

**Eine Punktmutation in *saeS* ist verantwortlich
für die veränderte Stressantwort von
Staphylococcus aureus Newman gegenüber
Desinfektionsmitteln**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Daniel Schäfer
aus Filderstadt

Würzburg, 2009

Eingereicht am: 29.06.2009

Mitglieder der Prüfungskommission:
Vorsitzender: Professor Dr. Roy Gross
Gutachter: Professor Dr. Dr. B. Sinha
Gutachter: PD Dr. K. Ohlsen

Tag des Promotionskolloquiums: 11.12.2009

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

**Eine Punktmutation in *saeS* ist verantwortlich
für die veränderte Stressantwort von
Staphylococcus aureus Newman gegenüber
Desinfektionsmitteln**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Daniel Schäfer
aus Filderstadt

Würzburg, 2009

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Die Experimente wurden in der Zeit vom Mai 2005 bis Juni 2009 am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade (neben dem Diplom in Biologie) erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, Juni 2009

Daniel Schäfer

Meiner Familie

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen

Herrn Prof. Dr. Matthias Frosch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Unterstützung in Vertragsangelegenheiten,

Herrn Prof. Dr. Dr. Bhanu Sinha und Prof. Dr. Joachim Reidl für die hervorragende Betreuung und kontinuierliche Unterstützung,

Herrn PD Dr. Knut Ohlsen für die Bereitschaft als Gutachter diese Arbeit,

Herrn PD Frank-Albert Pitten für die zeitweise Betreuung dieser Arbeit,

Frau PD Dr. Christiane Wolz und ihrer Arbeitsgruppe für die experimentelle Unterstützung,

Herrn Dr. Thiên-Trí Lâm alias Cacho für die Einführung in die Durchflusszytometrie,

allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie Würzburg, speziell Matthias, Ida, Rainer, Günter, Michel, Eddi, Stefan und Beate

Nadine, Astrid, Matthias, Johanna, Maja, Deepak, Wanja und Eddy für die klasse Atmosphäre im Labor,

den Echis Peter, Dirk und Kerstin für die tolle Zeit auch außerhalb der Arbeitszeit,

Ferenc für die Hilfe bei Computerproblemen und die netten Kaffeepausen,

meinen Reidls Anja, DoDo, Gaby und Karina für die seelische und fachliche Unterstützung aber auch für jede Menge Spaß, den wir zusammen hatten,

meiner Freundin Anke für die schöne Zeit und die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie,

meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1	Summary.....	3
2	Einleitung.....	4
2.1	Desinfektion.....	4
2.1.1	Geschichte der Hygiene und Desinfektion.....	4
2.1.2	Wirkmechanismen der Desinfektionsmittel.....	5
2.1.3	Substanzen.....	6
2.1.4	Resistenzen.....	7
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>.....	8
2.2.1	Vorkommen und Bedeutung von <i>S. aureus</i>	9
2.2.1.1	Kolonisierung mit <i>S. aureus</i>	9
2.2.1.2	Intrazelluläres Überleben von <i>S. aureus</i>	10
2.2.2	<i>S. aureus</i> als Krankheitserreger.....	12
2.2.2.1	Infektionen.....	12
2.2.2.2	Toxikosen.....	13
2.2.3	Therapie und Resistenzen.....	13
2.2.3.1	MRSA (Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>).....	14
2.2.4	Pathogenese und Virulenzfaktoren.....	14
2.2.4.1	Die Zellwand von <i>S. aureus</i>	14
2.2.4.2	Adhäsine/Invasine.....	15
2.2.4.2.1	Zellwandverankerte Adhäsine.....	15
2.2.4.2.1.1	Protein A.....	15
2.2.4.2.1.2	Fibronektin Bindeproteine (FnBP).....	16
2.2.4.2.1.3	Clumping Faktoren.....	17
2.2.4.2.2	Lösliche Adhäsine.....	17
2.2.4.2.2.1	Extracellular adherence protein (Eap).....	17
2.2.4.2.2.2	Extracellular matrix binding protein (Emp).....	18
2.2.4.2.2.3	Extracellular fibrinogen binding protein (Efb).....	18
2.2.4.2.2.4	Koagulase (Coa).....	18
2.2.4.3	Extrazelluläre Enzyme.....	18
2.2.4.4	Immunevasion.....	19
2.2.4.4.1	Superantigene.....	19
2.2.4.5	Biofilmbildung.....	20
2.2.4.5.1	Resistenz durch Biofilm.....	21
2.2.5	Stressantwort und Genregulation.....	22
2.2.5.1	Stressantwort.....	22
2.2.5.2	Genregulation.....	23
2.2.5.2.1	Sigmafaktoren.....	23
2.2.5.2.1.1	Der alternative Sigmafaktor σ^B	24
2.2.5.2.2	Zweikomponenten-Systeme.....	26
2.2.5.2.2.1	Agr (Accessory gene regulator).....	26
2.2.5.2.2.2	Sae-Operon.....	28
2.2.5.2.3	Transkriptionsfaktoren.....	31
2.2.5.2.3.1	Der Transkriptionsfaktor SarA und seine Homologe.....	31
2.3	Ziel der Arbeit.....	32
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide	33
3.2	Geräte und Chemikalien	34
3.3	Medien, Medienzusätze und Wachstumsbedingungen	36
3.3.1	Medien:.....	36
3.3.2	Medienzusätze:.....	36
3.3.3	Desinfektionsmittel:.....	37
3.3.3.1	Perform [®]	37
3.3.3.2	Incidin Plus.....	37

