

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Univ. – Prof. Dr. med. M. Herrmann

**Aktivität und Funktion des alternativen Sigma-Faktors  $\sigma^H$   
in *Staphylococcus aureus***

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2015**

vorgelegt von Tim Steffen Fischer  
Geb. am: 23.08.1986 in Worms



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>II. Einleitung</b>	<b>3</b>
1. Aufbau	3
2. <i>Staphylococcus aureus</i> als Humanpathogen	4
3. Das Problem der Resistenz	5
4. Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	6
4.1 Enterotoxine	6
4.2 Toxic Shock-Syndrom - Toxin	7
4.3 Hämolysine	7
4.4 Exfoliatin	8
4.5 Adhäsine	8
5. Regulation von Virulenzfaktoren	10
6. <i>S. aureus</i> Sigma-Faktor A ( $\sigma^A$ )	11
7. <i>S. aureus</i> Sigma-Faktor B ( $\sigma^B$ )	12
8. <i>S. aureus</i> Sigma-Faktor S ( $\sigma^S$ )	13
9. <i>B. subtilis</i> Sigma-Faktor H ( $\sigma^H$ )	14
10. <i>S. aureus</i> Sigma-Faktor H ( $\sigma^H$ )	16
10.1. $\sigma^H$ und seine Zielgene	16
10.2. Modulation der Expression der Zielgene SA1374 und SA1418	17
10.3. Die Beteiligung von $\sigma^H$ am System der Kompetenz von <i>S. aureus</i>	18
11. Ziele der Arbeit	19
<b>III. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
1. Primer	20
1.1. Primer für Klonierungen	20
1.2. Primer für quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR)	21
2. Plasmide	21
2.1. Externe Plasmide	21
2.2. In dieser Studie hergestellte Plasmide	22
3. Stämme	22
3.1. Externe Stämme	22
3.2. In dieser Studie hergestellte Stämme	23
4. Medien	24
5. Lösungen	25
6. Anzucht von Bakterien	26
6.1. In Flüssigkultur	26
6.2. Anzucht auf Agarplatten	27
7. Isolation von Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	27
7.1. Isolation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	27
7.2. Isolation von Plasmid DNA aus <i>S. aureus</i> .	27
7.3. Isolation von genomischer DNA aus <i>S. aureus</i>	28
8. Herstellung von Plasmiden	29
8.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	29
8.2. DNA Aufreinigung	29

8.3. DNA Konzentrationsbestimmung	30
8.4. Agarose Gelelektrophorese zur DNA Darstellung	30
8.5. Gelextraktion von DNA Fragmenten	30
8.6. Natriumacetat Fällung	31
8.7. Spezifisches Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	31
8.8. Dephosphorylierung von geschnittenen Plasmiden	32
8.9. Ligation von Plasmiden und DNA Fragmenten	32
9. DNA Transfer in das zu transformierende Bakterium	32
9.1. Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ Zellen	32
9.2. Heat shock Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ Zellen	33
9.3. Herstellung elektrokompenter <i>S. aureus</i> RN4220 Zellen	33
9.4. Elektroporation elektrokompenter <i>S. aureus</i> RN4220 Zellen	33
9.5. Phagentransduktion mittels Bakteriophage $\phi$ 85	34
9.5.1. Herstellen von Phagenlysat	34
9.5.2. Transduktion des Empfängerstamms	34
10. Quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR)	30
10.1. Isolation von Gesamt-RNA aus <i>S. aureus</i>	35
10.2. DNase -Verdau zur Entfernung letzter DNA Reste	36
10.3. Agarose Gelelektrophorese zur RNA Darstellung	36
10.4. Reverse Transkription	37
10.5. Real Time PCR	37
11. $\sigma^H$ Induktionsstämme (TF1, TF2)	88
12. Reporterstämme	39
12.1. Integration des <i>green fluorescent protein (gfp)</i> Reportergens unter der Kontrolle des <i>SA1418</i> Promotors in das Genom von <i>S. aureus</i> .	39
12.2. <i>gfp</i> Reportergen unter der Kontrolle des <i>SA1418</i> Promotors als replikatives Plasmid in <i>S. aureus</i>	40
12.3. <i>Luciferase/gfp</i> Reportergene unter der Kontrolle des <i>SA1418</i> Promotors als replikatives Plasmid in <i>S. aureus</i>	40
13. Stämme zur Testung der Reporterfunktionalität	40
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>41</b>
1. Regulationsmechanismen des $\sigma^H$ Regulons	41
2. Bestimmung der Abhängigkeit von Genen des $\sigma^H$ Regulons mittels Überexpression von <i>sigH</i>	41
2.1. Induktion von $\sigma^H$ im Laborstamm RN4220	42
2.1.1. Vergleich Induktionsstamm induziert vs. nicht induziert	42
2.1.2. Vergleich Kontrollstamm induziert vs. nicht induziert	43
2.1.3. Vergleich Induktionsstamm vs. Kontrollstamm nicht induziert	44
2.1.4. Vergleich Induktionsstamm vs. Kontrollstamm induziert	45
2.1.5. Einfluss von Cadmium auf das Wachstum von RN4220	46
2.2. Induktion von $\sigma^H$ im <i>S. aureus</i> Wildtyp Newman HG	47
2.2.1. Vergleich Induktionsstamm induziert vs. nicht induziert	47
2.2.2. Vergleich Kontrollstamm induziert vs. nicht induziert	48
2.2.3. Vergleich Induktionsstamm vs. Kontrollstamm nicht induziert	49
2.2.4. Vergleich Induktionsstamm vs. Kontrollstamm induziert	50
2.2.5. Einfluss von Cadmium auf das Wachstum von <i>S. aureus</i>	51

3.	Messung der Aktivität der Promotorregion des $\sigma^H$ abhängigen Gens <i>SA1418</i> mittels Green Fluorescent Protein (Gfp) und Luciferase (Luc).	52
3.1.	<i>SA1418</i> -GFP Reporterkonstrukte	52
3.2.	<i>SA1418</i> -Luciferase Reporterkonstrukt	52
4.	$\sigma^H$ Aktivität im <i>S. aureus</i> Stamm Newman HG während des Wachstums	54
4.1.	Überprüfung der Ergebnisse der Reporterkonstrukte mittels qRT-PCR	56
5.	Genauere Beobachtung der frühen Wachstumsphasen mittels qRT-PCR	58
5.1.	Messungen im <i>S. aureus</i> Stamm Newman HG	58
5.2.	<i>Eap</i> und <i>RNAIII</i>	60
5.3.	Messungen in der <i>S. aureus</i> Newman $\Delta sigH$ Deletionsmutante	61
6.	Suche nach spezifischen $\sigma^H$ aktivierenden Faktoren	61
6.1.	Verdünnungseffekte als $\sigma^H$ aktivierender Faktor?	62
6.2.	Verändertes Nährstoffangebot als $\sigma^H$ aktivierender Faktor?	63
6.3.	Veränderter pH Wert als $\sigma^H$ aktivierender Faktor?	64
<b>V.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>68</b>
1.	Das $\sigma^H$ Operon und die beteiligten Gene	68
2.	$\sigma^H$	69
2.1.	Aufbau der Promotorregion	69
2.2.	Die Transkription	70
2.3.	Die Translation	70
2.4.	Die posttranslationale Modifikation	70
3.	Die Zielgene von $\sigma^H$	71
3.1.	Aufbau der Promotorregionen	71
3.2.	Interaktionen der Promotorregionen der Zielgene mit $\sigma^H$	73
4.	Die <i>Integrase</i> als $\sigma^H$ abhängiges Gen?	74
5.	Aktivität von $\sigma^H$ im Wachstumsverlauf	74
5.1.	Stand der Wissenschaft	74
5.2.	<i>In vitro</i> Lumineszenzmessungen im Stamm TF12	75
5.3.	Die Wachstumsphasen von <i>S. aureus</i> in Kultur	76
5.3.1.	Phase der initialen Anpassung ( <i>lag</i> Phase)	76
5.3.2.	Exponentielles Wachstum	76
5.3.3.	Stationäre Phase	77
6.	Spezifische $\sigma^H$ Aktivität in der <i>lag</i> Phase	77
7.	Welche Umweltbedingungen aktivieren $\sigma^H$ ?	78
7.1.	Nährstoffarmes Medium („nutrient depleted“ Medium).	78
7.2.	Veränderungen im pH Wert	78
8.	Modell zur Funktion des $\sigma^H$ Regulons	80
9.	Ausblick	81
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>VII.</b>	<b>Publikationen</b>	<b>95</b>
<b>VIII.</b>	<b>Dank</b>	<b>96</b>
<b>IX.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>97</b>

## I. Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* ist ein wichtiger humanpathogener Erreger, welcher eine Vielfalt an Virulenzfaktoren exprimiert, die durch ein komplexes regulatorisches Netzwerk miteinander verbunden sind und kontrolliert werden.

Alternative Sigma-Faktoren sind in vielen Bakterien an der Kontrolle der Virulenz und am Überleben unter extremen Bedingungen beteiligt. *S. aureus* produziert die drei alternativen Sigma-Faktoren:  $\sigma^B$ ,  $\sigma^H$ , und  $\sigma^S$ . Während  $\sigma^B$  bereits intensiv untersucht wurde, ist nur wenig über die beiden anderen Sigma-Faktoren bekannt.  $\sigma^S$  gehört zur Gruppe der ECF-Sigma-Faktoren und es wurde kürzlich gezeigt, dass  $\sigma^S$  die Stressantwort und die Virulenz von *S. aureus* modulieren kann.  $\sigma^H$  besitzt Homologie zu  $\sigma^H$  in *Bacillus subtilis* und ComX in *Streptococcus pneumoniae* und ist, ähnlich wie die  $\sigma^H$  Homologe in letzteren Bakterien, sowohl an der Regulation der genetischen Kompetenz als auch an der Regulation der Stressantwort beteiligt (Morikawa, et al., 2012, Fagerlund et al., 2014). Die Bedingungen, unter denen  $\sigma^H$  in *S. aureus* aktiv ist, sind bis dato noch nicht bekannt.

Um  $\sigma^H$  aktivierende Bedingungen zu identifizieren wurde die folgende Strategie gewählt: Im ersten Schritt wurde ein Cadmium induzierbares *sigH* Überexpressionssystem konstruiert um die Abhängigkeit der Gene *SA1418* und *SA1374* zu bestätigen. Im zweiten Schritt wurde ein *SA1418* Promotor-Luciferase Reportersystem hergestellt und in den *S. aureus* Wildtypstamm Newman HG gebracht. Messungen der Luciferaseaktivität zeigten ein starkes Signal unmittelbar nach Beimpfen, welches im Wachstumsverlauf abnahm. Quantitativer Real Time RT-PCR (qRT-PCR) in Wildtyp und Mutationsstamm wiesen ebenfalls auf eine  $\sigma^H$  Aktivität in der *lag* Phase hin. Um den Zeitpunkt der Aktivität von  $\sigma^H$  im frühen Wachstum besser eingrenzen zu können, wurde die Genexpression während der ersten Stunde des Wachstums beobachtet. Hier zeigte sich eine starke aber kurze Expression von  $\sigma^H$  abhängigen Genen kurz nach Beimpfen mit einem Maximum nach ca. 5 Minuten, dies hinweisend auf eine mögliche Reaktion von  $\sigma^H$  auf die veränderten Umweltbedingungen der Zellen aufgrund des Übergangs von nährstoffarmem Medium („nutrient depleted“ Medium) in frisches Medium. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestützt, dass Veränderungen im pH Wert die  $\sigma^H$  Aktivität beeinflussen, so zeigte eine Reduktion des pH Wertes in der stationären Wachstumsphase eine  $\sigma^H$  spezifische Antwort.

## I. Summary

*Staphylococcus aureus* is an important human pathogen that expresses a plethora of virulence factors which are controlled by a complex regulatory network.

Alternative sigma-factors have been shown in many bacteria to be involved in virulence and the ability to survive under extreme or changing conditions. *S. aureus* produces three alternative sigma-factors:  $\sigma^B$ ,  $\sigma^H$ , and  $\sigma^S$ . While  $\sigma^B$  of *S. aureus* has been studied extensively, only little is known about the latter two sigma subunits.  $\sigma^S$  belongs to the group of ECF-type sigma-factors and was recently shown to modulate the stress response and virulence of this pathogen.  $\sigma^H$ , on the other hand, shares homology to  $\sigma^H$  of *Bacillus subtilis* and ComX of *Streptococcus pneumoniae*, which are both involved in regulating genetic competence and stress response. Similar to *B. subtilis* and *S. pneumoniae*,  $\sigma^H$  of *S. aureus* modulates the transcription of genes/operons whose products are involved in genetic competence and the stress response, respectively (Morikawa et al., 2012, Fagerlund et al., 2014). However, the conditions activating  $\sigma^H$  in *S. aureus* have not been identified yet.

In order to identify conditions that activate  $\sigma^H$ , the following strategy was applied: In a first step, a Cadmium-inducible *sigH* overexpression system was constructed to confirm that the genes *SA1418* and *SA1374* are controlled by this alternative sigma-factor. In a second step, a *SA1418* promoter-luciferase reporter system was created, and introduced into the *S. aureus* wild-type strain Newman HG. By monitoring luciferase activity in *S. aureus* cells we observed a strong signal early after the inoculation, which declined along with growth. Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR) in wild-type and mutant strains underlined these findings, suggesting  $\sigma^H$  to be active mainly during the *lag* phase. To better define the time frame in which  $\sigma^H$  is active during this early growth stage we next monitored the gene expression of  $\sigma^H$  driven genes during the first hour of growth. Here we discovered a strong but only short lived induction of the  $\sigma^H$  dependent genes early after the inoculation with maximum transcription rates occurring about five minutes, suggesting that  $\sigma^H$  might respond to environmental changes encountered by the bacterial cells due the switch from a nutrient depleted medium into fresh medium. Support for this assumption was gained by subsequent analyses indicating pH alterations to affect  $\sigma^H$  activity, while a reduction of pH in the stationary growth phase seems to trigger a  $\sigma^H$  specific response.

## II. Einleitung

### 1. Aufbau

Zur historisch ersten Beschreibung der Staphylokokken kam es durch den schottischen Chirurgen Sir Alexander Ogston (Ogston, 1882). Kurze Zeit später gelang dem Mikrobiologen Rosenbach die Anzucht der Staphylokokken in Reinkultur. Durch unterschiedliche Teilungsebenen imponieren sie im mikroskopischen Bild mit einer Traubenform, wodurch sie auch ihren Namen erhielten (griechisch Staphyle = Traube). Aufgrund ihres gelben Pigments, hervorgerufen durch das Carotinoid Staphyloxanthin, kam der Speziesname „aureus“ (lat. golden) hinzu.

*S. aureus* ist ein Gram-positives, unbewegliches, fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes Kugelbakterium mit einem Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  (Lowy, 1998).

Staphylokokken werden entsprechend des Vorhandenseins der Koagulase in Koagulase positive Staphylokokken und Koagulase negative Staphylokokken (CoNS) eingeteilt, wobei *S. aureus* Vertreter der ersten Gruppe ist. Neben dieser Eigenschaft kann *S. aureus* außerdem durch einen positiven Mannitolvermentationstest (Wilkinson und Holmes, 1979), sowie durch DNA Analysen weiter spezifiziert werden (Lowy, 1998).

Das Gesamtgenom von *S. aureus* besteht aus einem doppelsträngigen zirkulären Chromosom und beträgt 2.8 MBp mit einem GC Gehalt von 33%. *In vivo* kann DNA unter anderem in Form von Plasmiden von *S. aureus* aufgenommen (Lowy, 1998) und ins Genom integriert werden (Burrus und Waldor, 2004). Gene, die zum Beispiel Resistenzmechanismen gegen Antibiotika oder Virulenzfaktoren tragen, können so zwischen Gram-positiven Bakterien ausgetauscht werden (Schaberg und Zervos, 1986).

90% der *S. aureus* Stämme sind *in vivo* von einer Kapsel umgeben. Diese schützt vor Phagozytose und ist somit gleichermaßen den Virulenzfaktoren zuzurechnen. (Sompolinsky et al., 1985.)

Der Mensch stellt eines der natürlichen Reservoirs für *S. aureus* dar. Ca. 20% der Bevölkerung zeigen eine permanente nasale Besiedelung mit diesem Organismus, 60% sind intermittierend kolonisiert und eine Minderheit von 20% scheinen nicht durch *S. aureus* im Nasen-Rachenraum besiedelt zu sein („Noncarriers“) (Kluytmans et al, 1997). Bemerkenswerterweise scheinen permanent Besiedelte dabei vorrangig mit dem gleichen *S. aureus* Stamm besiedelt zu sein (VandenBergh et al., 1999). Die Besiedelung mit *S. aureus* ist ein prädiktiver Faktor im Hinblick auf Schwere und Häufigkeit von Erkrankungen. (Corbella et al., 1997, Wertheim et al., 2004), jedoch führt eine Besiedelung mit *S. aureus* nicht zwangsläufig zur Infektion.



## 2. *Staphylococcus aureus* als Humanpathogen

Gerade aufgrund der Vielfalt der durch *S. aureus* ausgelösten Infektionen ist dieses Bakterium ein wichtiges medizinisches Forschungsobjekt.

Die von *S. aureus* ausgelösten Infektionen können grob in zwei Gruppen unterschieden werden: Auf der einen Seite stehen Krankheiten, die durch lokale Wirkung des Bakteriums entstehen, auf der anderen Seite können Bakterientoxine, die sich im Körper des Infizierten verteilen, systemische Reaktionen auslösen.

*S. aureus* löst häufig Infektionen der Haut aus (Miller und Cho, 2011), die zur Furunkeln oder Abszessen führen können. Ein weitaus schwereres Krankheitsbild stellt die bakterielle Endokarditis dar, bei der es durch Besiedlung des Endokards, speziell im Bereich der Herzklappen, zur Bildung lokaler Vegetationen kommt. Diese können durch Ablösung einerseits septische Embolien, speziell im Bereich der hirnversorgenden Gefäße, verursachen oder aber durch lokale Zerstörung zu einer akuten Herzklappeninsuffizienz führen, welche die Gefahr eines akuten Herzversagens birgt. Eine erregerbezogene antibiotische Therapie ist hierbei lebensrettend.

Neben *S. aureus* sind vor allem die Koagulase negativen Staphylokokken (CoNS), allen voran *Staphylococcus epidermidis*, hervorragende Biofilmbildner. Venenkatheter sind heutzutage ein wichtiger Bestandteil der modernen Medizin, stellen jedoch einen Risikofaktor für eine Katheter-assoziierte Infektion (Catheter Related Infections, CRI) oder die Katheter-assoziierte Blutbahninfektion (Catheter-Related Blood-Stream Infection, CR-BSI) dar (Bouza et al., 2002). Die beste Therapie besteht in der Entfernung des besiedelten Katheters. Unter speziellen Umständen, wie zum Beispiel Schwierigkeiten bei der Neueinpflanzung eines Katheters oder bei antimikrobiell gut behandelbaren Mikroorganismen, kann von der Entfernung des Katheters abgesehen werden (Bouza et al., 2002).

Ein weiteres, für *S. aureus* typisches Krankheitsbild ist die Osteomyelitis. Diese entsteht durch die Ausbreitung einer kontaminierten Quelle und folgt somit zum Beispiel auf ein Trauma, Osteosynthese oder Gelenkersatz. Klinisch werden die akute und die chronische Osteomyelitis unterschieden, wobei die chronische Osteomyelitis durch lange Erregerpersistenz über Monate oder Jahre, niedrige Entzündungsreaktionen sowie das Entstehen von abgestorbenem Knochen gekennzeichnet ist. Während bei der akuten Osteomyelitis eine alleinige antibiotische Therapie ausreichend sein kann, erfordert die chronische Form eine operative Lösung (Lew und Waldvogel, 2004). Besonders Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) Isolate verursachen immer mehr komplexe Infektionen (Morrison und Herman, 2013).

*S. aureus* besitzt die Fähigkeit in ein Stadium verlangsamten Wachstums überzugehen. Diese „Small Colony Variants“ (SCV) weisen veränderte pathogene Eigenschaften auf und sind toleranter gegenüber  $\beta$ -Lactam Antibiotika (Atalla et al., 2011). SCV können auch nach ausgeheilte Infektion im Körper verbleiben und sind sehr wahrscheinlich für persistierende Infektionen oder Infektionsrezidive lange nach Ausheilen der Primärinfektion verantwortlich (Proctor et al., 1995).

### 3. Das Problem der Resistenz

Penicillin gehört zur Gruppe der  $\beta$ -Lactam Antibiotika und wirkt bakterizid, indem es die Transpeptidase(n) hemmt. Transpeptidasen oder auch Penicillin-bindende Proteine (PBPs) sind unter anderem in der Lage Quervernetzungen der Aminosäureseitenketten in der Bakterienwand zu katalysieren. Erste Resistenzmechanismen bestanden in der Expression einer  $\beta$ -Lactamase (Penicillinase), welche durch Hydrolyse des  $\beta$ -Lactamrings Penicilline abbauen kann (Zygmunt et al., 1992). Methicillin war das erste  $\beta$ -Lactamase-feste Penicillinderivat, welches erfolgreich bei der Therapie von durch Penicillin-resistente *S. aureus* hervorgerufene Infektionen eingesetzt wurde. Auch heute noch kann durch Verwendung eines  $\beta$ -Lactamaseinhibitors oder durch den Einsatz von penicillinasefesten Penicillinen, wie zum Beispiel Oxacillin, dieser Resistenzmechanismus, der in der Mehrzahl der im Krankenhausumfeld kursierenden *S. aureus* Isolate zu finden ist, überwunden werden.

Jedoch schon kurz nach der Einführung der Penicillinderivate Methicillin und Oxacillin in den Krankenhausbetrieb entwickelten einige *S. aureus* Isolate eine Resistenz gegenüber diesen Antibiotika (Jevons et al., 1963). Diese Resistenz beruht auf der Akquisition und Expression eines veränderten Penicillin-Bindeproteins (PBP), MecA oder PBP2a genannt (Hartman und Tomasz, 1981) und durch das *mecA* Gen kodiert wird (Matsushashi et al., 1986). Im Gegensatz zu den natürlich in *S. aureus* vorkommenden PBPs ist die Transpeptidaseaktivität von PBP2a, welches die Methicillinresistenz vermittelt, erst durch wesentlich höhere  $\beta$ -Lactam Konzentrationen inhibierbar. Durch die weite Verbreitung und den intensiven Gebrauch von  $\beta$ -Lactamase resistenten  $\beta$ -Lactam Antibiotika musste in den letzten Jahren ein kontinuierlicher Anstieg der MRSA Prävalenz festgestellt werden, sodass in vielen zentral- und südeuropäischen Ländern der MRSA Anteil bei >25% liegt. (Johnson, 2011).

Ein schlechter Gesundheitszustand gilt als Risikofaktor für Besiedelung mit MRSA (Anguelov et al., 2010). Gleichzeitig erhöht eine asymptomatische Besiedelung mit MRSA für einen längeren Zeitraum auch das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko (Datta und Huang, 2008).

Besonders bei Infektionen im Bereich gesundheitlicher Institutionen, den sog. „healthcare associated infections“ (HAI), nimmt die Prävalenz durch MRSA stark zu (Muto et al., 2006) und wird zum wachsenden Problem.

Bei der Bekämpfung von MRSA Infektionen stellen zurzeit die Glykopeptid-Antibiotika (Vancomycin, Teicoplanin) eine der gebräuchlichsten Therapieformen dar (Bamberger und Boyd, 2005). Jedoch traten auch hier, wie zuvor schon für Methicillin beobachtet, binnen kurzer Zeit nach Einführung dieser Antibiotikaklasse in die Krankenhausroutine 1996 die ersten klinisch selektionierten *S. aureus* Stämme mit reduzierter Vancomycin Sensibilität auf (CDC, 1997) und bereits 2002 wurde ein Vancomycin resistenter Stamm (VRSA) isoliert (CDC, 2002).

Die Vancomycin Resistenz in VRSA wird unter anderem durch den Erwerb des *vanA* Gens hervorgerufen. Dieses Gen kodiert für ein Protein, das zu einer veränderten Peptidseitenkette in den Zellwandvorstufen führt. Durch die veränderte Aminosäuresequenz wird die Bindungsfähigkeit von Vancomycin reduziert. (Arthur et al., 1997). Bei VRSA positiven Patienten wurden häufig gleichzeitig Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) nachgewiesen. Es wird daher davon ausgegangen, dass die VRSA ihre Resistenz gegenüber Glykopeptiden durch horizontalen Gentransfer des für VanA kodierenden Gens *vanA* erworben haben. Erst kürzlich konnte der Transfer des *vanA* enthaltenden Transposons Tn1546 von *Enterococcus faecalis* zu *S. aureus in vitro* gezeigt werden (De Niederhäusern et al., 2011). Klinisch spielen jedoch die aufgrund des häufigen Antibiotikaeinsatzes induzierten und selektionierten Resistenzen eine größere Rolle.

#### **4. Virulenzfaktoren von *S. aureus***

Die Virulenz eines *S. aureus* Isolates hängt maßgeblich von der in dieser Spezies durchaus variablen, genetischen Ausstattung ab. So sind besonders im Bereich der Ausstattung bzw. bei der Expression der Exotoxine große Unterschiede zwischen einzelnen *S. aureus* Isolaten zu verzeichnen.

Bei der Bekämpfung von Toxin-vermittelten Erkrankungen spielt neben der allgemeinen Immunabwehr speziell die Bildung Toxin-bindender Antikörper eine wichtige Rolle (Verkaik, et al., 2010).

##### **4.1. Enterotoxine**

Bis dato wurde in verschiedenen *S. aureus* Isolaten schon eine Reihe verschiedener Enterotoxine identifiziert. Viele dieser Toxine gehören zur Gruppe der „pyrogenic toxin superantigens“ (PTSAgs) (Dinges et al., 2000).

Enterotoxine sind sehr umweltresistent, sodass sie durch die meisten proteolytischen Enzyme nicht abgebaut werden können und den niedrigen pH Wert während der Magenpassage überstehen (Le Loir et al., 2003). Manche Enterotoxine, wie zum Beispiel Seb (Gaskill und Khan, 1988), Sec (Regassa et al., 1991) und Sed (Bayles und Iandolo, 1989), werden durch den „accessory gene regulator“ (*agr*) Locus auf transkriptioneller Ebene reguliert, während sich für die Sea Expression kein Anhalt für eine *agr* Beteiligung findet (Tremaine et al., 1993).

Eine Lebensmittelvergiftung tritt in kurzem Abstand nach oraler Aufnahme von Enterotoxinen auf. Häufig kommt es zu Erbrechen mit oder ohne Diarrhoe (Le Loir et al., 2003), regelmäßig in Verbindung mit Fieber oder Hypotension (Dinges et al., 2000). Typischerweise ist eine Lebensmittelvergiftung eine selbstlimitierte Erkrankung, die nach 24 bis 48 Stunden zur vollständigen Rekonvaleszenz führt (Dinges et al., 2000).

*S. aureus* steht mit 25% an zweiter Stelle der Lebensmittel assoziierten Magen-Darm-Erkrankungen, häufigster Vertreter sind mit 50% *Salmonella* Spezies. (Haeghebaert et al., 2003).

#### **4.2. Toxic Shock-Syndrom - Toxin**

Das Toxic Shock Syndrom ist eine schwere, potentiell tödliche Krankheit, welche sich vor allem durch systemische Reaktionen wie hohes Fieber, Hautrötung, Hautablösung und plötzliche Brechdurchfälle äußert (Tanner et al., 1981). Das Syndrom wurde bereits 1978 beschrieben (Todd et al., 1978) und erlangte vor allem bei weiblichen Patienten im Zusammenhang mit Menstruation und dem Einsatz von Tampons an Bedeutung (Gaventa et al., 1989). Das Toxische Schock Syndrom wird durch das Toxic Shock Syndrom Toxin 1 (TSST-1) ausgelöst (Bergdoll et al., 1982), welches große Ähnlichkeit zu den *S. aureus* Enterotoxinen besitzt, ebenfalls zur Gruppe der PTSAgs gehört und als Superantigen wirksam ist (Dinges et al., 2000). 4% aller Frauen sind mit *S. aureus* vaginal besiedelt und 2,6% aller Frauen weisen Toxin bildende Stämme auf (Chow et al., 1984). Ob es zum Ausbruch des TSS kommt, hängt maßgeblich von den Antikörpertitern der besiedelten Person ab (Parsonnet et al., 2005).

#### **4.3. Hämolyse**

In *S. aureus* existieren vier verschiedene Hämolyse, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Hämolyse benannt wurden (Wiseman, 1975).

Das  $\alpha$ -Hämolyse wird durch das *hla* Gen kodiert und wurde 1984 zum ersten Mal sequenziert (Gray und Kehoe, 1984). Primärer Lysemechanismus der Erythrozyten ist die von *S. aureus* ausgehende Sekretion von Monomeren, welche in die Zielmembran integrieren und zylindrische Heptamere formen, die letztlich eine Pore in der Zellmembran bilden (Gouaux et al., 1994).

Seit 1989 ist die Sequenz des *hly* Genes, welches für  $\beta$ -Hämolysin kodiert, bekannt (Projan et al., 1989).  $\beta$ -Hämolysin besitzt Phospholipase C Aktivität und baut bei Exposition Sphingomyelin aus Erythrozyten ab. (Maheswaren et al., 1967).  $\gamma$ -Hämolysin, kodiert durch *hlyABC*, besteht aus drei Untereinheiten. Eine Zusammensetzung erfolgt entweder als HlyAB oder HlyBC. Das fertige Protein kann, ähnlich dem  $\alpha$ -Hämolysin, eine Pore in der Membran der Zielzelle bilden (Alessandrini et al., 2013).

Das durch *hlyD* kodierte  $\delta$ -Hämolysin wird von 97% der *S. aureus* Stämme exprimiert (Dinges et al., 2000) und gehört zur Gruppe der „Phenol Soluble Modulins“ (PSM), die in höheren Konzentration als Detergenz wirken und Zellmembranen destabilisieren (Vandenesch et al., 2012).

Neue Therapieansätze bewegen sich in Richtung der aktiven und passiven Immunisierung (Kennedy et al., 2010).

Wichtige Regulationssysteme, welche die Expression von Exotoxinen modulieren, sind der *agr* Locus (Recsei et al., 1986) und der *sae* Locus (Giraud et al., 1997). Umweltfaktoren (Ohlsen et al., 1997), sowie die Exposition gegenüber Antibiotika (Lorian, 1971) spielen als Trigger ebenfalls eine Rolle. Beachtenswert ist außerdem, dass die Produktion von Exotoxinen bei Kontakt mit Hämoglobinketten, welche durch sie freigesetzt werden, gehemmt wird (Schlievert et al., 2007).

#### **4.4. Exfoliatin**

In *S. aureus* wurden bisher vier Exfoliatine identifiziert: ETA, ETB, ETC und ETD (Prévost, 2003). Diese Toxine sind hauptverantwortlich für die Krankheitsbilder Impetigo contagiosa und Staphylococcal-Skaled-Skin-Syndrome. Mit großer Mehrheit sind Kleinkinder betroffen (Prévost, 2003). Durch die Exfoliatine findet eine Ablösung der Haut zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum spinosum statt (Melish und Glasgow, 1970). Histologisch gleicht die Impetigo contagiosa der Autoimmunerkrankung Pemphigus foliaceus, bei der es durch Autoantikörper gegen Desmoglein-1 ebenfalls zur Ablösung der oberen Hautschichten kommt. Es wurde gezeigt, dass Exfoliatine auch Desmoglein-1 binden können (Amagai et al., 2000). Nach heutigem Verständnis ist Desmoglein-1 Ziel proteolytischer Aktivität von Exfoliatinen (Hanakawa et al., 2002).

#### **4.5. Adhäsine**

*S. aureus* besitzt eine Reihe Zellwand-gebundener Proteine, die in der Lage sind, Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) zu binden. Diese Bindung von Bakterien an die EZM ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Infektionen (Bartlett und Hulten, 2010). Die als „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMM) zusammengefassten

Proteine können anhand gemeinsamer Charakteristika identifiziert werden. So weisen Proteine dieser Gruppe eine konservierte Aminosäuresequenz am C-Terminus auf: Leucin – Prolin – X – Threonin – Glycin (LPXTG). Dieses Motiv wird von der Sortase A, einer membranständigen Transpeptidase, erkannt und es findet eine Trennung zwischen Threonin und Glycin statt, die Carboxylgruppe des Threonins wird kovalent an ein Bindeprotein des Peptidoglycans gebunden (Mazmanian et al., 2001).

Der Transport der Polypeptide vom Zytoplasma zur Zelloberfläche wird über das Sec System vermittelt (Bartlett und Hulten, 2010).

Wichtiger Vertreter der MSCRAMMs sind die Fibronectin-Bindeproteine FnBPA und FnBPB. Diese erkennen neben dem namensgebenden Fibronectin auch Fibrinogen (Wann et al., 2000) und Elastin (Roche et al., 2004). Beide Proteine werden durch unterschiedliche Gene kodiert, besitzen aber bezüglich der Aminosäure-Sequenz große Ähnlichkeit (Burke et al., 2010). Neben dem Anheften an die EZM kann die Bindung zwischen FnBP und Fibronectin die Aufnahme des Bakteriums in die Zelle auslösen (Jett und Gilmore, 2002). Durch das Ein- und Austreten in Organe oder den Blutstrom werden Bakterien im Körper verbreitet. Auch sind internalisierte Bakterien besser gegen das Immunsystem des Wirtes oder gegen eine antibiotische Chemotherapie geschützt.

Protein A („surface protein A“, Spa), ein weiterer wichtiger Vertreter der MSCRAMMs, bindet die Fc Region von Antikörpern (Cowan et al., 1979). Hierdurch ist das Bakterium vor Opsonierung und Phagozytose geschützt und verhindert die Aktivierung des klassischen Weges des Komplementsystems (Foster, 2009). Neben dieser wichtigen immunomodulatorischen Funktion gilt Spa auch als wichtiger Bindungsfaktor von *S. aureus* an von Willebrandfaktor (vWF) (Hartleib et al., 2000).

