDNA einer quantitativen PCR unterzogen.

a. und **b.:** Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig waren, bis ein Signal von *hld* erschien (**a.:** Aufzeichnung des Gerätes, **b.:** Graphische Auswertung der erhaltenen Daten); **c.** und **d.:** Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig waren, bis ein Signal von *hla* erschien (**c.:** Aufzeichnung des Gerätes, **d.:** Graphische Auswertung der erhaltenen Daten).

Bei der Untersuchung der *hld*-Transkription in Stamm 12805 wurde ermittelt, daß bei einer $OD_{[540]}$ von 0,1 der Crossing Point der SCV ca. drei PCR-Cyclen vor dem Crossing Point der LCV lag. Bei $OD_{[540]} = 0,3$ lag der Crossing Point der SCV immer noch ca. zwei PCR-Cyclen vor dem bei der LCV ermittelten.

Allerdings nahm bei der LCV die Transkription von *hld* zwischen $OD_{[540]} = 0,3$ und $OD_{[540]} = 1,0$ sehr stark zu (Unterschied im Crossing Point lag bei ca. fünf Cyclen). Im Unterschied zu den Beobachtungen bei Stamm OK lag der Crossing Point der LCV bei $OD_{[540]} = 1,0$ deutlich vor dem der SCV bei $OD_{[540]} = 0,3$ (ca. drei PCR-Cyclen Unterschied).

Betrachtet man die Werte für *hla*, so sieht man, daß bei $OD_{[540]} = 0,1$ und $OD_{[540]} = 0,3$ der Crossing Point der SCV jeweils ca. einen PCR-Cyclen vor dem der LCV lag. Erwartungsgemäß zeigt sich auch hier bei der LCV zwischen $OD_{[540]} = 0,3$ und $OD_{[540]} = 1,0$ ein deutlicher Anstieg der *hla*-Transkription von (Crossing Point der LCV bei $OD_{[540]} = 1,0$ lag ca. 2,5 PCR-Cyclen vor dem der LCV bei $OD_{[540]} = 0,3$ und ca. 1,5 PCR-Cyclen vor dem der SCV).

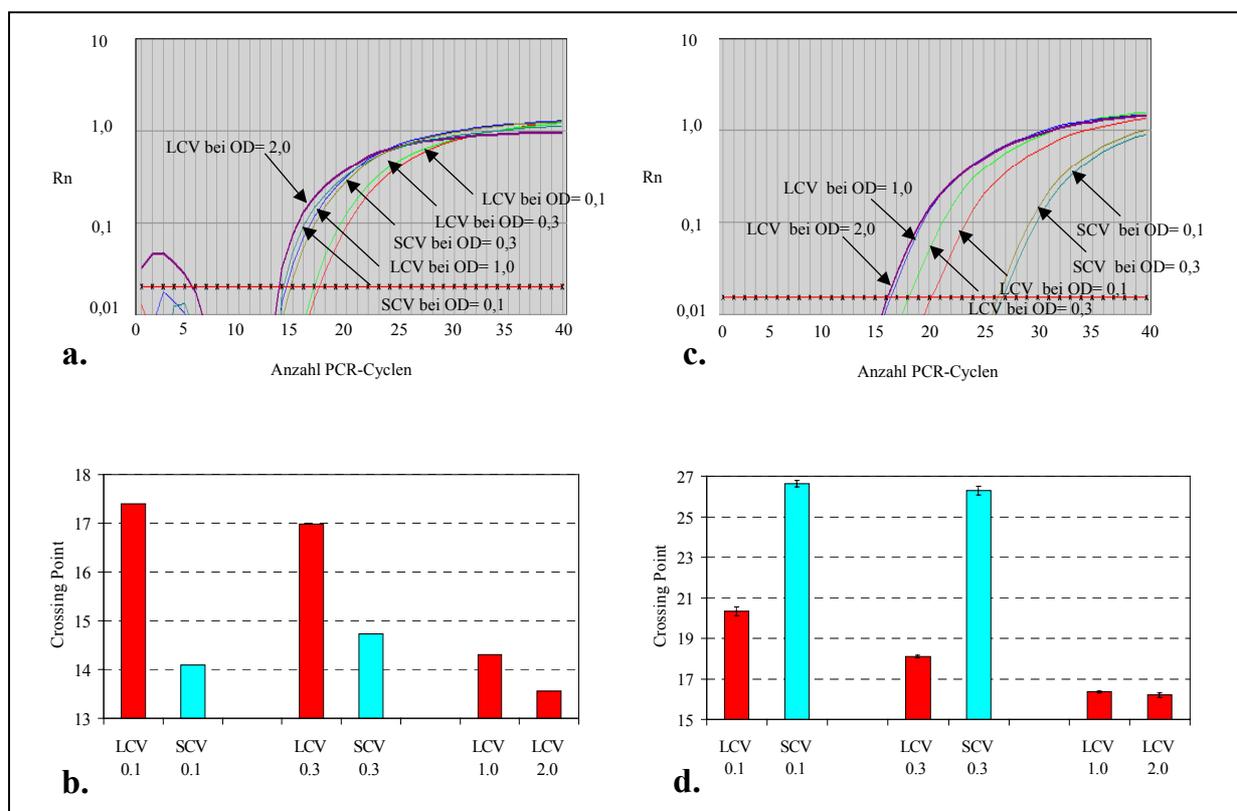


Abb. 3.13: RT-PCR zur Bestimmung der Expressionsniveaus von *hld* und *hla* in Stamm CE I.

S. aureus wurde in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei unterschiedlichen OD-Werten geerntet. DNA-freie RNA wurde gewonnen. Diese wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde quantitativ verdaut, die cDNA einer quantitativen PCR unterzogen.

a. und **b.:** Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig waren, bis ein Signal von *hld* erschien (**a.:** Aufzeichnung des Gerätes, **b.:** Graphische Auswertung der erhaltenen Daten); **c.** und **d.:** Anzahl an PCR-Zyklen, die nötig waren, bis ein Signal von *hla* erschien (**c.:** Aufzeichnung des Gerätes, **d.:** Graphische Auswertung der erhaltenen Daten).

Bei der Untersuchung der *hld*-Transkription in Stamm CE I wurde ermittelt, daß bei einer $OD_{[540]}$ von 0,1 der Crossing Point der SCV ca. drei PCR-Cyclen vor dem Crossing Point der LCV lag. Bei einer $OD_{[540]}$ von 0,3 lag der Unterschied immer noch bei ca. zwei Cyclen. Vergleicht man diese Werte mit den Crossing Point-Werten der LCV in späteren Wachstumsphasen, so erkennt man, daß das Transkriptionsniveau der SCV in etwa den Werten entspricht, die der LCV-Phänotyp bei ca. $OD_{[540]} = 1,0$ erreicht.

Ein überraschenderweise deutlich anderes Bild erhielt man bei Untersuchung der *hla*-Transkription. Hier konnte in der SCV nur ein sehr geringes Transkriptionsniveau festgestellt werden. Bei $OD_{[540]} = 0,1$ lag der Crossing Point der SCV ca. fünf Cyclen hinter dem der LCV. Bei $OD_{[540]} = 0,3$ zeigte sich sogar ein Unterschied von sieben Cyclen. Dies läßt darauf schließen, daß die α -Toxin-Produktion in der SCV des Stammes CE I gestört war.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bei den Stämmen OK, CE I und 12805 das *agr*-System bei den Small-Colony-Varianten bereits bei einer geringen Wachstumsdichte aktiviert ist. Das *agr*-Aktivitätsverhältnis variiert zwischen verschiedenen Stämmen. Die von *agr* gesteuerte Expression von Toxingenen ist bei den SCV-Phänotypen im Falle der Stämme OK und 12805 ebenfalls erhöht. Bei Stamm CE I fand in der Small-Colony-Variante allerdings nahezu keine Expression von *hla* statt.

3.5 Virulenzfaktoren in Small-Colony-Varianten

Nachdem festgestellt werden konnte, daß in einigen SCV-Phänotypen die Expression der Gene von Virulenzfaktoren infolge der Aktivität des *agr*-Systems erhöht ist, sollte dieser Befund nun auf Proteinebene untersucht werden.

Beide Phänotypen der sechs untersuchten Stämme wurden auf die Expression extrazellulärer Proteine hin untersucht. Dies geschah mittels eines eindimensionalen SDS-PAGE-Gels. Abb. 3.14 zeigt, daß die Freisetzung extrazellulärer Proteine im SCV-Phänotyp nicht generell reduziert ist. Zwar zeigen sich stammabhängig gewisse Unterschiede in der Freisetzung von Exoproteinen, es finden sich jedoch keine systematischen, für alle Stämme gültigen Unterschiede.

In Bezug auf Virulenz sind insbesondere von Interesse die Exotoxine (z.B. Enterotoxine oder das Toxic-Shock-Syndrome-Toxin, TSST), membranzerstörende Toxine (z.B. α -Toxin), sekretorische Enzyme sowie bakterielle Oberflächenproteine (z.B. Protein A).