3.3.4	Wachstumsbedingungen	37
3.4	Molekularbiologische Methoden	37
3.4.1	RNA-Präparation	37
3.4.2	cDNA-Synthese	38
3.4.3	LightCycler	38
3.4.4	Promotoraktivitäts-Assay	39
3.4.5	Konstruktion der <i>sae</i> Komplementanten	40
3.4.6	PCR (Polymerase-chain-reaktion)	41
3.4.7	DNA-Sequenzierung	41
3.5	Biochemische Methoden	42
3.5.1	Gesamtzellextrakt	42
3.5.2	Auftrennung von Proteinen über SDS-Gele (SDS-PAGE)	42
3.5.3	Silberfärbung	44
3.5.4	Tryptischer Verdau und LC-MS/MS-Analyse	45
3.5.5	Identifikation von MS/MS-Spektren anhand von Datenbankrecherchen	45
3.6	Phänotypische Tests	46
3.6.1	MHK/MBK-Bestimmung	46
3.6.2	Biofilm-Assay	46
3.6.3	Quantitativer Suspensionsversuch	47
3.7	Zellkulturarbeiten	49
3.7.1	Zellpassagierung	49
3.7.2	Zellzahlbestimmung und Ausplattierung in 24-Well Platten	50
3.7.3	Fluoreszenzfärbung von Bakterien mit FITC	50
3.7.4	Durchflusszytometrie	51
3.7.5	Auswertung der Durchflusszytometrie	51
3.7.6	Lysostaphin Protektions Versuch	52
3.8	Statistische Analysen	53
3.9	Software-Applikationen und Web-Adressen	53
4	Ergebnisse	54
4.1	MHK/MBK-Bestimmung	54
4.2	Perform in subletalen Konzentrationen verändert differentiell das Proteilmuster	54
4.3	SDS ist verantwortlich für das veränderte Proteilmuster	56
4.4	Das veränderte Bandenmuster wird nicht durch Solubilisierung verursacht	58
4.5	Perform und SDS erhöhen die Transkription von <i>saeS</i> und <i>eap</i>	59
4.6	Perform und SDS erhöhen die Aktivität des <i>sae</i> -Promotors P1	60
4.7	In Gegensatz zu anderen Stämmen erhöhen Perform und SDS die Invasivität des Stammes Newman	61
4.8	Die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman durch Perform und SDS ist Eap-abhängig	63
4.9	Die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman ist in der stationären Wachstumsphase noch ausgeprägter	64
4.10	Perform und SDS verändern die Aggregatgröße	65
4.11	Die veränderte Aggregatgröße ist nicht der Grund für die gesteigerte Invasivität	65
4.12	Perform und SDS verändern differentiell die Biofilmbildung	66
4.13	Die globalen Regulatoren Agr, SarA und SigB spielen bei der Invasivität unter Einfluss von Perform und SDS keine entscheidende Rolle	67
4.14	Der alternativen Sigmafaktor σ^B und die Wachstumsphase beeinflussen die Resistenz gegen Incidin Plus	69
4.15	Eine Punktmutation in <i>saeS</i> verändert die Stressantwort gegenüber Perform und SDS	70
5	Diskussion	73
6	Literaturverzeichnis	84
7	Anhang	101
7.1	Abkürzungsverzeichnis	101
7.2	Lebenslauf	103
7.3	Publikationsliste	104
7.3.1	Veröffentlichungen	104
7.3.2	Kongressbeiträge	104