Weitere wichtige mit der Bakterienzelle fest verbundene Adhäsionsfaktoren sind die Fibrinogenbindeproteine „clumping factor A“ (ClfA) und B (ClfB) (Foster und Höök, 1998), die eine wichtige Rolle bei der Kolonisation (ClfB) und Abszessbildung spielen. Das Elastinbindeprotein (EpbS) nimmt eine Sonderstellung ein, da es nicht über das LPXTG Motiv an die Zelle gebunden ist, sondern als integrales Membranprotein vorliegt (Downer et al., 2002). Es gehört somit nicht zur Gruppe der MSCRAMMs.

Neben diesen Hauptvertretern wurden bisher 21 weitere Proteine identifiziert, welche das LPXTG Motiv aufweisen (Roche et al., 2003).

Neben den Zellwand- bzw. Membran-ständigen Adhäsionsmolekülen gibt es eine Reihe von sekretorischen Proteinen, die als „secretable expanded repertoire adhesive molecules“ (SERAM)

zusammengefasst sind. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind das „extracellular adherence protein“ (Eap) (Harraghy et al., 2003) und das „extracellular matrix protein-binding protein“ (Emp) (Hussain et al., 2001). Emp ist ein wichtiger Faktor für die Adhäsion an Fibronektin und Fibrinogen (Hussain et al., 2001) und Eap vermag an eine ganze Reihe unterschiedlicher Wirtsfaktoren bzw. Zellstrukturen zu binden (Hussain et al., 2002). Im Gegensatz zu Proteinen der MSCRAMM Gruppe besitzen Emp und Eap kein LPXTG Motiv, was darauf hinweist, dass diese Proteine nicht kovalent an die Zellwand gebunden sind (Harraghy et al., 2003). Neben seiner Funktion als Adhäsionsfaktor konnte Eap noch eine Reihe immunomodulatorischer und anti-angiogenetischer Eigenschaften zugesprochen werden (Harraghy et al., 2003).

Bei verminderter Aktivität der Oberflächenproteine (zum Beispiel ClfB) reduziert sich die Fähigkeit von *S. aureus*, an Oberflächen wie zum Beispiel Nasenepithel zu haften. (Corrigan et al., 2009). Für die Interaktion mit Endothel sind sowohl membrangebundene als auch sekretorische Adhäsionsproteine von Bedeutung (Chavakis et al., 2005).

## **5. Regulation von Virulenzfaktoren**

Mehr als 50 Gene kodieren für Proteine, die im Zusammenhang mit der Pathogenität von *S. aureus* stehen. Die kodierten Proteine sind entweder zellwandgebunden oder werden extrazellulär sekretiert. Die Gesamtheit dieser „accessory genes“ wird als Virulon bezeichnet (Novick, 2003).

Einer der wichtigsten regulatorischen Elemente von Virulenzfaktoren in *S. aureus* ist der „accessory gene regulator“ (*agr*) Locus (Recsei, et al., 1986). Der *agr* Locus umfasst ca. 3 kbp und wird durch die Promotoren P2 und P3 aktiviert. Durch P2 wird die Transkription der Gene *agrA*, *agrB*, *agrC* und *agrD* kontrolliert.

Das „*agr* autoinducing peptide“ (AIP) ist ein posttranslational modifiziertes Peptid, welches aus einem durch *agrD* kodierten Propeptid entsteht und durch AgrB prozessiert und sekretiert wird. Sekretiertes AIP kann an den extrazellulären Rezeptor der transmembranständigen Sensorhistidinkinase AgrC binden und induziert dadurch die Autophosphorylierung der intrazellulär lokalisierten Tyrosinkinasedomäne (Ji et al., 1995). Letztere Phosphatgruppe wird in einem Folgeschritt auf den „response regulator“ AgrA übertragen (Nixon et al., 1986), welcher im phosphorylierten Zustand verstärkt dazu in der Lage ist, die Promotoren P2 und P3 zu aktivieren. Dieses Phänomen wird als Autoinduktion bezeichnet (Novick et al., 1995). Die P3 abhängige RNAIII ist letztlich in der Lage, mittels intrazellulären regulatorischen Komponenten, die Transkription einer Vielzahl an Virulenzgenen zu kontrollieren.

Da AIP sekretiert wird und mit Zunahme der Zelldichte extrazellulär akkumuliert, ermöglicht es dem Bakterium die Messung der Zelldichte. Dieser Mechanismus wird als „quorum sensing“ bezeichnet (Ji et al., 1995). Durch einen Konzentrationsanstieg an extrazellulärem AIP wird der *agr*-Lokus stärker stimuliert. Entsprechend wird das *agr*-System am Übergang zur stationären Phase aktiviert.

Nach einer Infektion mit *S. aureus* findet zunächst ein lokales Wachstum statt. Nachdem eine kritische Zellmenge erreicht wird, beginnt die invasive Aussaat der Bakterien, deren Exotoxine sich in hochaktivem Zustand befinden (Dunman et al., 2001). Gene für sekretorische Proteine werden stärker aktiviert, Gene für Zellwand-gebundene Proteine, die vor allem der Adhäsion dienen, werden zumeist reprimiert (Dunman et al., 2001).

Neben *agr* spielen weitere Zwei-Komponentensysteme wie zum Beispiel *sae* (Giraud et al., 1997) oder *srr* (Pragman et al., 2004), aber auch alternative Sigma-Faktoren wie  $\sigma^B$  eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Kontrolle des Virulons.

## 6. *S. aureus* Sigma-Faktor A ( $\sigma^A$ )

DNA ist der ubiquitäre Informationsträger in Prokaryoten, Eukaryoten und Viren. Information wird von der DNA abgelesen und durch die RNA-Polymerase (RNAP) in RNA transkribiert. Die bakterielle Transkription erfolgt durch den RNAP „core complex“, dem katalytisch kompetenten Teil der RNAP, der aus zwei identischen  $\alpha$ -Untereinheiten, einer  $\beta$ -Untereinheit und einer  $\beta'$ -Untereinheit besteht (Helmann et al., 1988).

Sigma-Faktoren sind integraler, jedoch nur transient gebundener Bestandteil des RNAP Holoenzym und sind in diesem Enzymkomplex für die Promotorerkennung und Initiation der Transkription essentiell (Burgess et al., 1969). An den RNAP „core complex“ gebundene Sigma-Faktoren erkennen vor den Transkriptionsstartpunkten liegende Promotorelemente auf der DNA und vermitteln die Bindung der RNAP an das zu transkribierende Gen. Nach der Transkriptionsinitiation verlässt der Sigma-Faktor den RNAP - DNA Komplex und kann an anderer Stelle die Transkription starten. Sigma-Faktoren sind essentielle Bestandteile im Genom, das Fehlen von Sigma-Faktoren ist tödlich für Bakterien (Deora und Misra, 1996).

Sigma-Faktoren können in eine  $\sigma^{70}$  Gruppe und eine  $\sigma^{54}$  Gruppe eingeteilt werden. Die  $\sigma^{70}$  Gruppe bezieht sich auf das *rhoD* Gen aus *E.coli*, dessen Produkt in einem Sigma-Faktor der Größe 70 kDa resultiert. Andere Sigma-Faktoren, die eine große Homologie auf Sequenzebene zeigen, werden ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt, auch wenn sie anderer Größe sind (Lonetto et al., 1992).



Die Gruppe der  $\sigma^{70}$  Sigma-Faktoren erkennt spezifische Promotorelemente, die normalerweise 5-6 Basenpaare lang sind und sich in der -10 und -35 Region des Promotors befinden (Mondal et al., 2010).

$\sigma^{54}$  Sigma-Faktoren unterscheiden sich von  $\sigma^{70}$  Faktoren in DNA- und Aminosäuresequenz, besitzen aber ebenfalls die Fähigkeit die RNAP zu binden (Studholme et al., 2000). Die Benennung dieser Gruppe richtet sich nach der Homologie des  $\sigma^{54}$  Sigma-Faktoren in *E. coli* (Lonetto et al., 1992).

Sigma-Faktoren können ihrer Funktion entsprechend in einen vegetativen Sigma-Faktoren und alternative Sigma-Faktoren eingeteilt werden. Der vegetative oder „housekeeping“ Sigma-Faktor initiiert die Transkription der sog. „housekeeping“ Gene, d.h. Gene deren Produkt in der Wachstumsphase kontinuierlich für das Bakterium erforderlich ist. Alternative Sigma-Faktoren verändern die Promotorspezifität der RNAP, werden als Reaktionen auf bestimmte Konditionen (zum Beispiel Hitzeschock) transkribiert und stellen eine spezifische Antwort dar. In *S. aureus* wurden bislang neben dem vegetativen Sigma-Faktor  $\sigma^A$ , kodiert durch das *plac* Gen (Deora und Misra, 1996), drei alternative Sigma-Faktoren beschrieben:  $\sigma^B$  (Wu et al., 1996),  $\sigma^H$  (Morikawa et al., 2003) und  $\sigma^S$  (Shaw et al., 2008).

## 7. *S. aureus* Sigma-Faktor B ( $\sigma^B$ )

$\sigma^B$  ist bis dato der am besten bekannte und charakterisierte alternative Sigma-Faktor in *S. aureus*. Durch  $\sigma^B$  werden 251 Gene beeinflusst, wobei 198 offene Leseraste (OLR) positiv und 53 negativ beeinflusst werden (Bischoff et al, 2004).  $\sigma^B$  wird durch mindestens zwei Promotoren (P1, P3) kontrolliert (Senn et al, 2005).

*In vitro* ist P1 bevorzugt in den frühen Wachstumsphasen aktiv, während P3 Transkripte während des ganzen Wachstumszyklus, jedoch verstärkt in den späteren Wachstumsphasen, produziert werden. Durch P3 initiierte Transkripte zeigen dabei einen Peak in der Übergangsphase zwischen exponentieller und stationärer Wachstumsphase. Die Transkriptionsrate spiegelt jedoch nicht die eigentliche Konzentration des Proteins  $\sigma^B$  wieder, diese ist während des gesamten Wachstumszyklus weitestgehend konstant (Senn et al, 2005).

Die Aktivität von  $\sigma^B$  wird durch die Phosphatase RsbU positiv beeinflusst. Mutationen in *rsbU* führen zu einem nahezu vollständigen Verlust der Transkription  $\sigma^B$  abhängiger Gene (Giachino et al, 2001). Das Gen *rsbW* kodiert für einen  $\sigma^B$ -spezifischen Anti-Sigma-Faktor (Miyazaki et al., 1999).

Unter Normalbedingungen wird  $\sigma^B$  durch seinen Antagonisten RsbW (Anti-Sigma-Faktor) inaktiv gehalten. Unter  $\sigma^B$  aktivierenden Bedingungen wird RsbW durch den Anti-Anti-Sigma-Faktor RsbV antagonisiert und  $\sigma^B$  wird frei. RsbV ist nur in dephosphorylierter Form in der Lage, mit  $\sigma^B$  um die RsbW Bindung zu konkurrieren. Der Phosphorylierungszustand von RsbV wird durch die Kinaseaktivität von RsbW und der Phosphatase RsbU reguliert. (Pané-Farré et al., 2006).

Eine Aktivierung von  $\sigma^B$  wird unter anderem durch Hitze-Schock, Zugabe von Natriumchlorid oder Ethanol, alkalischer Schock (Senn et al, 2005) oder Säure Schock (Palma und Cheung, 2001) ausgelöst.

$\sigma^B$  ist an vielen regulatorischen Mechanismen beteiligt. Eine Inaktivierung von  $\sigma^B$  reduziert die Methicillinresistenz in MRSA sowie die Glykopeptidresistenz in Glykopeptid intermediär resistenten *S. aureus* (GISA), vermutlich über das  $\sigma^B$  abhängige Operon *yabJ-spoVG* (Schulthess et al., 2011).

Umgekehrt führt die Hochregulation von  $\sigma^B$  direkt oder indirekt zur Entwicklung einer erhöhten Glykopeptid (Teicoplanin) Resistenz (Bischoff und Berger-Bächi, 2001). Wenn *S. aureus* Antibiotika ausgesetzt wird, z.B. Vancomycin-Stress bei einem Vancomycin resistenten *S. aureus* (VRSA), führt dies zu einer Aktivierung von  $\sigma^B$ , welches die  $\sigma^B$  abhängigen Virulenzfaktoren, wie z. B. *hla* und *fnbA* beeinflusst und insgesamt die Zytotoxizität erhöht (Chen et al., 2011).

Eine Behandlung mit subinhibitorischen Aminoglykosidkonzentrationen löst eine  $\sigma^B$  abhängige Steigerung der Biofilmbildung und das Auftreten von „Small Colony Variants“ (SCV) aus (Mitchell et al., 2009). Weitere durch  $\sigma^B$  beeinflusste Virulenzfaktoren sind die Nuklease (*nuc*), Lipase (*lip*) und extrazelluläre Protease (*sp/E*); die Kontrolle erfolgt ebenfalls zumindest teilweise über das  $\sigma^B$  abhängige *yabJ-spoVG* Operon (Schulthess et al., 2011). Eine weitere wichtige Funktion besitzt  $\sigma^B$  in der positiven Kontrolle von Superantigenen wie zum Beispiel TSST-1 (Kusch et al., 2011).

## 8. *S. aureus* Sigma-Faktor S ( $\sigma^S$ )

$\sigma^S$  gehört zur Familie der „extracytoplasmatic function“ (ECF) Sigma-Faktoren. Das Gen *SACOL1872* zeigt bezüglich der Proteinsequenz eine hohe Homologie zu den ECF-Sigma-Faktoren  $\sigma^M$  und  $\sigma^{YalG}$  aus *B. subtilis* sowie zu anderen Organismen. Weiterhin kann die Sequenz in mehreren *Staphylococcus* Genomen gefunden werden. (Shaw et al., 2008). Weitere Hinweise auf die Funktion als Sigma-Faktor von *SACOL1872* sind die Fähigkeit, die RNA Polymerase zu binden und die Transkription zu initiieren (Shaw et al., 2008). Die Untersuchung der Promotorregion zeigt drei Transkriptionsstartpunkte für *sigS* (*SACOL1872*), von denen einer für die Autoregulation, d.h. die eigene Initiierung der Transkription, verantwortlich ist (Miller et al., 2012).

Physiologisch spielt  $\sigma^S$  unter Langzeit-Nährstoffmangelbedingungen eine Rolle, wobei bei einem  $\sigma^S$  Mutationsstamm die Entwicklungsfähigkeit und Nährstoffmangel verringert ist (Shaw et al., 2008). In

*in vivo* Studien am Mausmodell zeigten eine reduzierte Virulenz einer  $\Delta sigS$  Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp (Shaw et al., 2008).

Weiterhin scheint  $\sigma^5$  eine Rolle zum Schutz vor DNA Schäden, Zellwandschäden und die Interaktion mit Komponenten des angeborenen Immunsystems zu spielen (Miller et al., 2012). Eine *sigS-lacZ* Reporterfusion zeigte keine nennenswerte Aktivität unter normalen Wachstumsbedingungen (Shaw et al., 2008, Miller et al., 2012), jedoch kann die *sigS* Transkription durch chemischen Stress, welcher DNA Schäden auslöst oder die Zellwand beschädigt, induziert werden (Miller et al., 2012).

Gleichzeitig zeigen  $\Delta sigS$  Deletionsmutanten eine hohe Empfindlichkeit gegenüber DNA schädigenden Substanzen und zellwandangreifenden Antibiotika (Miller et al., 2012).

Zusammenfassend wirkt  $\sigma^5$  bei der Regulation zum Schutz vor intra- und extrazytoplasmatischem Stress mit und gehört, soweit bis dato charakterisiert, zur Gruppe der Virulenzfaktoren-kontrollierenden Regulatoren in *S. aureus* (Miller et al., 2012).

### 9. *B. subtilis* Sigma-Faktor-H ( $\sigma^H$ )

*B. subtilis* ist ein Gram-positives, sporenbildendes Bakterium mit einem Genom von 4,2 MBps, welches 4100 proteinkodierende Gene enthält (Kunst et al., 1997). In *B. subtilis* existieren neben dem vegetativen Sigma-Faktor noch mindestens 17 alternative Sigma-Faktoren (Britton et al., 2002). Für den alternativen Sigma-Faktor  $\sigma^H$ , welcher vom *spo0H* Gen kodiert wird (Weir et al., 1991), sind bislang 32 Promotoren, die die Transkription von 33 Genen initiieren, bekannt. (Britton et al., 2002).

In *B. subtilis* steht  $\sigma^H$  unter der direkten Kontrolle von AbrB, einem globalen Regulator in *B. subtilis*, der mindestens 39 Operons, darunter auch das *sigH* enthaltende Operon, hemmt (Hamon et al., 2004). AbrB selbst wird durch Spo0A kontrolliert, indem phosphoryliertes Spo0A die Transkription von *abrB* hemmt und somit positiv auf die  $\sigma^H$  Menge wirkt. (Fujita und Sadaie, 1998). Steigende Mengen von Spo0A erhöhen die *sigH* Transkription. Dies setzt einen sich selbst verstärkenden Kreislauf in Gang, da das *spoA* Gen neben einem  $\sigma^A$  Promotor in diesem Bakterium auch eine Bindestelle für sich selbst besitzt (Predich et al., 1992).

In *B. subtilis* spielt  $\sigma^H$  eine besondere Rolle in der postexponentiellen Wachstumsphase. Die  $\sigma^H$  Menge steigt mit dem Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase bei hoher Zelldichte an. (Qi und Doi, 1990). Die beiden wichtigsten regulatorischen Netzwerke, bei denen  $\sigma^H$  in diesem Organismus eine Rolle spielt, sind Sporenbildung und genetische Kompetenz.

Bei Mangel an Nährstoffen können die Zellen von *B. subtilis* umweltresistente, ruhende Sporen bilden. Die Bildung von Sporen benötigt ca. 6 – 8 Stunden (Grossman, 1995). Essentielle

Sporulationsgene werden dabei von  $\sigma^H$  transkribiert, wie zum Beispiel *kinA*, *spoOF* und *spoOA* (Predich et al., 1992). Insgesamt sind an der Sporenbildung mehrere hundert Gene beteiligt (Wang et al., 2006).

Genetische Kompetenz ist die Fähigkeit von Zellen, Fremd-DNA zu binden und aufzunehmen. Wesentlich für die Kompetenzentwicklung ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ComK (Grossman, 1995). Aktiviertes ComK wiederum induziert die Expression von sich selbst und verschiedener Com-Genen. Ein hierbei wichtiger Faktor ist die Aktivierung durch Phosphorylierung von Spo0A durch physiologische Signale, wie zum Beispiel Nährstoffmangel. Die Messung der Zelldichte von *B. subtilis* Zellen im Medium geschieht über das Peptid ComX und den „competence stimulating factor“ (CSF) (Solomon et al., 1996).

Neben der regulatorischen Funktion von  $\sigma^H$  besitzt *B. subtilis* auch  $\sigma^H$ -abhängige Gene, deren Produkte direkt für das Binden und die Aufnahme von exogener DNA verantwortlich sind. Hierbei ist das *comE* Operon von besonderer Bedeutung. Dieses besteht aus vier offenen Leserastern (OLR): *comEA*, *comEB*, *comEC* und *comER* (*comER* wird in reverser Richtung transkribiert) (Inamine und Dubnau, 1995). ComEA dient als DNA Rezeptor und ist in der Lage, DNA zu binden, welche dann durch ComEC, einem Membrankanal, ins Zytosol transportiert wird (Draskovic und Dubnau, 2005). Die *comE* Operon Produkte ComEB und ComER sind für die Transformierbarkeit entbehrlich (Inamine und Dubnau, 1995).

Weiterhin ist am Prozess der genetischen Kompetenz das *comG* Operon beteiligt. Es besteht aus sieben OLR (*comGA*, *comGB*, *comGC*, *comGD*, *comGE*, *comGF* und *comGG*), wobei alle sieben für die Aufnahme von DNA essenziell sind (Chung und Dubnau, 1998). ComGA gehört zur Familie der Sekretions-ATPasen und wird für das Binden von DNA und für die DNA Aufnahme benötigt (Briley et al., 2011). ComGB ist ein konserviertes Transmembranprotein, ComGC ist das Haupt-Pseudopilin und ComGD, -GE und -GG sind kleinere Pseudopiline (Briley et al., 2011).

Eine Protease, die durch *comC* kodiert wird, wird benötigt, um die prä-Pseudopiline zu prozessieren (Chung and Dubnau, 1995). Der Pseudopilus ist für das Binden von DNA entbehrlich, wird jedoch für die Aufnahme der DNA benötigt (Briley et al., 2011).

Weitere wichtige Komponenten für die genetische Kompetenz von *B. subtilis* werden durch das Operon *comF* kodiert, welches aus drei OLR (*comFA*, *comFB* und *comFC*) besteht, die von einem  $\sigma^A$  abhängigen Promotor aktiviert werden. *comF* OLR1 kodiert für ein Protein, das den ATP-abhängigen RNA/DNA Helicasen gleicht. Insbesondere durch Inaktivierung von *comF* OLR1 wird die

Transformierbarkeit massiv reduziert (Londoño und Dubnau, 1993). Die genauen Funktionen der Proteine ComFB und ComFC sind bisher nicht bekannt.

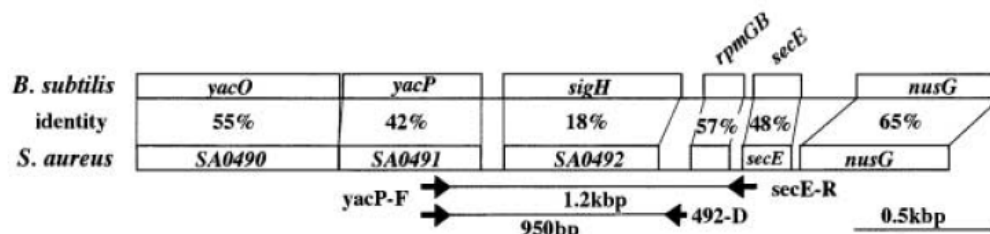
Weitere wichtige Rollen spielt  $\sigma^H$  im Citratzyklus (Tatti et al, 1989), bei pH Veränderungen (Wilks et al., 2009) oder bei der Biofilm Produktion (Kobayashi, 2007).

## 10. *S. aureus* Sigma-Faktor H ( $\sigma^H$ )

### 10.1. $\sigma^H$ und seine Zielgene

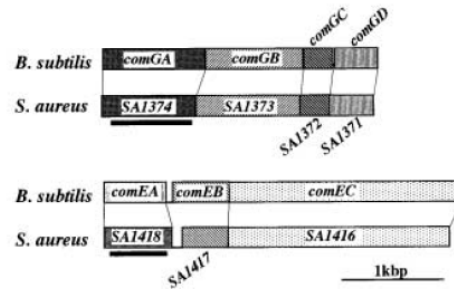
Homolog zu *sigH* (*spo0H*) in *B. subtilis* ist das Gen SA0492 in *S. aureus*. Dieses Gen liegt unmittelbar oberhalb von Genen, die für Komponenten der Transkriptionmaschinerie kodieren: *nusG* (Anti-Terminator); *rpoB*, *rpoC* (RNAP Untereinheiten  $\beta$  und  $\beta'$ ) sowie Komponenten der Translation; *rpmGB*, *rplK*, *rplA*, *rplJ*, *rplL* (ribosomale Proteine) und *secE*, welches für einen Teil eines Membrankanals zur Sekretion extrazellulärer Proteine dient (Morikawa et al., 2003, Sibbald et al., 2010).

Die oberhalb von *sigH* (SA0492) gelegenen Gene *yacC*, *yacO* und *yacP* kodieren für Proteine mit unbekannter Funktion. Dieses Genarrangement entspricht in weiten Teilen dem in *B. subtilis*, wobei die Aminosäuresequenzen der *sigH* umschließenden OLRs 40-90% Übereinstimmung zeigen, während die Aminosäuresequenz zwischen *Spo0H* in *B. subtilis* und SA0492 jedoch nur eine Übereinstimmung von 18% zeigen (Morikawa et al., 2003).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der genomischen Region um das *sigH*-Gen in *B. subtilis* und *S. aureus*. Die angegebenen Prozentzahlen zeigen die prozentualen Sequenzübereinstimmungen mit der korrespondierenden Region in *S. aureus*. Abbildung kopiert von Morikawa et al, 2003.

In *S. aureus* werden durch  $\sigma^H$  mehrere Gene positiv beeinflusst. Hierbei stehen die Gene des Kompetenzsystems im Vordergrund. Bereits 2003 wurde eine positive Beeinflussung der zu *B. subtilis* homologen Operons ComE und ComG gezeigt, wobei das erste Gen des ComE Operons *comEA* dem Gen SA1418 und das erste Gen des ComG Operons *comGA* dem Gen SA1374 entsprechen (Morikawa et al., 2003).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Genarrangements des ComG und ComE Operons in *B. subtilis* und die hierzu homologen Gene in *S. aureus*.** Abbildung kopiert von Morikawa, 2003.

2014 durchgeführte  $\sigma^H$ -Expressionsversuche zeigten eine positive Beeinflussung weiterer Genen des Kompetenzapparates (*dprA*, *coiA*) sowie Gene der Stressantwort (stress response), zum Beispiel die Hitzeschock-Gene *clpP* und *clpB* (Fagerlund et al., 2014).

Ein weiteres Gen, das in Zusammenhang zum  $\sigma^H$  Operon in *S. aureus* zu stehen scheint, ist das für die Integrase kodierende Gen *int* (Tao et al., 2010). Die Integrase ist ein Bestandteil von Prophagen, welche die Exzision und Integration von Bakteriophagen DNA in das Bakteriengenom vermittelt. Bakteriophagen tragen häufig zusätzliche Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel Enteroxin A, und dienen den Bakterien zum Austausch von Nukleinsäuren.

Integrase-Gene liegen hoch konserviert vor. Es zeigt sich ca. 40 bp upstream des *int* Gens eine konservierte, nicht translatierte Region, welche  $\sigma^H$  zu erkennen scheint. Versuche mit einem *sigH* Mutationsstamm zeigten eine Reduktion der *int* Transkripte *in vitro*. Da aber in den RNA-seq Analysen von Fagerlund und Kollegen (Fagerlund et al., 2014) keine Effekt von  $\sigma^H$  auf die *int* Transkription beobachtet wurde, ist fraglich, ob das *int* Gen tatsächlich Teil des  $\sigma^H$  Regulons von *S. aureus* ist.

## 10.2. Modulation der Expression der Zielgene SA1374 und SA1418

Neben  $\sigma^H$  selbst modulieren andere Gene die Expression der Gene SA1374 und SA1418. Das Gen SA0882 zeigt Übereinstimmungen mit den Gensequenzen von *comK* in *B. subtilis* und *comK1* in *B. cereus*, das Gen SA1596 besitzt genetische Ähnlichkeit zu *comK2* in *B. cereus*. Beide Gene sind in der Lage, die Expression von SA1374 und SA1418 zu modulieren, wobei die Expression von ComK1 synergistisch mit einer verstärkten Expression von  $\sigma^H$  die Transkription von SA1374 steigert. Fehlt das *sigH* Gen im Genom, kann ComK1 die Transkription von SA1374 jedoch nicht beeinflussen.

Bemerkenswerterweise resultierte eine simultane Überexpression von  $\sigma^H$  und ComK2 verglichen mit alleiniger  $\sigma^H$  Überexpression in einer leicht reduzierten Transkription von SA1374 (Fagerlund et al., 2014).

### 10.3. Die Beteiligung von $\sigma^H$ am System der Kompetenz von *S. aureus*

Überexpressionsexperimente von *sigH* bzw. *ComK1* simultan mit *sigH* in *S. aureus* zeigten eine verstärkte Transkription von insgesamt 40 Genen. Neben den Genen des *comG* und *comE* Operons wurden auch die zu *S. pneumoniae* homologen Gene *coiA* (kodiert für ein Protein unbekannter Funktion, Induktion während Kompetenz) und *dprA* (DNA recombination-mediator protein A) vermehrt transkribiert (Fagerlund et al., 2014). In *B. subtilis* werden die korrespondierenden Proteine mit Smf (DprA) bzw. YjbF (CoiA) bezeichnet.

Die durch *coiA* und *dprA* kodierten Proteine sind für die Entwicklung von Kompetenz in transformierbaren Spezies nötig (Claverys et al., 2009). In Pneumokokken ist DprA neben anderen Proteinen (SsbB, RecA und RadA) an der intrazellulären Bindung von Einzelstrang DNA (single stranded DNA, ssDNA) und deren Rekombination zur Herstellung ausreichender Homologie mit dem Genom des Empfängerstamms beteiligt (Attaiech et al., 2011, Quevillon-Cheruel et al., 2012). Diese Proteine finden sich mit Ausnahme von RadA auch in *B. subtilis* (Ogura et al., 2002).

Die für die Transformation essentiellen Gene *comFA*, *ComFC*, *comC* und *recA* wurden durch eine Aktivierung von  $\sigma^H$  in *S. aureus* nicht beeinflusst, *recA* zeigte jedoch bereits in der Vektorkontrolle eine hohe basale Transkriptionsrate (Fagerlund et al., 2014). Das einzige in *S. aureus* konservierte Einzelstrang DNA Bindeprotein (kodiert durch *ssb*) zeigte unter Expression von ComK1 eine verstärkte Transkription, nicht jedoch bei Expression von  $\sigma^H$  alleine, die Koexpression von ComK1 und  $\sigma^H$  zeigte hier einen synergistischen Effekt (Fagerlund et al., 2014). *B. subtilis* verfügt über zwei *ssb* Gene: *ssbA*, welches als housekeeping *ssb* an der chromosomalen Replikation beteiligt ist und *ssbB*, welches zur optimalen Transformation benötigt wird (Claverys et al., 2009).

2012 konnte gezeigt werden, dass aktives  $\sigma^H$  *S. aureus* in die Lage versetzt, auf sehr niedrigem Niveau Fremd-DNA aus der Umgebung aufzunehmen (Morikawa et al., 2012). 2014 konnten diese Beobachtungen jedoch auch bei Koexpression von  $\sigma^H$  und ComK1 nicht reproduziert werden (Fagerlund et al., 2014), was als Hinweis darauf gewertet werden kann, dass *S. aureus* auch unter  $\sigma^H$ -aktivierenden Bedingungen nur eine sehr schwache genetische Kompetenz entwickelt. Sogar eine zusätzlich Expression von ComFA-C und ComC neben  $\sigma^H$  und ComK1 zeigte keinen markanten Einfluss auf die Fremd-DNA Aufnahmefähigkeit von *S. aureus* (Fagerlund et al., 2014), was darauf schließen lässt, dass weitere, bis dato unbekannte Faktoren für die Entwicklung natürlicher Kompetenz in *S. aureus* essentiell zu sein scheinen.

## 11. Ziele der Arbeit

$\sigma^H$  ist einer der alternativen Sigma-Faktoren in *S. aureus*, dessen Gen in allen bisher sequenzierten *S. aureus* Isolaten nachgewiesen wurde (Ibarra et al., 2013). Diese strikte Konservierung des Gens spricht für eine physiologische Bedeutung von  $\sigma^H$  für *S. aureus*. *SigH* Überexpressionsstudien sprechen desweiteren dafür, dass dieser alternative Sigma-Faktor die Aufnahme von Fremd-DNA, wenn auch auf sehr niedrigem Niveau, zu stimulieren vermag (Morikawa et al., 2012), zumindest aber an der Regulation von Genen des Kompetenzsystems beteiligt ist (Fagerlund et al., 2014). Die Bedingungen, unter denen  $\sigma^H$  in *S. aureus* aktiv wird, sind bis dato jedoch weitgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, dieser Fragestellung nachzugehen. Hierzu wurde folgende Strategie gewählt:

1. Zunächst sollte ein Induktionsvektor konstruiert werden, welcher *sigH* unter die Kontrolle eines induzierbaren Promotors stellt. Durch Überexpression des *sigH* Gens soll die Abhängigkeit des Zielgene *SA1418*, *SA1374* und *int* verifiziert werden. Hierzu wurde deren Transkriptionslevel mittels quantitativer Real Time RT-PCR bestimmt (qRT-PCR).
2. Im Anschluss sollte ein Reporterkonstrukt hergestellt werden, welches die Aktivität von  $\sigma^H$  anzeigen kann. Hierzu wurden Reportergene (*lux* und *gfp*) unter die Kontrolle der *SA1418* Promotorregion, welche die  $\sigma^H$  Bilde Stelle enthält, gestellt. Um die  $\sigma^H$  Spezifität des Reportersystems zu testen, wurde dieses zunächst im  $\sigma^H$  Induktionsstamm getestet.
3. Ein erfolgreich in Punkt 2 getestetes Reportersystem sollte nachfolgend in einen *S. aureus* Wildtypstamm eingebracht werden. Das entstandene Derivat wurde im Anschluss dazu genutzt, anhand der Reporter die  $\sigma^H$  Aktivität in verschiedenen Wachstumsphasen und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu messen.
4. Sollte eine erhöhte Aktivität des Reporters zu einer bestimmten Wachstumsphase/-bedingung gemessen werden können, würde im Anschluss die Transkription der entsprechenden Gene mittels quantitativer Real Time RT-PCR unter diesen Bedingungen untersucht werden.