Repräsentativ wurden die Enterotoxine A und B, α -Toxin und Protein A mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

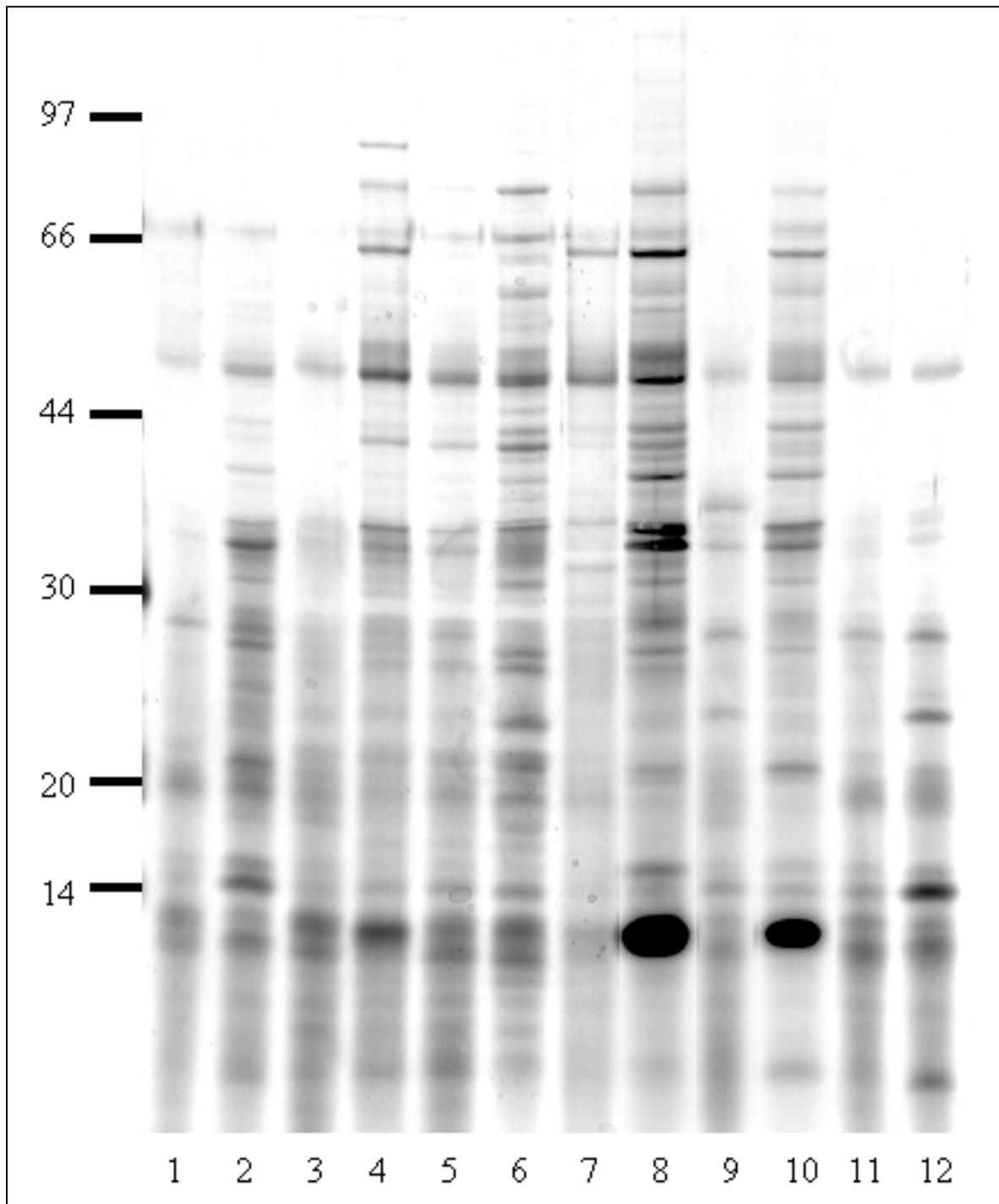


Abb. 3.14: 1-D-Gel zur Erfassung extrazellulärer Proteine in LCV und SCV. Die *S. aureus*-Stämme wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei Erreichen einer OD von 0,3 geerntet. Extrazelluläre Proteine wurden gewonnen wie in Kap. 2.6.2 beschrieben. Diese wurden durch ein SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Es wurden jeweils 20 µg Protein eingesetzt. Visualisierung mittels Silberfärbung.

Legende: 1 = LCV OK, 2 = SCV OK, 3 = LCV SCH, 4 = SCV SCH, 5 = LCV 12805, 6 = SCV 12805,
7 = LCV HS, 8 = SCV HS, 9 = LCV CE I, 10 = SCV CE I, 11 = LCV CE II, 12 = SCV CE II.

3.5.1 Enterotoxine

Beide Phänotypen der Stämme OK, HS, CE I und CE II wurden auf die Freisetzung von Enterotoxin A (M = 27 kDa) und Enterotoxin B (M = 28 kDa) getestet. Hierzu wurden extrazelluläre Proteine gewonnen. Diese wurden einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Abb. 3.15 zeigt das Ergebnis der Untersuchung auf Freisetzung der Enterotoxine A und B mittels Western Blot.

In der LCV des Stammes OK konnte im Gegensatz zur korrespondierenden SCV keine Freisetzung der Enterotoxine A und B nachgewiesen werden. In den anderen Stämmen wurde zwischen beiden Phänotypen hinsichtlich der freigesetzten Menge der Enterotoxine A und B kein signifikanter Unterschied festgestellt.

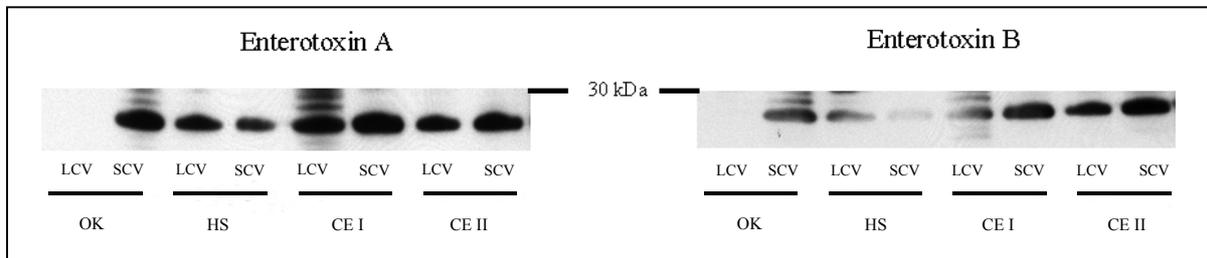


Abb. 3.15: Western-Blot-Analyse von LCV/SCV-Paaren auf Enterotoxin A und B.

LCV/SCV-Paare von *S. aureus*-Stämmen wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Bei Erreichen einer OD von 0,3 wurden die LCV/SCV-Paare geerntet und deren extrazelluläre Proteine gewonnen. Diese wurden einer Western-Blot-Analyse unterzogen und mit einem polyklonalen Antikörper inkubiert. Als Zweitantikörper diente der mit dem ECL-Kit gelieferte Kaninchen-Antikörper. Die Banden auf dem Blot wurden mittels der ECL-Reagenzien (Amersham) visualisiert.

3.5.2 Protein A

Beide Phänotypen der Stämme OK, CE I und CE II wurden auf die Produktion von Protein A getestet. Hierzu wurden cytoplasmatische Proteine gewonnen. Diese wurden einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Abb. 3.16 zeigt das Ergebnis der Untersuchung auf Produktion von Protein A mittels Western Blot.

In Stamm OK werden in beiden Phänotypen ungefähr gleiche Mengen an Protein A gebildet. In Stamm CE I bildet der LCV-Phänotyp eine deutlich größere Menge an Protein A.

Anders dagegen verhält sich Stamm CE II: Hier konnte nur bei der Small-Colony-Variante die Produktion einer signifikanten Menge an Protein A nachgewiesen werden. Es konnte keine Produktion von Protein A durch den LCV-Phänotyp nachgewiesen werden.

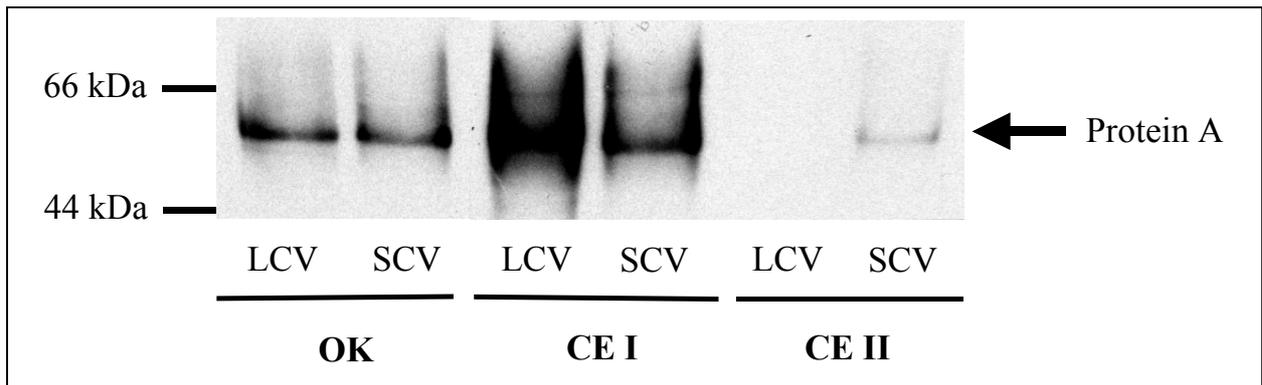


Abb. 3.16: Western-Blot-Analyse von LCV/SCV-Paaren.

LCV/SCV-Paare von *S. aureus*-Stämmen wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Bei Erreichen einer OD von 0,3 wurden die Bakterien geerntet und die cytoplasmatischen Proteine gewonnen. Diese wurden einer Western-Blot-Analyse unterzogen und mit monoklonalem Maus-Antikörper gegen Protein A inkubiert. Der Zweitantikörper wurde dem ECL-Detektionssystem (Amersham, Freiburg) entnommen. Die Banden auf dem Blot wurden mittels der ECL-Reagenzien (Amersham) visualisiert.

3.5.3 α -Toxin

Beide Phänotypen der Stämme OK, CE I und CE II wurden auf die Produktion von α -Toxin ($M = 33$ kDa) getestet. Hierzu wurden cytoplasmatische Proteine gewonnen. Diese wurden einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Abb. 3.17 zeigt das Ergebnis der Untersuchung auf Produktion von Protein A mittels Western Blot. Da die α -Toxin-Bande nur schwach erscheint, wurde zur Identifikation α -Toxin als Referenzsubstanz aufgetragen.

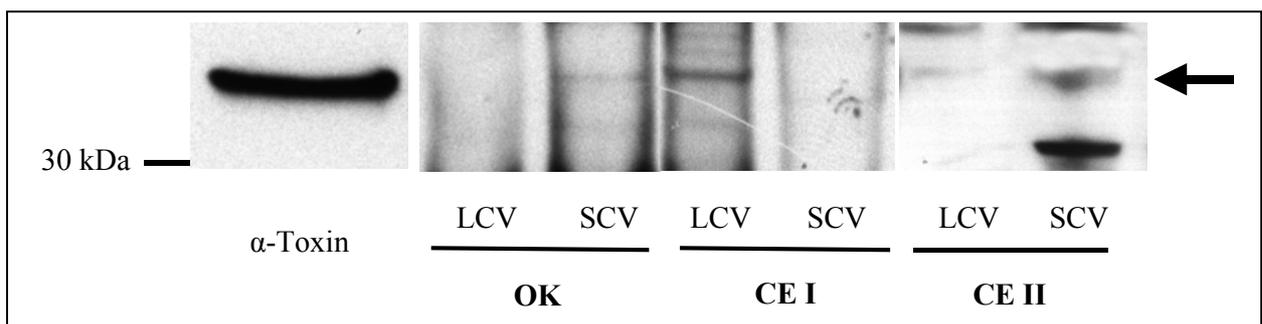


Abb. 3.17: Western-Blot-Analyse von LCV/SCV-Paaren.