Abbildungs- und Diagrammverzeichnis

Abb. 2-I: <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Abb. 2-II: Invasionsmechanismus von <i>S. aureus</i>	11
Abb. 2-III: Die Organisation der σ^B -Aktivität.....	25
Abb. 2-IV: Das Quorum Sensing-System Agr	27
Abb. 2-V: Genetischer Aufbau des <i>sae</i> -Operons	29
Abb. 2-VI: Proteinsequenzvergleich	30
Abb. 2-VII: Das Zweikomponenten-System SaeRS	31
Abb. 4-I: Perform in subletalen Konzentrationen verändert differentiell das Proteilmuster.....	55
Abb. 4-II: Die Änderungen des Proteilmusters im <i>S. aureus</i> Stamm Newman durch Perform sind <i>sae</i> -abhängig	56
Abb. 4-III: SDS ist verantwortlich für das veränderte Proteilmuster	57
Abb. 4-IV: Das veränderte Proteilmuster durch Perform ist unabhängig von Sauerstoffstress	57
Abb. 4-V: Das veränderte Proteilmuster ist nicht die Folge einer Solubilisierung.....	58
Abb. 4-VI: Perform und SDS erhöhen die Transkription von <i>saeS</i> und <i>eap</i>	59
Abb. 4-VII: Perform und SDS erhöhen die Aktivität des <i>sae</i> -Promotors P1	60
Abb. 4-VIII: Perform und SDS erhöhen die Invasivität des Stammes Newman.....	61
Abb. 4-IX: Perform und SDS erhöhen im Lysostaphin Protektions Versuch die Invasivität des Stammes Newman.....	62
Abb. 4-X: Die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman durch Perform und SDS ist Eap-abhängig .	63
Abb. 4-XI: Die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman ist in der stationären Wachstumsphasen noch ausgeprägter.....	64
Abb. 4-XII: Perform und SDS verändern die Aggregatgröße.....	65
Abb. 4-XIII: Die veränderte Aggregatsgröße ist nicht der Grund für die gesteigerte Invasivität	66
Abb. 4-XIV: Perform und SDS verändern differentiell die Biofilmbildung	67
Abb. 4-XV: Die globalen Regulatoren AGR, SarA und SigB spielen bei der Invasivität unter Einfluss von Perform und SDS keine entscheidende Rolle	68
Abb. 4-XVI: Der alternative Sigmafaktor σ^B und die Wachstumsphase beeinflussen die Resistenz gegen Incidin Plus.....	69
Abb. 4-XVII: Eine Punktmutation in <i>saeS</i> verändert die Stressantwort gegenüber Perform und SDS	70
Abb. 4-XVIII: Die gesteigerte Invasivität von Stamm ISP479C ist abhängig vom Newman <i>sae</i> -Operon..	71
Abb. 4-XIX: Der Stamm ISP479C <i>sae33</i> zeigt den Newman Phänotyp.....	72
Abb. 5-I: Regulation der Sae-Aktivierung durch Perform und SDS im Stamm Newman	79

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-I: Desinfektionsmittel	6
Tab. 2-II: Zellwandverankerte Adhäsine	16
Tab. 3-I: Verwendete Bakterien.....	33
Tab. 3-II: Plasmide.....	34
Tab. 3-III: Oligonukleotide für die qRT-PCR.....	34
Tab. 3-IV: Oligonukleotide für die Sequenzierung.....	34
Tab. 3-V: Geräteliste	35
Tab. 3-VI: RT-PCR Programm	39
Tab. 3-VII: Zusammensetzung der verwendeten SDS-PAGE-Gele	44
Tab. 3-VIII: Verwendete Web-Adressen.....	53
Tab. 3-IX: Verwendete Software-Applikationen	53
Tab. 4-I: MHK/MBK-Bestimmung von Perform und SDS.....	54