### III. Material und Methoden

#### 1. Primer

##### 1.1. Primer für Klonierungen

Bezeichnung	Schnittstelle	Sequenz in 5' - 3' Richtung*
Pcad fwd	KpnI	gtcggtagcGCACTTATTCAAGTGATTT
Pcad rew	EcoRI	gtcgaattcGTTTCAGACATTGACCTTCAC
SigH fwd	EcoRI	gtcgaattcaggaggatttctaTGAAATACGATTTGACAACTC
SigH rew	BamHI	gtcggtagcCTTAAGGCGCTTTTCAAATC
gfpmut2 fwd	Sall	ctcgtcgacAGGAGAAGAAGCTTTTGAATG
gfpmut2 rev	KpnI	gtcggtagcCTTATTTGTATAGTTCATCCATGC
Psa1418 fwd	HindIII	gtcaagcTTACCTTTAAGTGTTTATCATG
Psa1418 rew	Sall	ctcgtcgACAATAAAACCACTCCTCAAC
Psa1418reg+ fwd	HindIII	gtcaagcTAGAAGCTTTAGGTAATGTTACTG
Psa1418reg+ rew	Sall	ctcgtcgGCTTTAGCTTGCCCAACTCC
Psa1418-2 fwd	SmaI	gtacccgggAACTTTATACACGTCTGAGCG
Psa1418-2 rew	EcoRI	ctcgaattCTTTAAGTGTTTATCATGATATGAC

\*Klein = angehängte Sequenz, groß = DNA Bindestelle

## 1.2. Primer für quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR)

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Richtung
RT SA1418 fwd	TTGGATGATGCAGATGTAAGTCGA
RT SA1418 rew	TTTTACGTGCACACTGTTTACTTCAAT
RT SA1374 fwd	GTTTATATGAAGTTTCAAGCTGG
RT SA1374 rew	TCTTGCCAAGTGACAATGG
RT sigH fwd	ACAACCATTAATTATTTCGACGCATCA
RT sigH rew	GCTGCTCTCCACTAAAATCAAATGT
RT int fwd	TCGGAAATATCCCTATTGGC
RT int rew	AACCTGCCACACAGATCG
RT rnalIII fwd	AGGAGTGATTTCAATGGCACAAG
RT rnalIII rew	TGTGTCGATAATCCATTTTACTAAGTCA
RT eap fwd	AAGCGTCTGCCGCAGCTA
RT eap rew	TGCATATGGAACATGGACTTTAGAA
RT gyrB fwd	GACTGATGCCGATGT
RT gyrB rew	AACGGTGGCTGTGCA

## 2. Plasmide

### 2.1. Externe Plasmide

Name	Beschreibung	Resistenz*	Herkunft
pCN56	<i>E. coli-S. aureus</i> shuttle plasmid, enthält <i>gfpmut2</i>	Amp100/Erm10	Charpentier et al., 2004
pCN44	<i>E. coli-S. aureus</i> shuttle plasmid, enthält den Cadmium induzierbaren Promotor P <sub>cad</sub>	Amp100/Erm10	Charpentier et al., 2004
pEC1	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, keine Replikation in <i>S. aureus</i> , enthält die Erythromycin Resistenzkassette <i>erm(B)</i>	Amp100/Erm10	Brückner, 1997
pBus1	<i>E. coli-S. aureus</i> shuttle plasmid	Tet8	Rossi et al., 2003
pBT	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, keine Replikation in <i>S. aureus</i> , enthält die Tetracyclin Resistenzkassette <i>tet(L)</i>	Tet8	Giachino et al., 2001
pSB2035	<i>E. coli-S. aureus</i> shuttle plasmid, enthält die Reportergene/Operons <i>gfp</i> und <i>luxABCDE</i> unter der Kontrolle des <i>agr P3</i> Promotors	Cm7	Qazi et al., 2001

\*Amp = Ampicillin, Erm = Erythromycin, Tet = Tetrazyklin, Cm = Chloramphenicol, Zahl: Zielkonzentration in µg/ml.

## 2.2. In dieser Studie hergestellte Plasmide

Name	Ausgangsplasmid	Resistenz*
pTF1	pEC1-Derivat, enthält das Reportergen <i>gfpmut2</i> unter der Kontrolle des $\sigma^H$ -abhängigen Promotors P <sub>1418</sub> (ca. 300 Basenpaare der Promotorregion)	Amp100/Erm10
pTF2	pEC1-Derivat, enthält das Reportergen <i>gfpmut2</i> unter der Kontrolle des $\sigma^H$ -abhängigen Promotors P <sub>1418reg+</sub> (ca. 700 Basenpaare der Promotorregion)	Amp100/Erm10
pTF3	pCN56-Derivat, enthält das Reportergen <i>gfpmut2</i> unter der Kontrolle des $\sigma^H$ -abhängigen Promotors P <sub>1418</sub> (ca. 300 Basenpaare der Promotorregion)	Amp100/Erm10
pTF4	pCN56-Derivat, enthält das Reportergen <i>gfpmut2</i> unter der Kontrolle des $\sigma^H$ -abhängigen Promotors P <sub>1418reg+</sub> (ca. 700 Basenpaare der Promotorregion)	Amp100/Erm10
pTF5	pBT-Derivat, enthält das Reportergen <i>gfpmut2</i> unter der Kontrolle des $\sigma^H$ -abhängigen Promotors P <sub>1418</sub> (ca. 300 Basenpaare der Promotorregion)	Tet8
pTF6	pBT-Derivat, enthält das Reportergen <i>gfpmut2</i> unter der Kontrolle des $\sigma^H$ -abhängigen Promotors P <sub>1418reg+</sub> (ca. 700 Basenpaare der Promotorregion)	Tet8
pTF7	pSB2035-Derivat, enthält die Reportergene/Operons <i>gfp</i> und <i>luxABCDE</i> unter der Kontrolle des $\sigma^H$ -abhängigen Promotors P <sub>1418-2</sub> (ca. 700 Basenpaare der Promotorregion, enthält für pSB2035 passende Schnittstellen)	Cm7
pTF8	pBus1-Derivat, enthält das <i>sigH</i> -Gen, amplifiziert aus <i>S. aureus</i> N315, das unter der Kontrolle des Cadmium induzierbaren Promotors P <sub>cad</sub> steht	Tet8

## 3. Stämme

### 3.1. Externe Stämme

Name	Beschreibung	Herkunft
Newman	ATCC 25904, klinisches <i>S. aureus</i> Isolat, Mutation in <i>saeS</i>	Duthie und Lorenz, 1952
Newman HG	<i>S. aureus</i> Newman Derivat mit einem reparierten <i>sae</i> Locus	Herbert et al., 2010
Newman $\Delta sigH$	<i>S. aureus</i> Newman <i>sigH</i> Deletionsmutante	Dumoulin, 2005
RN4220	Restriktions-negatives, Modifikations-positives <i>S. aureus</i> NCTC 8325 Derivat	Kreiswirth et al., 1983
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> Laborstamm	Life Technologies, Inc.

### 3.2. In dieser Studie hergestellte Stämme

Name	Ausgangsstamm	Enthaltene Plasmide	Beschreibung
TF1	RN4220	pTF8	$\sigma^H$ Induktionsstamm, enthält das multicopy shuttle-Plasmid pTF8, in welchem das <i>sigH</i> -Gen unter der Kontrolle des Cadmium induzierbaren Promotors $P_{cad}$ steht
TF2	Newman HG	pTF8	$\sigma^H$ Induktionsstamm, enthält das multicopy shuttle-Plasmid pTF8, in welchem das <i>sigH</i> -Gen unter der Kontrolle des Cadmium induzierbaren Promotors $P_{cad}$ steht
TF3	RN4220	pTF2	Reporterstamm, enthält das $P_{1418reg+}$ - <i>gfpmut2</i> Promotor-Reportersystem enthaltende Plasmid pTF2, <i>cis</i> -integriert im Chromosom im SA1418 Locus
TF4	RN4220	pTF3	Reporterstamm, enthält das multicopy $P_{1418}$ - <i>gfpmut2</i> Promotor-Reporterplasmids pTF3
TF5	RN4220	pTF4	Reporterstamm, enthält das multicopy $P_{1418}$ - <i>gfpmut2</i> Promotor-Reporterplasmids pTF4 mit verlängerter Promotorregion
TF6	RN4220	pTF7	Reporterstamm, enthält das $P_{1418-2}$ - <i>gfp-luxABCDE</i> multicopy Promotor-Reporterplasmid pTF7
TF7	RN4220	pTF2, pTF8	TF3 Derivat, transformiert mit dem $\sigma^H$ -Induktionsplasmid pTF8
TF8	RN4220	pTF3, pTF8	TF4 Derivat, transformiert mit dem $\sigma^H$ -Induktionsplasmid pTF8
TF9	RN4220	pTF4, pTF8	TF5 Derivat, transformiert mit dem $\sigma^H$ -Induktionsplasmid pTF8
TF10	RN4220	pTF7, pTF8	TF6 Derivat, transformiert mit dem $\sigma^H$ -Induktionsplasmid pTF8
TF11	RN4220	pBus1, pTF8	Negativ-Kontroll Stamm, enthält neben dem $\sigma^H$ -Induktionsplasmid pTF8, das <i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> shuttle plasmid pBus1.
TF12	Newman HG	pTF7	Reporterstamm, enthält das $P_{1418}$ - <i>gfp-luxABCDE</i> Promotor-Reportersystem enthaltende multicopy Plasmid pTF7.

#### 4. Medien

Bei allen verwendeten Medien wurde der Ziel-pH Wert, falls nicht anders angegeben, auf pH 7 eingestellt. Alle Lösungen und Medien wurden mit dH<sub>2</sub>O auf das Zielvolumen aufgefüllt und für 15 Minuten bei 121°C autoklaviert.

##### LB Lennox Medium

pro Liter

5 g	Hefeextrakt
10 g	Trypton (pankreatisch abgebautes Casein)
5 g	NaCl <sub>2</sub>

##### TSB Medium

pro Liter

17 g	Trypton
3 g	Soyaextrakt
2,5 g	Glucose
5 g	NaCl <sub>2</sub>
2,5 g	Dikaliumhydrogenphosphat

##### TB Medium

pro Liter

12 g	Trypton
24 g	Hefeextrakt
4 ml	Glycerin
2,13 g	Kaliumhydrogenphosphat
12,54 g	Dikaliumhydrogenphosphat

##### SOB Medium

pro Liter

20 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
0,5 g	NaCl <sub>2</sub>

Die Bestandteile wurden vermischt, anschließend wurden 10 ml einer 250 mM KCl Lösung zugegeben, der pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt und das Volumen auf 1 Liter mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Das Medium wurde autoklaviert und kurz vor Benutzung wurden pro Liter 5 ml einer 2M MgCl<sub>2</sub> Lösung zugeben.

### **SOC Medium**

SOC Medium ist gleich dem SOB Medium außer, dass es zusätzlich 20 mM Glucose enthält. Es wurde zu autoklaviertem SOB Medium zugegeben (zum Beispiel 20 ml einer sterilen 1 M Glucose Lösung pro Liter SOB). Anschließend folgte steriles Filtrieren.

### **B2 Medium**

Pro 500ml

5g	Caseinhydrolysat
12,5g	Hefeextrakt
0,6g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
12,5g	NaCl <sub>2</sub>

Das Gemisch wurde autoklaviert und im Anschluss 12,5 ml einer 20% Glucoselösung pro 500 ml hinzugefügt.

### **LB Lennox Softagar (LB Lennox Softy)**

LB Lennox Softagar entspricht dem LB Lennox Medium plus Zugabe von 0,6% Agar. Kurz vor der Verwendung wurde der LB Lennox Softagar in einem Mikrowellenofen erhitzt und im Wasserbad auf ca. 55°C gekühlt.

## **5. Lösungen**

Alle Lösungen wurden mit Milli-Q Wasser (Millipore Corporation, deionisiert und 22 µm filtriert) angesetzt und für 15 min bei 121°C autoklaviert.

### **TE Puffer**

10 mM	Tris
1 mM	EDTA

Mischen, anschließend wurde mit HCl auf pH 8 eingestellt.

### **5x TBE Puffer**

pro Liter

54 g	Tris
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA pH 8,0

### **Phagenpuffer**

Phagenpuffer besteht aus LB Lennox Medium, versetzt mit einer Endkonzentration von 5 mM CaCl<sub>2</sub>.

### **Ladepuffer 6x Loading Dye Orange (DNA Gele)**

0,15 %	Orange G
10 mM	Tris
60mM	EDTA

### **(3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure) Puffer (MOPS Puffer)**

10 x MOPS Puffer Stammlösung

200 mM	MOPS
50 mM	Na-Acetat
10 mM	EDTA

Der pH Wert wurde mit 1M NaOH auf 7,0 eingestellt und der Pufferansatz wurde autoklaviert. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

### **Ladepuffer 1x Loading Dye Bromphenolblau (RNA Gele)**

10 µl	Formamid
3,5 µl	Formaldehyd
2 µl	MOPS Puffer (10 x Stammlösung)
2 µl	Bromphenolblau im MOPS Puffer*

\*Zur Herstellung von Bromphenolblau im MOPS Puffer wurden 0,5 ml 10 x MOPS Puffer, 3,5 ml Glycerin, 0,05 % Xylencyanol und 1 ml EDTA (200 mM) verwendet.

## **6. Anzucht von Bakterien**

Bakterien wurden entweder in Flüssigkultur oder auf Agarplatten angezogen.

### **6.1. In Flüssigkultur**

Wenn nicht anders erwähnt, wurden Flüssigkulturen bei 37°C und 150 Umdrehungen pro Minute (UpM) in einem Glaskolben bei einem Flüssigkeit-zu-Gefäßvolumen-Verhältnis von 1:10 zur optimalen Sauerstoffversorgung angezogen.

Bei einigen Ansätzen wurde das Flüssigmedium vor Verwendung der Nährstoffgehalt reduziert („nutrient depleted“ Medium). Die Vorbereitung erfolgte nach folgendem Protokoll: Es wurden Zellen in Kultur für ca. 12 Stunden im Flüssigmedium angezogen. Anschließend wurde das Medium bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,2 µm Filter steril filtriert.

## 6.2. Anzucht auf Agarplatten

Es wurde LB Lennox Medium mit 1,5% Agar vermischt, autoklaviert und gelagert. Zur Plattenherstellung wurde das Gemisch in der Mikrowelle bis zur Verflüssigung erhitzt, im Wasserbad auf 55°C heruntergekühlt, gegebenenfalls mit Antibiotika versetzt und in Petrischalen gegossen. Nach ca. 15 Minuten konnten die Platten verwendet oder bei 4°C gelagert werden.

Nach dem Ausplattieren der Bakterien wurden die beimpften Platten im Brutschrank bei 37° C in der Regel für mindestens 24 Stunden bebrütet.

## 7. Isolation von Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

### 7.1. Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte mit den Puffern P1, P2 und N3 des QIAprep Spin Miniprep Kits (Quiagen). Nach einer Wachstumszeit von 12 - 14 Stunden wurde die in antibiotikahaltigem LB Lennox Medium angezogene Bakterienkultur für zunächst zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und eine Minute bei 18.000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte eine Resuspension des Pellets mit 250 µl Puffer P1 und nach einer Inkubation von einer Minute auf Eis wurde 250 µl Puffer P2 zugegeben. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde durch Inversion gemischt und für weitere vier Minuten auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden 350 µl Puffer N3 zugegeben und nach erneuter Inversion des Gefäßes erfolgte eine Inkubation auf Eis für fünf bis zehn Minuten.

Anschließend wurde das Gemisch bei 18.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert und 700 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu den 700 µl Überstand wurden weitere 700 µl Isopropanol gegeben und es wurde erneut für 15 Minuten bei 18.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet mit 700 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 18.000 x g für 5 Minuten wurde der 70%ige Ethanol ohne das Pellet aufzulösen vorsichtig abgezogen und das Pellet je nach Flüssigkeitsrückstand für 10 bis 20 Minuten getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet mit 50 µl dH<sub>2</sub>O gelöst.

### 7.2. Isolation von Plasmid DNA aus *S. aureus*.

Die Präparation von Plasmiden aus *S. aureus* wurde ebenfalls mit den Puffern P1, P2 und N3 (Quiagen) durchgeführt. Aus der Übernachtskultur wurde ein Bakterienpellet eine Minute bei 18.000 x g abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Im Gegensatz zu *E. coli* lässt sich die Zellwand von *S. aureus* durch alkalische Lyse nur unzureichend auflösen, es war daher eine enzymatische Auflösung mit Lysostaphin erforderlich: Hierzu wurde zum



in Puffer P1 resuspendierten Bakterienpellet 5 µl einer 2 mg/ml haltigen Lysostaphinlösung gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und leichtem Schütteln für max. 30 Minuten inkubiert. Die Lyse der Zellen lies sich makroskopisch an Zellbestandteilen im Reaktionsgefäß, sowie einer Zunahme der Viskosität erkennen.

Nach sichtbarer Lyse wurden 250 µl Puffer P2 zugegeben und die Isolation wie unter 7.1. beschrieben fortgesetzt.

### **7.3. Isolation von genomischer DNA aus *S. aureus***

Die Methode nach Marmur (Marmur et al., 1951) birgt die Gefahr der DNA Fragmentierung durch Scherkräfte, es ist somit auf besondere Sorgfalt bei der Präparation zu achten.

Zellen einer Übernachtskultur in LB Lennox Medium wurden benutzt, um eine 20 ml Hauptkultur (LB Lennox Medium) mit einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 0,05 zu beimpfen. Nach dem Erreichen der exponentiellen Phase ( $OD_{600}$ : 0,6 – 0,9) wurden die Zellen bei 5.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 2 ml einer 0,9%igen NaCl Lösung resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 15.000 x g für eine Minute. Der Überstand wurde vollständig entfernt und es wurden 180 µl TE Puffer zugegeben. Die Zellen wurden bis zur vollständigen Resuspension mittels Vortexmischer gemischt, danach wurde 20 µl einer 10 mg/ml haltigen RNase A Lösung zugegeben. Zur Lyse der Gram-positiven Zellwand wurde zusätzlich 1 µl Lysostaphin (2 mg/ml Stammlösung) und 2µl Lysozym (1 mg/ml Stammlösung) zugegeben. Im Folgenden wurde 30 Minuten bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer Proteinase K (20 mg/ml) Lösung zugegeben und das Gemisch für weitere 10 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Es folgte eine Extraktion mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1.

Hierzu wurde der Ansatz zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, dann für 3 Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde weitere zwei Mal wiederholt, wobei jeweils 20 Minuten geschüttelt wurde. Zum Ausfällen der DNA wurden 500 µl Isopropanol zugegeben und durch Inversion gemischt. Es folgten 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, sowie 5 Minuten Zentrifugation bei 15.000 x g. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde zweimal durch Zugeben und Abheben von 700 µl Ethanol 70% gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in TE Puffer gelöst.

## 8. Herstellung von Plasmiden

### 8.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

In dieser Studie wurden zwei verschiedene Ansätze zur Amplifikation von DNA Fragmenten verwendet. Zur analytischen Amplifikation, bei der die Amplifikation nur zum Nachweis der spezifischen DNA Sequenzen diente, kam die Fast Start Taq Polymerase (Roche) zum Einsatz. Bei der Amplifikation von Fragmenten, die zur Klonierung weiterverwendet wurden, fand die Fast Start High Fidelity Polymerase (Roche) Verwendung. Der Ansatz erfolgte nach folgendem Pipettierschema.

DNA	1µl	max. 500 ng
Polymerase	0,5µl	entspricht 2, 5 Units
Puffer 10x	5µl	
Primer forward	2µl	entspricht 0,4 µM aus 10µM Stammlösung
Primer reverse	2µl	entspricht 0,4 µM aus 10µM Stammlösung
Desoxynukleosid-Triphosphat Gemisch (dNTPs)	1µl	entspricht 200 µM
Wasser (dH <sub>2</sub> O)	38,5µl	
<b>Gesamtansatz</b>	<b>50µl</b>	

Am Thermocycler wurden folgende Einstellungen vorgenommen.

	<b>Zyklen</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Initiale Denaturierung	1	2 min	94°C
Denaturierung	35	30 s	95°C
Annealing	35	30 s	55 - 72°C
Elongation	35	30 s - 3 min	72°C
terminale Elongation		7 min	72°C
Kühlung		unlimitiert.	4°C

Die Annealing-Temperatur wurde ca. 5°C unter der nach Wallace-Ikatura Regel (Wallace et al., 1979) berechneten Schmelztemperatur der verwendeten Primer gewählt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des amplifizierten Fragments, wobei mit einer Amplifikationsgeschwindigkeit von 0,5-1 Kilo-Basen (kB) pro Minute gerechnet wurde.

### 8.2. DNA Aufreinigung

Es kam das QIAquick PCR Purification (Quiagen) zum Einsatz. Hiermit konnten sowohl PCR Produkte als auch Plasmide aufgereinigt werden. Die Durchführung erfolgte mit den Puffern PB1, PE und EB entsprechend der Herstellerangaben. Die DNA wurde in dH<sub>2</sub>O gelöst.

### **8.3. DNA Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der DNA Konzentration erfolgte mittels Quiant-iT Assay (Invitrogen). Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben.

### **8.4. Agarose Gelelektrophorese zur DNA Darstellung**

Die Agarose Gelelektrophorese erlaubte das Auftrennen von DNA Fragmenten entsprechend ihrer Größe sowie das spätere Sichtbarmachen durch Anfärben. Das Prinzip besteht darin, dass negativ geladene DNA Fragmente im elektrischen Feld bei gleicher Laufzeit ihrer Größe entsprechend verschieden schnell durch das Agarosegel wandern, wobei kleine Fragmente schneller wandern als größere.

Die Konzentration an Agarose im Gel wurde abhängig von der erwarteten Fragmentlänge gewählt. Standardmäßig wurden die Gele mit 1% Agarose gegossen, für kleinere Fragmente wurden höhere Konzentrationen gewählt.

Zunächst wurde die entsprechende Menge Agarose in einem Glaskolben mit 0,5% TBE Puffer vermischt. Die Suspension wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig auflöst war. Nach kurzer Abkühlzeit von ca. 5 Minuten wurde das noch flüssige Gel in seine Form gegossen und der Kamm wurde eingesetzt. Das Gel konnte nach seiner Trocknung verwendet werden.

Die Proben wurden mit 6 x Loading Dye Orange (LD-Orange) vorbereitet. Zum Anfärben der DNA wurde pro  $\mu\text{l}$  Probenansatz 1-/10000 SYBR Gold Volumen (Invitrogen) der Ausgangslösung entsprechend Herstellerangaben zugegeben. Nach Beladen der Geltaschen wurde standardmäßig eine Spannung von 100 V an die Gelkammer angelegt.

Als Größenmarker kam der Invitrogen 1 kB Größenmarker zum Einsatz. Der Marker lag in einer Ausgangskonzentration von  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  vor. Der Größenmarker wurde vor Einsatz im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Die DNA wurde durch das im LD-Orange enthalte SYBR Gold (Invitrogen) unter UV Licht sichtbar gemacht.

### **8.5. Gelextraktion von DNA Fragmenten**

In dieser Studie wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) verwendet. Zunächst musste das gewünschte DNA Fragment mittels Gelelektrophorese und gegebenenfalls einem Restriktionsverdau von der unerwünschten DNA getrennt werden. DNA Fragmente, die nach Extraktion weiter kloniert werden sollten, durften aufgrund des Risikos von Mutationen nur sehr kurzem, niedrig dosiertem

UV-Einfluss ausgesetzt werden. Nach der Identifikation des gewünschten Fragmentes wurde das die DNA enthaltende Gel-Stück mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die weitere Extraktion erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die DNA wurde in dH<sub>2</sub>O gelöst.

### **8.6. Natriumacetat Fällung**

Die Natriumacetat Fällung diente der Aufkonzentrierung von DNA. Die größte Anwendung fand das Verfahren nach Extraktion von Plasmiden aus Zellen, um bei der anschließenden Elektroporation die größtmögliche DNA Menge einsetzen zu können.

Es wurde zunächst das 0,1 fache Volumen Natriumacetat (3 M, pH 4,8) zur DNA-Lösung gegeben. Anschließend wurde das 2-fache Volumen auf -20°C vorgekühltes Ethanol (100%) zugegeben, der Ansatz gut vermischt und bei -20°C für mind. 2 Stunden inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4°C und 18.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 700 µl Ethanol (70%) zugegeben und wieder abgehoben. Diese Schritte wurden weitere zweimal wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet wahlweise bei Raumtemperatur oder bei 37°C getrocknet und anschließend in dem gewünschten Volumen dH<sub>2</sub>O gelöst.

### **8.7. Spezifisches Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen**

Es kamen die Fast Digest Enzyme (Fermentas) zum Einsatz. Es wurde zwischen analytischem Verdau, der zum Nachweis der korrekten Insertion eines Fragments in einem Plasmid diente und einer Behandlung von DNA, die zur Ligation weiter verwendet werden sollte, unterschieden.

Je nach Ansatz wurden die unten stehenden Pipiettiertschemata verwendet. Im Fall einer Weiterverwendung der geschnittenen DNA zur Ligation wurden die eingesetzten Enzyme zusätzlich hitzeinaktiviert.

**Analytisch**

DNA	2µl*
Enzym 1	0,3µl
Enzym 2	0,3µl
Puffer 10x	1µl
Wasser (dH <sub>2</sub> O)	6,4µl
<b>Gesamt</b>	<b>10µl</b>

**Klonierung**

DNA	15µl*
Enzym 1	0,5µl
Enzym 2	0,5µl
Puffer 10x	2µl
Wasser (dH <sub>2</sub> O)	2µl
<b>Gesamt</b>	<b>20µl</b>

**Durchführung**

Verdau	37°C	20 min
Hitzeinaktivierung	entfällt	

**Durchführung**

Verdau	37°C	40 min
Hitzeinaktivierung	80°C	15 min

\*Volumen abhängig von der enthaltenen DNA-Konzentration: bei Plasmid DNA sollte die maximale DNA Menge 1µg nicht überschreiten, bei Verwendung eines PCR Produktes sollte die eingesetzten DNA Menge ca. 0,2µg betragen. Das Volumen kann je nach DNA Konzentration von 0,5µl bis 10µl variiert werden. Standardmäßig wurden o. g. Volumina eingesetzt. Angaben gemäß Hersteller.

**8.8. Dephosphorylierung von geschnittenen Plasmiden**

Durch Dephosphorylieren von geschnittenen Plasmiden werden vornehmlich die Phosphatgruppen am 5' Ende der DNA Überhänge abgespalten. Eine Religation des Plasmides ohne das einzubringende DNA Fragment wird verhindert. Es kam die alkalische Phosphatase (Roche) nach Herstellerangaben zum Einsatz.

**8.9. Ligation von Plasmiden und DNA Fragmenten**

Zur Ligation wurde die T4 DNA Ligase (Roche) verwendet. Der Ligationsansatz richtete sich nach den Herstellerangaben, wobei ein Molekülverhältnis von 3:1 für Insert zu Plasmid angestrebt wurde. Das Volumen des Ansatzes wurde so klein wie möglich gehalten, mindestens jedoch 10 µl. Die Gesamtmasse an eingesetztem Plasmid sollte zwischen 60 ng und 100 ng liegen. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

**9. DNA Transfer in das zu transformierende Bakterium****9.1. Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* DH5α Zellen**

Entsprechend der Methode nach Inoue (Inoue et al., 1990) wurden zunächst Zellen einer Übernachtkultur in SOB Medium in eine Hauptkultur (SOB Medium) überimpft. Nach dem Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Kultur zunächst für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 2.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 80 ml gekühltem TB-Medium resuspendiert. Es folgten weitere 10 Minuten auf Eis und eine erneute Zentrifugation bei 2.500 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Bakterien wurden in 20 ml TB Medium resuspendiert. Zuletzt wurde langsam ein Volumen von 1,4 ml

Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben (Zielkonzentration 7%). Die Zellen wurden zu je 200 µl aliquotiert, mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

### **9.2. Heat shock Transformation chemisch kompetenter *E.coli* DH5α Zellen**

Die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut, anschließend wurde das Plasmid zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis folgten 45 Sekunden Hitzeschock im 42°C warmen Wasserbad. Es folgten weitere 5 Minuten Inkubation auf Eis. Danach wurden 800 µl eines auf 37°C vorgewärmten SOC Mediums zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zuletzt wurde der Ansatz auf mit Antibiotikum beschichtete LB Lennox Agarplatten ausplattiert und für 24 h bei 37°C inkubiert. Methode nach Inoue (Inoue et al., 1990).

### **9.3. Herstellung elektrokompetenter *S. aureus* RN4220 Zellen**

Nach der Methode nach Schenk und Laddaga (Schenk und Laddaga, 1992) wurde zunächst eine Übernachtskultur des *S. aureus* Stamms RN4220 in B2 Medium bei 37°C angelegt. Aus dieser wurde am nächsten Tag eine frische Kultur (25 ml B2 Medium, Start OD<sub>600</sub> 0,05) beimpft. Nach dem Erreichen der frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> 0,6 – 0,9) folgten mehrere Schritte des Waschens und des Aufkonzentrierens: Zunächst wurden die Zellen bei 8.000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden im gleichen Volumen (25 ml) dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Danach wurden die Zellen in 20% des Ausgangsvolumens (5 ml) 10%iges Glycerin resuspendiert und wieder zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 10% des Ausgangsvolumens (2,5 ml) Glycerin 10% resuspendiert und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert.

Zuletzt wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 800 µl Glycerin 10% resuspendiert. Falls eine DNA Aufnahmen im Sinne einer chromosomalen Integration geplant war, sollten die Zellen sofort zur Elektroporation verwendet werden. Zur Aufnahme von Plasmid DNA konnten die Zellen auch zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, bei -70°C aufbewahrt und später zur Elektroporation verwendet werden.

### **9.4. Elektroporation elektrokompetenter *S. aureus* RN4220 Zellen**

Es wurden 60 µl elektrokompetente Zellen mit der aufzunehmenden DNA vermischt. Prinzipiell gilt: je höher die eingesetzte DNA Menge, desto effektiver die Elektroporation. Je größer jedoch das eingesetzte Volumen, desto mehr Elektrolyte gelangen in den Reaktionsansatz und die Gefahr der Ausbildung eines Lichtbogens steigt. Es wurde daher versucht, ein geringes Volumen (1 – 2 µl) mit hoher DNA Konzentration ( $\geq 1$  µg/µl) einzusetzen.

Der Ansatz wurde in eine Küvette mit 0,1 cm Elektrodenabstand gegeben. Die Zellen wurden bei 2,3 kV, 100 Ohm Widerstand und einer Kapazität von 25  $\mu\text{F}$  elektroporiert. Die optimale Zeitkonstante betrug 2,3 ms. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen in 390  $\mu\text{l}$  auf 37°C vorgewärmtes B2 Medium gegeben und für eine Stunde bei 37° unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf mit Antibiotika versehene Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C für 18-24 h inkubiert. Methode nach Schenk und Laddaga (Schenk und Laddaga, 1992).

### **9.5. Phagentransduktion mittels Bakteriophage $\phi 85$**

Mittels Phagentransduktion können DNA Fragmente und Plasmide zwischen unterschiedlichen *S. aureus* Stämmen ausgetauscht werden. Im ersten Schritt musste die DNA aus dem Donor in Phagen verpackt werden. Der Rezipient, welcher die DNA erhalten sollte, wurde anschließend mit den gewonnenen Phagen behandelt.

#### **9.5.1. Herstellen von Phagenlysat**

Zunächst wurde der Phage  $\phi 85$  in Phagenpuffer verdünnt, wobei Verdünnungen zwischen  $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$  verwendet wurden. Anschließend wurden in eine LB Lennox Übernachtskultur des Donors  $\text{CaCl}_2$  (Zielkonzentration: 5 mM) gegeben. Es wurden je 300  $\mu\text{l}$  Kultur mit 100  $\mu\text{l}$  verdünnten Phagen gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 4 ml 50°C warmes LB Softy Medium zugegeben, vermischt und auf Blutagarplatten gegeben. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte mit der niedrigsten Phagenkonzentration, auf der eine konfluente Bakterienlyse zu erkennen war, weiter verwendet. Die übrigen Platten wurden verworfen.

Im Folgenden wurden zunächst 2 ml Phagenpuffer auf die ausgewählte Platte gegeben, anschließend wurde die LB Softy Schicht, in der sich die Phagen befanden, mit einem Spatel gelöst und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wurde 10 Minuten bei 5.000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde durch einen 0,2  $\mu\text{m}$  Filter gepresst. Das gewonnene Lysat konnte bei 4°C gelagert werden.

#### **9.5.2. Transduktion des Empfängerstamms**

Prinzipiell wurde zur Verbringung in den Empfängerstamm das gleiche Protokoll wie zur Herstellung von Phagenlysat verwendet. Es sollten jedoch folgende Unterschiede beachtet werden: Die Übernachtskultur enthielt den Empfängerstamm. Weiterhin wurde im LB Softy auf  $\text{CaCl}_2$  verzichtet und die Zellen wurden zum Abschluss nicht auf Blutagar sondern auf LB Lennox Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen gebracht. Eine erfolgreich durchgeführte Transduktion ließ sich

phänotypisch durch die eingebrachte Antibiotikaresistenz, genotypisch durch PCR oder Plasmidextraktion überprüfen.

## **10. Quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR)**

Eine quantitative Real Time RT-PCR (qRT-PCR) dient der quantitativen, spezifischen RNA Bestimmung. Es ist somit möglich die Transkriptionsstärke bestimmter Gene zu verschiedenen Zeitpunkten miteinander zu vergleichen.

### **10.1. Isolation von Gesamt-RNA aus *S. aureus***

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit den Puffern RA1, RA2, RNA3 und MDB (Macherey-Nagel-Kit). Zunächst wurden die Zellen aus der Kultur bei 4°C für 2 bis 5 Minuten bei 5.000 x g abzentrifugiert. Um eine ausreichende Anzahl an Bakterien zu erhalten, wurde das Volumen so gewählt, dass es einem Milliliter bei OD<sub>600</sub> von 2 entspricht. Bei der Isolation aus Übernachtskulturen musste das eingesetzte Volumen höher sein, da bei Bakterien aus der stationären Wachstumsphase weniger RNA pro Zelle zur Isolation zur Verfügung steht. Außerdem konnten durch die Messungen der optischen Dichte tote Zellen ohne RNA nicht von lebenden Zellen unterschieden werden.