LCV/SCV-Paare von *S. aureus*-Stämmen wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Bei Erreichen einer OD von 0,3 wurden die Bakterien geerntet und cytoplasmatische Proteine gewonnen. Diese wurden einer Western-Blot-Analyse unterzogen und mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gegen α -Toxin inkubiert. Der Zweitantikörper wurde dem ECL-Detektionssystem (Amersham, Freiburg) entnommen. Die Banden auf dem Blot wurden mittels der ECL-Reagenzien (Amersham) visualisiert. Zur Identifikation der Bande wurde α -Toxin-Referenzsubstanz zusätzlich aufgetragen.

Bei Stamm OK konnte eine Produktion von α -Toxin nur in der Small-Colony-Variante nachgewiesen werden. Bei Stamm CE I konnte eine Produktion von α -Toxin nur in der Large-Colony-Variante nachgewiesen werden. Bei Stamm CE II konnte eine Synthese von α -Toxin in beiden Phänotypen nachgewiesen werden. Allerdings ist die produzierte Toxinmenge in der Small-Colony-Variante des Stammes CE II verglichen mit der LCV erhöht.

3.6 Proteomanalyse

Durch die vergleichende Untersuchung der Transkription beider Phänotypen mittels DNA-Chip konnten Unterschiede zwischen beiden Phänotypen in der Transkription des Regulatorsystems *agr* und der hiervon regulierten Gene nachgewiesen werden. Es konnten aber weder Erkenntnisse über metabolische Besonderheiten im SCV-Phänotyp gewonnen werden, noch ergaben sich Hinweise auf Mechanismen, die zu Bildung und Aufrechterhaltung dieses Phänotyps beitragen könnten.

Um Hinweise auf spezifische metabolische Prozesse in Small-Colony-Varianten von *S. aureus* zu erhalten erschien es sinnvoll, die Proteinexpression des LCV- und des SCV-Phänotyps zu vergleichen. Hierzu diente die zweidimensionale SDS-PAGE. Flüssigkulturen beider Phänotypen wurden bei definierten Bedingungen kultiviert, nach Ernte wurden die zytoplasmatischen Proteine beider Kulturen isoliert und mittels einer 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Trennung erfolgte nach zwei Parametern: Zuerst wurde nach dem isoelektrischen Punkt aufgetrennt (Erste Dimension). Dies geschah durch isoelektrische Fokussierung. Hierfür wurden Polyacrylamidgele verwendet, die einen immobilisierten pH-Gradienten enthielten. Nach der isoelektrischen Fokussierung folgte eine Trennung nach dem Molekulargewicht (Zweite Dimension). Dies geschah über eine SDS-PAGE. Das entstehende Gel konnte nun gefärbt werden, wobei die Proteine als Punkte (Spots) sichtbar wurden. Nach Vergleich der Gele mittels einer geeigneten Software (Delta 2D[®], Decodon, Greifswald) wurden die im Hinblick auf die Fragestellung interessanten Spots aus dem Gel ausgeschnitten. Nach Verdau (im Gel mit Trypsin) und anschließender Extraktion der Peptidfragmente konnten diese durch MALDI-TOF-Analyse identifiziert werden.

In Abb. 3.18 sind die Proteinexpressionsmuster beider Phänotypen des Stammes OK dargestellt. Abb. 3.18 A. zeigt das Proteinexpressionsmuster der LCV, Abb. 3.18 B. zeigt das Proteinexpressionsmuster der SCV. Abb. 3.18 C. zeigt eine graphische Überlagerung beider Gele, aus der die Unterschiede leichter erkennbar werden. Die Abb. 3.19 und 3.20 zeigen jeweils die 2-D-Gele

beider Phänotypen der Stämme CE I bzw. CE II sowie die dazugehörigen graphischen Überlagerungen der zusammengehörigen Gele. In Abb. 3.21 werden die via MALDI-MS identifizierten Proteine aufgelistet.

Zum Einen konnte gezeigt werden, daß es in keiner Small-Colony-Variante der untersuchten Stämme zu einer generellen Inhibition der Proteinexpression kommt. Die Proteinexpressionsmuster beider Phänotypen unterscheiden sich lediglich in der Expression einiger weniger Proteine.

Für die Enzyme Lactatdehydrogenase, Carbamatkinase, Ornithintranscarbamoylase, Phosphoglyceratkinase, Glycerin-3-aldehyd-3-phosphatdehydrogenase, D-Alaninaminotransferase, Cysteinsynthase sowie Glycerolkinase konnte eine Expression ausschließlich in der Small-Colony-Variante festgestellt werden. Diese Enzyme katalysieren entweder Reaktionen der Glycolyse und dienen damit der Energiegewinnung oder sie katalysieren Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsreaktionen und stehen damit im Zusammenhang mit dem ATP-Gehalt der Bakterienzelle.

Eine ausschließliche Expression im LCV-Phänotyp konnte dagegen für die Enzyme Pyruvatdehydrogenase, Inositolmonophosphatdehydrogenase und für den Translationselongationsfaktor TU festgestellt werden.

In der Small-Colony-Variante des Stammes HS zeigte sich ebenfalls etwa das gleiche Expressionsmuster (Daten werden nicht gezeigt).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in den 2D-Gelen aller untersuchten Stämme die gleichen Unterschiede in der Proteinexpression beider Phänotypen gezeigt werden konnte. Eine generelle Inhibition der Proteinsynthese fand nicht statt. Die beobachteten selektiven Unterschiede betreffen Enzyme, die mit Energiegewinnung bzw. ATP-Verwertung im Zusammenhang stehen.

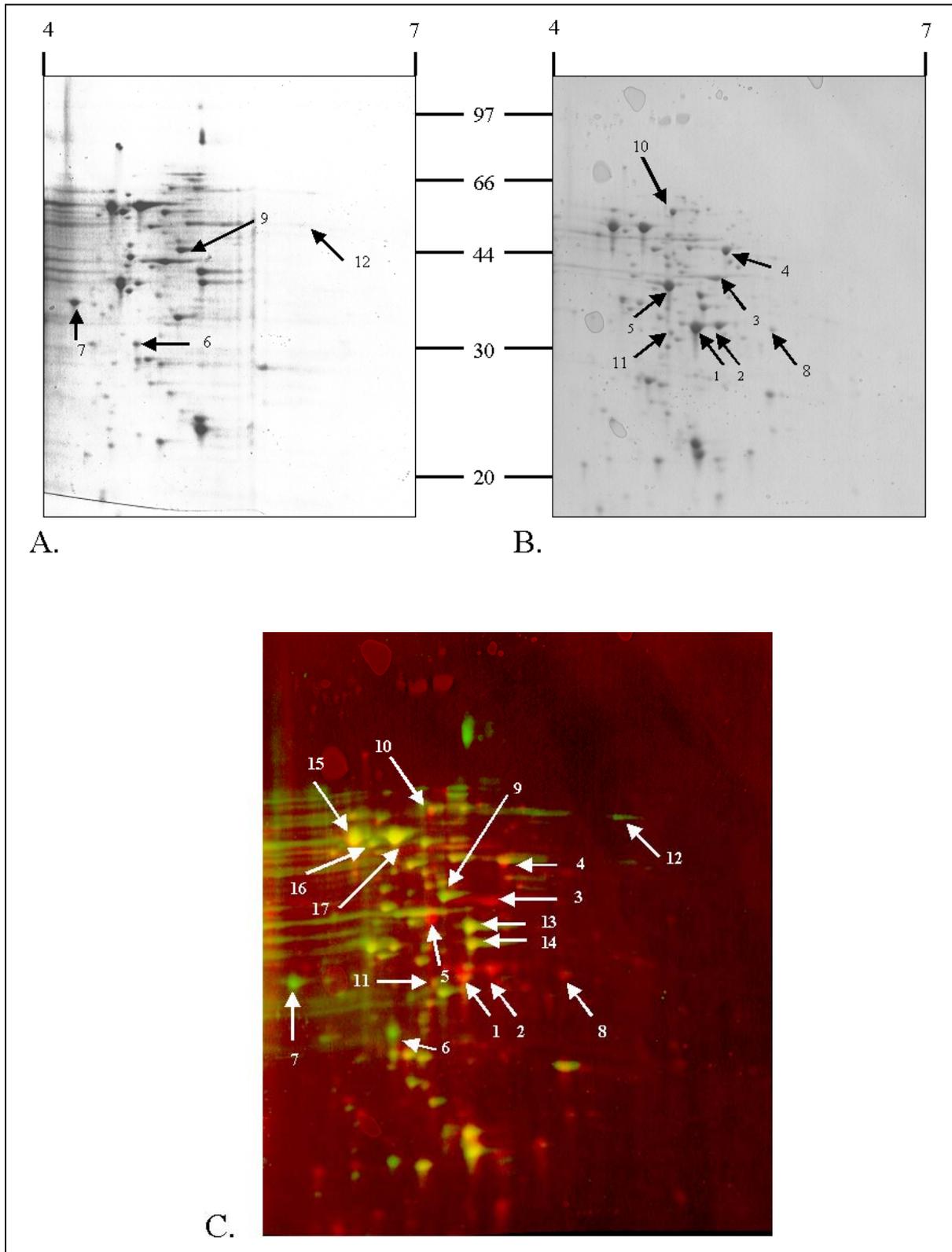


Abb. 3.18: Zweidimensionale SDS-PAGE Gele des LCV/SCV-Paares des Stammes OK.

LCV und SCV von *S. aureus* wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei Erreichen einer OD von 0,3 geerntet. Die zytoplasmatischen Proteine wurden gewonnen und einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen. Es wurden 300 µg Protein aufgetragen. Trennung erfolgte im pH-Bereich von 4-7. Visualisierung erfolgte mit Colloidal Coomassie.

A.: LCV. B.: SCV. C.: Vergleichende Darstellung mittels graphischer Überlagerung der beiden Gele aus A. und B. Angewandt wurde die Delta-2-D-Software (Decodon, Greifswald). Proteine, die nur in der SCV exprimiert werden, erscheinen als rote Punkte, Proteine, die nur in der LCV exprimiert werden, erscheinen in der Abbildung grün. Gelb erscheinende Punkte stellen Proteine dar, die in beiden Phänotypen exprimiert werden. Legende der Zahlen siehe Abb. 3.21.