1 Zusammenfassung

Staphylococcus aureus reagiert auf veränderte Umweltbedingungen wie Hitze, pH und Chemikalien mit Hilfe globaler Regulatoren wie dem Sae (*S. aureus* exoprotein expression) Zweikomponenten-System. Subinhibitorische Konzentrationen einiger Antibiotika können die Expression von Virulenzfaktoren erhöhen. In dieser Arbeit wurde die Stressantwort von *S. aureus* auf subletale Konzentrationen des geläufigen Desinfektionsmittels Perform[®] untersucht. Dazu wurden biochemische Methoden wie SDS-PAGE und Massenspektrometrie sowie molekularbiologische Methoden wie qRT-PCR und Promotoraktivitäts-Assays eingesetzt. Davon abhängige, funktionelle Veränderungen wurden in durchflusszytometrischen Invasions-Assays analysiert.

Perform wirkt durch die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS). Das Wachstum von *S. aureus* in Medien mit subletalen Konzentrationen von Perform verringerte in den Stämmen 6850, COL und ISP479C die Expression mehrerer Proteine, wohingegen im Stamm Newman eine gesteigerte Expression mehrerer Proteine festgestellt werden konnte. In der Literatur werden diese vermehrt exprimierte Proteine als *sae*-abhängig beschrieben. Der Effekt von Perform konnte durch das im Desinfektionsmittel enthaltene Detergenz SDS nachgeahmt werden, jedoch nicht durch Paraquat oder weitere Detergenzien wie Triton X-100 oder Tween 20. Eine Solubilisierungsreaktion durch die Detergenz-Wirkung konnte ausgeschlossen werden, da der beobachtete Effekt von lebenden Bakterien abhängt. Für Eap (extracellular adherence protein) konnte die deutlichste Steigerung der Proteinexpression festgestellt werden und eine Transkriptionsanalyse bestätigte die gesteigerte Eap-Expression. Die Promotoraktivität des *sae* Promotors P1 wurde sowohl durch Perform als auch durch SDS verstärkt. Die Anwesenheit von Perform und SDS hatte auch funktionelle Änderungen zur Folge: In durchflusszytometrischen Experimenten erhöhte sich beispielsweise die Invasivität auf das 2,5- bzw. 3,2-fache und die beobachteten Unterschiede konnten durch Lysostaphin Protektions Versuche bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Invasivität in Stamm Newman von Eap und dem *sae*-System abhängig war, während *agr*, *sarA*, *sigB* und FnBPs keinen entscheidenden Einfluss auf die Invasivität hatten. In dieser Arbeit wurde außerdem aufgedeckt, dass die Besonderheit des Stammes Newman durch eine Mutation in *saeS* (Sensor-Histidinkinase) bedingt war. Obwohl postuliert wird, dass diese Punktmutation ein konstitutiv aktiviertes *sae*-System zur Folge hat, konnte die hohe

sae-Aktivität durch Perform und SDS jedoch noch weiter gesteigert werden. Durch den Austausch des gesamten *sae*-Operons konnte gezeigt werden, dass sich der Stamm Newman *sae*_{ISP479C} wie der Stamm ISP479C, und der Stamm ISP479C *sae*_{Newman} sich analog zu Stamm Newman verhielt.

Zusammenfassend kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass ein Aminosäureaustausch in der Sensor-Histidinkinase SaeS des Stammes Newman verantwortlich für die gesteigerte Expression von Eap und die daraus resultierende gesteigerte Invasivität nach der Inkubation mit subletalen Konzentrationen von Perform und SDS ist. Diese Daten können dazu beitragen, die Virulenzmechanismen im Stamm Newman, speziell die Rolle des Sae-Systems, aber auch die der generellen Regulation, besser verstehen zu können.

1 Summary

Staphylococcus aureus copes with changing environmental conditions like heat, pH and chemicals by utilizing global regulators such as the Sae (*S. aureus* exoprotein expression) two-component signaling system. Subinhibitory concentrations of some antibiotics were shown to increase virulence factor expression. Here, we investigated the *S. aureus* stress response to sublethal concentrations of the commonly used biocide, Perform[®]. Therefore biochemical methods including SDS-PAGE and mass spectrometry as well as molecular biological methods like qRT-PCR and promoter activity assays, were used. Additionally, functional differences were analyzed by flow cytometric invasion assays.