Der Überstand wurde abgehoben. Die Pellets konnten in diesem Zustand in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet werden. Im Folgenden wurde das Pellet in 100 µl TE Puffer resuspendiert und es wurden 500 µl Puffer RA1 und 5 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Es folgte die Lyse der Zelle im Ribolyser (Bio 101 Thermo Savant Fast Prep 120 Cell Disrupter) für 20 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5, wobei ein Röhrchen der Lysing Matrix B (MP Biomedicals Lysing Matrix B) verwendet wurde. Danach wurde für zwei Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für zwei Minuten bei 15.000 x g. Im Anschluss wurde der Überstand in den Nucleo Spin Filter (violett) eingefüllt und für eine Minute bei 11.000 x g zentrifugiert. Bevor das Lysat auf die RNAII Säule (blau) gegeben werden konnte, mussten 350 µl 70%iger Ethanol zugegeben und durch Pipettieren gemischt werden. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 8.000 x g wurde der Durchlauf verworfen und es wurden 350 µl Puffer MDB auf die Membran gegeben. Der Durchlauf wurde nach einer Minute bei 11.000 x g verworfen und das Röhrchen wurde erneut für 30 Sekunden bei 11.000 x g zentrifugiert. Zum Abbau der Desoxynukleinsäuren wurden 10 µl DNase I Lösung zu 90 µl Reaktionspuffer gegeben, durch Anschneiden gemischt und 95 µl dieser Mischung auf die Säulenmembran gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Puffer RA2 auf die Membran gegeben und 30 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein neues Sammelgefäß gestellt, es wurden 600 µl Puffer RA3 zugegeben und 30



Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen anschließend wurden erneut 250 µl Puffer RA3 auf die Säule gegeben und zwei Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchlaufs wurde für weitere zwei Minuten bei 11.000 x g zentrifugiert. Zum Lösen der RNA von der Säule wurde diese in ein RNase freies Reaktionsgefäß gestellt und es wurden 44 µl RNase freies Wasser auf die Membran gegeben. Nach einer letzten Zentrifugation von einer Minute bei 11.000 x g befand sich die isolierte RNA gelöst im Reaktionsgefäß, die Säule konnten verworfen werden.

### **10.2. DNase -Verdau zur Entfernung letzter DNA Reste**

Um letzte DNA Reste aus der RNA zu entfernen, folgte nach der RNA-Isolation eine weitere Behandlung mit DNase I. Es kam hierzu das Turbo DNase Kit (Invitrogen) zum Einsatz. Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Pipettierschema zusammengestellt.

RNA	44µl
Puffer (10x)	5µl
Dnase	1µl
<b>Gesamt</b>	<b>50µl</b>

Der Ansatz wurde bei 37°C unter leichtem Schütteln für etwa 20 Minuten inkubiert. Zuletzt wurde 1 µl DNase Inactivation-Reagenz zum Ansatz gegeben und der Ansatz bei 10.000 x g für 90 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand, der die gereinigte RNA enthielt, konnte in ein neues Gefäß überführt werden und sollte sofort bei -70°C eingefroren oder - bei weiterer Verwendung - auf Eis gelagert werden.

### **10.3. Agarose Gelelektrophorese zur RNA Darstellung**

Ein RNA Gel wurde im Gegensatz zum DNA Gel nicht zur Darstellung spezifischer Fragmente, sondern zur Beurteilung der Qualität der RNA vor der weiteren Verwendung eingesetzt.

RNA Gele bestanden aus 1% Agarose und 1 x MOPS Puffer (z. B. 5 ml MOPS der 10 x Stammlösung bei 50 ml Gel) vermischt mit Wasser. Beides wurde in einem Glaskoben mit 90 % des Endvolumens an Wasser vermischt und aufgeköcht. Der Kolben wurde dann in einem Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Zuletzt wurden 10% des Endvolumens an Formaldehyd zugegeben und das Gel wurde in seine Form gegossen. Es wurden 10 µl RNA mit 18 µl Probenpuffer für 10 Minuten bei 55 – 60 °C denaturiert anschließend wurde 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml Stammlösung) zugegeben. Das Gel wurde bei 100 V für mindestens 60 Minuten dem elektischen Feld ausgesetzt. Als Puffer in der Gelkammer wurde MOPS – Puffer (1 x) sowie dH<sub>2</sub>O verwendet.

#### 10.4. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wurde die isolierte RNA mittels Reverser Transkriptase zu cDNA umgeschrieben, welche im Anschluss mittels qRT-PCR quantifiziert werden konnte. In dieser Studie wurde das High Capacity Reverse Transkriptase Kit (ABI) verwendet.

Zunächst wurde die Konzentration der isolierten RNA photometrisch gemessen. Es wurde pro Ansatz 1 µg RNA eingesetzt, das eingesetzte RNA Volumen richtete sich nach der RNA Konzentration.

Der Ansatz wurde nach folgendem Pipettierschema erstellt.

10x RT Puffer	6µl
25x dNTP	2,5µl
10x Random Primer	6µl
Reverse Transkriptase	3µl
RNase out	0,75µl
Wasser (dH <sub>2</sub> O)	11,75µl - 41,25µl
RNA	0,5 - 30µl
<b>Gesamt</b>	<b>60µl</b>

Die Einstellungen am Thermocycler wurden entsprechend Herstellerangaben vorgenommen. Nach erfolgreichem Umschreiben wurde die cDNA im Verhältnis 1:2 weiter verdünnt, sodass die cDNA nun in einer Konzentration von 8,33 ng/µl vorlag.

#### 10.5. Real Time PCR

Zur Durchführung der Real Time PCR wurde das Light Cycler 2.0 System (Roche) mit 20 µl Kapillaren und das QuantiFast SYBR Green Kit (Quiagen) verwendet. Der Ansatz wurde nach folgendem Pipettierschema hergestellt.

<b>Ansatz</b>		
cDNA	2,5µl	entspricht 1ng/µl aus 8,33ng/µl Stammlösung
Primer fwd	0,6µl	entspricht 0,3µM aus 10 pmol/µl Stammlösung
Primer rew	0,6µl	entspricht 0,3µM aus 10 pmol/µl Stammlösung
2x Sybr Green Master Mix	10µl	
Wasser (dH <sub>2</sub> O)	6,3µl	
<b>Gesamt</b>	<b>20µl</b>	

Am Light Cycler 2.0 System wurden folgende Einstellungen vorgenommen.

Durchführung	Zyklen	Zeit	Temperatur	Anstieg/Abfall	Messung
Denaturierung	1	10 min	95°C	20°C/sek	keine
Annealing/Amplifikation	40	10 sek	95°C	20°C/sek	keine
		30 sek	60°C	20°C/sek	einfach
Schmelzkurve	1	0 sek	95°C	20°C/sek	keine
		1 min	65°C	20°C/sek	keine
		0 sek	95°C	0,1°C/sek	kontinuierlich
Kühlung	1	30 sek	40°C	20°C/sek	keine

Alle Ansätze wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. Als Referenzgen zur relativen Quantifizierung wurde das für die Gyraseuntereinheit B kodierende Gen *gyrB* verwendet. Es wurden außerdem Negativkontrollen mit dH<sub>2</sub>O angesetzt und es wurde eine RNA Probe, welche nicht mit Reverser Transkriptase behandelt wurde, in der Zielkonzentration 1 ng/μl eingesetzt, um zu bestätigen, dass die vorangegangene DNase Behandlung vollständig war.

Die Auswertung erfolgte entsprechend der  $\Delta\Delta CT$  Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Die Zykluszahl wurde zunächst auf die Menge an *gyrB* der entsprechenden Probe angeglichen, anschließend wurden die gleichen Gene zu unterschiedlichen Messzeitpunkten verrechnet. Das Ergebnis ist ein Faktor, welcher die Menge an RNA eines Gens zu unterschiedlichen Messzeitpunkten wiedergibt.

### 11.σ<sup>H</sup> Induktionsstämme (TF1, TF2)

Zunächst wurden der Cadmium-induzierbare Promotor aus dem Plasmid pCN44 (Charpentier et al., 2004) und der für den offenen Leseraster kodierende Teil des *sigH*-Gen aus dem *S. aureus* Wildtyp N315 mittels PCR amplifiziert (Primer: Pcad fwd, Pcad rew beziehungsweise SigH fwd, SigH rew).

Es folgte die Behandlung des Plasmides pBus1 und des per PCR amplifizierten Promotorfragments *Pcad* mit den Restriktionsenzymen KpnI und EcoRI. Das Plasmid wurde dephosphoriliert und das Fragment wurde durch Ligation in das Plasmid gebracht. Nach Transformation, Vermehrung, Extraktion und analytischem Verdau wurden Plasmid und das für das offene Leseraster von *sigH* kodierende Fragment mit EcoRI und BamHI behandelt und das *sigH* Fragment so hinter den Cadmium-induzierbaren Promotor kloniert und hierdurch unter dessen Kontrolle gestellt. Es folgten erneut Transformation, Vermehrung und Extraktion und analytischer Verdau.

Das entstandene Plasmid pTF8 wurde anschließend durch Elektroporation in den *S. aureus* Stamm RN4220 gebracht und von dort mittels Phagentransduktion weiter in den *S. aureus* Wildtyp Newman HG.

## 12. Reporterstämme

Die Messungen von Fluoreszenz und Lumineszenz wurden in einem Perkin Elmer Victor2 Multilabel Counter in einer 96x Mikrotiterplatte durchgeführt. Die Messzeit der Lumineszenz betrug 5 Sekunden, die gemessenen Werte wurden zum Konzentrationsausgleich durch die zum selben Messzeitpunkt ermittelte OD<sub>600</sub> geteilt.

### 12.1. Integration des *green fluorescent protein (gfp)* Reportergens unter der Kontrolle des *SA1418* Promotors in das Genom von *S. aureus*.

Es wurden zunächst die Fragmente mit den Primern *gfpmut2 fwd* und *gfpmut2 rev* aus dem Plasmid pCN56 (Charpentier et al., 2004), sowie mit *Psa1418 fwd* und *Psa1418 rew*, bzw. *Psa1418reg+ fwd* und *Psa1418reg+ rew* aus *S. aureus* N315 amplifiziert.

Im Plasmid pBT wurden anschließend die amplifizierten, verschieden langen Promotorregionen des *SA1418* Gens P<sub>1418</sub> (300 bp) bzw. P<sub>1418reg+</sub> (600 bp), welche die natürliche  $\sigma^H$  Bindestelle und originale ribosomale Bindestelle (RBS) enthalten, vor das Reportergen *gfpmut2* kloniert.

Das Plasmid wurde nach jeder Ligation im *E. coli* Laborstamm DH5 $\alpha$  vermehrt. Das P<sub>1418</sub>-*gfpmut2* Fragment wurde durch Restriktionsverdau mit KpnI und BamHI aus dem Plasmid pBT1 gelöst, mittels eines Agarosegels isoliert und in das Plasmid pEC1 kloniert. Es entstanden die Plasmide pTF1 mit kurzer *SA1418*-Promotorregion (ca. 300bp) und pTF2 mit einer längeren Sequenz der Promotorregion (ca. 700bp). Durch die Sall Schnittstelle blieb das originale Startcodon TTG im Reportersystem erhalten. Da im Plasmid *pEC1* keine solche Schnittstelle vorlag, musste die Fusion von P<sub>1418</sub> und *gfpmut2* bzw. P<sub>1418reg+</sub> und *gfpmut2* im Plasmid pBT stattfinden. Die fertigen Plasmide wurden anschließend mittels Elektroporation in das Genom von *S. aureus* RN4220 integriert. Entscheidend hierfür war das Fehlen eines in Gram-positiven Bakterien funktionalen „origin of replication“ (*ori*) auf dem Plasmid: Nach Elektroporation ging DNA, welche nicht in die chromosomale DNA integriert wurde, verloren.

Eine chromosomale Integration gelang nur mit dem Plasmid pTF2, es entstand der Stamm TF3. Die korrekte Integration des Plasmides wurde mittels Extraktion der chromosomalen DNA sowie anschließender Amplifikation des integrierten Fragmentes überprüft.

### **12.2. *gfp* Reporter gen unter der Kontrolle des SA1418 Promotors als replikatives Plasmid in *S. aureus***

Es wurde ein Plasmid konstruiert, welches in multiplen Kopien frei in der Bakterienzelle vorliegt und stark repliziert wird. Es wurde hierzu das bereits klonierte P<sub>1418</sub> – *gfp*-Fragment, bzw P<sub>1418reg+</sub>-*gfp* aus pBT (identische Schnittstellen zum vorangegangenen Ansatz) ausgeschnitten, über ein Agarosegel isoliert und in das vorverdaute und dephosphorylierte Plasmid pCN56 (Charpentier et al., 2004) eingesetzt. Im Gegensatz zu pEC1 enthält pCN56 mit pT181 *cop623 repC* einen *ori*, der von *S. aureus* erkannt wird. Die Vermehrung erfolgte in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Anschließend wurden die entstandenen Plasmide pTF3 (300bp Promotorsequenz) und pTF4 (700bp Promotorsequenz) in den *S. aureus* Laborstamm RN4220 elektroporiert (Stämme TF4 und TF5).

### **12.3. *Luciferase/gfp* Reportergene unter der Kontrolle des SA1418 Promotors als replikatives Plasmid in *S. aureus***

In diesem Ansatz wurde das Plasmid pSB2035 als Ausgangsplasmid (Qazi et al., 2001) herangezogen. Dieses Plasmid setzte sich aus mehreren Reportersystemen zusammen: es befand sich das *luxABCDE* Operon und ein translationsoptimiertes *gfp*. Das Plasmid wurde mit EcoRI und SmaI verdaut. Es folgte eine Auftrennung mittels Agarosegel, das lineare Plasmid ohne Promotor wurde extrahiert. Anschließend wurde das P<sub>1418-2</sub>-Fragment mit den Primern Psa1418-2 fwd und Psa1418-2 rew amplifiziert. Das amplifizierte Fragment (700 bp) wurde mit SmaI und EcoRI behandelt und in das extrahierte Plasmid ligiert. Es entstand das Plasmid pTF7. Es folgten Vermehrung und Extraktion in *E. coli*. Das Plasmid wurde anschließend mittels Elektroporation in den *S. aureus* Stamm RN4220 gebracht (TTF6) und von dort mittels Phagentransduktion weiter in den *S. aureus* Wildtyp Newman HG (TF12). Die korrekte DNA Aufnahme in die *S. aureus* Stämme wird mittels Plasmidextraktion und anschließendem analytischem Verdau sichergestellt.

### **13. Stämme zur Testung der Reporterfunktionalität**

Um das richtige Ansprechen des Reportersystems zu überprüfen, wurden die Stämme TF3, TF4, TF5 und TF6 elektrisch kompetent gemacht und das  $\sigma^H$  Induktionsplasmid pTF8 wurde zusätzlich in die Stämme elektroporiert. Es entstanden die Stämme TF7 bis TF10. Zusätzlich wurde der Kontrollstamm TF11 hergestellt, dieser enthielt statt des  $\sigma^H$  Induktionsplasmides das Plasmid pBus1.

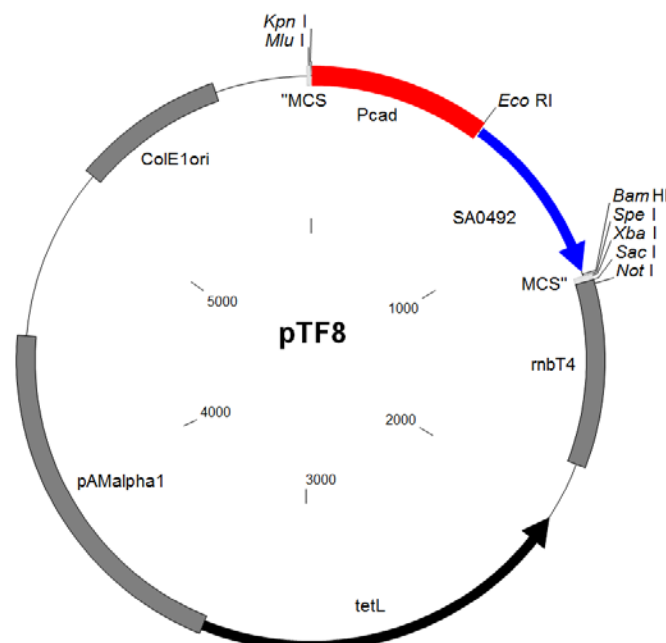
## IV. Ergebnisse

### 1. Regulationsmechanismen des $\sigma^H$ Regulons

Als  $\sigma^H$ -abhängige Gene wurden bisher die Gene *SA1374* und *SA1418* identifiziert, deren Transkription durch diesen Sigma-Faktor positiv beeinflusst wird (Morikawa et al., 2003). 2010 wurde von Tao und Kollegen die Integrase (*int*) als weiteres  $\sigma^H$ -abhängiges Gen identifiziert (Tao et al., 2010). Jüngste Untersuchungen, die erst nach Abschluss der experimentellen Phase dieser Arbeit veröffentlicht wurden, weisen darauf hin, dass noch wenige weitere Gene bzw. einige Gegenstrangtranskripte durch diesen alternativen Sigma-Faktor direkt kontrolliert werden (Fagerlund et al. 2014).

### 2. Bestimmung der Abhängigkeit von Genen des $\sigma^H$ Regulons mittels Überexpression von *sigH*

Um das Ansprechen der Zielgene *in vivo* untersuchen zu können, wurde in einem ersten Schritt ein Vektor zur Überexpression von  $\sigma^H$  hergestellt. Hierzu wurde ein mit Cadmium induzierbarer Promotor (*Pcad*) mit dem offenen Leseraster (OLR) des *sigH* Gens fusioniert. Im *sigH* Gen wurde dabei die ursprüngliche ribosomale Bindestelle (RBS) durch die typische Sequenz 5'AGGAGGG3' ersetzt. Weiterhin wurde das ursprüngliche Startcodon „TTG“ durch „ATG“ ersetzt, beides um eine möglichst starke Translation des *sigH* Transkriptes zu induzieren und somit möglichst viel aktives Protein zu erhalten.

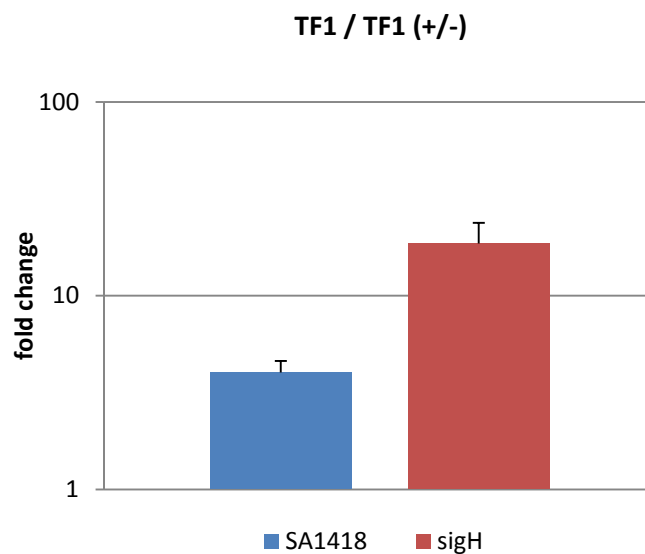


**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Induktionsplamides pTF8.** In das Ausgangsplasmid pBus1 wurden ein Cadmium induzierbarer Promotor *Pcad* (Charpentier et al., 2004) mit den Schnittstellen KpnI und EcoRI sowie der für das offene Leseraster kodierende Teil des *sigH*-Gen aus dem *S. aureus* Wildtyp N315 mit den Schnittstellen EcoRI und BamHI kloniert. Das Plasmid enthält eine Tetracyclin Resistenzkassette.

## 2.1. Induktion von $\sigma^H$ im Laborstamm RN4220

### 2.1.1. Vergleich Induktionsstamm induziert vs. nicht induziert

Zunächst wurde das *Pcad-sigH* Plasmid (pTF8) in den *S. aureus* Laborstamm RN4220 gebracht (Stamm TF1). Dieser wurde unter Antibiotikaselektion in LB Medium als Übernachtskultur herangezogen. Nach Überimpfung in frisches LB Medium wurde nach drei Stunden Wachstum ohne Antibiotikum eine Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  Cadmium im Medium eingestellt und die Zellen nach weiteren 1,5 Stunden, insgesamt 4,5 Stunden, geerntet. Die Expression von *sigH* und des  $\sigma^H$ -abhängigen Gens *SA1418* wurden mittels quantitativer Real Time RT-PCR (qRT-PCR) entsprechend der  $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode (Livak und Schmittgen, 2001) analysiert (Abbildung 4).

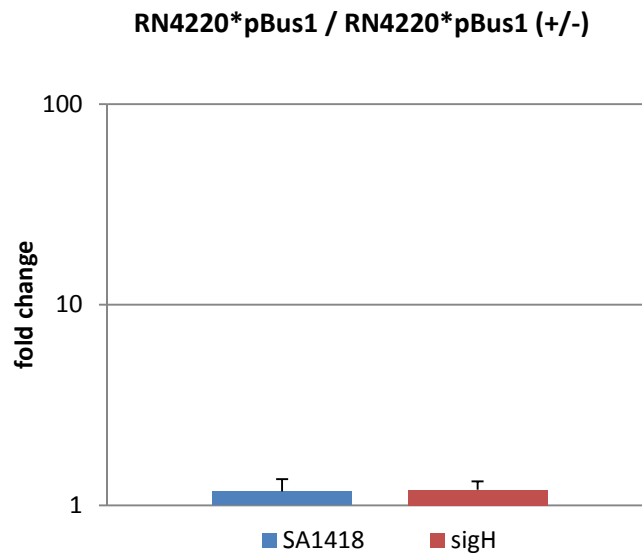


**Abbildung 4: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH* und *SA1418* in TF1 nach Induktion der *sigH* Transkription durch Cadmium.** Eine der beiden dreistündigen TF1 Kulturen in TSB wurde mit 5  $\mu\text{M}$  Cadmium versetzt und im Anschluss für weitere 90 Minuten wie zuvor inkubiert, bevor Proben für die RNA-Extraktion entnommen wurden. Die relativen Transkriptmengen an *sigH* und *SA1418* wurden per qRT-PCR bestimmt und auf das house-keeping Gen *gyrB* normiert. Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptmengen in Relation zu der unbehandelten Kontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Es zeigte sich, dass die Induktion der *sigH* Transkription durch Cadmium Zugabe eine Steigerung des *sigH* Transkripts um den Faktor  $18,6 \pm 5,2$  eine Transkriptionssteigerung von *SA1418* um den Faktor  $4,0 \pm 0,6$  auslöst.

### 2.1.2. Vergleich Kontrollstamm induziert vs. nicht induziert

Um eventuelle Einflüsse von Cadmium direkt auf die  $\sigma^H$  Aktivität, bzw. auf die Transkription der  $\sigma^H$ -Zielgene auszuschließen, wurden die *sigH* und *SA1418* Transkriptmengen zusätzlich in einem RN4220 Derivat, das ein leeres pBus1 Plasmid enthält (RN4220\*pBus1), mit und ohne Cadmiumzusatz bestimmt (Abbildung 5).



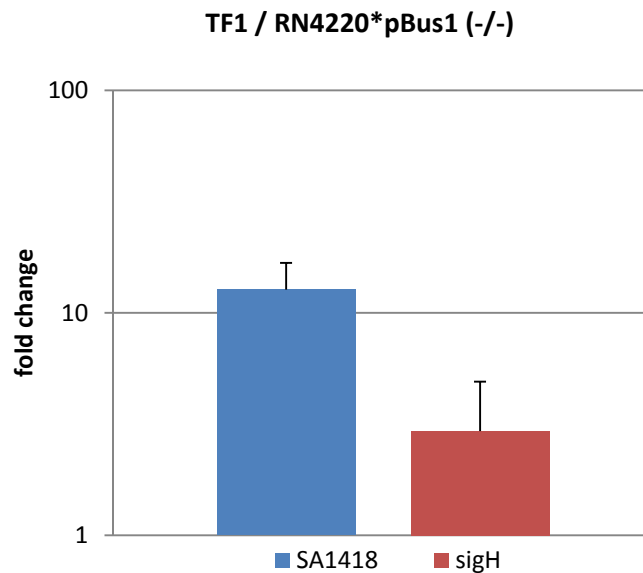
**Abbildung 5: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH* und *SA1418* einem *S. aureus* RN4220, welcher das Plasmid pBus1 enthält nach Zugabe von Cadmium.** Analog des obigen genannten Ansatzes wurde eine der beiden dreistündigen Kulturen in TSB mit 5  $\mu$ M Cadmium versetzt, nach weiteren 90 Minuten in Kultur erfolgte die Bestimmung der relativen Transkriptmengen an *sigH* und *SA1418* per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptmengen in Relation zu der unbehandelten Kontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

In diesen Versuchen konnte nach Zugabe von Cadmium keine relevante Veränderung der *sigH* (Faktor:  $1,2 \pm 0,1$ ) und *SA1418* (Faktor  $1,2 \pm 0,2$ ) Transkription beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden darf, dass die alleinige Zugabe von Cadmium in RN4220 keinen Einfluss auf die Transkription dieser Gene hat.



### 2.1.3. Vergleich Induktionsstamm vs. Kontrollstamm nicht induziert

Induzierbare bakterielle Promotorsysteme weisen in der Regel auch ohne Aktivator eine basale Grundexpression auf. Daher wurde im nächsten Ansatz untersucht, wie stark der  $P_{cad}$  Promotor auch ohne Cadmiumzugabe die Transkription von *sigH* und *SA1418* in TF1 beeinflusst.

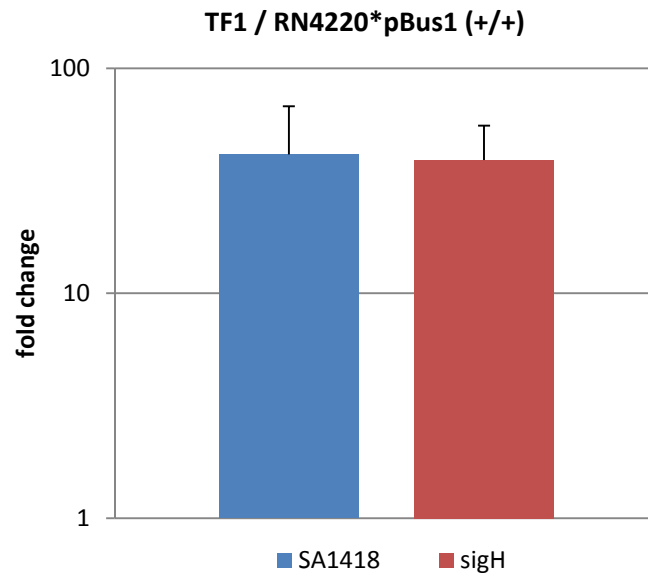


**Abbildung 6: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH* und *SA1418* im Stamm TF1 verglichen mit einem *S. aureus* RN4220 Derivat, welches das Plasmid pBus1 enthält ohne Cadmium Induktion.** Probenentnahme nach 4,5 Stunden Wachstum in TSB Medium ohne Zusatz von Cadmium. Bestimmung der relativen Transkriptmengen an *sigH* und *SA1418* per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Dargestellt sind die relativen Unterschiede der Transkriptmengen in beiden Stämmen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Bei dem Vergleich der relativen *sigH* und *SA1418* Transkriptmengen in RN4220 \* pBus1 und TF1 konnten klare Unterschiede detektiert werden (Abbildung 6). Auch ohne Cadmiumzugabe war dabei in TF1 eine Erhöhung des *sigH* Transkriptes um den Faktor  $2,9 \pm 2,0$  messbar. Dieser Anstieg der *sigH* Transkription führte zu einer Steigerung der *SA1418* Transkriptmenge um den Faktor  $12,7 \pm 4,1$ .

#### 2.1.4. Vergleich Induktionsstamm vs. Kontrollstamm induziert

Im Anschluss wurde die Transkription von induziertem  $\sigma^H$  im Stamm TF1 mit dem Kontrollstamm (RN4220\*pBus1), welcher ebenfalls in Anwesenheit von Cadmium angezogen wurde, verglichen (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH* und *SA1418* im Stamm TF1 verglichen mit einem *S. aureus* RN4220, welcher das Plasmid pBus1 enthält nach Induktion in beiden Stämmen durch Cadmium.** Nach dreistündigem Wachstum in TSB Medium erfolgte die Zugabe von 5  $\mu$ M Cadmium in beide Kulturen. Probenentnahme und Bestimmung der relativen Transkriptmengen an *sigH* und *SA1418* nach weiten 90 Minuten Wachstum per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Dargestellt sind die relativen Unterschiede der Transkriptmengen in beiden Stämmen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Es zeigte sich eine maximale Transkriptionssteigerung von *sigH* um den Faktor  $41,4 \pm 26,4$ , die Transkription im Zielgen wurde ebenfalls um den Faktor  $39,1 \pm 16,5$  gesteigert.

### 2.1.5. Einfluss von Cadmium auf das Wachstum von RN4220

In höheren Konzentrationen ist Cadmium für *S. aureus* ein toxisches Element, eine Wachstumsbeeinträchtigung war im Stamm RN4220 ab einer Konzentration von 15 µM sichtbar (Charpentier et al., 2004). Um sicherzustellen, dass eine Cadmiumkonzentration von 5 µM keinen gravierenden Einfluss auf das Wachstum der Zellen ausübt, wurde das Wachstum der Kulturen mit und ohne Cadmiumzusatz verglichen. Hierbei zeigten sich allenfalls geringe Unterschiede in der Zelldichte nach 4,5 Stunden Wachstum (Tabelle 1).

	<b>OD<sub>600</sub></b>	<b>SD</b>
TF1 induziert	1,255	0,17
TF1	1,38	0,20
RN4220*pBus1 induziert	1,225	0,06
RN4220*pBus1	1,275	0,10

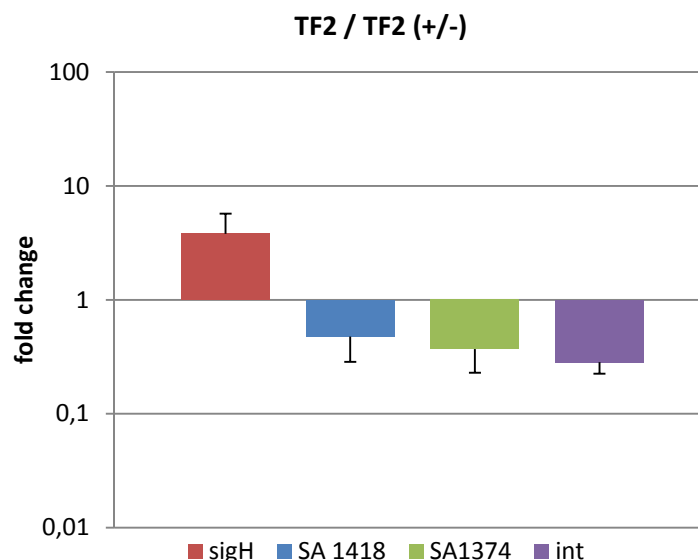
**Tabelle 1: Einfluss von Cadmium auf das Wachstum der verwendeten Stämme.** Nach Wachstum in einer Übernachtskultur unter Antibiotikaselektion erfolgte das Animpfen der Hauptkultur auf eine Start OD<sub>600</sub> von 0,05 in vorgewärmtes TSB Medium. Das Wachstum erfolgte bei 37°C und 150 Umdrehungen pro Minute (UpM) ohne Antibiotikaselektion. Je nach Ansatz wurde 5µM Cadmium nach drei Stunden Wachstum zum *S. aureus* Kontrollstamm RN4220, welcher das Plasmid pBus1 enthält und zum Induktionsstamm TF1 zugegeben. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive der Standardabweichungen.

## 2.2. Induktion von $\sigma^H$ im *S. aureus* Wildtyp Newman HG

Im nächsten Schritt wurde der Ansatz mit dem *S. aureus* Stamm Newman HG (Herbert et al., 2010) wiederholt. Analog zum vorangegangenen Ansatz wurde das Plasmid pTF8 in den *S. aureus* Stamm Newman HG eingebracht (Stamm TF2). Zur Kontrolle wurde ein leeres pBus1 (Ausgangsvektor) in den Stamm Newman HG gebracht (Newman HG\*pBus1).

### 2.2.1. Vergleich Induktionsstamm induziert vs. nicht induziert

Zunächst wurde der Unterschied zwischen induziertem und nicht induziertem Überexpressionsstamm untersucht. Es wurde die RNA Konzentration der Gene *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* mittels qRT-PCR gemessen.

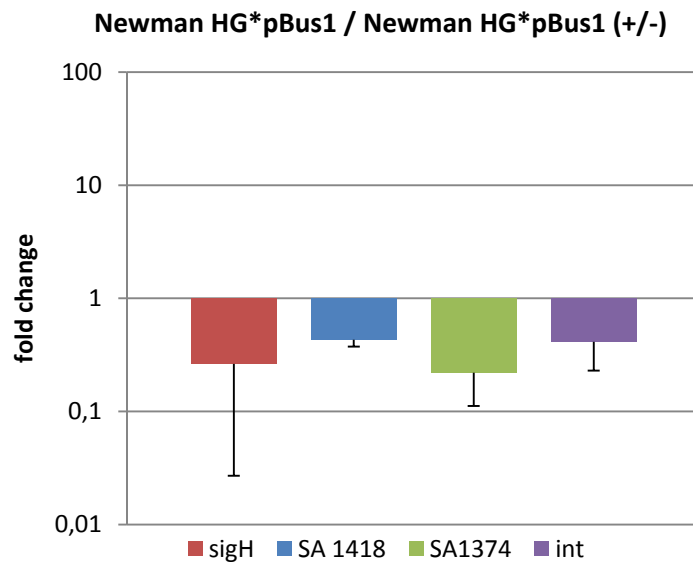


**Abbildung 8: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* im Stamm TF2 nach Induktion der *sigH* Transkription durch Cadmium.** Nach dreistündigem Wachstum in TSB Medium erfolgt die Zugabe von 5  $\mu$ M Cadmium in eine der beiden Kulturen. Probenentnahme und Bestimmung der relativen Transkriptmengen an *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* nach weitem 90 Minuten Wachstum per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptmengen in Relation zu der unbehandelten Kontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Die Induktion der *sigH* Transkription per Cadmiumzugabe (5  $\mu$ M) führte in TF2 zu einer Steigerung der *sigH* Transkriptmenge um den Faktor  $3,8 \pm 1,9$ . Bemerkenswerterweise führte diese Zunahme an *sigH* mRNA in TF2 jedoch nicht, wie zuvor bei TF1 gesehen, zu einer Steigerung der Transkriptmengen der Zielgene, sondern zu einem Abfall der Transkriptionsraten (*SA1418*:  $0,5 \pm 0,2$ , *SA1374*:  $0,4 \pm 0,1$ , *int*:  $0,3 \pm 0,1$ ). (Abbildung 8).

### 2.2.2. Vergleich Kontrollstamm induziert vs. nicht induziert

Im nächsten Schritt wurde analog der Einfluss von Cadmium auf die Transkription von *sigH* und der Zielgene untersucht. Hierzu wurde die Genexpression des Kontrollstamms Newman HG\*pBus1 mit und ohne Cadmium untersucht.