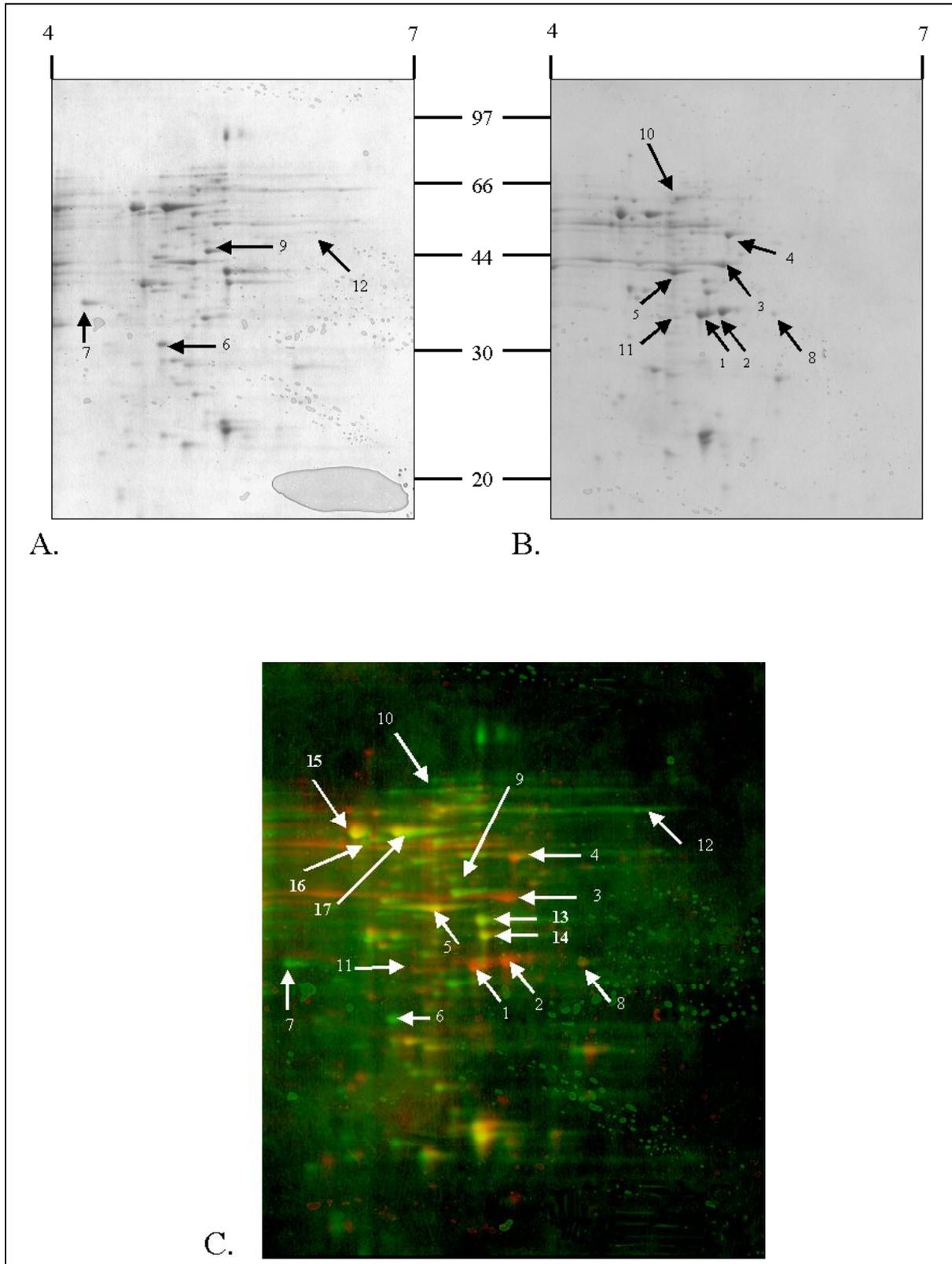


Abb. 3.19: Zweidimensionale SDS-PAGE Gele des LCV/SCV-Paares des Stammes CE I.

LCV und SCV von *S. aureus* wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei Erreichen einer OD von 0,3 geerntet. Die zytoplasmatischen Proteine wurden gewonnen und einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen. Es wurden 300 µg Protein aufgetragen. Trennung erfolgte im pH-Bereich von 4-7. Visualisierung erfolgte mit Colloidal Coomassie.

A.: LCV. **B.:** SCV. **C.:** Vergleichende Darstellung mittels graphischer Überlagerung der beiden Gele aus A. und B. Angewandt wurde die Delta-2-D-Software (Decodon, Greifswald). Proteine, die nur in der SCV exprimiert werden, erscheinen als rote Punkte, Proteine, die nur in der LCV exprimiert werden, erscheinen in der Abbildung grün. Gelb erscheinende Punkte stellen Proteine dar, die in beiden Phänotypen exprimiert werden. Legende der Zahlen siehe Abb. 3.21.

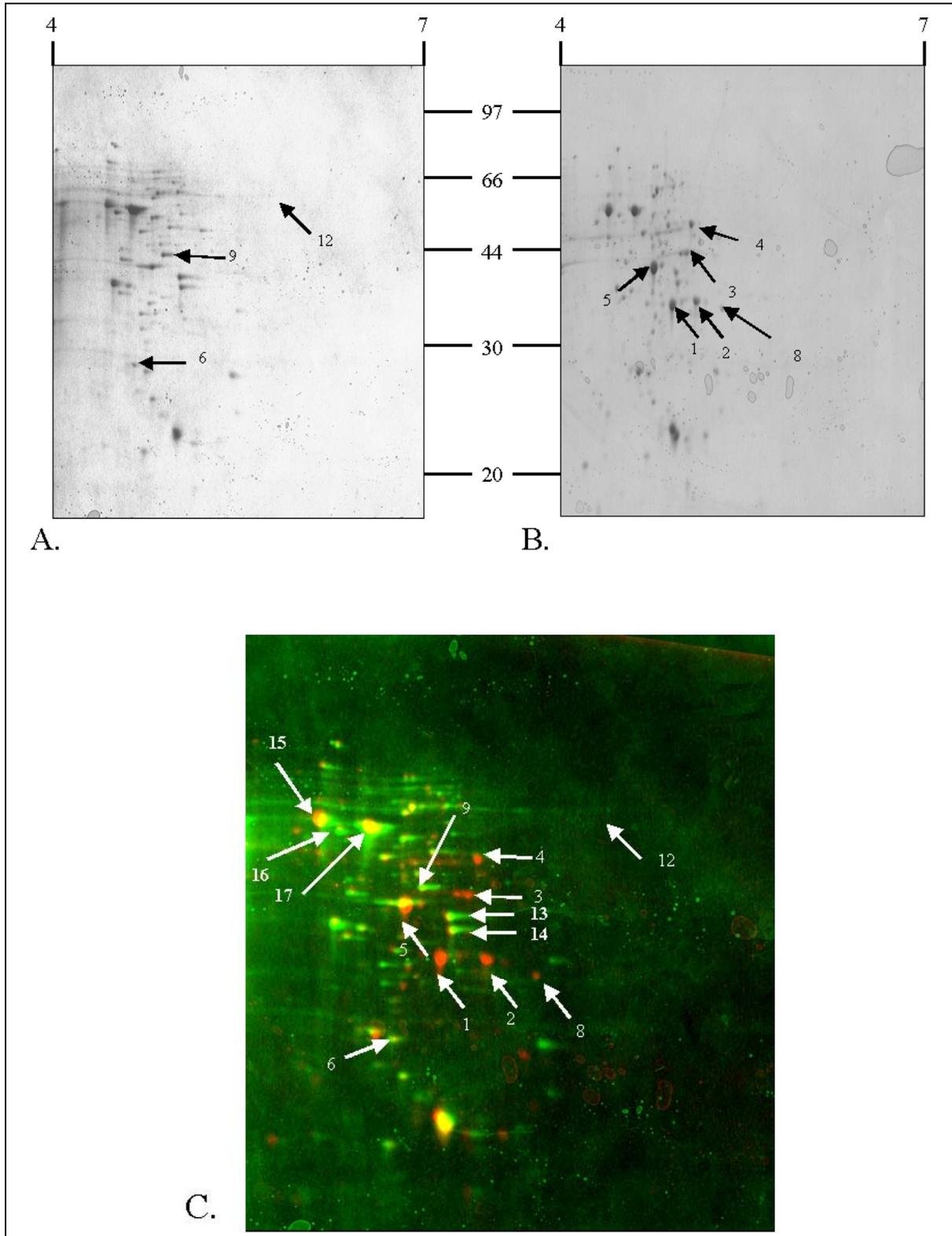


Abb. 3.20: Zweidimensionale SDS-PAGE Gele des LCV/SCV-Paares des Stammes CE II.

LCV und SCV von *S. aureus* wurden in LB-Medium bei 37 °C kultiviert und bei Erreichen einer OD von 0,3 geerntet. Die zytoplasmatischen Proteine wurden gewonnen und einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen. Es wurden 300 µg Protein aufgetragen. Trennung erfolgte im pH-Bereich von 4-7. Visualisierung erfolgte mit Colloidal Coomassie.

A.: LCV. B.: SCV. C.: Vergleichende Darstellung mittels graphischer Überlagerung der beiden Gele aus A. und B. Angewandt wurde die Delta-2-D-Software (Decodon, Greifswald). Proteine, die nur in der SCV exprimiert werden, erscheinen als rote Punkte, Proteine, die nur in der LCV exprimiert werden, erscheinen in der Abbildung grün. Gelb erscheinende Punkte stellen Proteine dar, die in beiden Phänotypen exprimiert werden. Legende der Zahlen siehe Abb. 3.21.

Spot Nr.	NCBI access. No.	MOWSE Score	Sequenz-abdeckung (%)	Molekulargewicht (gemessen) (Da)	Molekulargewicht / Isoelektrischer Punkt (theoretisch) (Da) / pI	Protein-Bezeichnung
1	15923231	239	69	35 000	34 662 / 4,94	L-Lactatdehydrogenase
2	15925622	193	43	35 000	35 626 / 5,36	Carbamatkinase
3	15928220	225	47	40 000	37 867 / 5,15	Ornithin-transcarbamoylase
4	15923763	139	38	44 000	42 632 / 5,17	Phosphoglyceratkinase
5	15923762	225	71	38 000	36 372 / 4,89	Glycerin-3-aldehyd-3-phosphatdehydrogenase
6	14586711	94	34	30 000	29 647 / 4,41	Translations-elongations-faktor TU
7	21263606	175	44	35 000	47 145 / 4,22	2-Phosphoglyceratdehydratase
8	15923503	187	48	35 000	33 012 / 5,39	Cysteinsynthase
9	15924083	71	29	44 000	41 357 / 4,90	Pyruvatdehydrogenase E1- α -Untereinheit
10	15924291	282	45	60 000	55 774 / 4,94	Glycerolkinase
11	15927327	172	52	33 000	31 945 / 4,95	D-Alaninaminotransferase
12	15923380	138	42	50 000	52 932 / 5,61	Inositolmonophosphatdehydrogenase
13	1644433	115	31	35 000	36 716 / 5,10	D-2-Hydroxysäuredehydrogenase
14	15927699	100	29	30 000	30 931 / 5,01	Fructosebisphosphataldolase
15	15923766	211	47	50 000	47 145 / 4,55	Enolase (2-Phosphoglyceratdehydratase)
16	15925093	199	58	50 000	51 368 / 4,68	ATP-Synthase (β -Kette)
17	15925095	140	36	49 000	54 607 / 4,91	ATP-Synthase (α -Kette)

Abb. 3.21: Auflistung der durch MALDI-MS identifizierten Proteine.