Perform, acting through the production of reactive oxygen species, generally downregulated the expression of extracellular proteins in strains 6850, COL, ISP479C, but upregulated these proteins in Newman. All upregulated proteins were *sae*-dependent. Whereas the Perform component SDS mimicked the biocide effect, paraquat or other detergents, as Triton X-100 or Tween 20 did not. A solubilisation by the detergents could be excluded due to the effect's requirement of live bacteria. Eap (extracellular adherence protein) was most prominently augmented. Upregulation of *eap* was confirmed by qRT-PCR. Promoter activity of the *sae* promoter P1 was increased by Perform and SDS. Flow cytometric analysis revealed that both substances enhanced cellular invasiveness 2.5-fold and 3.2-fold, respectively, and the increased invasiveness could be validated by a lysostaphin protection assay. Furthermore, the increased invasiveness was dependent on Eap and the *sae* system, whereas *agr*, *sarA*, *sigB* and FnBPs had no major effect in strain Newman. This unique response pattern was due to a point mutation in SaeS, as demonstrated by allele swapping. Newman-*saeS*_{ISP479C} behaved like ISP479C, whereas *saeS*_{Newman} rendered ISP479C equally responsive as Newman. The point mutation is said to lead to a constitutively active *sae*-system, but with Perform and SDS we were able to further enhance the already high *sae*-activity.

Taken together, an amino acid-substitution in the sensor histidine kinase SaeS of strain Newman was shown to be responsible for the increased expression of Eap upon exposure to sublethal Perform and SDS concentrations, leading to increased Eap-dependent cellular invasiveness. These data may be important for a deeper understanding and further analyzing the virulence mechanism in strain Newman, especially the role of the *sae*-system but also the general regulation.

2 Einleitung

2.1 Desinfektion

Desinfektion (des- = weg, inficere = beeinträchtigen, beeinflussen) bedeutet, die Anzahl von Infektionserregern auf einer Fläche oder einem Gegenstand so weit zu reduzieren, dass davon keine Infektionsgefahr ausgehen kann bzw. keine Erregerübertragung mehr möglich ist. Desinfiziert werden Körperoberflächen, insbesondere Hände, Flächen und Instrumente. Darüber hinaus werden auch Trinkwasser, Lebensmittel, Arzneimittel und Luft desinfiziert. In Abhängigkeit der zu desinfizierenden Fläche gibt es unterschiedliche Desinfektionsverfahren z.B. die physikalische Desinfektion durch Hitze (thermisch) oder durch Strahlen (aktinisch), aber auch chemische und chemothermische Desinfektion.

Im Gegensatz zu Antibiotika, welche meist auf spezifische Strukturen abzielen (188,251) besitzen Desinfektionsmittel ein breiteres Wirkspektrum, so dass parallel meist mehrere Zielstrukturen angegriffen werden. Einige Faktoren wie Konzentration, Einwirkzeit, pH-Wert, Temperatur, Anwesenheit von störendem Material, die Art, die Anzahl, die Umgebung und der Zustand der Mikroorganismen beeinflussen die biozide Aktivität (251).

2.1.1 Geschichte der Hygiene und Desinfektion

Bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts galten Miasmen, schlechte Ausdünstungen, als Auslöser von Infektionen. Räucherungen und die Verwendung von Essig und anderen stark riechenden Substanzen stellten die Gegenmaßnahmen dar (197).

Max von Pettenkofer war ein Verfechter dieser Theorie. Er gilt als Begründer der Hygiene in Deutschland und erhielt 1865 den ersten Lehrstuhl für Hygiene in München (191,197).

Im Jahre 1846 untersuchte Ignaz Philipp Semmelweis in Wien die Kindbettsterblichkeit. Diese betrug 11,4 % in einer Gebärklinik, in welcher die behandelnden Ärzte und Studenten auch Obduktionen durchführten, jedoch nur 2-3 % in einer Hebammenklinik. Semmelweis vermutete die Übertragung von Leichengift und führte deshalb die Waschung der Hände mit Chlorkalklösung vor jeder Untersuchung ein. Durch diese Maßnahme sank in der Wiener Gebärklinik die Kindbettsterblichkeit auf 1 % (149,197).