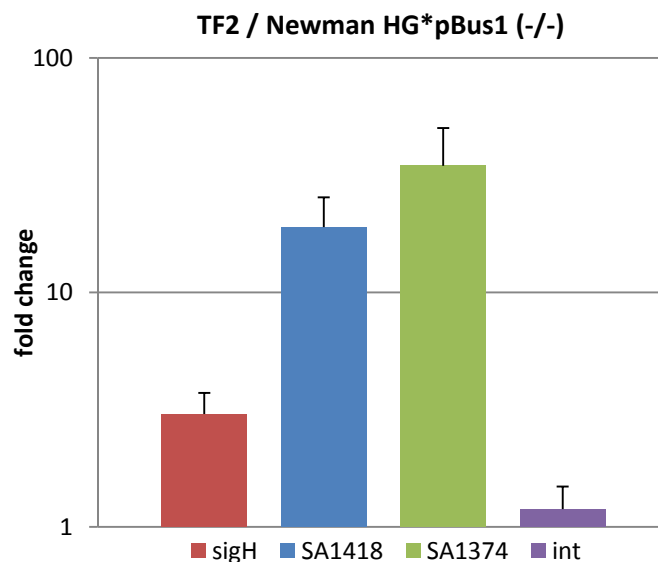


**Abbildung 9: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* einem *S. aureus* Newman HG Derivat, welcher das Plasmid pBus1 enthält nach Zugabe von Cadmium.** Nach dreistündigem Wachstum in TSB wurde eine der beiden Kulturen mit 5  $\mu$ M Cadmium versetzt, nach weiteren 90 Minuten in Kultur erfolgte die Bestimmung der relativen Transkriptmengen an *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Dargestellt sind die Unterschiede der Transkriptmengen in Relation zu der unbehandelten Kontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Im *S. aureus* Stamm Newman HG besitzt die Exposition gegenüber Cadmium einen größeren Einfluss auf die Genexpression, als dies im Laborstamm RN4220 der Fall ist. Die Transkription von *sigH* und der Zielgene war bei Cadmiumexposition reduziert: *sigH*:  $0,3 \pm 0,2$ , *SA1418*:  $0,4 \pm 0,1$ , *SA1374*:  $0,2 \pm 0,1$  und *int*:  $0,4 \pm 0,2$  (Abbildung 9).

### 2.2.3. Vergleich Induktionsstamm vs. Kontrollstamm nicht induziert

Im Anschluss wurde untersucht, wie sich die Transkription von *sigH* und der  $\sigma^H$  Zielgene im nicht induzierten Überexpressionsstamm TF2 im Vergleich zum Kontrollstamm Newman HG verhält.



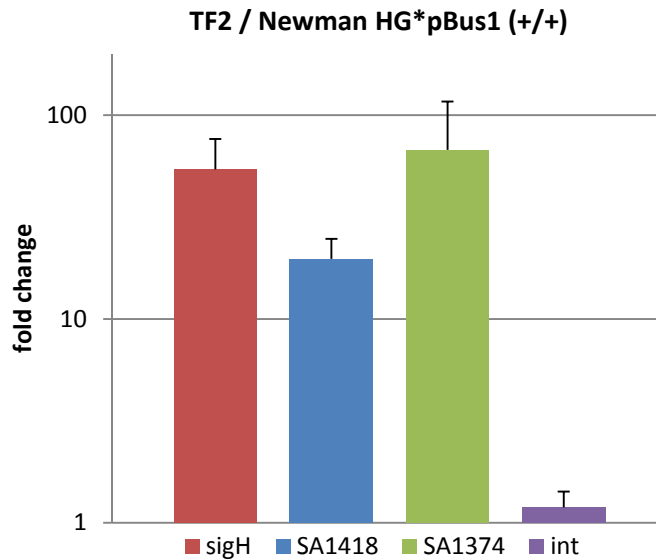
**Abbildung 10: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* im Stamm TF2 verglichen mit einem *S. aureus* Newman HG Derivat, welches das Plasmid pBus1 enthält, ohne Cadmium Induktion.**

Probenentnahme nach 4,5 Stunden Wachstum in TSB Medium ohne Zusatz von Cadmium. Bestimmung der relativen Transkriptmengen an *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Dargestellt sind relative Unterschiede der Transkriptmengen beider Stämme. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Hier zeigte sich, dass das Vorhandensein von Plasmid pTF8 im Stamm Newman HG, ähnlich wie zuvor im RN4220 Derivat TF1 beobachtet, schon in Abwesenheit von Cadmium zu einem Anstieg an *sigH* mRNA von  $3,0 \pm 0,7$  führt, der eine starke Transkriptionssteigerung der Zielgene *SA1418* und *SA1374* um den Faktor  $19 \pm 6,4$  bzw. ca.  $34,7 \pm 15,6$  induzierte. Die Transkription des Integrase Gens *int* hingegen wurde kaum beeinflusst (Faktor von  $1,19 \pm 0,3$ ) (Abbildung 10).

#### 2.2.4. Vergleich Induktionsstamm vs. Kontrollstamm induziert

Im nächsten Schritt wurde der maximale *sigH* abhängige Effekt abgebildet. Hierzu wurden sowohl der Stamm TF2, als auch der *S. aureus* Kontrollstamm mit Cadmium induziert.

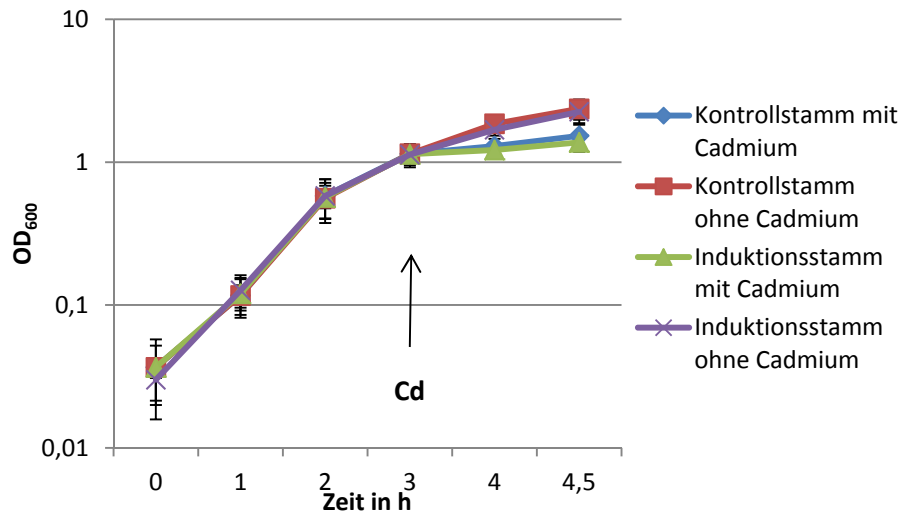


**Abbildung 11: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* im Stamm TF2 verglichen mit einem *S. aureus* Newman HG, welcher Plasmid pBus1 enthält nach Induktion in beiden Stämmen durch Cadmium.** Nach dreistündigem Wachstum in TSB Medium erfolgte die Zugabe von 5  $\mu$ M Cadmium in beide Kulturen. Probenentnahme und Bestimmung der relativen Transkriptmengen nach weiteren 90 Minuten Wachstum an *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Dargestellt sind die relativen Unterschiede der Transkriptmengen beider Stämme. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Durch den Cadmium-induzierten starken Anstieg der *sigH* Transkription von  $54,2 \pm 22,2$  ließ sich die Transkription der Zielgene nicht entsprechend proportional steigern. Die Transkriptionssteigerung von *SA1418* war mit  $19,4 \pm 5$  gleichbleibend zum vorangegangenen Experiment, bei *SA1374* ist die Steigerung mit  $67,5 \pm 49,1$  ca. doppelt so hoch wie im vorangegangenen Experiment (Abbildung 11).

### 2.2.5. Einfluss von Cadmium auf das Wachstum von *S. aureus*

Analog zu den Ansätzen des Stamms TF1 wurden die Auswirkungen von Cadmium auf das Wachstum des *S. aureus* Newman HG untersucht.



**Abbildung 12: Einfluss von Cadmium auf das Wachstum der verwendeten Stämme.** Nach Wachstum in einer Übernachtskultur unter Antibiotikaselektion erfolgte das Animpfen der Hauptkultur auf eine Start  $OD_{600}$  von 0,05 in vorgewärmtes TSB Medium. Das Wachstum erfolgte bei 37°C und 150 Umdrehungen pro Minute (UpM) ohne Antibiotikaselektion. Je nach Ansatz wurde 5  $\mu$ M Cadmium nach drei Stunden Wachstum zum *S. aureus* Kontrollstamm Newman HG, welcher das Plasmid pBus1 enthält und zum Induktionsstamm TF2 zugegeben. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive der Standardabweichungen.

Der Zusatz von 5  $\mu$ M Cadmium im *S. aureus* Stamm Newman HG hatte ein verlangsamtes Wachstum zur Folge (Abbildung 12).



### **3. Messung der Aktivität der Promotorregion des $\sigma^H$ abhängigen Gens SA1418 mittels Green Fluorescent Protein (Gfp) und Luciferase (Luc).**

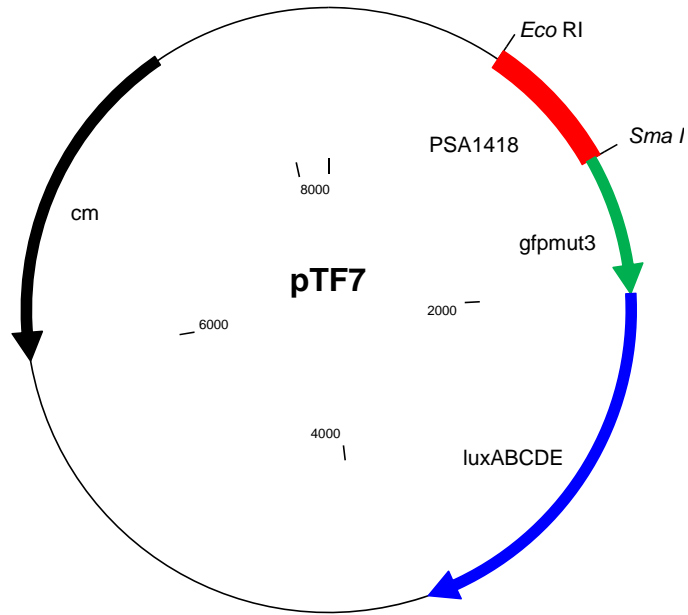
Zur Herstellung eines Reportersystems, welches die Aktivität des SA1418 Promotors anzeigt, wurden verschiedene Ansätze getestet.

#### **3.1. SA1418-GFP Reporterkonstrukte**

Zunächst wurde die SA1418 Promotorregion mit dem offenen Leseraster des für Gfp kodierenden Gens *gfp* fusioniert. Hier sollte durch die in Zellkultur gemessene Fluoreszenz von Gfp eine Aussage über Translationsstärke von SA1418 getroffen werden. Die *gfp* Reporterkonstrukte enthielten die natürliche RBS und das natürliche Startcodon des SA1418 Gens. Die im Material- und Methodenteil beschriebenen *gfp* Reporterkonstrukte (Stämme TF7-TF9) zeigten, wenn überhaupt, nur eine geringe Aktivität, die nicht eindeutig von der Hintergrundfluoreszenz des Assays unterscheidbar war (Daten nicht gezeigt). Diese Stämme wurden nicht weiter verwendet.

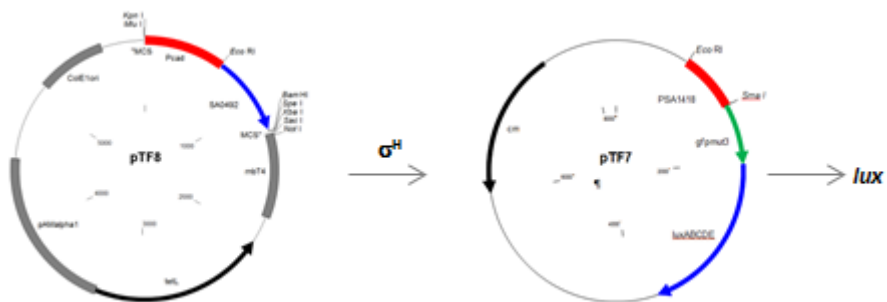
#### **3.2. SA1418-Luciferase Reporterkonstrukt**

Als Ausgangsvektor wurde das Plasmid pSB2035 (Qazi et al., 2001) verwendet. Hier stehen die Reportergene *gfp* und *luxABCDE* unter der Kontrolle des *agr* P3 Promotors. Die Gene liegen bereits in translations- und transkriptionsoptimierter Form vor (Startcodon und RBS). Der vorhandene Promotor in pSB2035 wurde gegen die Promotorregion von SA1418 ausgetauscht.



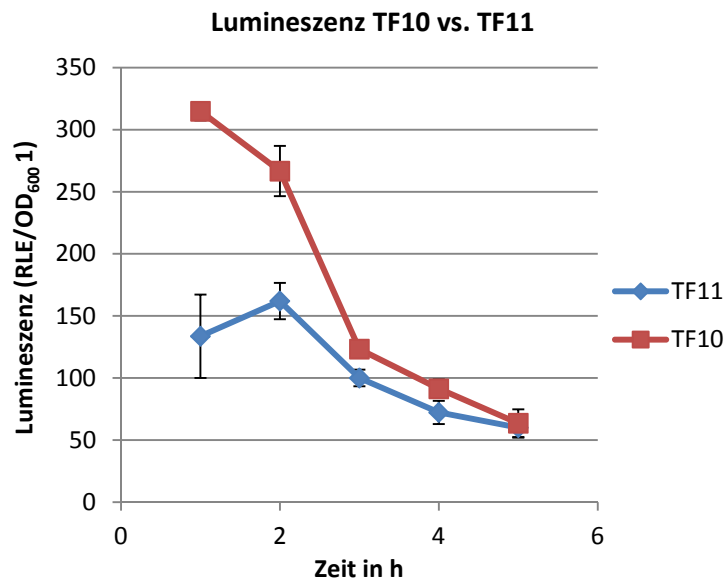
**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Reporterplasmides pTF7.** In das Ausgangsplasmid pSB2035 (Qazi et al., 2001), welches bereits die Reportergene *gfpmut3* und *luxABCDE* enthält wurde mittels der Schnittstellen *EcoRI* und *SmaI* eine ca. 700 bp lange Sequenz der Promotorregion des *SA1418* Gens vorgeschaltet. Das Plasmid enthält eine Chloramphenicol Resistenzkassette.

In dem entstandenen Plasmid (pTF7) stehen nun die Reportergene *gfp* und *luxABCDE* unter der Kontrolle der  $\sigma^H$  abhängigen Promotorsequenz des Gens *SA1418*. Um die  $\sigma^H$  Abhängigkeit des Reporterkonstruktes zu testen, wurden sowohl das Plasmid zur Überexpression von  $\sigma^H$  (pTF8) als auch das Reportersystem (pTF7) in den *S. aureus* Stamm RN4220 überführt (Stamm TF10). Als Kontrollstamm diente ein Stamm, der neben dem Reporterkonstrukt das Plasmid pBus1 ohne *sigH*-Gen enthielt (Stamm TF11).



**Abbildung 14: Schematische Darstellung zur Testung der  $\sigma^H$  Abhängigkeit des Reportersystems pTF7.** Der Stamm TF10 enthält sowohl das  $\sigma^H$  Induktionsplasmid pTF8, als auch das Reportersystem pTF7. Innerhalb einer Zelle wird durch pTF8 aktives  $\sigma^H$  produziert, welches anschließend, durch Anlagerung an die entsprechende Bindestelle der *SA1418* Promotorsequenz, welche sich auf dem Plasmid pTF7 befindet, die Transkription der Reportergene induziert.

Es wurde im Folgenden untersucht ob sich die Stämme TF10 und TF11 bezüglich der gemessenen Lumineszenz unterscheiden.

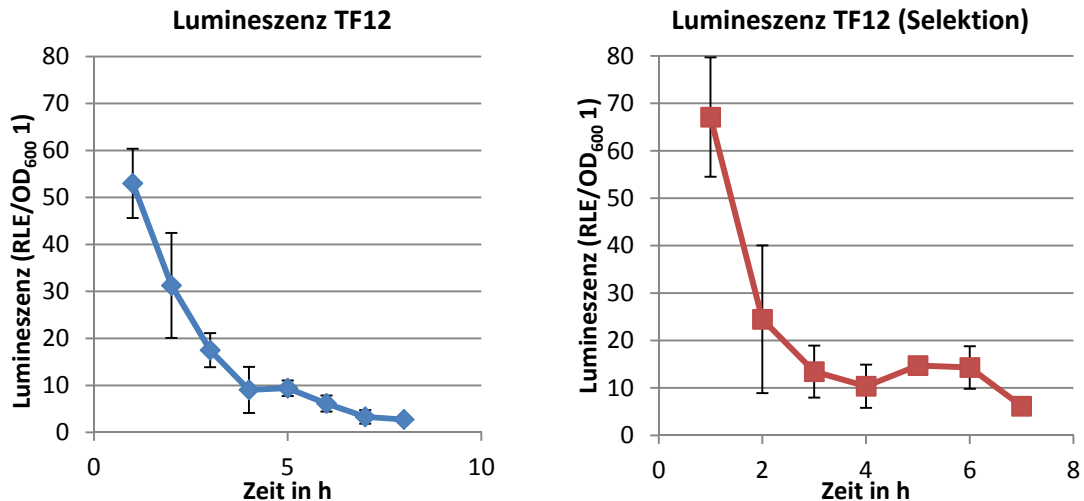


**Abbildung 15: Gemessene Lumineszenz der Stämme TF10 und TF11.** Die Stämme TF10 und TF11 wurden in einer Übernachtskultur (TSB Medium) mittels doppelter Antibiotikaselektion angezogen. Anschließend wurde in einer frischen Kultur mit einer Start OD<sub>600</sub> von 0,05 ohne Antibiotikaselektion stündlich die Lumineszenz gemessen. Die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLE) wurden auf die Zelldichte (OD<sub>600</sub> 1) normiert. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive Standardabweichungen

Hier zeigt sich eine deutlich verstärkte Lumineszenz im Stamm TF10 gegenüber dem Stamm TF11. Es ist aus den qRT-PCR Experimenten bekannt, dass der Promotor P<sub>cad</sub>, wenn nicht induziert, nicht völlig inaktiv ist, es findet auch ohne Induktion Transkription statt (ca. Faktor 3 des *sigH* Transkriptes). Die Bindung von aktivem  $\sigma^H$  an die *SA1418* Promotorregion im Stamm TF10 spiegelte sich in der erhöhten Lumineszenz wieder (Abbildung 15).

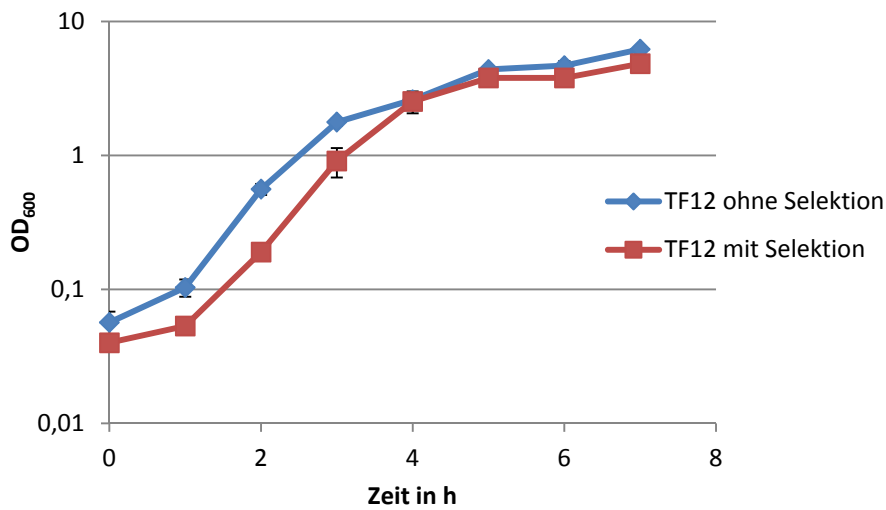
#### 4. $\sigma^H$ Aktivität im *S. aureus* Stamm Newman HG während des Wachstums

Im nächsten Schritt erfolgte die Messung der  $\sigma^H$  Aktivität im *S. aureus* Stamm Newman HG. Hierzu wurde das zuvor getestete Reporterplasmid pTF7 in den Stamm Newman HG per Phage  $\phi 85$  transduziert und so Stamm TF12 erstellt. In TF12 wurde dann die Lumineszenz im Wachstumsverlauf mit und ohne Antibiotikaselektion gemessen.



**Abbildung 16: Gemessene Lumineszenz von TF12 im Wachstumsverlauf.** Eine Übernachtskultur des *S. aureus* Stamms TF12 wurde in frischem TSB Medium auf eine Start OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Dargestellt ist die gemessene Lumineszenz im Wachstumsverlauf, normiert auf die Zelldichte ohne Selektion für das Reporterplasmid und mit Selektion für das Reporterplasmid. Die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLE) wurden auf die Zelldichte (OD<sub>600</sub> 1) normiert. Abgebildet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive Standardabweichungen.

Sowohl mit als auch ohne Antibiotikaselektion war die gemessene Lumineszenz zum frühesten getesteten Zeitpunkt, nach einer Stunde Wachstum, am höchsten.  $\sigma^H$  scheint somit in dieser sehr frühen Wachstumsphase am aktivsten zu sein. Die Zugabe von Antibiotika scheint keinen höhergradigen Effekt auf die frühen gemessenen Werte zu haben (Abbildung 16). Hierbei ist hervorzuheben, dass in den Übernachtskulturen keine relevanten Lumineszenzwerte gemessen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

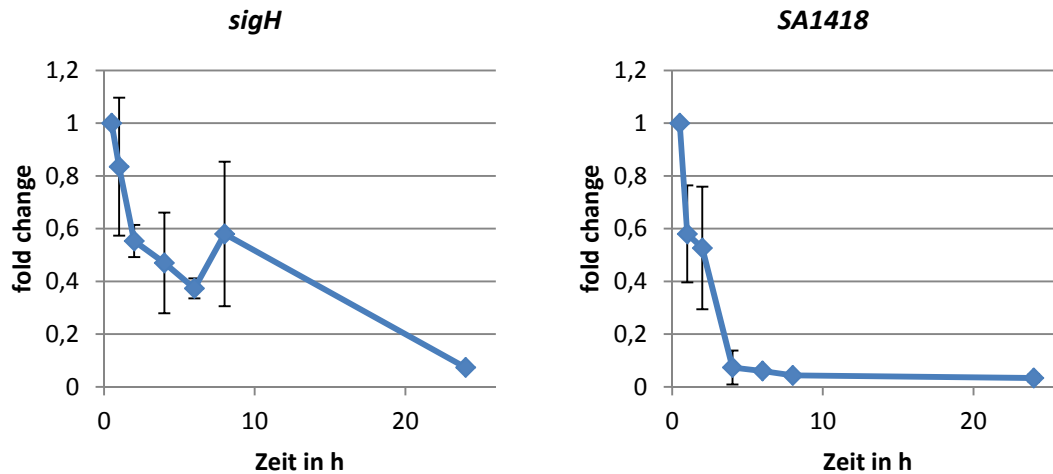


**Abbildung 17: Wachstumskurve der Messkulturen.** Beimpft wurde aus der Übernachtskultur frisches TSB Medium mit und ohne Antibiotikaselektion. Zelldichte gemessen bei OD<sub>600</sub>. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive der Standardabweichungen.

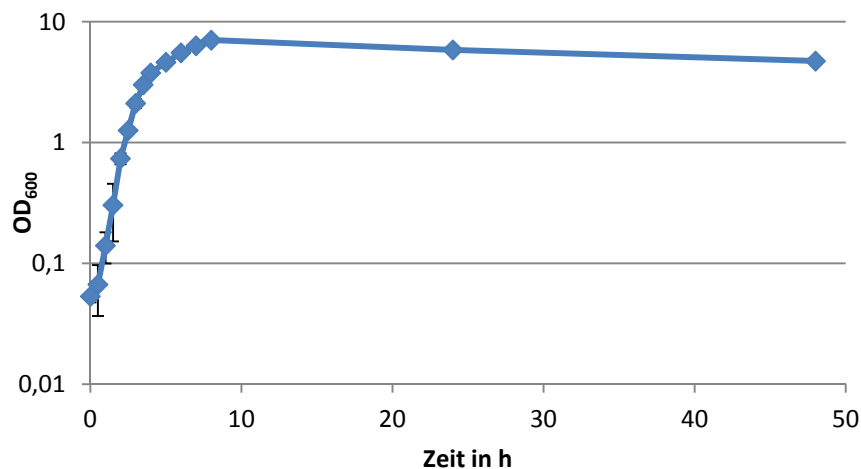
Beim Vergleich der Wachstumskurven des Stamms TF12 in Kultur mit und ohne Antibiotikaselektion für das Reporterplasmid pTF7 zeigt sich erwartungsgemäß ein leichter Wachstumsunterschied (Abbildung 17).

#### 4.1. Überprüfung der Ergebnisse der Reporterkonstrukte mittels qRT-PCR

Nachdem das Reporterkonstrukt eine  $\sigma^H$  Aktivität vor allem zu Beginn des Wachstums angezeigt hat, wurden diese Ergebnisse per qRT-PCR überprüft. Hierzu wurde der *S. aureus* Stamm Newman HG unter den gleichen Bedingungen wie im vorangegangenen Experiment kultiviert (ohne Antibiotikum). Es wurden Zellen zu definierten Zeitpunkten entnommen und die Transkriptmengen von *sigH* und *SA1418* mittels qRT-PCR zu unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen.



**Abbildung 18: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH* und *SA1418* im Stamm Newman HG im zeitlichen Verlauf.** Das Wachstum erfolgte in TSB Medium. Es erfolgte eine mehrmalige Probenentnahme und Bestimmung der relativen Transkriptmengen per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Als Referenz wurde die Transkriptmenge zum Zeitpunkt 0,5 h gleich „1“ gesetzt. Die folgenden Werte repräsentieren die relativen Unterschiede der Transkriptmengen zur Referenz aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.



**Abbildung 19: Wachstumskurve der Messkultur (*S. aureus* Newman HG).** Aus der Übernachtskultur wurde mit einer Start OD<sub>600</sub> von 0,05 und frischem TSB Medium beimpft. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive der Standardabweichungen.

Als Referenzwert wurde die cDNA Menge der Zieltranskripte nach 30 Minuten (0,5 Stunden)

Wachstum mit „1“ festgelegt, die cDNA der späteren Messzeitpunkte wurden in Relation zum 30 Minuten Wert angegeben.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass sowohl das *sigH* Gen, als auch das *SA1418* Gen zu Beginn des Wachstums am stärksten transkribiert wurden. Im Vergleich zum Ausgangswert zeigte die Transkriptmenge von *SA1418* eine relativ schnelle Abnahme, wohingegen das *sigH* Transkript zunächst auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes abfiel und auf diesem Niveau für ca. 8 Stunden relativ

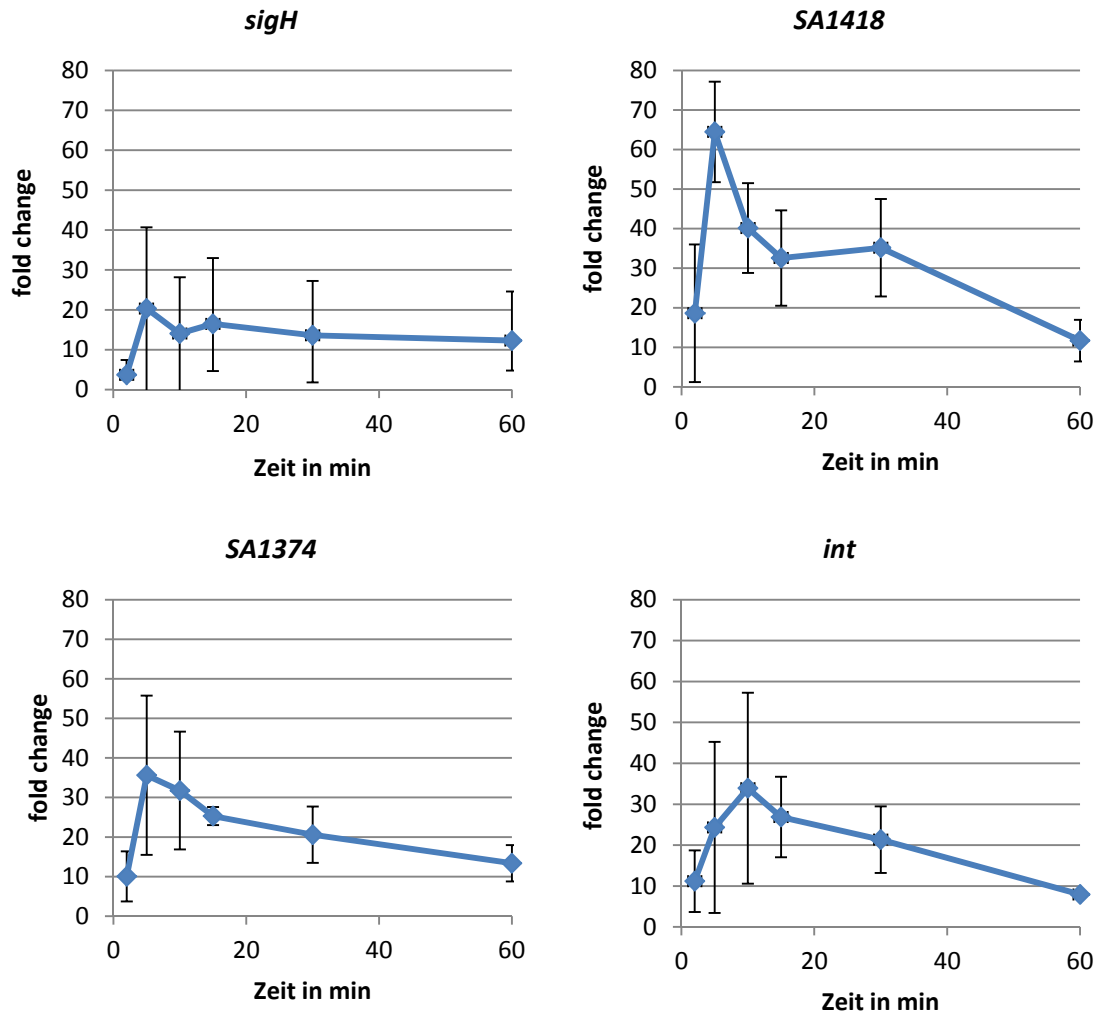
stabil blieb. Auch jenseits von 24 Stunden wurde kein Anstieg in der Transkriptmenge registriert (Abbildung 18). Dieses Experiment stützt die Ergebnisse der vorangegangenen Reporterexperimente. Es kann somit angenommen werden, dass  $\sigma^H$  vor allem in den frühen Wachstumsphasen aktiv ist.

## **5. Genaue Beobachtung der frühen Wachstumsphasen mittels qRT-PCR**

### **5.1. Messungen im *S. aureus* Stamm Newman HG**

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass  $\sigma^H$  wahrscheinlich zu Beginn, in der *lag* Phase oder der frühen exponentiellen Phase des Wachstums aktiv ist und die Genexpression von *S. aureus* beeinflusst.

Im nächsten Ansatz wurde diese Phase gezielter untersucht und es wurden qRT-PCR Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der ersten Stunde nach Überimpfen der Übernachtskultur in eine frische Kultur durchgeführt. Der Transkriptgehalt des jeweiligen untersuchten Gens der Übernachtskultur wurde als Referenzwert mit „1“ festgesetzt.



**Abbildung 20: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH*, *SA1418*, *SA1374* und *int* in *S. aureus* Newman HG im zeitlichen Verlauf.** Das Wachstum erfolgte in TSB Medium. Bestimmung der relativen Transkriptmengen per qRT-PCR sowie die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Als Referenz wurde die Transkriptmenge der Übernachtskultur gleich „1“ gesetzt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Die Zellen wurden zunächst geerntet, abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Aufarbeitung fand anschließend für alle Zeitpunkte simultan statt. Bei geringer Zelldichte zu Wachstumsbeginn mussten, um ausreichend RNA zu gewinnen, relativ hohe Mengen Zellkultur geerntet werden (bis max. 50 ml). Die erste Messung erfolgte bereits nach zwei Minuten, die Zellen wurden direkt nach dem Überimpfen aus dem Medium genommen und abzentrifugiert. Diese kurze Zeit reichte offenbar aus, um bereits eine markante Veränderung der Transkription erkennen zu lassen.

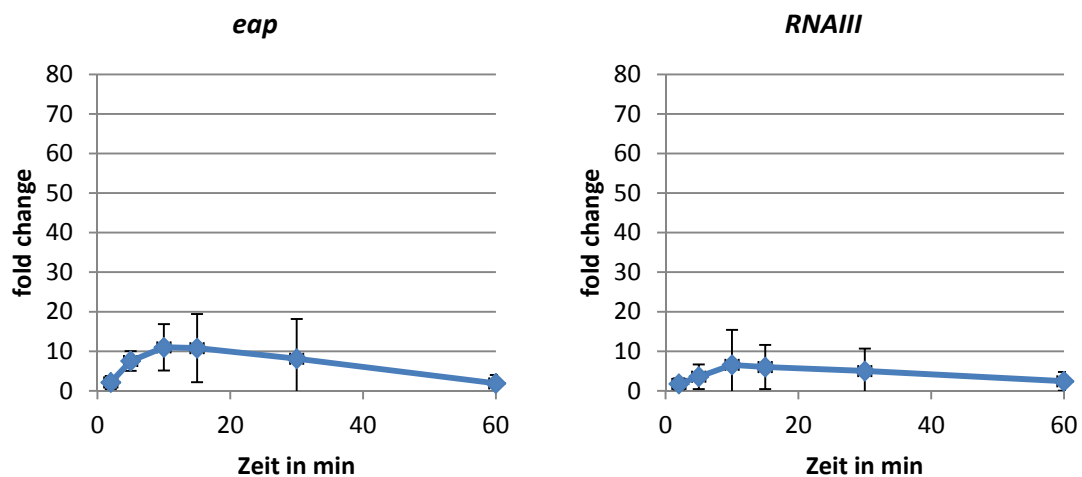
Für die Gene *sigH*, *SA1418* und *SA1374* zeigte sich eine maximale RNA Konzentration fünf Minuten nach Inokulation der Bakterien in das frische Kulturmedium. Die maximale Transkriptionsstärke von *int* war zum Zeitpunkt 10 Minuten zu beobachten. Im Fall von *SA1418*, *SA1374* und *int* war im Anschluß an diesen Zeitpunkt eine kontinuierliche Abnahme der Transkriptmengen zu verzeichnen.