Proteine, die sich nur in der LCV finden, sind grün gedruckt, Proteine, die sich nur in der SCV finden, sind rot gedruckt.

4. Diskussion

4.1 Genetische Identität von LCV und SCV verschiedener *S. aureus*-Stämme

Die genetische Identität zwischen Small-Colony-Variante und dazugehörigem normal wachsenden *S. aureus* konnte für alle Stämme nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für *S. aureus*-Stämme, deren Large-Colony-Varianten durch Reversion einer SCV gewonnen wurde (OK, SCH und 12805), als auch für die Stämme, bei denen beide Phänotypen aus klinischem Material gewonnen wurden, deren genetische Identität anschließend bestätigt wurde (HS, CE I und CE II).

4.2 Reversion

Die Ausbildung der Small-Colony-Variante stellt einen dynamischen Vorgang dar. Alle untersuchten Stämme zeigten gelegentlich das Phänomen der Reversion. Für den Stamm OK konnte gezeigt werden, daß mehrere unterschiedliche Flüssigkulturansätze binnen weniger Stunden revertieren. Von Eiff beschrieb eine Small-Colony-Variante, die eine *hemB*-Mutante darstellte (v. Eiff *et al.*, 1997). Eine solche müßte hinsichtlich ihrer Eigenschaften stabil sein. Es ist davon auszugehen, daß dieser Fall eher die Ausnahme darstellen dürfte. Bei vielen auftretenden Small-Colony-Varianten handelt es sich wahrscheinlich nicht um Mutanten. Im Falle von häufig auftretenden Reversionen ist davon auszugehen, daß es sich nicht um Rückmutationen handelt, denn es wäre sehr unwahrscheinlich, daß diese wiederholt und mit hoher Frequenz an der gleichen Stelle im Genom auftreten. Es ist vielmehr davon auszugehen, daß die Bildung der Small-Colony-Variante und die Reversion aktive und reversible Prozesse sind. Als Ursache für deren Auftreten könnten entweder aktive Regulationsmechanismen oder die Auswirkungen mobiler genetischer Elemente (Transposons oder Phagen) in Frage kommen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Hinweise gefunden werden, die die Bildung des SCV-Phänotyps oder seine Reversion erklären könnten.

4.3 Metabolische Besonderheiten der Small-Colony-Varianten

Die Ausbildung der Small-Colony-Variante von *S. aureus* wurde bislang erklärt über Defekte in der Häm- und Menadionbiosynthese, die wiederum zu Fehlfunktionen in der Atmungskette führen (Proctor *et al.*, 1994). Funktionieren die Prozesse der Atmungskette nicht, so besteht in der bakteriellen Zelle ATP-Mangel. Dieser wiederum führt zu einem in Small-Colony-Varianten meßbaren, reduzierten Membranpotential (Baumert *et al.*, 2002).

Die drei Proteom-analytisch untersuchten Stämme OK, CE I und CE II wiesen Menadion-Auxotrophie auf. Diese läßt darauf schließen, daß in diesen Stämmen in Übereinstimmung mit der gängigen Theorie Defekte in der Atmungskette vorliegen. Die transkriptomanalytische Untersuchung des Stammes OK mittels DNA-Chip zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Transkription der Gene der Atmungskette, obwohl zu vermuten wäre, daß bei funktionellen Defekten der Atmungskette die Transkription der für deren Enzyme kodierenden Gene über eine negative Rückkopplung erhöht sein müßte. Die Untersuchung zytoplasmatischer Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zeigte ebenfalls keine Unterschiede in der Transkription der Enzyme der Atmungskette.

Überraschenderweise konnte bei keinem der untersuchten Stämme in den Small-Colony-Varianten eine generelle Inhibition der Proteinsynthese nachgewiesen werden. Allerdings zeigten alle drei Proteom-analytisch untersuchten Stämme (OK, CE I und CE II) spezifische Unterschiede in den Proteinexpressionsmustern von SCV-Phänotyp und normal wachsenden *S. aureus*. In den untersuchten Small-Colony-Varianten wurden bestimmte Proteine der Glycolyse (Lactatdehydrogenase, Phosphoglyceratkinase sowie Glycerin-3-aldehyd-3-phosphatdehydrogenase) exprimiert, die in den Proteinextrakten der korrespondierenden LCV nicht gefunden wurden. Das Enzym Lactatdehydrogenase katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat. Hiermit geht die Regeneration von NADH zu NAD einher. Finden die Prozesse der Atmungskette nicht mehr statt, so ist dies die einzige Möglichkeit zur Regeneration von NADH zu NAD und somit die einzige Möglichkeit, um die Energiegewinnung, wenn auch in eingeschränktem Maße, über die Glycolyse aufrecht zu erhalten. Ferner zeigt sich im SCV-Phänotyp die Expression von Alaninaminotransferase. Dieses Enzym dient der Überführung von Alanin in Pyruvat. Auch diese biochemische Reaktion findet normalerweise bei Energiemangel statt.

ATP-abhängige, metabolische Vorgänge laufen bei ATP-Mangel nur in vermindertem Maße ab. In den Small-Colony-Varianten wird eine vermehrte Expression der Enzyme Carbamatkinase, Ornithintranscarbamoylase, Phosphoglyceratkinase und Glycerolkinase beobachtet. Diese Enzyme sind für Phosphorylierungen notwendig. Das verglichen mit normal wachsenden *S.*

aureus erhöhte Expressionsniveau dieser Enzyme kann als Reaktion auf den ATP-Mangel interpretiert werden. Bemerkenswert erscheint allerdings, daß beispielsweise das Enzym ATP-Synthase in beiden Phänotypen gleich exprimiert wird, obwohl gerade bei diesem Enzym eine vermehrte Expression in der Small-Colony-Variante zu erwarten gewesen wäre. Im LCV-Phänotyp wird dagegen das Enzym Pyruvatdehydrogenase vermehrt exprimiert. Da dieses Enzym für seine Funktion Ferricytochrom B 1 benötigt, ist seine biochemische Wirkung an die Bedingungen eines aeroben Stoffwechsels gekoppelt.

Durch Proteom-analytischen Vergleich der Proteinexpressionsmuster beider Phänotypen konnte ferner gezeigt werden, daß hinsichtlich der Produktion diverser anderer metabolischer Enzyme (Fructosebisphosphataldolase, 2-Hydroxysäuredehydrogenase, Enolase, ATP-Synthase) zwischen beiden Phänotypen kein signifikanter Unterschied besteht.

Es wäre zu erwarten gewesen, daß der auftretende Energiemangel sich auf die Bakterienzelle als Streßfaktor auswirkt. Somit sollten sich in Small-Colony-Varianten vermehrt Streßproteine finden lassen. In der Literatur wurde beschrieben, daß *S. aureus* für das Überleben einer Periode mangelhafter Nährstoffversorgung sowie die nachfolgende Regenerationsphase das Protein *ctaA* benötigt (Clements *et al.*, 1999). In der Small-Colony-Variante sollte sich deswegen eine vermehrte Expression dieses Gens nachweisen lassen. Die Daten aus dem DNA-Chip zeigen jedoch keine signifikante Diskrepanz in der Transkription dieses Gens zwischen beiden Phänotypen. Für andere mit dem DNA-Chip erfäßbare Streßproteine konnte in der SCV ebenfalls keine erhöhte Transkription nachgewiesen werden. Auch durch Proteom-analytischen Vergleich beider Phänotypen konnte kein Unterschied in der Expression von Streßproteinen festgestellt werden.

4.4 Virulenzfaktoren und Globalregulatoren in Small-Colony-Varianten

Im Vergleich mit normal wachsenden *S. aureus* gilt die Small-Colony-Variante im allgemeinen als weniger pathogen. Dies wird damit erklärt, daß unter ATP-Mangelbedingungen die Produktion von Virulenzfaktoren erniedrigt ist (Proctor *et al.* 1994). Andererseits konnte Jonsson bei in vivo-Untersuchungen einer *hemB*-Mutante von *S. aureus*, die SCV-Charakteristik aufweist, zeigen, daß deren Pathogenität in der Maus erhöht ist (Jonsson *et al.*, 2003).

Wichtige Regulatoren von Virulenzfaktoren sind *agr*, *sar* und *sigmaB*. In der Transkriptomanalyse des Stammes OK mittels DNA-Chip konnte zwischen beiden Phänotypen kein Unterschied in der Transkription der Regulatorsysteme *sigmaB* und *sar* festgestellt werden. Dagegen konnte

gezeigt werden, daß die Aktivität des *agr*-Systems in der Small-Colony-Variante des Stammes OK, signifikant erhöht ist. Mittels RT-PCR konnte auch für die Small-Colony-Varianten der Stämme 12805 und CE I eine erhöhte *agr*-Transkription nachgewiesen werden. Das *agr*-System stellt ein quorum-sensing-System dar, das normalerweise in Abhängigkeit von der Wachstumsdichte der Bakterien aktiviert wird (Kornblum *et al.*, 1990).

Im *agr*-Locus sind die zwei Promotoren P2 und P3 enthalten. Diese induzieren bei Aktivierung die Transkription von RNA II bzw. RNA III. RNA II umfaßt die Gentranskripte *agrA*, *agrB*, *agrC* und *agrD*. Überschreitet *agrA* einen bestimmten Schwellenwert, so wird P3 aktiviert, es kommt zur Transkription von RNA III. Diese beinhaltet das Gentranskript *hld*. Somit kann die *hld*-Transkription als direktes Maß der *agr*-Aktivität gelten (Novick *et al.*, 1993). Für die quantitative Erfassung der *agr*-Aktivität konnte deswegen die Messung der *hld*-Transkription mittels RT-PCR herangezogen werden. Als quantitatives Maß für die Produktion von Exotoxinen wurde repräsentativ die *hla*-Transkription gemessen.