Als weiterer Vorreiter der modernen Desinfektion gilt der schottische Mediziner Sir Joseph Lister. Er vermutete krankmachende Mikroben in der Luft, die von Wunden ferngehalten werden müssten. Aus diesem Grund führte er 1867 die Benetzung von Räumen und Geräten sowie auch der Hände der Ärzte mit Karbolsäure ein. Zudem wurden Verbände in Karbolsäure getränkt (Listerscher Verband). Dadurch gilt Lister als Begründer der Antiseptik und die von ihm eingeführten Maßnahmen senkten die Patientensterblichkeit rapide (149,197).

Die britische Krankenschwester Florence Nightingale verbesserte während des Krimkrieges die hygienischen Verhältnisse z.B. durch das Auskochen von Verbänden und das Wechseln der Bettwäsche und senkte so die Sterblichkeit in Lazaretten von 42 % auf 2 % (149,197).

Louis Pasteur wies nach, dass „niedere Lebewesen“ niemals selbst entstehen, sondern z.B. durch die Luft in keimfreie Stoffe gelangen und dort als Gärungserreger wirken. Durch diese Erkenntnis schuf Pasteur die Grundlage der heutigen Bakteriologie und der Sterilisationstechnik (149,197).

Doch erst durch die Züchtung des Milzbranderreger 1876 und die Entdeckung des Tuberkuloseerregers 1882 konnte Robert Koch die mittelalterliche Miasmen-Theorie entkräften und gilt somit als Begründer der Bakteriologie (149,197).

2.1.2 Wirkmechanismen der Desinfektionsmittel

Die bisher bekannten Desinfektionsmittel können aufgrund ihrer Wirkungsmechanismen in vier Kategorien eingeteilt werden:

1. Oxidantien/Oxidationsmittel, z.B. Chlor oder Peroxide, wirken schnell durch eine Radikal-vermittelte Oxidation von organischem Material (42,59).
2. Elektrophile Agenzien, z.B. anorganische Ionen wie Silber, Kupfer, Quecksilber sowie organische Biozide wie Formaldehyd inaktivieren Enzyme. Es wird vermutet, dass dabei intrazelluläre Radikale entstehen, welche die Wirkung unterstützen (44,269).
3. Kationische Membran-aktive Biozide, z.B. Chlorhexidin oder quaternäre Ammoniumverbindungen und Alkohole wie Phenoxyethanol, destabilisieren die Membran und führen zu einer schnellen Zellyse (28,36,86).
4. Protonophoren, z.B. schwache Säuren wie Sorbinsäure oder Benzoesäure, behindern die Membran, einen pH-Gradienten aufrecht zu erhalten und führen in der Folge zur Ansäuerung des Zytoplasmas und somit zur Störung des Metabolismus (64).

2.1.3 Substanzen

Im Folgenden sind einige der geläufigen Desinfektionsmittel zusammengefasst (Tab. 2-I).

Tab. 2-I: Desinfektionsmittel

Substanzklasse	Beispiele	Wirkungsweise	Wirkspektrum
Alkohole	Ethanol, Isopropanol, N-Propanol	Schädigung der Membran, Denaturierung von Proteinen	+ vegetative Bakterien, Pilze, behüllte Viren - Sporen, Viren ohne Hülle
Aldehyde	Formaldehyd, Glutaraldehyd	Interaktion mit Proteinen, DNA, RNA, Schädigung der Zellwand	+ bakterizid, sporozid, viruzid
Anilide		Zerstörung der semipermeablen Eigenschaften der Zytoplasmamembran	+ Gram-positive Bakterien (-) Gram-negative Bakterien, Pilze
Biguanidine	Chlorhexidin	Schädigung der semipermeablen Membran, Verlust und Koagulation von intrazellulären Bestandteilen	+ Bakterien
Chlorabspaltende Verbindungen	Natriumhypochlorit, Kalziumhypochlorit (Chlorkalk)	Oxidation von Proteinen und Nukleinsäuren, Interaktion mit SH-Gruppen von Enzymen	+ Bakterien, Bakteriensporen, Pilze - Viren
Jodabspaltende Verbindungen	Jodtinktur, Jodoform, Polyvinylpyrrolidon-jod	Oxidation von Proteinen, Unterbrechung des Elektronentransports in der Atmungskette	+ Bakterien, Bakteriensporen, Pilze (-) Viren
Peroxidverbindungen	Peressigsäure, Ozon, Kaliumpermanganat, Wasserstoffperoxid, Kaliumperoxymonosulfat	Oxidation und Denaturierung von Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden	+ Bakterien, Bakteriensporen, Pilze, Viren - Sporen
Schwermetallverbindungen	Silbernitrat	Interaktion mit Thiolgruppen in Enzymen und Proteinen	
Phenole		Membranaktive Wirkung, Freisetzung von K ⁺ , Interaktion mit Proteinen	+ Bakterien, behüllte Viren +/- Pilze -Viren ohne Hülle
Bisphenole	Triclosan	Verhinderung der Aufnahme von Nährstoffen, Verlust zellulärer Komponenten	
Diamidine		Verhinderung der Sauerstoffaufnahme, Verlust von Aminosäuren	
Quaternäre Verbindungen	Benzylammoniumchlorid	Membrandisorganisation, Degradierung von Proteinen und DNA	+ Gram-positive Bakterien, Pilze und deren Sporen, behüllte Viren +/- Gram-negative Bakterien -Viren ohne Hülle, Sporen