Den stärksten Anstieg zeigte das Gen *SA1418* mit einem Faktor von  $64,4 \pm 12,7$ . Die *SA1374* Transkriptmenge stieg nach fünf Minuten um den Faktor  $35,6 \pm 20,1$  an. Bei *sigH* war nach 5 Minuten ein ca. 20-facher ( $\pm 22,9$ ) Anstieg an Transkriptmenge zu verzeichnen. Zudem zeigte sich im Vergleich zu den anderen gemessenen Genen bei *sigH* ein vergleichsweise konstanter Verlauf mit Werten nach fünfzehn Minuten von  $26,5 \pm 24,5$  und  $12,3 \pm 7,5$  nach 60 Minuten (Abbildung 20).

## 5.2. *Eap* und *RNAIII*

Um auszuschließen, dass der Anstieg der Transkription der Gene des  $\sigma^H$  Regulons Teil einer generellen Transkriptionssteigerung nach Überimpfen war, wurde die Expression der Gene *RNAIII* (Effektormolekül des *agr* Lokus) und *eap* („extracellular adherence protein“) ebenfalls bestimmt. Diese werden bekanntermaßen erst im späteren Verlauf des Wachstumszyklus verstärkt transkribiert (Boisset et al., 2007; Dunman et. al, 2001; Joost et al., 2009).

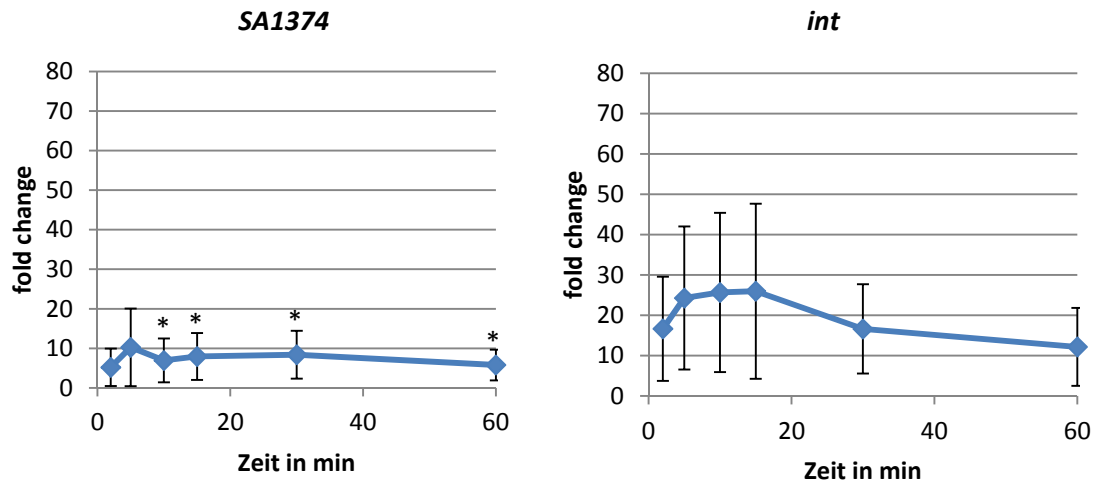


**Abbildung 21: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *eap* und *RNA3* in *S. aureus* Newman HG im zeitlichen Verlauf.** Analoges Ansatz, Auswertung per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Referenz „1“: Transkriptmenge der Übernachtskultur. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Auch für diese beiden Gene konnte schon kurz nach der Inokulation in frisches Medium ein Anstieg in den Transkriptmengen beobachtet werden. Allerdings fiel dieser Anstieg insbesondere im Fall von *RNAIII* mit einem maximalen Faktor von  $6,6 \pm 8,9$  (15 Minuten) verglichen mit den zuvor getesteten Genen deutlich geringer aus. Für *eap* konnte mit dem Faktor  $11 \pm 5,9$  (10 Minuten) eine vergleichsweise starke Induktion detektiert werden (Abbildung 21).

### 5.3. Messungen in der *S. aureus* Newman $\Delta sigH$ Deletionsmutante

Um zu differenzieren, ob es sich bei dem Transkriptionsanstieg um ein  $\sigma^H$ -spezifisches Phänomen handelt, wurde im Folgenden der Versuch mit einer *S. aureus* Newman  $\Delta sigH$  Deletionsmutante durchgeführt.



**Abbildung 22: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *SA1374* und *int* in der *S. aureus* Newman  $\Delta sigH$  Deletionsmutante im zeitlichen Verlauf.** Analoger Ansatz, Auswertung per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Referenz „1“: Transkriptmenge der Übernachtskultur. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen. Statistisch signifikante Unterschiede der Transkriptionsveränderungen der gemessenen Gene verglichen mit *S. aureus* Newman HG (Abbildung 20) wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. \*  $p < 0,05$ .

Das *sigH* Transkript konnte nicht amplifiziert werden, wodurch der Genverlust von *sigH* in diesem Derivat bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Menge des *SA1418* Transkripts lag in diesem Isolat unterhalb des Detektionsschwellenwertes, was als weiteres Indiz dafür gewertet werden kann, dass *SA1418* maßgeblich über  $\sigma^H$  reguliert wird und das  $\sigma^H$  in Wildtypisolaten eine basale Aktivität zeigt. Im Fall von *SA1374* lag der maximale Wert nach fünf Minuten bei  $10,3 \pm 9,8$  im Vergleich zu  $35,6 \pm 20,1$  im Wildtyp. Bezüglich der *int* Transkription ließ sich kein Unterschied feststellen (Abbildung 22).

### 6. Suche nach spezifischen $\sigma^H$ aktivierenden Faktoren

Nachdem nun Hinweise auf die natürliche Aktivität von  $\sigma^H$  in der frühen Wachstumsphase vorlagen, wurde nach spezifischen  $\sigma^H$  aktivierenden Faktoren gesucht.

Beim Überimpfen von Zellen in Kultur sind diese vielen verschiedenen Einflüssen ausgesetzt, da in der neuen Zellkultur veränderte Wachstumsbedingungen vorliegen. Die Veränderungen können grob in zwei Gruppen unterschieden werden:

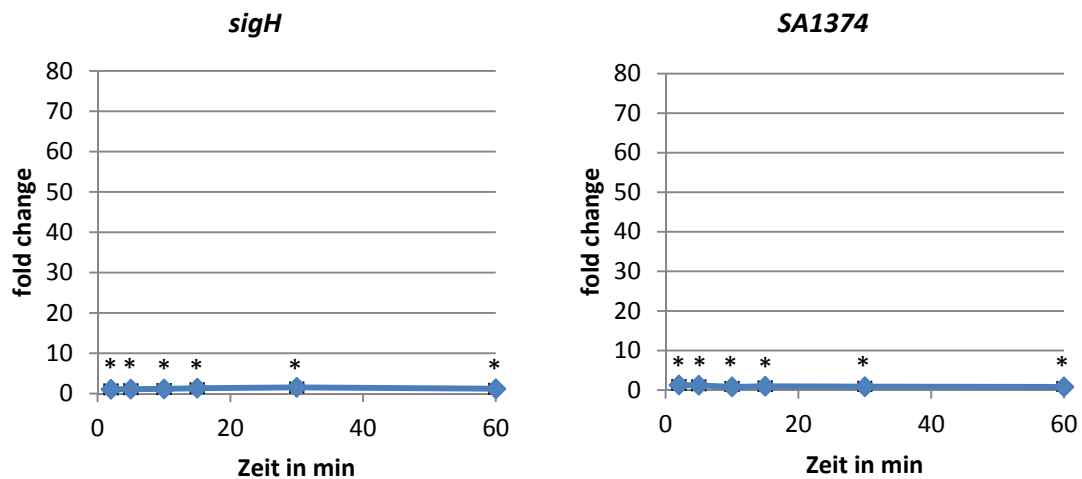
Effekte, die durch das Überimpfen selbst ausgelöst werden, zum Beispiel mechanischer Stress der Pipettenspitze oder Verdünnungseffekte im Medium sowie Effekte, die hauptsächlich durch den

Kontakt zu frischem Medium auftreten, wie zum Beispiel verbesserte Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und Veränderungen im pH Wert.

Ein Einfluss der Temperatur wurde experimentell weitgehend verhindert, da das frische Medium vor Einsatz auf 37°C vorgewärmt wurde.

### 6.1. Verdünnungseffekte als $\sigma^H$ aktivierender Faktor?

Um der Frage nachzugehen, ob das Überimpfen selbst die  $\sigma^H$ -Reaktion auslöst, wurden die Zellen nicht erst nach 12 Stunden mit Erreichen der stationären Phase in ein neues Medium überimpft, sondern es wurden analog zum vorangegangenen Experiment Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, überimpft.



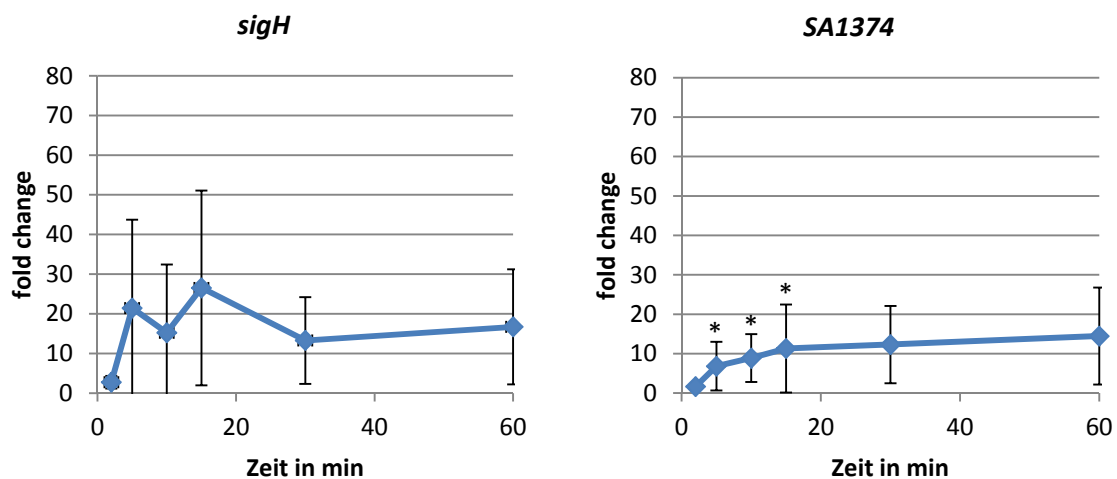
**Abbildung 23: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH* und *SA1374* in *S. aureus* Newman HG im zeitlichen Verlauf.** Überimpfen der Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (3,5 Stunden Wachstum) in eine frische Kultur. Auswertung per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Referenz „1“: Transkriptmenge der Ausgangskultur nach 3,5 Stunden Wachstum. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen. Statistisch signifikante Unterschiede der Transkriptionsveränderungen der gemessenen Gene verglichen mit dem Überimpfen aus der Übernachtskultur (Abbildung 20) wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. \*  $p < 0,05$ .

Hierbei zeigte sich kein Anstieg der *SA1374* oder *sigH* Transkriptionslevel. Ein alleiniger Verdünnungseffekt oder ein Effekt durch das Überimpfen kann damit weitestgehend ausgeschlossen werden (Abbildung 23).

## 6.2. Verändertes Nährstoffangebot als $\sigma^H$ aktivierender Faktor?

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Übernachtskultur und der frisch beimpften Kultur liegt im veränderten Nährstoffangebot. Während sich die Zellen aus der Übernachtskultur aufgrund begrenzter Nährstoffe in der stationären Wachstumsphase befinden, liegen im frischen Medium für die Zellen genügend Nährstoffe vor, um exponentielles Wachstum zu ermöglichen. Im Folgenden wurde untersucht, ob das Nährstoffangebot im Zusammenhang mit der  $\sigma^H$  Aktivierung steht.

Zunächst wurde nährstoffarmes Medium („nutrient depleted“ Medium) hergestellt. Hierzu wurden Zellen im TSB Medium in einer Übernachtskultur angezogen (12 Stunden), anschließend wurde die Kultur zentrifugiert und der Überstand steril filtriert. Das so erhaltene zellfreie Medium ist nährstoffarm, enthält jedoch extrazelluläre Faktoren, zum Beispiel des „quorum sensing“ Systems. Auf das Inaktivieren dieser Proteine durch Autoklavieren wurde verzichtet, da hierbei die Proteine denaturieren und sich somit in einem unmittelbar für die Bakterien verwertbaren Zustand befänden.



**Abbildung 24: Bestimmung der Transkriptionsveränderungen von *sigH* und *SA1374* bei Wachstum in „nutrient depleted“ Medium in *S. aureus* Newman HG.** Auswertung per qRT-PCR und die Normierung auf das house-keeping Gen *gyrB*. Referenz „1“: Transkriptmenge der Übernachtskultur. Zur Herstellung des verwendeten Mediums siehe Material und Methoden. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen. Statistisch signifikante Unterschiede der Transkriptionsveränderungen der gemessenen Gene im Vergleich mit dem Wachstum in TSB Medium (Abbildung 20) wurden mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt. \*  $p < 0,05$ .

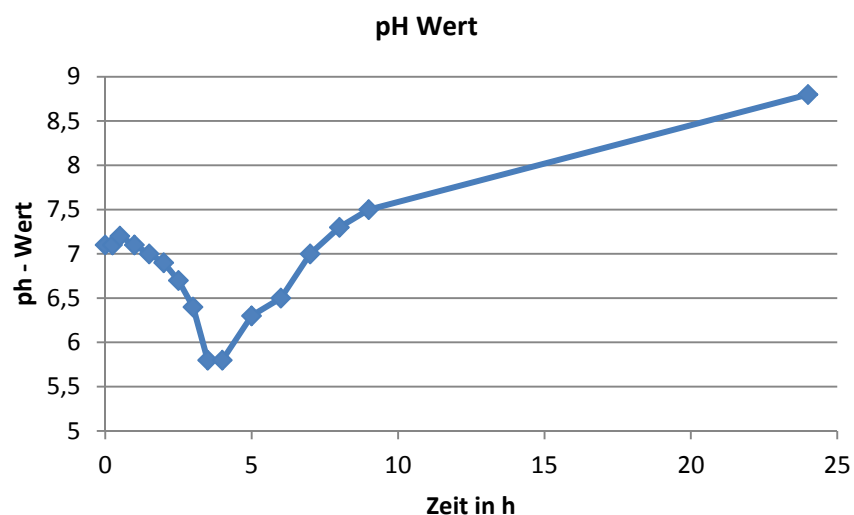
Die Transkriptionsstärke des *sigH* Gens in Zellen, die in „nutrient depleted“ Medium überführt wurden, zeigte im Vergleich zu Zellen, die in nährstoffhaltiges TSB Medium überführt wurden, nur geringe Unterschiede. Es kam sowohl im „nutrient depleted“ Medium als auch im Standardmedium zu einem Anstieg der Transkription (Messzeitpunkt 5 Minuten: TSB Medium:  $20 \pm 21,9$ , „nutrient depleted“ Medium:  $21,4 \pm 22,3$ ), der im Verlauf der ersten Stunde wieder abfiel (Messzeitpunkt 60 Minuten: TSB-Medium:  $12,3 \pm 7,5$ , „nutrient depleted“ Medium:  $16,7 \pm 14,5$ ).

In der Transkription von SA1374 war hingegen ein Unterschied zwischen Standardmedium und „nutrient depleted“ Medium zu erkennen. Während im Standardmedium die höchste Transkription zum Messzeitpunkt 5 Minuten nach Überimpfen mit einem Anstieg von  $35,6 \pm 20,1$  gegenüber der Übernachtskultur gemessen wurde, zeigte sich im „nutrient depleted“ Medium ein langsamer Anstieg mit Werten nach 5 Minuten von  $6,8 \pm 6,2$  und einem Maximum nach 60 Minuten von  $14,45 \pm 12,3$  (Abbildung 24).

### 6.3. Veränderter pH Wert als $\sigma^H$ aktivierender Faktor?

Beim Überimpfen der Zellen von der Übernachtskultur in frisches Medium kommt es zu einem raschen Wechsel im pH Wert. Ein Wechsel des pH Wertes zwingt die Zellen zur schnellen Anpassung und löst eine Vielzahl an intrazellulären Anpassungsvorgängen aus (Cosby und Zuber, 1997, Wilks et al., 2009).

Zunächst wurde der Verlauf des pH Wertes in Zellkultur bestimmt.

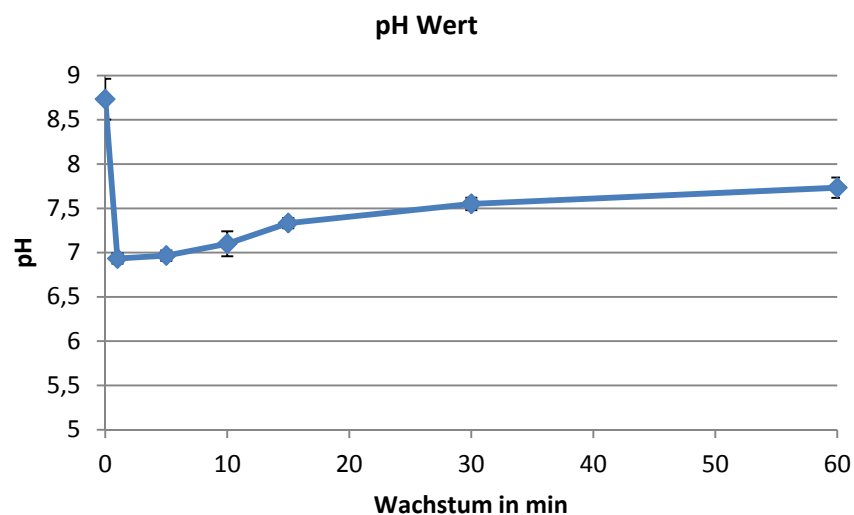


**Abbildung 25: Veränderungen des pH Wertes im Wachstumsverlauf von *S. aureus* Newman HG.** Wachstum im TSB Medium bei 37°C und 150 UpM. Wachstumsbeginn mit einer Start  $OD_{600}$  von 0,05. Die Daten repräsentieren ein Experiment.

Bei Wachstum in TSB Medium kam es zunächst während der exponentiellen Wachstumsphase zu einem pH Abfall, da durch die bevorzugte Verstoffwechslung von Zucker über die Glykolyse je nach Sauerstoffverfügbarkeit saure Produkte wie Acetat (ausreichend Sauerstoff) oder Laktat (Sauerstoffmangel) sekretiert werden. Mit Beginn der stationären Phase begann der pH Wert dann zu steigen. In dieser Wachstumsphase werden neben Acetat zunehmend auch Aminosäuren verstoffwechselt und stickstoffhaltige Verbindungen freigesetzt.

Eine  $\sigma^H$  Aktivierung durch den schnellen pH Anstieg von 6 auf 7 im exponentiellen Wachstum konnte durch das vorangegangene Experiment bereits ausgeschlossen werden (Abbildung 23). Es kam nach Überimpfen und somit nach o.g. pH Wert Veränderung nach 3,5 Stunden Wachstum zu keinem wesentlichen Anstieg der Transkripte von *sigH* und *SA1374*.

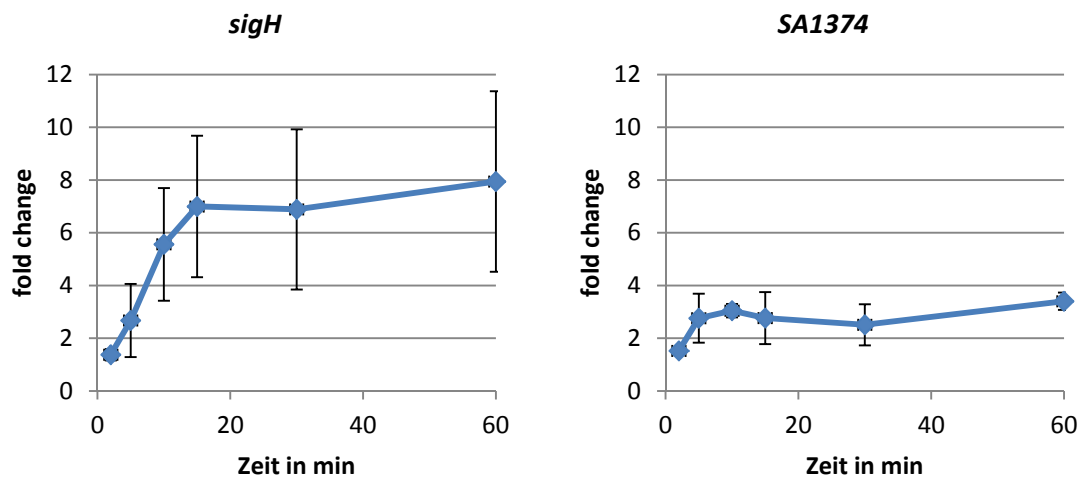
Neben vielen anderen Veränderungen stellt ein plötzlicher Wechsel im pH Wert eine wesentliche Veränderung beim Überimpfen einer Übernachtskultur in frisches Medium dar (Abbildung 25). Im Folgenden wurde untersucht, ob eine plötzliche pH Wert Absenkung in der stationären Wachstumsphase einen Effekt auf die  $\sigma^H$  Aktivität ausübt und somit zumindest zum Teil die  $\sigma^H$  Aktivität in der *lag* Phase nach Überimpfen erklärt wäre. Hierzu wurde eine Kultur mit *S. aureus* Newman HG und ein *S. aureus* Newman *sigH* Mutationsstamm in der stationären Wachstumsphase (21 Stunden Wachstum) durch Zugabe von konzentrierter Essigsäure auf einen der pH Wert von 7 abgesenkt und nachfolgend die Veränderung des pH Wertes, der OD<sub>600</sub> und die Transkriptionsstärken von *sigH* und *SA1374* bestimmt.



**Abbildung 26: Veränderungen des pH Wertes nach plötzlichem Absenken auf pH 7 nach 21h Wachstum in Kultur.** Der pH Wert in Kultur (*S. aureus* Newman HG) in TSB Medium bei 37°C und 150 UpM wurde nach 21 Stunden Wachstum (Start OD<sub>600</sub> 0,05) mittels 99%iger Essigsäure (Volumen 62µl) von pH 8,7 auf pH 7 abgesenkt. Die pH Messungen erfolgten über eine Stunde nach Säurezugabe. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten inklusive der Standardabweichungen.

Der pH Wert in Kultur nach 21 Stunden Wachstum betrug pH 8,7. Der pH-Wert begann unmittelbar nach Zugabe der Säure wieder langsam zu steigen und erreichte nach einer Stunde bereits einen Wert von 7,7 (Abbildung 26). Die Zelldichte veränderte sich im Stamm *S. aureus* Newman HG in dieser Zeit nur leicht (OD<sub>600</sub> 6,31 vor Säurezugabe, OD<sub>600</sub> 6,46 eine Stunde nach Säurezugabe). Zwischen Wildtyp und  $\Delta sigH$  Mutante zeigten sich keine markanten Unterschiede in den pH- oder der Wachstumskurven nach Säurezugabe (Daten nicht gezeigt).

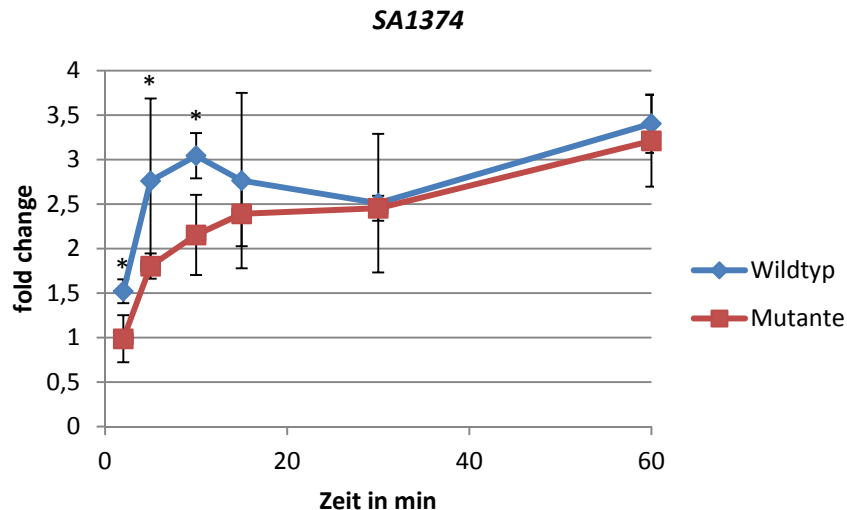
Bezüglich der Transkriptionsraten im *S. aureus* Newman HG zeigten sich nach Säurezugabe folgende Veränderungen von *sigH* und *SA1374*.



**Abbildung 27: Änderungen der Transkriptmenge von *sigH* und *SA1374* nach Absenken des pH Wertes in *S. aureus* Newman HG.** Plötzliche Zugabe von 99%iger Essigsäure nach 21 Stunden Wachstum in Kultur (siehe auch Abbildung 26). Messungen der Transkriptionsunterschiede mittels qRT-PCR. Referenz „1“: Transkriptmenge unmittelbar vor Säurezugabe. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen.

Es zeigte sich ein schneller Transkriptionsanstieg von *SA1374* mit einem Faktor von  $3 \pm 2,5$  nach 10 Minuten. Der 60 Minuten Faktor liegt mit  $3,4 \pm 0,33$  nur gering über dem 10 Minuten Faktor. Im Fall der *sigH* Transkription zeigte sich ein langsamerer, insgesamt jedoch stärkerer Anstieg der ab dem Zeitpunkt 15 Minuten ( $7,0 \pm 2,7$ ) im Wesentlichen stationär verläuft. (Abbildung 27).

Um zu bestimmen, ob es sich hierbei um einen  $\sigma^H$  abhängigen Effekt handelt, wurde der gleiche Ansatz mit der *S. aureus*  $\Delta sigH$  Deletionsmutante durchgeführt und die *SA1374* Transkription gemessen.



**Abbildung 28:** Änderungen der Transkriptmenge von SA1374 in der *S. aureus*  $\Delta sigH$  Deletionsmutante verglichen mit dem Wildtyp *S. aureus* Newman HG nach Veränderung des pH Wertes von 8,7 auf 7,0. Analoges Versuchsdesign zum vorangegangenen Experiment. Messungen der Transkriptionsunterschiede von SA1374 in *S. aureus* Newman HG und *S. aureus*  $\Delta sigH$  Deletionsmutante mittels qRT-PCR. Referenz „1“: Transkriptmenge unmittelbar vor Säurezugabe. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, welche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden inklusive der Standardabweichungen. Statistisch signifikante Unterschiede der Transkriptionsveränderungen des gemessenen Gens zwischen Wildtyp und Mutationsstamm (Abbildung 20) wurden mittels des Mann-Whitney-U—Tests ermittelt. \*  $p < 0,05$ .

Interessanterweise ließ sich ein geringer Unterschied im SA1374 Transkriptionsniveau zwischen beiden Stämmen in der frühen Phase, kurz nach Säurezugabe feststellen. Der deutlichste Unterschied zeigte sich nach 10 Minuten, wobei im Wildtyp ein Transkriptionsunterschied von  $3,0 \pm 0,3$  und im  $\Delta sigH$  Mutationsstamm von  $2,2 \pm 0,5$  beobachtet werden konnte. Es scheint sich somit bei dem frühen Transkriptionsanstieg zumindest zum Teil um einen  $\sigma^H$  abhängigen Effekt zu handeln (Abbildung 28).



## V. Diskussion

### 1. Das $\sigma^H$ Operon und die beteiligten Gene

$\sigma^H$  ist Bestandteil eines komplexen regulatorischen Netzwerkes, welches vor allem an der Regulation von Genen des natürlichen Kompetenzsystems in *S. aureus* beteiligt ist. Neben diesen Genen werden auch Gene des „stress response“ Systems positiv von  $\sigma^H$  beeinflusst (Fagerlund et al., 2014). *SA1374* und *SA1418* sind die bisher am besten untersuchten  $\sigma^H$ -abhängigen Gene (Morikawa et al., 2003). Beide stehen neben  $\sigma^H$  unter dem Einfluss weiterer regulatorischer Elemente (Fagerlund et al., 2014). 2003 konnte als  $\sigma^H$  Bindestelle die Konsensussequenz „CTCMKACGTGWTA“\* um die -10 Promotoreregionen als auch eine AT reiche Sequenz in der -35 Region der Zielgene *SA1374* und *SA1418* bestimmt werden (Morikawa et al., 2003).

\*M = A oder C, K = G oder T, W = A oder T

Neuere Untersuchungen weisen auf die  $\sigma^H$  Konsensussequenz „AGTAA“ in der -35 Region und „ACGTG“ in der -10 Region hin. Diese konnte sowohl in den Promoterregionen der Gene *SA1374* (*comGA*), *SA1418* (*comEA*) und *SA0858* (*coiA*), als auch in den Promotorregionen dreier  $\sigma^H$ -abhängiger „antisense“ RNAs, die gegenläufig zu den offenen Leserastern der Gene *SA0511* (uncharakterisierte Epimerase/Dehydratase), *SA1138* (*mutL*, „DNA mismatch repair protein“) und *SA1634* (*bsaG*, lantibiotic ABS Transporter protein, permease subunit) synthetisiert werden, vorgefunden werden (Fagerlund et al. 2014).

Antisense Transkripte sind wichtige Regulationsmechanismen der Genexpression. Es wurde gezeigt, dass Antisense Transkripte die Genexpression ihrer Komplementärgene auf Ebene der Transkription, Translation und RNA Stabilität regulieren (Georg und Hess, 2011). Die durchgeführten  $\sigma^H$  Überexpressionsversuche zeigten im Fall der Gene *SA0511*, *SA1138* und *SA1634* eine verminderte Transkription (Fagerlund et al., 2014).

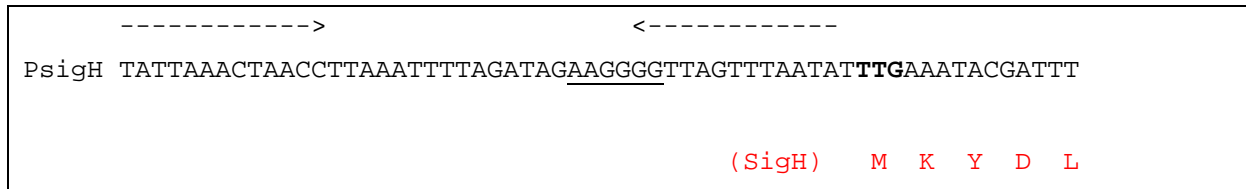
PSA1374	TAAattga <b>agta</b> aataaaaacacctcct <b>acgtg</b> attatatgtaggagggtgttttt <b>TTGAAG</b>
PSA1418	AAAATAAA <b>agtaa</b> aaccactcgcctcag <b>acgtg</b> tataaagttgaggagtggtttta <b>TTGTA</b>
PSA0858	gctgaaaa <b>agtaa</b> tagtagttaactt <b>acgtg</b> taataatatttgaggatgaagat <b>ATGTTAGT</b>
PasSA1138	ctttttga <b>agtag</b> totttcatotttttc <b>acgtg</b> tattattataaccggaagattcatcatc
PasSA0511	aaataaag <b>agtaa</b> tttaaaatattcatt <b>acgtg</b> tattaaagtgaatggaaatgattagtta
PasSA1634	ctttaaag <b>agtaa</b> aactgctaataagca <b>acgtg</b> ataataatatagattgccaatgttaatg

**Abbildung 29: Promotorregionen der Gene SA1374 (comGA), SA1418 (comEA) und SA0858 (coiA) sowie der asRNA SA1138 (mutL), SA0511 und SA1634 (bsaG).** Rot markiert sind die Konsensussequenzen in der -35 bzw. in der -10 Promotorregion der Gene. Unterstrichen sind die ribosomalen Bindestellen (RBS). Fett gedruckt sind die entsprechenden Startcodons, gefolgt von der (in Großbuchstaben) für Aminosäuren codierenden Sequenz (Fagerlund et al., 2014).

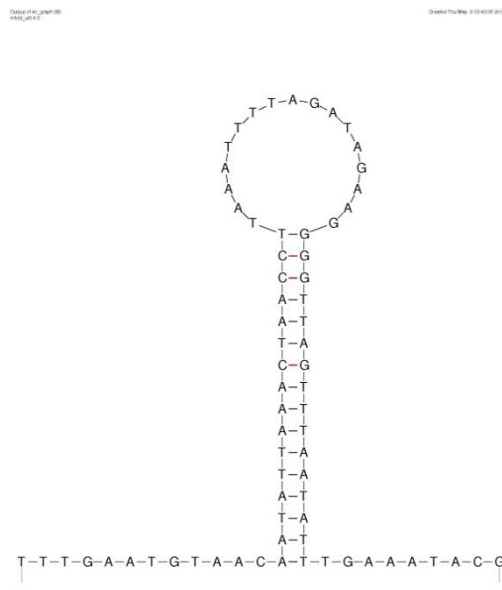
## 2. $\sigma^H$

### 2.1. Aufbau der Promotorregion

Die Promotorregion des *sigH* Gens enthält eine palindromische Sequenz, die an der Regulation der Expression beteiligt ist (Dumoulin, 2005). Die ribosomale Bindestelle „AAGGGG“ liegt innerhalb, das Startcodon „TTG“ liegt außerhalb der palindromischen Sequenz.



**Abbildung 30: Promotorregion des *sigH* Gens aus *S. aureus* Newamn.** Die Pfeile markieren die palindromische Sequenz. Unterstrichen ist die RBS. Fett gedruckt sind die entsprechenden Startcodons, gefolgt von der (in Großbuchstaben) für Aminosäuren codierenden Sequenz. Rot geschrieben sind die für die jeweiligen Basen-Triplets codierenden Aminosäuren.