Gemessen wurde die *hld*- bzw. *hla*-Transkription in beiden Phänotypen der Stämme OK, 12805 und CE I. In allen Stämmen wurde eine vermehrte Transkription von *hld* in der Small-Colony-Variante nachgewiesen. Quantitativ zeigen sich zwischen den Stämmen allerdings gewisse Unterschiede.

In der Small-Colony-Variante des Stammes OK scheint *agr* konstitutiv angeschaltet zu sein. Schon bei einer OD_[540] von 0,1 entspricht die *hld*-Expression der Small-Colony-Variante dem Niveau, das eine LCV bei einer OD_[540] von ca. 1,8 aufweist, wobei zwischen OD_[540] = 0,1 und OD_[540] = 0,3 keine signifikante Änderung in der *agr*-Aktivität festzustellen ist. Zwar konnte die in der SCV erhöhte *hld*-Expression in der Transkriptomanalyse mittels DNA-Chip nicht beobachtet werden. Ursache hierfür war jedoch, daß das Fluoreszenzsignal zu schwach war, als daß es bei der Auswertung zu erfassen gewesen wäre.

Mit der in der SCV schon bei geringen Wachstumsdichten signifikant erhöhten *agr*-Transkription einhergehend ist erwartungsgemäß auch die Produktion von α -Toxin gesteigert, was mittels DNA-Chip, mittels RT-PCR und mittels Western-Blot-Analyse gezeigt werden konnte. Die Daten aus der Transkriptom-analytischen Untersuchung des Stammes OK mittels DNA-Chip zeigen, daß auch die anderen Toxine sich so verhalten, wie dies unter den Bedingungen einer *agr*-Aktivierung zu erwarten ist: Die Gene für das Toxischer-Schock-Syndrom-Toxin und das γ -Hämolyysin werden in der Small-Colony-Variante vermehrt transkribiert. Die Transkription der Gene, die für bestimmte Oberflächenstrukturen kodieren (clumping factor A, Fibronectin-bindendes Protein sowie IgG-bindendes Protein) ist gleichfalls in der Small-Colony-Variante erhöht. Vaudaux beschreibt in seinen Studien eine erhöhte Expression von „clumping-factor“

und dem Fibronectin-bindenden Protein in Small-Colony-Varianten (Vaudaux *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der Transkriptonalyse beider Phänotypen der Stammes OK liefern einen Hinweis in diese Richtung. Allerdings bleibt nachzuweisen, daß diese Proteine auch in vermehrtem Maße freigesetzt werden. Mittels Proteomanalyse konnten hierüber keine Aufschlüsse erhalten werden, da hier nur cytoplasmatische Proteine untersucht werden konnten. Bei „clumping-factor“ und dem Fibronectin-bindenden Protein handelt es sich aber um Zellwand-gebundene Proteine, die im Rahmen diese Arbeit nicht erfaßt wurden.

Die Untersuchung des Stammes 12805 in Hinblick auf die Aktivierung des *agr*-Locus bei der Small-Colony-Variante via RT-PCR lieferte ein ähnliches Ergebnis. Allerdings ergibt sich hier ein deutlicher Unterschied zwischen den *hld*-Expressionswerten der SCV bei $OD_{[540]} = 0,1$ und $OD_{[540]} = 0,3$. Hier kann zwar von einer früheren, nicht aber von einer konstitutiven Aktivierung des *agr*-Locus ausgegangen werden. Bei der Untersuchung der Produktion von α -Toxin mittels Western-Blot-Analyse zeigt sich diese in der SCV signifikant erhöht. Allerdings zeigt hier die LCV bei höheren $OD_{[540]}$ -Werten eine relativ zu $OD_{[540]} = 0,3$ deutlich höhere Produktionsrate von α -Toxin, als dies im Stamm OK der Fall war.

Auch bei Stamm CE I zeigt das *agr*-System eine Aktivierung bei der SCV bei optischen Dichten von 0,1 bzw. 0,3. Überraschenderweise tritt hier bei der SCV nahezu keine Expression von α -Toxin auf. Das *hla*-Gen ist sowohl in der LCV als auch in der SCV erhalten. Erklärt werden könnte das Ausbleiben eines Anstiegs der α -Toxin-Produktion trotz *agr*-Aktivierung über die Wirkung mobiler genetischer Elemente (Transposons oder Phagen), die mit dem *agr*-Transkriptionsfaktors RNA III in Wechselwirkung treten.

Die Betrachtung der Freisetzung von Exoproteinen im Allgemeinen zeigt zwar geringfügige, stammspezifische Unterschiede, aber bei keinem der untersuchten Stämme wird eine generell verminderte Freisetzung von Exoproteinen in den SCV-Phänotypen sichtbar.

Ferner konnte sowohl mittels DNA-Chip als auch mittels Western-Blot-Analyse gezeigt werden, daß die Expression von Protein A in den Small-Colony-Varianten der untersuchten Stämme vermindert ist. Auch dies ist eine Folge der *agr*-Aktivierung. Die Transkription von Protein A wird durch das *agr*-System inhibiert.

Die Expression von Enterotoxin B ist ebenfalls durch das *agr*-System kontrolliert, hier zeigt sich in der Western-Blot-Analyse zwischen LCV und SCV in allen untersuchten Stämmen ein vergleichbares Expressionsniveau. Die Daten der Transkriptomalyse des Stammes OK bestätigen, daß bezüglich Enterotoxin B kein Unterschied in der Genexpression besteht.

Enterotoxin A unterliegt nicht der Kontrolle durch das *agr*-System (Tremaine *et al.*, 1993). Die LCV des Stammes OK zeigt in der Western-Blot-Analyse keine Freisetzung von Enterotoxin A.

Auf Transkriptionsebene zeigte sich hier kein Unterschied. In allen anderen Stämmen waren die Expressionsniveaus von Enterotoxin A in beiden Phänotypen gleich.

Die Daten bezüglich Transkription und Expression von Exotoxinen korrelieren mit den Ergebnissen, die Jonsson (2003) unlängst im Mausmodell mit der oben erwähnten *hemB*-Mutante erzielen konnte. Für diese konnte gezeigt werden, daß die Produktion von Exoproteinen (vor allem sezernierte Enzyme) im SCV-Phänotyp keineswegs generell reduziert ist. Die Pathogenität stellte sich im Mausmodell hinsichtlich des Auftretens einer septischen Arthritis bei der SCV als deutlich höher heraus. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Expression einer großen Anzahl an Serinproteasen durch *agr* gesteigert wird (Dunman *et al.*, 2001). Diese Tatsache deckt sich wiederum mit der Beobachtung einer erhöhten *agr*-Aktivität.

Das *agr*-System beeinflusst über RNA III die Transkription einer großen Anzahl verschiedener Gene (Dunman *et al.*, 2001). Darunter befinden sich auch metabolische Gene wie etwa die Carbamatkinase, Chorismatsynthase, Carbamoylphosphatsynthase, Ornithintranscarbamoylase (Expression wird durch *agr* aktiviert) sowie einige anaerobe Dehydrogenasen (Expression wird durch *agr* inhibiert). Diese Beeinflussung könnte einen Beitrag zu den beobachteten Unterschieden in der Proteinexpression beider Phänotypen leisten. So konnte mittels der zweidimensionalen Gelelektrophorese gezeigt werden, daß die Small-Colony-Varianten vermehrte Expression von Genen wie der Carbamatkinase und der Ornithintranscarbamoylase zeigen. Andererseits inhibiert *agr* normalerweise die Expression von Genen, die etwa für anaerobe Dehydrogenasen kodieren. In der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist das Gegenteil sichtbar: So wird beispielsweise die Lactatdehydrogenase in Small-Colony-Varianten in hohem Maße synthetisiert.

Aus der beobachteten Aktivierung des *agr*-Systems in Small-Colony-Varianten von *S. aureus* ergibt sich die Frage nach deren Ursache. Bislang war bekannt, daß das *agr*-System ein quorum-sensing-System darstellt, das sich in Abhängigkeit von der Wachstumsdichte selbst reguliert (McDowell *et al.*, 2001). Diese Autoregulation scheint bei der SCV gestört zu sein, über die Ursachen kann gegenwärtig nur spekuliert werden. Bislang finden sich in der Literatur keinerlei Hinweise, daß eine Beziehung zwischen Energieverknappung und der Aktivierung des *agr*-Locus bestehen könnte. Darüber hinaus sollte bedacht werden, daß die Regulation von Genen, die für metabolische Enzyme kodieren, meist sehr komplex ist. Die Wirkung eines Regulationssystems alleine ist daher meist nicht hinreichend, um die Expression metabolischer Gene zu erklären. Die erhöhte *agr*-Aktivität reicht als alleiniges Kriterium für die Erklärung der metabolischen Besonderheiten in Small-Colony-Varianten von *S. aureus* nicht aus.

Ferner wäre die Frage nach Ursache und Wirkung zu stellen. Zum einen wäre denkbar, daß zuerst ein Energiemangelzustand auftritt, der seinerseits eine Aktivierung von *agr* bewirkt und zu

den beobachteten Auswirkungen auf Genexpressionsebene führt. Andererseits könnte ein aktiver, bislang unbekannter Mechanismus über eine Aktivierung unter anderem von *agr* zu den beobachteten Phänomenen einer veränderten Genexpression führen. Diese könnte zu einer verminderten Bildung bestimmter metabolischer Enzyme und daraus resultierend zu Energiemangel führen. Der Energiemangel scheint nicht ursächlich zu sein, denn in diesem Fall wäre die Expression einer großen Anzahl von Streßfaktoren zu erwarten. Eine solche konnte jedoch weder bei den Transkriptomuntersuchungen mittels DNA-Chip noch bei den Untersuchungen der Proteinexpression mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese festgestellt werden.

5. Zusammenfassung

Small-Colony-Varianten sind in ihren Eigenschaften heterogen. Die unterschiedlichen Eigenschaften, die beobachtet werden können, werden nicht insgesamt durch die derzeit im Raum stehenden Theorien erklärt.