**Abbildung 31: Faltungssimulation der *sigH* Promotorregion.** Aufgrund der palindromischen Sequenz legen Faltungssimulationen sowie die Berechnung der freien Energie die Ausbindung einer Haarnadelstruktur *in vivo* nahe. Die Berechnung der freien Energie und Faltungssimulation wurde mit dem Programm „mfold“ (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>) erstellt.

Aufgrund der palindromischen Sequenz in der *sigH* Promotorregion ist die Ausbildung einer Haarnadelstruktur energetisch günstig ( $\Delta G$  -11.08 kcal/mol). Es ist anzunehmen, dass DNA oder RNA, wenn einzelsträngig vorliegend, *in vivo* in dieser Konfiguration vorliegt (Abbildung 31).

## 2.2 Die Transkription

Die Regulation des  $\sigma^H$  Regulons findet auf mehreren Ebenen statt. Der erste Schritt ist die Kontrolle der Transkription von *sigH*. Ein genauer Transkriptionsstartpunkt des *sigH*-Gens konnte bisher noch nicht bestimmt werden, jedoch wiesen bisherige Experimente darauf hin, dass *sigH* vermutlich Teil eines polycistronischen Transkripts ist (Dumoulin, 2005). Bei Sigma-Faktoren ist bekannt, dass die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren vor allem auf posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene reguliert wird (Pané-Farré et al., 2006).

## 2.3 Die Translation

Im nächsten Schritt folgt die Translation der RNA in eine Aminosäuresequenz. Der erste Schritt hierbei besteht in der Bindung von ribosomaler Bindestelle (RBS) des transkribierten RNA Moleküls an das Ribosom. Im Fall von *sigH* ist die RBS Teil der Haarnadel (Abbildung 31). Haarnadelstrukturen sind längst als wichtige regulatorische Elemente in der Genexpression bekannt. Neuerdings können „single strand“ DNA Moleküle mit einem Haarnadelanteil aufgrund der hohen Bindungsspezifität an der Zielstruktur auch als „molecular beacons“ eingesetzt werden (Kim et al., 2008).

Es ist bekannt, dass eine Blockade der RBS durch eine solche Sekundärstruktur die Translationseffizienz zu beeinflussen vermag (De Smit und van Duin, 1990). Im Fall von *sigH* besitzt die Haarnadel negativen Einfluss auf die Expression (Dumoulin, 2005).

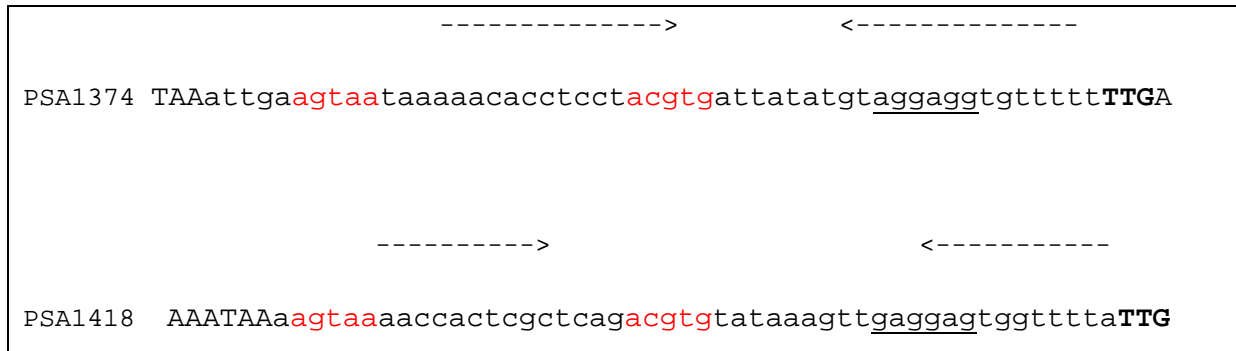
## 2.4 Die posttranslationale Modifikation

Die hier gewonnenen Daten lassen nur begrenzte Schlüsse auf die posttranslationale Modifikation von  $\sigma^H$  zu. Im Gegensatz zu vielen anderen Sigma-Faktoren ist für  $\sigma^H$  kein Anti-Sigma-Faktor bekannt. Die gewonnenen Daten im Überexpressionsansatz lassen darauf schließen, dass  $\sigma^H$  auch ohne ein weiteres regulatorisches Element mit dem RNA Polymerase „core complex“ ein funktionales Holoenzym zu bilden vermag, was als Hinweis darauf gewertet werden kann, dass die Aktivität von  $\sigma^H$  in *S. aureus* hauptsächlich über die posttranskriptionelle Kontrolle erfolgt. Die Frage, inwiefern die  $\sigma^H$  Aktivität auch posttranslational durch externe Moleküle im Bindeverhalten der RNA Polymerase oder der spezifischen Promotorregionen beeinflusst wird, muss in einem gesonderten Ansatz beantwortet werden.

### 3. Die Zielgene von $\sigma^H$

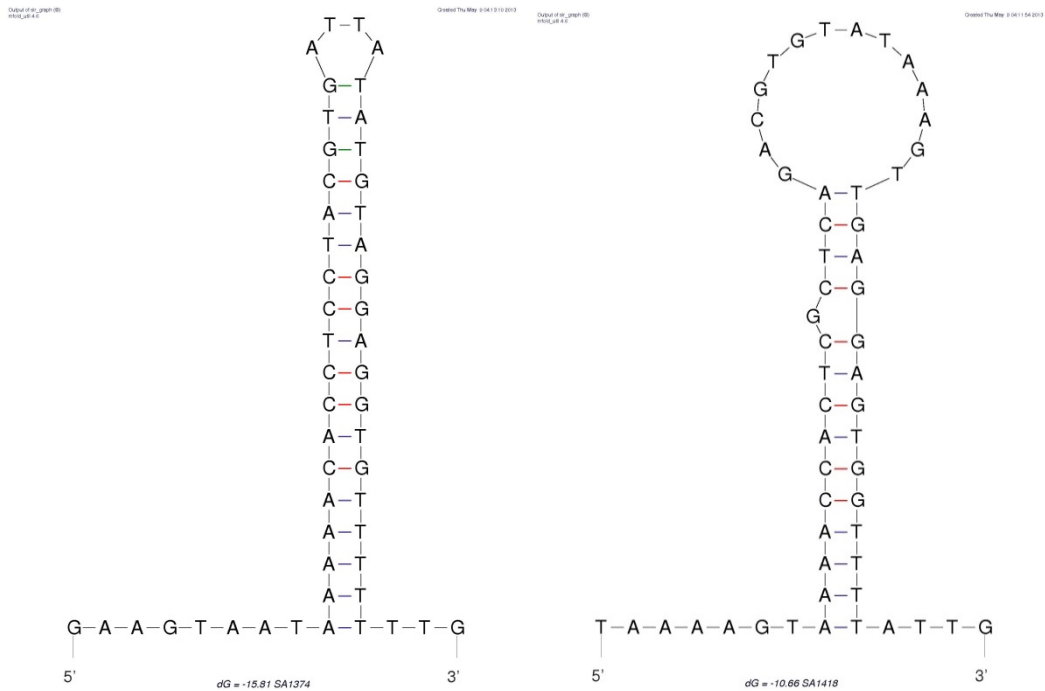
#### 3.1. Aufbau der Promotorregionen

Bereits 2003 konnten die Gene *SA1418* und *SA1374* als  $\sigma^H$  abhängig charakterisiert werden (Morikawa et al., 2003). Die RBS hinter dem Transkriptionsstartpunkt besteht im Fall von *SA1374* aus der Sequenz „AGGAGG“, bei *SA1418* aus „GAGGAG“. In beiden Genen ist, analog zum *sigH* Gen das Startcodon ein „TTG“.



**Abbildung 32: Promotorregion der Gene SA1374 und SA1418 aus *S. aureus* COL.** Die Pfeile markieren die palindromische Sequenz. Der unterstrichene Teil stellt die RBS dar. Das Startcodon ist fett gedruckt. Der rot markierte Bereich ist die Konsensussequenz aus beiden Promotorregionen und enthält vermutlich die  $\sigma^H$  Bindestelle (Fagerlund et al., 2014).

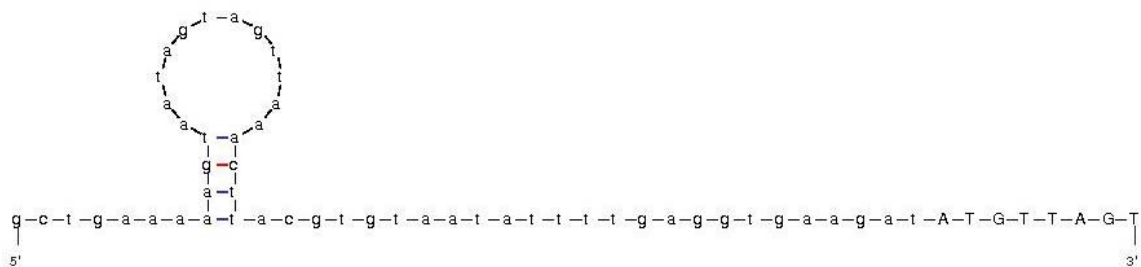
Wie auch bei *sigH* selbst existieren innerhalb der Promotorregionen beider Gene palindromische Sequenzen, die eine Haarnadel ausbilden kann. Im Fall von *SA1418* liegt die mutmaßliche  $\sigma^H$  Bindestelle der -10 Region im „Loop-Bereich“ der Haarnadel, bei *SA1374* liegt die -10 Region mit mutmaßlicher  $\sigma^H$  Bindestelle innerhalb der Haarnadel (Abbildung 32).



**Abbildung 33: Faltungssimulationen der Promotorregionen der Gene SA1374 (links) und SA1418 (rechts).** In den Promotorregionen der Gene SA1374 und SA1418 finden sich ebenfalls palindromische Sequenzen. Die Ausbildung einer Haarnadel ist analog der Abbildung 31 energetisch günstig ( $\Delta G$  (SA1374): -15,81 kcal/mol,  $\Delta G$  (SA1418): -10,66 kcal/mol). Berechnung der freien Energie und Faltungssimulation erstellt mit „mfold“ (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

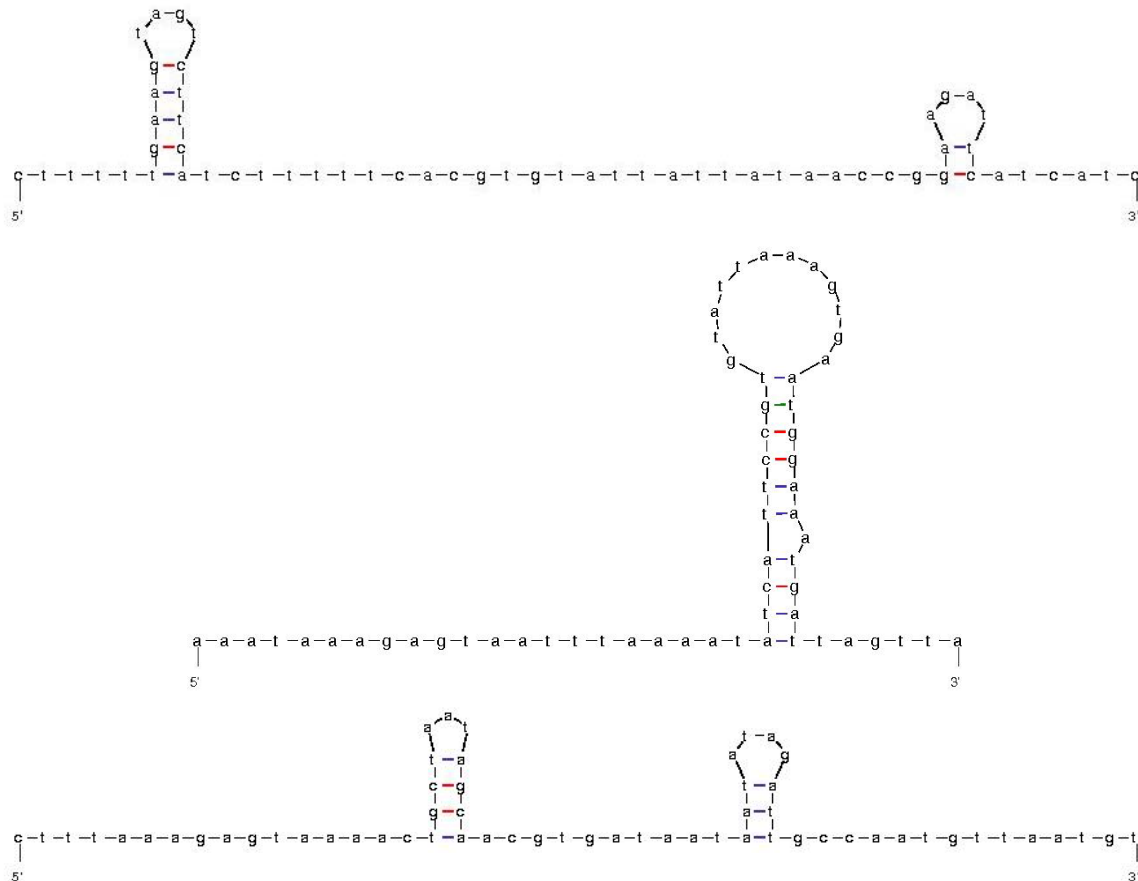
Die Faltungssimulationen und die Berechnungen der freien Energie legen die Ausbildung einer Haarnadelstruktur der Promotorregionen von SA1374 und SA1418 nahe (Abbildung 33).

Im Fall des Gens SA0858, bzw. der Gegenstrangsequenzen liegen die freien Energien deutlich unter derer von sigH, SA1374 und SA1418.



**Abbildung 34: Faltungssimulationen der Promotorregionen des Gens SA0858** Es findet sich nur eine kurze palindromische Sequenz.  $\Delta G = -0,76$  kcal/mol. Berechnung der freien Energie und Faltungssimulation erstellt mit „mfold“ (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

In der Promotorregion des Gens SA0858 (*coiA*) findet sich nur eine kurze palindromische Sequenz, die freie Energie ( $\Delta G$ ) beträgt  $-0,76$  kcal/mol. Diese liegt allerdings im Bereich der Konsensussequenz in der -35 Region (Abbildung 34).



**Abbildung 35: Promotorregionen der antisense RNAs von SA1138 (oben), SA0511 (mitte) und SA1634 (unten).** Gezeigt wird der errechnete energetisch günstigste Zustand.  $\Delta G$  (*asSA1634*): -1,55 kcal/mol,  $\Delta G$  (*asSA1138*): -2,56),  $\Delta G$  (*asSA0511*): -2,10 kcal/mol Berechnung der freien Energie und Faltungssimulation erstellt mit „mfold“ (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>).

Im Fall der antisense RNA der Gene SA1138, SA0511 und SA1634 sind die errechneten freien Energien verglichen mit den Genen SA1374 und SA1418 ebenfalls deutlich geringer, die simulierten Faltungen sind weniger stabil. Es ist somit von einer weniger signifikanten physiologischen Bedeutung auszugehen (Abbildung 35).

### 3.2. Interaktionen der Promotorregionen der Zielgene mit $\sigma^H$

Sigma-Faktoren werden zur Transkriptionsinitiation benötigt und können bereits nach wenigen Basenpaaren Transkription die RNA Polymerase wieder verlassen, um an neuer Stelle die Transkription zu starten. Ein Sigma-Faktor wird entsprechend nur für kurze Zeit benötigt und kann in kurzer Zeit viele Transkriptionszyklen starten.

In den Überexpressionsansätzen mit induzierbarem  $\sigma^H$  zeigen sich die typischen Eigenschaften eines Sigma-Faktors: Bei Fehlen der palindromischen Sequenz in der Promotorregion von *sigH* löst bereits ein geringer Anstieg an *sigH* Transkript einen starken Anstieg der Zielgene aus, während eine weitere Steigerung des *sigH* Transkripts und somit von aktivem  $\sigma^H$  Protein nur zu einer verhältnismäßig

geringen, weiteren Zunahme der Transkriptmenge der Zielgene führte. Eine weitere Erhöhung an Sigma-Faktor-Molekülen führt nicht linear zum entsprechenden Transkriptanstieg, da andere Faktoren des Transkriptionsapparates, wie zum Beispiel die RNA Polymerase, durch hohe Auslastung zum limitierenden Faktor werden.

Wie oben beschrieben scheint die  $\sigma^H$  Bindestelle im Fall der Gene *SA1418* und *SA1374* im „Loop-Bereich“ bzw. innerhalb der Haarnadel zu liegen. Es ist möglich, dass eine Interaktion von  $\sigma^H$  mit der Bindestelle in der -10 Region beider Gene eine Konformationsänderung der DNA in diesem Bereich auslösen kann.

Neben der Funktion als mögliches  $\sigma^H$  abhängiges regulatorisches Element sind Haarnadeln auch bekannt dafür, unter chemischen (zum Beispiel Natriumkonzentration) oder physikalischen Einflüssen (zum Beispiel Temperaturänderung) spontan die Struktur zu verändern und somit Einfluss auf die Genexpression zu nehmen (Lah et al., 2011).

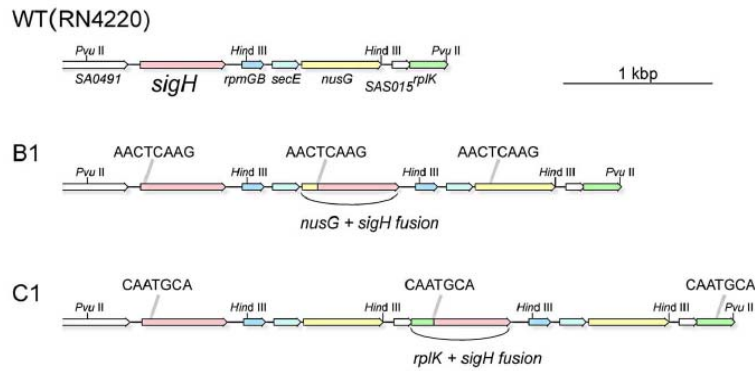
#### **4. Die *Integrase* als $\sigma^H$ abhängiges Gen?**

Die Integrase *int* wurde von Tao et al., 2010 als weiteres  $\sigma^H$  abhängiges Gen vorgestellt. Die hier durchgeführten  $\sigma^H$ -Überexpressionsversuche zeigten, dass sich das *int* Transkript deutlich von den Transkripten der Gene *SA1374* und *SA1418* unterschied. Im Gegensatz zu den  $\sigma^H$  abhängigen Genen *SA1374* und *SA1418* zeigte das *int* Gen in den *sigH* Überexpressionsansätzen keine vermehrte Transkription, eine direkte  $\sigma^H$  Abhängigkeit ist somit eher fraglich.

### **5. Aktivität von $\sigma^H$ im Wachstumsverlauf**

#### **5.1. Stand der Wissenschaft**

Eine physiologische Aktivierung von *sigH* konnte bis dato nicht gezeigt werden. Ein kürzlich vorgestelltes Modell (Morikawa et al, 2012) geht davon aus, dass  $\sigma^H$  durch spontane, statistische auftretende Genomveränderungen mit einer Frequenz von weniger als  $10^{-5}$  aktiv wird. *S. aureus* RN4220 Stämme, bei denen  $\sigma^H$  aktiv war, zeigten als genetisches Korrelat eine 1210 bp große Region, die tandemartig dupliziert wurde, wodurch ein Fusionsgen mit downstream liegenden Genen entstand. Die Originalstruktur von  $\sigma^H$  selbst wurde nicht verändert. Das chimäre  $\sigma^H$  Protein zeigte im SDS PAGE eine höhere molekulare Masse als das originale  $\sigma^H$  (Morikawa et al., 2012).



**Abbildung 36: Fusionsgen aus *sigH* und downstream gelegenen Genen.** Abbildung kopiert von Morkawa et al., 2012.

Zusätzlich zur Aktivierung durch Genfusion zeigte ein GFP Reporterkonstrukt unter der Kontrolle des SA1374 (*comG*) Promoters Aktivität in synthetischen Medien, bezeichnet als CS2, CS1 und GS. Northern Blot Analysen bestätigten eine erhöhte Transkription von SA1365, dem letzten Gen des *comG* Operons. Die  $\sigma^H$  Aktivierung in den getesteten Medien wurde durch einen chromosomalen tandem repeat ausgelöst. Dies lässt darauf schließen, dass neben der statistischen Aktivierung durch chromosomale Duplikation auch andere Mechanismen zur  $\sigma^H$  Aktivierung in *S. aureus* existent sind (Morikawa et al., 2012).

## 5.2. *In vitro* Lumineszenzmessungen im Stamm TF12

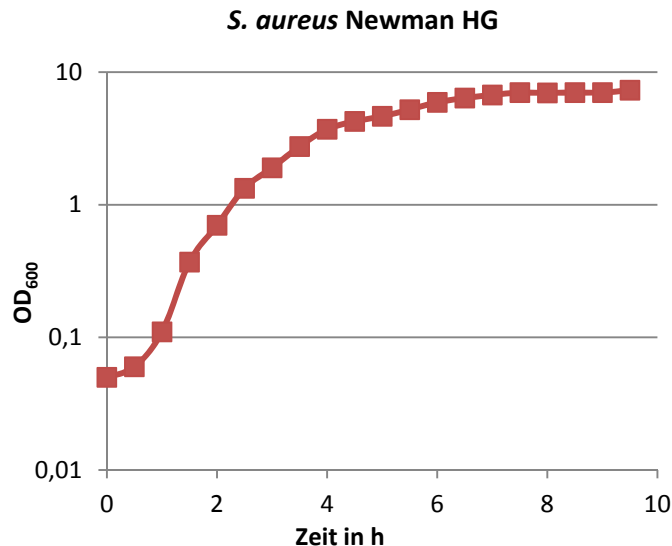
Nachdem die Abhängigkeit des Reportersystems pTF7 in den Stämmen TF10 und TF11 bestätigt worden war, konnte nun die Lumineszenz im *S. aureus* Stamm TF12 getestet werden. Die hier durchgeführten Reporterassays zeigten eine erhöhte Lichtemission zu Beginn der Wachstumsphase. In der qRT-PCR, die der Bestätigung dieser vorangegangenen Versuche diente, ließ sich ebenfalls eine vermehrte Transkription der Gene SA1418 und SA1374 sowie -wenn auch in geringerem Ausmaß- für *sigH* selbst feststellen.

Anhand der vorliegenden Daten lässt sich schließen, dass  $\sigma^H$  kurze Zeit nach Überimpfen der Zellen in ein neues Medium zeitlich begrenzt aktiv ist.



### 5.3. Die Wachstumsphasen von *S. aureus* in Kultur

Das Wachstum von Zellen in Kultur lässt sich in verschiedene Abschnitte unterteilen (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Wachstumskurve von *S. aureus* Newman HG.** Aus einer Übernachtskultur wurde eine frische Kultur (TSB Medium) mit einer Start OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Wachstumskurve bei 37°C und 150 UpM.

#### 5.3.1. Phase der initialen Anpassung (*lag* Phase)

Werden die Zellen einer Übernachtskultur in neues Medium überimpft, treten sie zunächst in die *lag* Phase ein. Hierbei kommt es nach Überimpfen vielfach zu einer Anpassungsreaktion auf die rasch veränderten Umweltbedingungen wie zum Beispiel Nährstoffangebot, Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH Wert, was ebenfalls zu schnellen und starken Veränderungen im Zellinneren führt. In *Lactococcus lactis* wurden in der *lag* Phase 28 Gene exprimiert, die folgenden Funktionen zugeordnet werden konnten: Nukleotid Stoffwechsel, Glykolyse, Stressantworten, Translation, Transkription, Zellteilung, Aminosäurestoffwechsel und Coenzym Synthese (Larsen et al., 2006).

Sind die Anpassungen an die neuen Bedingungen erfolgt, beginnen die Zellen bei günstiger Nährstoffversorgung mit der Teilung und treten somit in die Phase des exponentiellen Wachstums ein. In *E. coli* hängt die Dauer der *lag* Phase vom Alter der überimpften Zellen ab: je älter die Zellen, desto länger dauert die *lag* Phase (Pin et al., 2009).

#### 5.3.2. Exponentielles Wachstum

In der Phase des exponentiellen Wachstums herrschen für die Zellen optimale Umwelteinflüsse. Die Zellen teilen sich mit der physiologisch maximalen Teilungsrate. Pro Zyklus verdoppelt sich die Zellzahl, die Gesamtzellmenge verhält sich exponentiell zur Zeit.

### 5.3.3. Stationäre Phase

Zellen im Wachstum erreichen irgendwann eine Phase kritischer Zelldichte, in der es zu Nährstoffknappheit kommt. Die Zellen reagieren daraufhin mit dem Einstellen der Zellteilung. Zunächst besteht noch ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung und dem Absterben der Zellen, jedoch mit zunehmender Zeit führen die angesammelten Stoffwechselprodukte und der Mangel an Nährstoffen zur Abnahme der Gesamtzellzahl. Bakterien in der stationären Wachstumsphase weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika auf (Eng et al., 1991) und können durch schnelles Auftreten von Mutationen das Überleben verbessern (Finkel, 2006). Je nach Art des Nährstoffmangels reagieren Bakterien mit unterschiedlichen Anpassungsvorgängen (Chubukov und Sauer, 2014).

### 6. Spezifische $\sigma^H$ Aktivität in der *lag* Phase

Das vermehrte Vorhandensein von *SA1374*, *SA1418* und *sigH* Transkript unmittelbar zu Beginn der *lag* Phase deutet auf eine Aktivierung des  $\sigma^H$  Regulons hin. Die gemessenen Transkriptmengen der Kontrollgene *eap* und *RNAIII* unterschieden sich von den  $\sigma^H$  abhängigen Genen. Der Unterschied wurde vor allem während der frühesten Messzeitpunkte (5 Minuten) deutlich. Zudem wiesen die Kurven generell einen flacheren Verlauf auf. Physiologisch wird das verwendete Kontrollgen *eap* in der späten exponentiellen Phase produziert (Joost et al., 2009, Dunman et al., 2001), *RNAIII* wird durch das *agr*-System induziert und somit auch im späten exponentiellen Wachstum hergestellt (Boisset et al., 2007). Der gemessene Anstieg der Gene *eap* und *RNAIII* in der *lag* Phase entsprach möglicherweise einem Wachstumssignal der vorangegangenen stationären Phase der letzten Kultur. Die RNA-Polymerase lagert sich an die DNA an, die Polymerisation kann aufgrund der schlechten Wachstumsbedingungen (pH Wert, Nährstoffmangel) nicht starten. Im Moment der Überimpfung findet eine schnelle Veränderung der Rahmenbedingungen statt, woraufhin die RNA Polymerase RNA produzieren kann, welche dann mit der qRT-PCR gemessen wird. Die Transkriptmenge 60 Minuten nach Überimpfen entspricht nahezu dem Referenzwert der Übernachtskultur.

Die Versuche mit dem *S. aureus*  $\Delta sigH$  Deletionsmutante führten nach Überimpfen der Übernachtskulturzellen auch zu einem Anstieg der Transkription des Gens *SA1374*, dieser fiel jedoch deutlich geringer als im Wildtyp aus. Das Transkript von *SA1418* war mittels qRT-PCR aufgrund der geringen Mengen in der Newman  $\Delta sigH$  Deletionsmutante nicht mehr quantifizierbar, was als starkes Indiz dafür gewertet werden kann, dass die im Wildtyp detektierbaren Transkriptmengen an *SA1418* höchstwahrscheinlich auf  $\sigma^H$  zurückzuführen sind.

Bezüglich der Transkription des für die Integrase codierenden Gens *int* zeigten sich zwar keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Newman  $\Delta sigH$  Deletionsmutante, aber ein deutlicher Anstieg

der Transkriptmengen kurz nach Überimpfen der stationären Phase-Zellen. Diese Beobachtungen weisen in Einklang mit den Erkenntnissen von Fagerlund und Kollegen (Fagerlund et al., 2014) zum einen darauf hin, dass die *int* nicht Teil des  $\sigma^H$  Regulons ist. Zum anderen lassen sie vermuten, dass in dieser frühen *lag* Phase wahrscheinlich weitere Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die für den Anstieg an *int* Transkript und in geringerem Maße möglicherweise auch für die Erhöhung der *eap* und *RNAIII* Transkript-Pools kurz nach Animpfen verantwortlich sind.

Zusammenfassend können die gemessenen Daten wahrscheinlich als Überlagerung von zwei Effekten beschrieben werden: Zum einen besteht ein genereller Anstieg der Transkription nach Überimpfen während der *lag* Phase, was den Transkriptionsanstieg der Gene *eap*, *int* und *RNAIII* erklärt, der wahrscheinlich zumindest teilweise auf das Überführen von Wachstumssignalen aus der vorangegangenen stationären Phase-Kultur zurückzuführen ist. Zum anderen existiert eine kurze  $\sigma^H$  - abhängige Aktivierung der Zielgene dieses alternativen Sigma-Faktors.

## 7. Welche Umweltbedingungen aktivieren $\sigma^H$ ?

### 7.1. Nährstoffarmes Medium („nutrient depleted“ Medium).

Zunächst zeigte die geringe Zunahme der Zelldichte im Wachstumsverlauf (Daten nicht gezeigt), dass sich die Zellen in einem Zustand reduzierten Stoffwechsels befanden.

Im Fall der Transkriptmenge von *SA1374* fehlte der bei den Ansätzen mit frischem Medium beobachtete initiale Peak der Transkriptmenge, die Transkriptmenge nach 60 Minuten entsprach in etwa der Menge in normalem Medium. Das *sigH* Transkript in „nutrient depleted“ Medium unterscheidet sich nicht wesentlich von den Messungen in frischem Medium. Das Fehlen des initialen Peaks ist vermutlich auf das Fehlen eines  $\sigma^H$  spezifischen Signals zurückzuführen.

### 7.2. Veränderungen im pH Wert

In *Bacillus subtilis* spielt  $\sigma^H$  neben den bereits gut bekannten Funktionen in Sporenbildung und genetischer Kompetenz eine Rolle bei der Anpassung an einen veränderten pH Wert.

Bei Wachstum von *B. subtilis* Zellen in einem aminosäure- und glucosereichen Medium sinkt der pH Wert der Kultur aufgrund der Verstoffwechslung der Glucose und der damit einhergehenden Sekretion von Acetat und/oder Lactat vorübergehend in den sauren Bereich ab. Nach dem Aufbrauchen der Glucose werden diese Sekretionsprodukte durch die Bakterien wieder aufgenommen und, ebenso wie die im Medium verfügbaren Aminosäuren, als alternative Kohlenstoffquellen über verschiedene zentrale Stoffwechselwege zur Energiegewinnung genutzt. Diese Prozesse führen dazu, dass der pH Wert der Kultur in den späteren Wachstumsphasen in den

alkalischen Bereich ansteigt. Messungen des pH Wertes in einer *S. aureus* Kultur zeigten die gleichen Veränderungen im pH Verlauf.

Wird bei *B. subtilis* der pH Wert im angereicherten Medium in der späten Wachstumsphase künstlich konstant gehalten, so zeigen sich erhöhte Aktivitäten der  $\sigma^H$  abhängigen Promotoren sowie eine erhöhte Proteinmengen von  $\sigma^H$  selbst. Weitere Untersuchungen ergaben Hinweise, dass die *spoOH* Transkription durch das Vorhandensein von Aminosäuren gehemmt wird, wohingegen *spoOH* als Reaktion auf den pH Wert im Medium posttranslational beeinflusst wird (Cosby und Zuber, 1997). Andere Beobachtungen zeigten, dass während ein niedriger pH Wert in der späten Wachstumsphase die Aktivität von  $\sigma^H$  vermindert, so werden bei einer pH Erhöhung Teile des  $\sigma^H$  Operons (*citG*, *kinA*, *spoO* und *spoVG*) hochreguliert (Wilks et al., 2009).

Generell scheint *B. subtilis* sich besser an Säurestress anpassen zu können. Stress durch hohe pH Werte führen zu einer längeren *lag* Phase und zu größeren genetischen Adaptionen. Eine hohe Säuretoleranz ist zum Beispiel bei dem Nahrungsmittel assoziierten Pathogen *B. cereus* von Vorteil, um im Gastrointestinaltrakt wirken zu können (Thomassin et al., 2006). Auch *S. aureus* ist als wichtiges „food-borne“ Pathogen erstaunlich resistent gegenüber niedrigen pH Werten.

Die Auswirkungen von einem sich schnell verändernden pH Wert auf die Aktivität von  $\sigma^H$  wurden in diesem Ansatz gezielt untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen kurzzeitigen Unterschied der Transkriptmenge von *SA1374* nach plötzlicher pH Absenkung in der stationären Phase zwischen *S. aureus* Wildtyp und *S. aureus* Newman  $\Delta sigH$  Deletionsmutante (Abbildung 28). Der plötzliche Anstieg des pH Werts beim Überimpfen innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase-Zellen in frisches Medium übte keinen Einfluss auf die Transkriptmengen des  $\sigma^H$ -abhängigen Gens *SA1374* aus (Abbildung 23). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass  $\sigma^H$  in *S. aureus* möglicherweise durch schnelle pH Absenkungen in der stationären Phase aktiviert werden kann und so an der Stressantwort des Bakteriums auf diese Art der Milieu-Veränderung beteiligt ist. Um die Bedeutung der pH Veränderung auf die Aktivierung von  $\sigma^H$  jedoch im Detail zu klären, sind weitere Versuche nötig. Die mutmaßliche Beteiligung von  $\sigma^H$  an der Stressantwort wird aber auch schon durch die Beobachtung gestützt, dass sich bei einer künstlichen Aktivierung von  $\sigma^H$  neben der verstärkte Transkription von Genen des Kompetenzapparates auch eine Transkriptionssteigerung von Genen des „stress response“ Systems beobachten lies (Fagerlund et al., 2014).

Zusammenfassend lassen die Beobachtungen darauf schließen, dass hier erneut zwei unterschiedliche Effekte kombiniert auftreten: In der stationären Phase ist der hohe pH Wert neben dem Mangel an Nährstoffen wachstumslimitierend. Durch das Absenken des pH Wertes von 9 auf 7 werden die Zellen wieder in die Lage versetzt, stickstoffhaltige Verbindungen als Nährstoffquelle zu

nutzen. Hierbei kommt es, analog der Situation beim Überimpfen, zu einem allgemeinen Transkriptionsanstieg. Zum anderen zeigen die Unterschiede im Transkriptionslevel von SA1374 zwischen Wildtyp und Mutante eine  $\sigma^H$  abhängige Aktivierung in der frühen Anpassungsphase an den veränderten pH Wert.

## 8. Modell zur Funktion des $\sigma^H$ Regulons

Im Gegensatz zu  $\sigma^H$  in *B. subtilis* oder  $\sigma^B$  in *S. aureus* scheint  $\sigma^H$  nicht mit dem Eintritt in die stationäre Phase aktiv zu werden. Die vorliegenden Daten zeigten kurzzeitig verstärkte Transkription von  $\sigma^H$  abhängigen Genen - und somit eine Aktivierung von  $\sigma^H$  - in der *lag* Phase und bei einer plötzlichen Absenkung des pH Wertes in der stationären Phase. Neben diesen physiologischen Anpassungsreaktionen scheinen nach Morikawa und Mitarbeiter seltene chromosomale Veränderungen zu einer permanenten  $\sigma^H$  Aktivierung zu führen.

2012 zeigten Morikawa und Mitarbeiter, dass ein künstlich aktiviertes  $\sigma^H$  *S. aureus* unter bestimmten Voraussetzungen in die Lage versetzt, bei funktionalen *comE* und *comG* Operon in sehr geringem Maße Fremd-DNA aufzunehmen. Dies gilt sowohl für Plasmide als auch für gereinigte genomische DNA mit einer Effizienz von ca.  $10^{-8}$  –  $10^{-9}$ . Des Weiteren konnte ein Plasmidaustausch zwischen koinkubierten Stämmen erfolgen. Eine genetische Kompetenz in höherem Maße konnte bisher auch bei Aktivierung zusätzlicher an natürlicher Kompetenz beteiligter Gene nicht gezeigt werden (Fagerlund et al., 2014). Neben der Kontrolle durch  $\sigma^H$  werden mehrere Kompetenzgene auch durch andere Kontrollmechanismen, wie dem kürzlich identifizierten zusätzlichen Regulationsmechanismus per Transkriptions-Aktivator ComK1 reguliert (Fagerlund, 2014).

Für *S. aureus* könnte der Nutzen der  $\sigma^H$  Operon ein evolutionärer Mechanismus zur Anpassung an plötzlich veränderte Umweltbedingungen sein. Unter extremen Umweltbedingungen, wie zum Beispiel die hier getestete schnelle pH Wert Veränderungen, wird  $\sigma^H$  für kurze Zeit aktiv. Dies ermöglicht es *S. aureus* neben anderen Vorgängen möglicherweise für kurze Zeit genetisch kompetent zu werden und durch genetischen Austausch eine bessere Anpassung zu erreichen.

Das Phänomen, dass Zellen bei Umweltstress kurzzeitig genetische Kompetenz erlangen ist unter anderem bereits für *Escherichia coli* beschrieben worden und wird im Verfahren der Hitze Shock Transformation eingesetzt. Auf regulatorischer Ebene scheinen hierbei Haarnadelstrukturen eine wesentliche Rolle zu spielen. In *E. coli* führt Hitze-Schock zum Anstieg des Hitze-Schock-Sigma-Faktors  $\sigma^{32}$ . Einer der Mechanismen liegt im Schmelzen der mRNA Sekundärstruktur bei hohen Temperaturen und somit durch bessere Bindung an das Ribosom zur vermehrten Translation (Morita et al., 1999). In *S. aureus* liegt eine regulatorische Funktion der Haarnadeln in der Promotorregion von

*sigH* und einigen *sigH* abhängigen Genen auf posttranskriptionaler Ebene nahe. Die  $\sigma^H$  Bindestelle liegt bei einigen  $\sigma^H$  abhängigen Genen innerhalb der Haarnadelstruktur, möglicherweise findet hierdurch eine Regulation auch bereits auf transkriptioneller Ebene statt.

## 9. Ausblick

In folgenden Ansätzen sollte versucht werden, weitere  $\sigma^H$  aktivierende Umweltbedingungen zu finden. Hierzu kann das Reporterkonstrukt pTF7 eingesetzt werden. Naheliegende Versuche beinhalten z. B. die Reaktionen auf Hitzeschock oder Kälteschock.

Ein sehr interessanter Ansatz ist die weitere Charakterisierung der Kompetenz in *S. aureus*. Hier wäre die Entdeckung der bisher noch fehlenden Faktoren zum Erlangen genetischer Kompetenz, sowie letztlich die Phänotypisierung ein wesentlicher Schritt zum Verständnis von *S. aureus*.

Letztlich kann ein Zusammenhang zwischen plötzlich veränderten Umweltbedingungen und dem Auftreten natürlicher Kompetenz untersucht werden. Kann durch Umweltstress eine erhöhte genetische Kompetenz – unter anderem moduliert durch das  $\sigma^H$  Operon – festgestellt werden, so wäre dies vermutlich ein wichtiger evolutionärer Anpassungsmechanismus von *S. aureus*.

## VI. Literaturverzeichnis

1. Alessandrini A, Viero G, Dalla Serra M, Prévost G, Facci P (2013)  $\gamma$ -Hemolysin oligomeric structure and effect of its formation on supported lipid bilayers: an AFM investigation. *Biochim Biophys Acta* 1828:405-11.
2. Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR (2000) Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med* 6:1275-7.
3. Anguelov A, Giraud K, Akpabie A, Chatap G, Vincent JP (2010) Predictive factors of acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a rehabilitation care unit. *Med Mal Infect* 40:677-82.
4. Arthur M, Depardieu F, Gerbaud G, Galimand M, Courvalin P (1997) The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J Bacteriol* 179:97-106.
5. Atalla H, Gyles C, Mallard B (2011) *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim Health Res Rev* 12:33-45.
6. Attaiech L, Olivier A, Mortier-Barrière I, Soulet AL, Granadel C, Martin B, Polard P, Claverys JP (2011) Role of the single-stranded DNA-binding protein SsbB in pneumococcal transformation: maintenance of a reservoir for genetic plasticity. *PLoS Genet* 7:e1002156.
7. Bamberger DM, Boyd SE (2005) Management of *Staphylococcus aureus* Infections. *Am Fam Physician* 72:2474-81.
8. Bartlett AH, Hulten KG (2010) *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. *Pediatr Infect Dis J* 29:860-1.
9. Bayles KW, Iandolo JJ (1989) Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J. Bacteriol* 171:4799-806.
10. Bergdoll MS, Crass BA, Reiser RF, Robbins RN, Lee AC, Chesney PJ, Davis JP, Vergeront JM, Wand PJ (1982) An enterotoxin-like protein in *Staphylococcus aureus* strains from patients with toxic shock syndrome. *Ann Intern Med* 96:969-71.
11. Bischoff M, Berger-Bächli B (2001) Teicoplanin stress-selected mutations increasing  $\sigma^B$  activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1714-20.
12. Bischoff M, Dunman P, Kormanec J, Macapagal D, Murphy E, Mounts W, Berger-Bächli B, Projan S (2004) Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus*  $\sigma^B$  regulon. *J Bacteriol* 186:4085-99.

13. Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, Chevalier C, Helfer AC, Benito Y, Jacquier A, Gaspin C, Vandenesch F, Romby P (2007) *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* 21:1353-66.
14. Bouza E, Burillo A, Muñoz P (2002) Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol Infect* 8:265-74.
15. Briley K Jr, Dorsey-Oresto A, Prepiak P, Dias MJ, Mann JM, Dubnau D (2011) The secretion ATPase ComGA is required for the binding and transport of transforming DNA. *Mol Microbiol* 81:818-30.
16. Britton RA, Eichenberger P, Gonzalez-Pastor JE, Fawcett P, Monson R, Losick R, Grossman AD (2002) Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (Sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184:4881-90.
17. Brückner R (1997) Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol Lett* 151:1-8.
18. Burgess RR, Travers AA, Dunn JJ, Bautz EK (1969) Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221:43-6.
19. Burke FM, McCormack N, Rindi S, Speziale P, Foster TJ (2010) Fibronectin-binding protein B variation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 10:160.
20. Burrus V, Waldor MK (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol* 155:376-86.
21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (1997) *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin--United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 46:851.
22. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2002) *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51:565-7.
23. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP (2004) Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70:6076-85.
24. Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT, Herrmann M (2005) *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thromb Haemost* 94:278-85.
25. Chen HY, Chen CC, Fang CS, Hsieh YT, Lin MH, Shu JC (2011) Vancomycin activates  $\sigma^B$  in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* resulting in the enhancement of cytotoxicity. *PLoS One* 6:e24472.



26. Chow AW, Bartlett KH, Percival-Smith R, Morrison BJ (1984) Vaginal colonization with *Staphylococcus aureus*, positive for toxic-shock marker protein, and *Escherichia coli* in healthy women. *J Infect Dis* 150:80-4.
27. Chubukov V, Sauer U (2014) Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 80:2901-9.
28. Chung YS, Dubnau D (1998) All seven *comG* open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180:41-5.
29. Claverys JP, Martin B, Polard P (2009) The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol Rev* 33:643-56.
30. Corbella X, Domínguez MA, Pujol M, Ayats J, Sendra M, Pallares R, Ariza J, Gudiol F (1997). *Staphylococcus aureus* nasal carriage as a marker for subsequent staphylococcal infections in intensive care unit patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16:351-7.
31. Corrigan RM, Miajlovic H, Foster TJ (2009) Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol* 9:22.
32. Cosby WM, Zuber P (1997) Regulation of *Bacillus subtilis*  $\sigma^H$  (spo0H) and AbrB in response to changes in external pH. *J Bacteriol* 179:6778-87.
33. Cowan FM, Klein DL, Armstrong GR, Pearson JW (1979) Neutralization of immune complex inhibition of antibody dependent cellular cytotoxicity *in vitro* by *Staphylococcus-aureus* protein A. *Biomedicine* 30:23-7.
34. Datta R, Huang SS (2008) Risk of infection and death due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in long-term carriers. *Clin Infect Dis* 47:176-81.
35. De Niederhäusern S, Bondi M, Messi P, Iseppi R, Sabia C, Manicardi G, Anacarso I (2011) Vancomycin-resistance transferability from VanA enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* 62:1363-7
36. De Smit MH, van Duin J (1990) Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: A quantitative analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7668-72
37. Deora R, Misra TK (1996) Characterization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 271:21828-34.
38. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13:16-34.
39. Downer R, Roche F, Park PW, Mecham RP, Foster TJ (2002) The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *J Biol Chem* 277:243-50.

40. Draskovic I, Dubnau D (2005) Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membranetopology, oligomerization and formation of disulphide bonds. *Mol Microbiol* 55:881-96.
41. Dumoulin A (2005) Molecular genetic studies on the thiol-disulfide oxidoreductase lipoprotein DSBA and the alternative sigma factor SigH of *Staphylococcus aureus*. Dissertation ETH No. 15982, Swiss federal institute of technology Zurich.
42. Dunman PM, Murphy E, Haney S, Palacios D, Tucker-Kellogg G, Wu S, Brown EL, Zagursky RJ, Shlaes D, Projan SJ (2001) Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol* 183:7341-53.
43. Duthie ES, Lorenz LL (1952) Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol* 6:95–107
44. Eng RH, Padberg FT, Smith SM, Tan EN, Cherubin CE (1991) Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1824-8.
45. Fagerlund A, Granum PE, Håvarstein LS (2014) *Staphylococcus aureus* competence genes: mapping of the SigH, ComK1 and ComK2 regulons by transcriptome sequencing. *Mol Microbiol* 94:557-79.
46. Finkel SE (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol* 4:113-20.
47. Foster TJ, Höök M (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 6:484-8.
48. Foster TJ (2009) Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion. *Vet Dermatol* 20:456-70.
49. Fujita M, Sadaie Y (1998) Feedback loops involving Spo0A and AbrB in *in vitro* transcription of the genes involved in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Biochem* 124:98-104.
50. Gaskill ME, Khan SA (1988) Regulation of the enterotoxin B gene in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 263:6276-80.
51. Gaventa S, Reingold AL, Hightower AW, Broome CV, Schwartz B, Hoppe C, Harwell J, Lefkowitz LK, Makintubee S, Cundiff DR, et al. (1989) Active surveillance for toxic shock syndrome in the United States, 1986. *Rev Infect Dis* 11: 28-34.
52. Georg J, Hess WR (2011) Cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:286-300.
53. Giachino P, Engelmann S, Bischoff M (2001)  $\sigma^B$  activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183:1843-52.

54. Giraudo AT, Cheung AL, Nagel R (1997) The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch Microbiol* 168:53-8.
55. Gouaux JE, Braha O, Hobaugh MR, Song L, Cheley S, Shustak C, Bayley H (1994) Subunit stoichiometry of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin in crystals and on membranes: A heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12828-31.
56. Gray GS, Kehoe M (1984) Primary sequence of the  $\alpha$ -toxin gene from *Staphylococcus aureus* wood 46. *Infect Immun* 46:615-8.
57. Grossman AD (1995) Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 29:477-508.
58. Haeghebaert S, Sulem P, Deroudille L, Vanneroy-Adenot E, Bagnis O, Bouvet P, Grimont F, Brisabois A, Le Querrec F, Hervy C, Espié E, de Valk H, Vaillant V (2003) Two outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France, 2001. *Euro Surveill* 8:151-6.
59. Hamon MA, Stanley NR, Britton RA, Grossman AD, Lazazzera BA (2004) Identification of AbrB-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 52:847-60.
60. Hanakawa Y, Amagai M, Shirakata Y, Yahata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K (2002) Differential effects of desmoglein 1 and desmoglein 3 on desmosome formation. *J Invest Dermatol* 119:1231-6.
61. Harraghy N, Hussain M, Haggar A, Chavakis T, Sinha B, Herrmann M, Flock JI (2003) The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* 149:2701-7.
62. Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96:2149-56.
63. Hartman B, Tomasz A (1981) Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 19:726-35.
64. Helmann JD, Masiarz FR, Chamberlin MJ (1988) Isolation and characterization of the *Bacillus subtilis*  $\sigma^{28}$  factor. *J Bacteriol* 170:1560-7.
65. Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schäfer T, Hecker M, Albrecht D, Novick R, Götz F (2010) Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun* 78:2877-89

66. Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G, Herrmann M (2001) Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surfaceprotein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J Bacteriol* 183:6778-86.
67. Hussain M, Haggar A, Heilmann C, Peters G, Flock JI, Herrmann M (2002) Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect Immun* 70:2933-40.
68. Ibarra JA, Pérez-Rueda E, Carroll RK, Shaw LN (2013) Global analysis of transcriptional regulators in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 14:126
69. Inamine GS, Dubnau D (1995) ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J Bacteriol* 177:3045-51.
70. Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-8.
71. Jett BD, Gilmore MS (2002) Host-parasite interactions in *Staphylococcus aureus* keratitis. *DNA Cell Biol* 21:397-404.
72. Jevons MP, Coe AW, Parker MT (1963) Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet*. 1:904-7.
73. Ji G, Beavis RC, Novick RP (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12055-9.
74. Johnson AP (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *J Antimicrob Chemother.* 66, Suppl 4:iv43-iv48.
75. Joost I, Blass D, Goerke C, Wolz C, von Müller L, Becker K, Preissner K, Herrmann M, Bischoff M (2009) Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and *in vitro*. *J Infect Dis* 199:1471-8.
76. Kennedy AD, Bubeck Wardenburg J, Gardner DJ, Long D, Whitney AR, Braughton KR, Schneewind O, DeLeo FR (2010) Targeting of alpha-hemolysin by active or passive immunization decreases severity of USA300 skin infection in a mouse model. *J Infect Dis* 202:1050-8.
77. Kim Y, Sohn D, Tan W (2008) Molecular beacons in biomedical detection and clinical diagnosis. *Int J Clin Exp Pathol* 1:105-16.
78. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10:505-20.

79. Kobayashi K (2007) Gradual activation of the response regulator DegU controls serial expression of genes for flagellum formation and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 66:395-409.
80. Kreiswirth BN, Löfdahl S, Betley MJ, O'Reilly M, Schlievert PM, Bergdoll MS, Novick RP (1983) The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305:709-12
81. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessières P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Codani JJ, Connerton IF, Danchin A, et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390:249-56.
82. Kusch K, Hanke K, Holtfreter S, Schmutde M, Kohler C, Erck C, Wehland J, Hecker M, Ohlsen K, Bröker B, Engelmann S (2011) The influence of SaeRS and  $\sigma^B$  on the expression of superantigens in different *Staphylococcus aureus* isolates. *Int J Med Microbiol* 301:488-99.
83. Lah J, Seručnik M, Vesnaver G (2011) Influence of a hairpin loop on the thermodynamic stability of a DNA oligomer. *J Nucleic Acids* 2011:513910.
84. Larsen N, Boye M, Siegumfeldt H, Jakobsen M (2006) Differential expression of proteins and genes in the *lag* phase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* grown in synthetic medium and reconstituted skim milk. *Appl Environ Microbiol* 72:1173-9.
85. Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* 2:63-76.
86. Lew DP, Waldvogel FA (2004) Osteomyelitis. *Lancet* 364:369-79.
87. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> method. *Methods* 25:402-8.
88. Londoño-Vallejo JA, Dubnau D (1993) *ComF*, a *Bacillus subtilis* late competence locus, encodes a protein similar to ATP-dependent RNA/DNA helicases. *Mol Microbiol* 9:119-31.
89. Lonetto M, Gribskov M, Gross CA (1992) The  $\sigma^{70}$  family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* 174:3843-9.
90. Lorian V (1971) Effect of antibiotics on staphylococcal hemolysin production. *Appl Microbiol* 22:106-9.
91. Lowy, FD (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-32
92. Maheswaran SK, Smith KL, Lindorfer RK (1967) Staphylococcal  $\beta$ -hemolysin. I. Purification of  $\beta$ -hemolysin. *J Bacteriol* 94:300-5.

93. Marmur J, Schlenk F, Overland RN (1951) An improved method of preparation of inosinic acid and ribose 5-phosphate. *Arch Biochem Biophys* 34:209-15.
94. Matsushashi M, Song MD, Ishino F, Wachi M, Doi M, Inoue M, Ubukata K, Yamashita N, Konno M (1986) Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 167:975-80.
95. Mazmanian SK, Ton-That H, Schneewind O (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 40:1049-57.
96. Melish ME, Glasgow LA (1970) The staphylococcal scalded-skin syndrome. *N Engl J Med* 282:1114-9.
97. Miller HK, Carroll RK, Burda WN, Krute CN, Davenport JE, Shaw LN (2012) The extracytoplasmic function sigma factor  $\sigma^S$  protects against both intracellular and extracytoplasmic stresses in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 194:4342-54.
98. Miller LS, Cho JS (2011) Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. *Nat Rev Immunol* 11:505-18.
99. Mitchell G, Brouillette E, Séguin DL, Asselin AE, Jacob CL, Malouin F (2009) A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. *Microb Pathog* 48:18-27.
100. Mittenhuber G (2002) A phylogenomic study of the general stress response sigma factor  $\sigma^B$  of *Bacillus subtilis* and its regulatory proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4:427-52.
101. Miyazaki E, Chen JM, Ko C, Bishai WR (1999) The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (*orf159*) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *J Bacteriol* 181:2846-51.
102. Mondal R, Ganguly T, Chanda PK, Bandhu A, Jana B, Sau K, Lee CY, Sau S (2010) Stabilization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus* by core RNA polymerase. *BMB Rep* 43:176-81.
103. Morikawa K, Inose Y, Okamura H, Maruyama A, Hayashi H, Takeyasu K, Ohta T (2003) A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes Cells* 8:699-712.
104. Morikawa K, Takemura AJ, Inose Y, Tsai M, Nguyen Thi le T, Ohta T, Msadek T (2012) Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 8:e1003003.
105. Morrison MJ, Herman MJ (2013) Hip septic arthritis and other pediatric musculoskeletal infections in the era of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Instr Course Lect* 62:405-14.

106. Muto CA, Vos MC, Jarvis WR, Farr BM (2006) Control of Nosocomial Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis* 43:287-8.
107. Nixon BT, Ronson CW, Ausubel FM (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7850-4.
108. Novick RP, Projan SJ, Kornblum J, Ross HF, Ji G, Kreiswirth B, Vandenesch F, Moghazeh S (1995) The agr P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 248:446-58.
109. Novick RP (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* 48:1429-49.
110. Ogston, A (1882). Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol* 17:24-58
111. Ogura M, Yamaguchi H, Kobayashi K, Ogasawara N, Fujita Y, Tanaka T (2002) Whole-genome analysis of genes regulated by the *Bacillus subtilis* competence transcription factor ComK. *J Bacteriol* 184:2344-51.
112. Ohlsen K, Koller KP, Hacker J (1997) Analysis of expression of the Alpha-Toxin gene (*hla*) of *Staphylococcus aureus* by using a chromosomally encoded *hla::lacZ* gene fusion. *Infect Immun* 65:3606-14.
113. Palma M, Cheung AL (2001)  $\sigma^B$  activity in *Staphylococcus aureus* is controlled by RsbU and an additional factor(s) during bacterial growth. *Infect Immun* 69:7858-65.
114. Pané-Farré J, Jonas B, Förstner K, Engelmann S, Hecker M (2006) The  $\sigma^B$  regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int J Med Microbiol* 296:237-58.
115. Parsonnet J, Hansmann MA, Delaney ML, Modern PA, Dubois AM, Wieland-Alter W, Wissemann KW, Wild JE, Jones MB, Seymour JL, Onderdonk AB (2005) Prevalence of toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus* and the presence of antibodies to this superantigen in menstruating women. *J Clin Microbiol* 43:4628-34.
116. Pin C, Rolfe MD, Muñoz-Cuevas M, Hinton JC, Peck MW, Walton NJ, Baranyi J (2009) Network analysis of the transcriptional pattern of young and old cells of *Escherichia coli* during lag phase. *BMC Syst Biol* 3:108.
117. Pragman AA, Yarwood JM, Tripp TJ, Schlievert PM (2004) Characterization of virulence factor regulation by SrrAB, a two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 186:2430-8.
118. Predich M, Nair G, Smith I (1992) *Bacillus subtilis* early sporulation genes *kinA*, *spo0F*, and *spo0A* are transcribed by the RNA polymerase containing  $\sigma^H$ . *J Bacteriol* 174:2771-8.

119. Prévost G, Couppié P, Monteil H (2003) Staphylococcal epidermolysins. *Curr Opin Infect Dis* 6:71-6.
120. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD (1995) Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 20:95-102.
121. Projan SJ, Kornblum J, Kreiswirth B, Moghazeh SL, Eisner W, Novick RP (1989) Nucleotide sequence: the  $\beta$ -hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 17:3305.
122. Qazi SN, Counil E, Morrissey J, Rees CE, Cockayne A, Winzer K, Chan WC, Williams P, Hill PJ (2001) *agr* expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome. *Infect Immun* 69:7074-82
123. Qi FX, Doi RH (1990) Localization of a second SigH promoter in the *Bacillus subtilis sigA* operon and regulation of *dnaE* expression by the promoter. *J Bacteriol* 172:5631-6.
124. Quevillon-Cheruel S, Campo N, Mirouze N, Mortier-Barrière I, Brooks MA, Boudes M, Durand D, Soulet AL, Lisboa J, Noirot P, Martin B, van Tilbeurgh H, Noirot-Gros MF, Claverys JP, Polard P (2012) Structure-function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:2466-75.
125. Recsei P, Kreiswirth B, O'Reilly M, Schlievert P, Gruss A, Novick RP (1986) Regulation of exoprotein gene expression in *Staphylococcus aureus* by agar. *Mol Gen Genet* 202:58-61.
126. Regassa LB, Couch JL, Betley MJ (1991) Steady-state staphylococcal enterotoxin type C mRNA is affected by a product of the accessory gene regulator (*agr*) and by glucose. *Infect Immun* 59:955-62.
127. Roche FM, Downer R, Keane F, Speziale P, Park PW, Foster TJ (2004) The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *J Biol Chem* 279:38433-40.
128. Roche FM, Massey R, Peacock SJ, Day NP, Visai L, Speziale P, Lam A, Pallen M, Foster TJ (2003) Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. *Microbiology* 149:643-54.
129. Rossi J, Bischoff M, Wada A, Berger-Bächli B (2003) MsrR, a putative cell envelope-associated element involved in *Staphylococcus aureus sarA* attenuation. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2558-64.
130. Schaberg DR, Zervos MJ (1986). Intergeneric and interspecies gene exchange in Gram-positive cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 30:817-22.
131. Schenk S, Laddaga RA (1992) Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 73:133-8.



132. Schlievert PM, Case LC, Nemeth KA, Davis CC, Sun Y, Qin W, Wang F, Brosnahan AJ, Mleziva JA, Peterson ML, Jones BE (2007) Alpha and beta chains of hemoglobin inhibit production of *Staphylococcus aureus* exotoxins. *Biochemistry* 46:14349-58.
133. Schulthess B, Bloes DA, François P, Girard M, Schrenzel J, Bischoff M, Berger-Bächi B (2011) The  $\sigma^B$ -dependent *yabJ-spoVG* operon is involved in the regulation of extracellular nuclease, lipase, and protease expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 193:4954-62.
134. Senn MM, Giachino P, Homerova D, Steinhuber A, Strassner J, Kormanec J, Flückiger U, Berger-Bächi B, Bischoff M (2005) Molecular analysis and organization of the  $\sigma^B$  operon in *Staphylococcus aureus*. 187:8006-19.
135. Shaw LN, Lindholm C, Prajsnar TK, Miller HK, Brown MC, Golonka E, Stewart GC, Tarkowski A, Potempa J (2008) Identification and characterization of  $\sigma^S$ , a novel component of the *Staphylococcus aureus* stress and virulence responses. *PLoS One* 3:e3844.
136. Sibbald MJ, Winter T, van der Kooi-Pol MM, Buist G, Tsompanidou E, Bosma T, Schäfer T, Ohlsen K, Hecker M, Antelmann H, Engelmann S, van Dijl JM (2010) Synthetic effects of *secG* and *secY2* mutations on exoproteome biogenesis in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 192:3788-800.
137. Solomon JM, Lazazzera BA, Grossman AD (1996) Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 10:2014-24.
138. Sompolinsky D, Samra Z, Karakawa WW, Vann WF, Schneerson R, Malik Z (1985). Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. *J Clin Microbiol* 22:828-34.
139. Studholme DJ, Buck M (2000) The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: insights from genome sequences. *FEMS Microbiol Lett* 186:1-9.
140. Tanner MH, Pierce BJ, Hale DC (1981) Toxic shock syndrome. *West J Med* 134:477-84.
141. Tao L, Wu X, Sun B (2010) Alternative sigma factor  $\sigma^H$  modulates prophage integration and excision in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 6:e1000888.
142. Tatti KM, Carter HL 3rd, Moir A, Moran CP Jr (1989) Sigma H directed transcription of *citG* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 171:5928-32.
143. Thomassin S, Jobin MP, Schmitt P (2006) The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Arch Microbiol* 186:229-39.
144. Todd J, Fishaut M, Kapral F, Welch T (1978) Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I Staphylococci. *Lancet* 25:1116-8.

145. Tremaine MT, Brockman DK, Betley MJ (1993) Staphylococcal enterotoxin A gene (*sea*) expression is not affected by the accessory gene regulator (*agr*). *Infect Immun* 61:356-9.
146. VandenBergh MF, Yzerman EP, van Belkum A, Boelens HA, Sijmons M, Verbrugh HA (1999). Follow-up of *Staphylococcus aureus* nasal carriage after 8 years: redefining the persistent carrier state. *J Clin Microbiol* 37:3133-40.
147. Vandenesch F, Lina G, Henry T (2012) *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* 2:12.
148. Verkaik NJ, Dauwalder O, Antri K, Boubekri I, de Vogel CP, Badiou C, Bes M, Vandenesch F, Tazir M, Hooijkaas H, Verbrugh HA, van Belkum A, Etienne J, Lina G, Ramdani-Bouguessa N, van Wamel WJ (2010) Immunogenicity of toxins during *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 50:61-8.
149. Wallace R, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to  $\phi\chi$  174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucl Acids Res* 63543-3558.
150. Wang ST, Setlow B, Conlon EM, Lyon JL, Imamura D, Sato T, Setlow P, Losick R, Eichenberger P (2006) The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 358:16-37.
151. Wann ER, Gurusiddappa S, Hook M (2000) The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol Chem* 275:13863-71.
152. Weir J, Predich M, Dubnau E, Nair G, Smith I (1991) Regulation of *spo0H*, a gene coding for the *Bacillus subtilis*  $\sigma^H$  factor. *J Bacteriol* 173:521-9.
153. Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH, Verbrugh HA (2004). Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. *Lancet* 364:703-5.
154. Wilkinson BJ, Holmes KM (1979). *Staphylococcus aureus* cell surface: capsule as a barrier to bacteriophage adsorption. *Infect Immun*. 23:549-52.
155. Wilks JC, Kitko RD, Cleeton SH, Lee GE, Ugwu CS, Jones BD, BonDurant SS, Slonczewski JL (2009) Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 75:981-90.
156. Wiseman GM (1975) The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol Rev* 39:317-44.
157. Wu S, de Lencastre H, Tomasz A (1996) Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J Bacteriol* 178:6036-42.

158. Zygmunt DJ, Stratton CW, Kernodle DS (1992) Characterization of four  $\beta$ -lactamases produced by *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 36:440-5.

## VII. Publikationen

### Kongressbeiträge

1. Fischer T, Halfmann A, Hermann M, Bischoff M (2011) Activity of the alternative sigma factor  $\sigma^H$  in *Staphylococcus aureus*. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Essen, Poster (MPP11).
2. Halfmann A, Fischer T, Hermann M, Bischoff M (2010) In search of the role of the alternative sigma factor  $\sigma^H$  in *Staphylococcus aureus*. 3<sup>rd</sup> Joint Conference German Society for Hygiene and Microbiology, Hannover, Poster (GRP57).

## VIII. Dank

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Mathias Herrmann, danke ich besonders für die freundliche Überlassung des Themas und für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien. Mein besonderer Dank gilt Professor Herrmann aber auch für Zeit und Aufmerksamkeit, die mir auch über die Disseratation hinaus in mikrobiologischen und infektiologischen Themen zuteil wurde.

Vielen Dank an meinen Betreuer, Herrn PD Dr. rer. nat. Markus Bischoff, der jederzeit bereit war mich bei Schwierigkeiten oder Hindernissen während meiner Forschungstätigkeit mit ausgezeichnetem Sachverstand und Motivation zu unterstützen. Herrn PD Dr. rer. nat. Markus Bischoff ist es stets gelungen auch bei schwierigen Abschnitten meine Begeisterung für die Mikrobiologie und das experimentelle Arbeiten im Labor zu entfachen.

Besonderen Dank auch Dr. rer. nat. Alexander Halfmann, der mich neben fachlichen Fragestellungen insbesondere zu Beginn meiner Arbeit bezüglich Methodik exzellent unterstützt hat. Dank Ihm waren selbst Planung und Durchführung methodisch anspruchsvoller Ansätze stets technisch erfolgreich.

Karin Hilgert möchte ich ebenfalls meinen besonderen Dank aussprechen. Ohne die exzellente Organisation unseres Labors wäre ein reibungsloses Abarbeiten der geplanten Experimente kaum durchführbar gewesen. Insbesondere trug Sie wesentlich zum sehr guten Betriebsklima des Institutes bei, welches ich während meiner gesamten Zeit außerordentlich genossen habe.

Aber auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen aus dem Team der medizinischen Mikrobiologie, die immer wieder bereit zu Hilfestellungen waren, möchte ich einen ganz herzlichen Dank aussprechen. Ich habe mich im Labor und in dem gesamten dazugehörigen Team mehr als nur wohl und gut aufgehoben gefühlt. Schließlich möchte ich mich auch bei Frau Ebel und dem restlichen Team des Sekretariats bedanken, die immer ein offenes Ohr bezüglich administrativer Angelegenheiten hatten.

Es fällt mir nicht leicht meine Arbeit dort zu beenden, letztlich jedoch mit dem Wissen, dass der Kontakt zu guten Freunden auch über meine Arbeit hinaus bestehen wird.

Vielen Dank auch an meine Freundin Adriana, meine Schwester Meike und meine Eltern, die mich immer und mit ganzem Einsatz unterstützt haben.

## IX. Lebenslauf

### Angaben zur Person

Nachname / Vorname **Fischer, Tim Steffen**  
Geburtsdatum 23.08.1986  
Geburtsort Worms

### Curriculum Vitae

#### Schul- und Berufsbildung

Weiterbildung	03/2014	<b>1. Teilprüfung Facharzt Radiologie (FMH)</b>
Hochschulstudium	11/2012	<b>2. Ärztliche Prüfung</b>
	08/2008	<b>1. Ärztliche Prüfung</b>
	10/2006	Beginn des Studiums der Humanmedizin, Universität des Saarlandes
Schulischer Werdegang	03/2006	<b>Allgemeine Hochschulreife</b> (Leistungskurse: Physik, Biologie, Englisch)

#### Praktische Tätigkeit

Weiterbildung	Radiologie	Seit 05/2013 Weiterbildungsassistent Institut für Radiologie, Kantonsspital Baden, Schweiz
Praktisches Jahr	Innere Medizin	04 – 07/2012, UniversitätsSpital Zürich, Schweiz
	Radiologie	12/2011 – 03/2012, Knappschaftskrankenhaus Püttlingen
	Chirurgie	08 – 12/2011, Knappschaftskrankenhaus Püttlingen
Famulaturen	Innere Medizin	08/2011, Royal Devon & Exeter Hospital, Department of Respiratory Medicine, Exeter, United Kingdom
	Anästhesie	03/2011, Klinik für Anästhesie und Schmerztherapie der Universitätsklinik Homburg
	Neurologie	09/2010, Neurologische Universitätsklinik Homburg
	Radiologie	03/2010, Praxis für Radiologie und Nuklearmedizin, Zweibrücken
	Innere Medizin	09/2009, Krankenhaus Hetzelstift, Bereich Gastroenterologie, Neustadt Weinstraße