In dieser Arbeit wurde erstmals das Expressionsmuster cytoplasmatischer Proteine der Small-Colony-Variante mit dem einer normal wachsenden, isogenen Large-Colony-Variante von *S. aureus* verglichen. Hierzu diente eine zweidimensionale Gelelektrophorese. Differentiell exprimierte Proteine wurden mittels MALDI-TOF-Analyse identifiziert, ebenso einige Proteine mit annähernd identischer Expression in beiden Phänotypen. Eine generell reduzierte Proteinsynthese in der SCV konnte nicht festgestellt werden. Ebenso wenig konnten Hinweise auf eine selektive Inhibition bestimmter, für Enzyme der Atmungskette kodierender Gene gefunden werden. Vielmehr konnten einige spezifische Unterschiede in den Proteinexpressionsmustern verschiedener Small-Colony-Varianten nachgewiesen werden: Im SCV-Phänotyp wurden bestimmte Proteine exprimiert, die dazu beitragen können, funktionelle Defizite in der Atmungskette zu kompensieren (z.B. Lactatdehydrogenase). Desweiteren synthetisieren Small-Colony-Varianten solche Proteine vermehrt, deren erhöhte Expression als Reaktion auf ATP-Mangel angesehen werden kann (z.B. Carbamatkinase). Andererseits kann für einige Proteine, bei denen ebenfalls eine Beeinflussung der Expression durch Defekte in der Atmungskette zu erwarten gewesen wäre, keine differentielle Expression festgestellt werden (z.B. ATP-Synthase). Es konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, daß die beobachteten Unterschiede in den Proteinexpressionsmustern auf eine selektive Regulation zurückgeführt werden können.

Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit ein DNA-Chip konstruiert, mit dessen Hilfe das Transkriptionsmuster der Small-Colony-Variante mit dem einer normal wachsenden, isogenen Large-

Colony-Variante von *S. aureus* verglichen werden konnte. In dieser Analyse konnten keine Unterschiede in der Transkription von Genen, die für die Menadion- und Hämsynthese kodieren, festgestellt werden. Ebenso wenig konnten Unterschiede in der Expression von Streßgenen, Antibiotikaresistenz-Genen, oder Genen, die für Lantibiotika kodieren festgestellt werden.

In Small-Colony-Varianten konnte ein erhöhtes Transkriptionsniveau des Globalregulatorsystems *agr* und einiger von diesem regulierter Toxingene nachgewiesen werden. Diese Resultate konnten auf Transkriptionsebene mittels einer RT-PCR und auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Dieser Befund hat Auswirkungen auf die Bewertung der Virulenz, die von SCV-Phänotypen von *S. aureus* ausgeht. Da nachgewiesen werden konnte, daß sowohl *agr*, das die Expression zahlreicher Exotoxine reguliert, als auch die hiervon regulierten Exotoxine vermehrt exprimiert werden, erscheint die These, nach der Small-Colony-Varianten von *S. aureus* weniger virulent sein sollen, als normal wachsende Large-Colony-Varianten, nicht länger haltbar.

Eine Erklärung, welche Ursachen der Ausbildung des SCV-Phänotyps zugrundeliegen, konnte indes nicht geliefert werden. Ebenso wenig konnten Hinweise gefunden werden, die einen Beitrag zur Aufklärung des Phänomens der Reversion leisten könnten. Es könnte sich bei der Bildung sowie bei der Reversion um die Auswirkungen mobiler Elemente (Transposons oder Phagen) handeln, die bestimmte Gene, deren Promotoren oder übergeordnete Regulationssysteme temporär oder permanent zerstören können.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Ursachen von Bildung und Reversion der Small-Colony-Varianten von *S. aureus* aufzuklären.

6. Anhang

Anhang 1: Gene auf dem DNA-Chip

Gen	Länge (nt)	Gen	Länge (nt)	Gen	Länge (nt)	Gen	Länge (nt)
Metabolische Gene		Resistenzgene		Toxingene		Sonstige Gene	
<i>aroB</i>	285	<i>aphD</i>	318	<i>lip</i>	435	<i>murC</i>	429
<i>aroC</i>	443	<i>cat</i>	443	<i>lukF</i>	295	<i>rpoB</i>	449
<i>aroE</i>	304	<i>blaI</i>	355	<i>lukS_C</i>	305	<i>sirR</i>	234
<i>aroF</i>	269	<i>blaR1</i>	482	<i>lukS_N</i>	199	<i>spgG</i>	204
<i>aroG</i>	305	<i>blaZ</i>	409	<i>nag</i>	432	<i>sprV</i>	436
<i>gyrA</i>	448	<i>dfrA</i>	270	<i>nuc</i>	352	<i>sstA</i>	438
<i>gyrB</i>	358	<i>ermA</i>	354	<i>sak</i>	230	<i>sstB</i>	288
<i>hemA</i>	496	<i>ermB</i>	312	<i>sea</i>	160	<i>sstC</i>	438
<i>hemB</i>	457	<i>ermC</i>	178	<i>seb</i>	345	<i>sstD</i>	437
<i>hemC</i>	342	<i>femA</i>	156	<i>sec1</i>	361	<i>yhiN</i>	471
<i>hemD</i>	291	<i>femB</i>	205	<i>sei</i>	327		
<i>hemE</i>	619	<i>femD</i>	435	<i>spc</i>	424		
<i>hemH</i>	578	<i>fmhB</i>	429	<i>tag</i>	482		
<i>hemL</i>	383	<i>glnA</i>	426	<i>tst</i>	302		
<i>hemN</i>	450	<i>glnR</i>	339				
<i>hemY</i>	430	<i>grlA</i>	390	Streßgene			
<i>lepA</i>	629	<i>grlB</i>	343	<i>asp23</i>	287		
<i>menB</i>	203	<i>linA</i>	259	<i>cadA</i>	274		
<i>menC</i>	397	<i>mecA</i>	257	<i>clpC</i>	268		
<i>menD</i>	365	<i>mecI</i>	332	<i>clpP</i>	321		
<i>menE</i>	380	<i>mecR1</i>	422	<i>ctaA</i>	350		
<i>menF</i>	236	<i>msrSA</i>	365	<i>dnaK</i>	262		
<i>norA</i>	172	<i>mreA</i>	258	<i>groEL</i>	206		
<i>pbg</i>	353	<i>mreB</i>	327	<i>groES</i>	403		
<i>pdhB</i>	329	<i>mreR</i>	195	<i>mutL</i>	313		
<i>pdhC</i>	303	<i>pbpF</i>	399	<i>mutS</i>	322		
<i>pdhD</i>	436	<i>qacA</i>	477	<i>sodA</i>	251		
<i>tyrA</i>	409			<i>trxA</i>	163		
		Toxingene		<i>trxB</i>	363		
Regulatorgene		<i>atl</i>	429				
<i>agrA</i>	155	<i>atlE</i>	424	Sonstige Gene			
<i>agrB</i>	431	<i>clfA</i>	378	<i>dhsC</i>	143		
<i>agrC</i>	435	<i>clfB</i>	400	<i>dltA</i>	336		
<i>ctsR</i>	357	<i>coa</i>	336	<i>dltB</i>	340		
<i>rsbU</i>	302	<i>EDIN</i>	430	<i>dltC</i>	210		
<i>rsbV</i>	254	<i>eta</i>	424	<i>dltD</i>	286		
<i>rsbW</i>	191	<i>etb</i>	313	<i>elkT</i>	224		
<i>sarA</i>	241	<i>geh</i>	426	<i>epiB</i>	309		
<i>sigB</i>	212	<i>hla</i>	380	<i>epiC</i>	693		
		<i>hlb</i>	293	<i>epiD</i>	236		
Resistenzgene		<i>hld</i>	104	<i>epiP</i>	761		
<i>aacA</i>	318	<i>hlgA-C</i>	379	<i>hysA</i>	351		
<i>aadD</i>	370	<i>hlgA-N</i>	210	<i>lrgA</i>	265		
<i>aas</i>	436	<i>hlgB</i>	321	<i>lrgB</i>	280		
<i>aphA</i>	378	<i>hlgC</i>	311	<i>lytM</i>	388		

Anhang 2: Gene der Häm- und Menadionbiosynthese, die mit dem DNA-Chip erfaßt werden können

Bezeichnung des Gens	EC-Nummer	Funktion
<i>hemA</i>		Glutamyl-tRNA-Reduktase
<i>hemB</i>	4.2.1.24	δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase
<i>hemC</i>	4.3.1.8	Porphobilinogen-Desaminase
<i>hemD</i>	4.2.1.75	Uroporphyrinogen-III-Synthase
<i>hemE</i>	4.1.1.37	Uroporphyrinogen-Decarboxylase
<i>hemH</i>	4.99.1.1	Ferrochelatase
<i>hemL</i>	5.4.3.8	Glutamat-1-semialdehyde 2,1-aminomutase
<i>hemN</i>	1.3.3.3	Sauerstoff-unabhängige Coproporphyrinogen-Oxidase III
<i>hemY</i>	1.3.3.4	Protoporphyrinogen-Oxidase
<i>aroB</i>	4.2.3.4	3-Dehydrochinat-Synthase
<i>aroC</i>	4.2.3.5	Chorismat-Synthase
<i>aroE</i>	1.1.1.25	Shikimat-5-Dehydrogenase
<i>aroF</i>	4.6.1.4	vermutete Chorismat-Synthase
<i>menB</i>	4.1.3.36	Naphthoat-Synthase
<i>menC</i>		O-Succinylbenzoat-Synthase
<i>menD</i>		Menachinon-Biosyntheseprotein
<i>menE</i>	6.2.1.26	O-Succinylbenzoat-CoA-Ligase
<i>menF</i>	5.4.99.6	Isochorismat-Synthase

7. Literatur

Anwar, M.S. and Bokhari, S.R. (2003). Antimicrobial resistance of community and hospital acquired *Staphylococcus aureus* isolates to oxacillin and glycopeptides. J Coll Physicians Surg Pak. Jan;13(1), 33-36.

Bayles, K.W., Wesson, C.A., Liou, L.E., Fox, L.K., Bohach, G.A. and Trumble, W.R. (1998). Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. Infect Immun 66, 336-342.

Baumert, N., von Eiff, C., Schaaff, F., Peters, G., Proctor, R.A. and Sahl, H.G. (2002). Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. Microb Drug Resist 8(4), 253-260.

Benner, E.J. and Kayser, F.H. (1968). Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 11, 741-744.

Cheung, A.L., Bayer, M.G., and Heinrichs, J.H. (1997). *Sar* genetic determinants necessary for transcription of RNA II and RNA III in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 179, 3963-3971.

Chien, Y.T., and Cheung, A.L. (1998). Molecular interactions between two global regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 273, 2645-2652.

Chuard, C., Vaudaux, P.E., Proctor, R.A., and Lew, D.P. (1997). Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. J Antimicrob Chemoth 39, 603-608.

Clements, M.O., Watson, S.P., Poole, R.K. and Foster, S.J. (1999). *CtaA* of *Staphylococcus aureus* Is Required for Starvation Survival, Recovery and Cytochrome Biosynthesis. J Bacteriol 181(2), 501-507.

Cui, L., Murakami, H., Kuwarara, K. and Hiramatsu, K. (2000). Contribution of a thickened cell wall and its glutamine non amidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu 50. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2276-2285.

Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlades, D. and Projan, S.J. (2001). Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the *agr* and/or *sarA* Loci. *J Bacteriol* 183, 7341-7353.

von Eiff, C., Heilmann, C., Proctor, R.A., Woltz, C., Peters, G. and Götz, F. (1997). A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J Bacteriol* 179(15), 4706-4712.

von Eiff, C., Bettin, D., Proctor, R.A., Rolaufts, B., Lindner, N., Winkelmann, W. and Peters, G. (1997). Recovery of Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus* Following Gentamicin Bead Placement for Osteomyelitis. *Clin Infect Dis* 25, 1250-1251.

von Eiff, C., Lindner, N., Proctor, R.A., Winkelmann, W. and Peters, G. (1998). Auftreten von Gentamicin-resistenten Small Colony Variants von *S. aureus* nach Einsetzen von Gentamicin-Ketten bei Osteomyelitis als mögliche Ursache für Rezidive. *Z Orthop* 136, 268-271.

von Eiff, C., Becker, K., Metze, D., Lubritz, G., Hockmann, J., Schwarz, T. and Peters, G. (2001). Intracellular Persistence of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants within Keratinocytes: A Cause for Antibiotic Treatment Failure in a Patient with Darier's Disease. *Clin Infect Dis* 32, 1643-1647.

Emori, T.G., and Gaines, R.P. (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of microbiology laboratory. *Clin Microb Rev* 6, 428-442.

Giacometti, A., Cirioni, O., Gov, Y., Ghiselli, R., del Petre, M.S., Mocchegiani, F., Saba, V., Orlando, F., Scalise, G., Balaban, N. and dell'Aqua, G. (2003). RNA III Inhibiting Peptide Inhibits In Vivo Biofilm Formation by Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemoth*, 1979-1983.

Gillespie, M.T. and Skurray, R.A. (1989). Nucleotide sequence of the *blaZ* gene of the *Staphylococcus aureus* beta-lactamase transposon Tn4002. *Nucleic Acids Res* 17, 8854.

Görg, A., Postel, W. and Günther, S. (1988). *Electrophoresis* 9, 531-546.

Götz, M.T., Heilmann, C. and Cramtorn, S.E. (2000). Molecular basis of catheder-associated infections by staphylococci. Kluwer Academic Plenum Publishers, London.

Hanaki, H., Kuwahara-Arai, K., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., Labischinski, H., Hiramatsu, K. (1998). Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* 42(2), 199-209.

Hecker, M., and Engelmann, S. (2000). Proteomics, DNA arrays and the analysis of still unknown proteins of *Bacillus subtilis* and pathogenic Gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* 290, 123-134.

Hiramatsu, K., Asada, K., Suzuki, E., Okonogi, K. and Yokota, T. (1992). Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) . *FEBS Lett* 298, 133-136.

Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K. and Tenover, F.C. (1997). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemoth* 40, 135-136.

Horsburgh, M.J., Aish, J.L., White, I.J., Lithgow, J.K. and Foster, S.J. (2002). *SigmaB* modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional *rsbU* strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol* 184(19), 5457-5467.

Jonsson, I.M., von Eiff, C., Proctor, R.A., Peters, G., Ryden, C. and Tarkowski, A. (2003). Virulence of a *hemB* mutant displaying the phenotype of a *Staphylococcus aureus* small colony variant in a murine model of septic arthritis. *Microb Pathog* 34,2: 73 - 79.

Kahl, B., Herrmann, M., Everding, A.S., Koch, H.G., Becker, K., Harms, E., Proctor, R.A. and Peters, G. (1998). Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *J Infect Dis* 177, 1023-1029.

Kahl, B., Belling, G., Reichelt, R., Herrmann, M., Proctor, R.A. and Peters G. (2003). Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol* 41, 410-413.

Kloos, W.E., and Bannerman, T.L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 7, 117-140.

Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H. und Pulverer, G. (2001). *Medizinische Mikrobiologie*, 8. Auflage, Urban & Fischer.

Kolle, W. und Hetsch, H. (1913). *Die experimentelle Bacteriologie und die Infektionskrankheiten mit besonderer Berücksichtigung der Immunitätslehre*. Band 1, 3. Auflage, Berlin : Urban und Schwarzenberg.

Kornblum, J., Kreiswirth, B., Projan, S.J. Ross, H. and Novick, R.P. (1990). *Agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. VCH publishers, New York, N.Y.

Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New Engl J Med* 339 : 520-532.

McDowell, P., Affas, Z., Reynolds, C., Holden, M., Wood, S., Saint, S., Cockayne, A. and Williams, P. (2001). Structure, activity and evolution of the group I thiolactone peptide quorum-sensing system of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 41(2), 503-512.

Mitsuyama, J., Yamada, H., Maehana, J., Fukuda, Y., Kurose, S., Minami, S., Todo, Y., Watanabe, Y. And Narita H. (1997). Characteristics of quinolone-induced small colony variants in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chem* 39, 697-705

Morfeldt, E. (1996). The accessory gene regulator, *agr*, a system for coordinate control of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. In *Microbiology and Tumorbiology Center*. Stockholm: Karolinska Institutet.

Murphy, E., Huwyler, L. and do Carmo de Freire Bastos, M. (1985). Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. *EMBO J* 4,12, 3357-3365

Neuhoff, V., Stamm, R., Pardowitz, I., Arold, N., Ehrhardt, W. and Taube, D. (1990). Essential problems in quantification of proteins following coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels and their solution. *Electrophoresis* 11(2), 101-117

Noble, W.C., Virani, Z. and Cree, R.G. (2002). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecium* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 72, 195-198.

Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B. and Moghazeh, S. (1993). Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* 12, 3967-3975.

Novick, R.P., Projan, S.J., Kornblum, J., Ross, H.F., Ji, G. and Moghazeh, S. (1995). The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet.* 248, 446-458.

Pattee, P.A. (1981). Distribution of Tn 551 Insertion Sites Responsible for Auxotrophy on the *Staphylococcus aureus* Chromosome. *J Bacteriol* 145, 479-488

Pelletier, L.L, Richardson, M. and Feist, M. (1979). Virulent gentamycin-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Lab Clin Med* 94, 324-334

Pfaller, M.A, and Herwald, L.A. (1988). Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microb Rev* 1, 281-299

Proctor, R.A., Balwit, J.M. and Vesga, O. (1994). Variant Subpopulations of *Staphylococcus aureus* As Cause of Persistent and Recurrent Infections. *Infect Agents Dis.* 3,6, 302-12

Proctor, R.A., van Langevelde, P., Kritjansson, M. and Arbeit, R.T. (1995). Persistent and Relapsing Infections Associated with Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 20, 95-102

Proctor, R.A., Kahl, B., von Eiff, C., Vaudaux, P.E., Lew, D.P. and Peters, G. (1998). Staphylococcal Small Colony Variants Have Novel Mechanisms for Antibiotic Resistance. *Clin Infect Dis.* 27, 68-74

Projan, S.J., and Novik, R.P. (1997). The molecular basis of pathogenicity. In: *The staphylococci in human disease.* Crosley, K.B. and Gordon, L.A. (eds) Churchill Livingstone. 187-198

Reilly, S.S., Hudson, M.C., Kellam, J.F. and Ramp, W.K. (2000). In Vivo Internalization of *Staphylococcus aureus* by Embryonic Chick Osteoblasts. *Bone* 26, 63-70

Rolauffs, B., Bernhardt, T.M., von Eiff, C., Hart, M.L. and Bettin, D. (2002). Osteopetrosis, femoral fracture, and chronic osteomyelitis caused by *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCV) treated by girdlestone resection--6-year follow-up. *Arch Orthop Trauma Surg.* 122(9-10):547-550.

Rouch, D., Byrne, M., Kong, Y., and Skurray, R. (1987). The *aacA-aphD* Gentamicin and Kanamicin Resistance Determinant of Tn 4001 from *Staphylococcus aureus*: Expression and Nucleotide Sequence Analysis. *J Gen Microbiol* 133, 3039-3052

Rouch, D., Messerotti, L., Loo, L., Jackson, C., and Skurray, R. (1989). Trimethoprim resistance transposon Tn 4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolat reductase and thymidylate synthase flanked by three copies of IS 257. *Mol Microbiol* 3(2), 161-175

Rupp, M.E., and Archer, G.L. (1994). Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 19, 231-245

Schägger, H., and Jagow, G. (1987). *Anal Biochem* 106, 368-379

Seifert, H., von Eiff, C. and Fatkenheuer, G. (1999). Fatal case due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small colony variants in an AIDS patient. *Emerg Infect Dis* 5(3), 450-453

Spearman, P., Lakey, D., Jotte, S., Chernowitz, A., Claycomb, S. and Stratton, C. (1996). Sternoclavicular Joint Septic Arthritis with Small-Colony Variant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 26, 13-15

Stewart, G.T., and Holt, R.J. (1963). Evolution of natural resistance to the newer penicillin. *Br Med J* 1, 308-311

Stewart, P.S., and Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance in biofilms. *Lancet* 358, 135-138

Tremaine, M.T., Brockman, D.K. and Betley, M.J. (1993). Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect Immun*, 61 (1), 356-359

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). *Proc Natl Acad Sci* 76, 4350-4354

Wesson, C.A., Liou, L.E., Todd, K.M., Bohach, G.A., Trumble, W.R. and Bayles, K.W. (1998). *Staphylococcus aureus Agr* and *Sar* Global Regulators Influence Internalization and Induction of Apoptosis. *Infect Immun*, 5238-5243

Wong, S.S. (1999). Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance (In Process citation). *Clin Infect Dis* 29 (4), 760-767

Vaudaux, P., Francois, P., Bisognano, C., Kelley, W.L., Lew, D.P., Schrenzel, J., Proctor, R.A., McNamara, P.J., Peters, G. and von Eiff, C. (2002). Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by *hemB* mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infect Immun* 70(10), 5428-5437

Vesga, O., Groeschel, M.C., Otten, M.F., Brar, D.W., Vann, J.M., and Proctor, R.A., (1996). *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants Are Induced by the Endothelial Cell Intracellular Milieu . J Infect Dis 173, 739-742

York, M.K., Gibbs, L., Chehab, and Brooks, G.F., (1996). Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 34, 249-253