Der Inhalt der Tab. 2-I ist den Quellen (52,188) entnommen.

2.1.4 Resistenzen

Resistenzen gegenüber Desinfektionsmittel sind schon seit 1952 bekannt, als Chaplin die Resistenz von *Serratia marcescens* gegen quaternäre Ammoniumverbindungen (QACs) beschrieb (32). Interessanterweise benutzen Bakterien dabei die gleichen Resistenzmechanismen gegen Biozide wie gegen Antibiotika (33).

Die Ausbildung solcher Resistenzen kann sowohl natürlichen Ursprungs sein (intrinsisch) als auch erworben werden durch spontane Mutationen oder die Aufnahme von Plasmiden, Transposons und anderen mobilen genetischen Elementen (135). Im Detail betrachtet wird eine intrinsische Resistenz durch eine verringerte Permeabilität der äußeren Hülle z.B. die äußere Membran bei Gram-negativen Bakterien, den Cortex bei bakteriellen Sporen, die wachsartige Zellwand von Mycobakterien und die Glycocalyx bei Gram-positiven Bakterien bedingt (188). Erworbene Resistenzmechanismen hingegen gehen auf die Veränderung oder die Überexpression von Zielstrukturen, die Inaktivierung oder Modifikation des Desinfektionsmittels, den Bypass oder das Fehlen eines metabolischen Weges zurück (251).

Ein weiteres Problem stellt der Efflux, d.h. der Transport von Desinfektionsmitteln aus der Zelle, dar. Bei *S. aureus* sind mehrere Arten solcher "multiple drug resistance" (MDR)-Proteine bekannt, welche die Resistenz gegenüber vielen strukturell verschiedenen Wirkstoffen vermitteln (223,297). Der Großteil dieser MDR-Pumpen ist auf Plasmiden kodiert, es werden aber auch chromosomal lokalisierte MDR-Pumpen beschrieben (192,263,290,313). Bekannte MDR-Pumpen sind die „major facilitator superfamily“ (MFS)-Proteine, die aus 12 oder 14 Transmembran-Domänen aufgebaut sind und sowohl Symporter, Antiporter als auch Uniporter darstellen (178). Als Beispiel für *S. aureus* ist hier NorA zu erwähnen, eine MDR-Pumpe, welche die Resistenz gegenüber hydrophilen Stoffen vermittelt (312). Es gibt aber auch Protonengradient-getriebene Kanäle, wie QacA und QacB, welche die Resistenzen gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen, organischen Kationen (Ethidium, Benzalkonium, Cetrimid, Chlorhexidin, Biguanidine, Diamidine und Pentamidine) vermitteln (168,182). Interessanterweise verfügen mehr MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)-Isolate als MSSA (Methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*)-Isolate über die Gene *qacA/B*, da diese oftmals auf Multiresistenzplasmiden lokalisiert sind (182). Die Expression von *qacA* wird durch den Repressor QacR reguliert. QacR bindet an den *qacA* Promotor und verhindert dadurch die Transkription von *qacA*. Bindet jedoch ein Substrat von QacA, wie z.B. Ethidium, an den Repressor QacR, löst sich

dieser vom Promotor, was zur Transkription von *qacA* führt (102). Eine weitere Gruppe von MDR-Pumpen sind die „small multidrug resistance (SMR) family“-Proteine. Sie sind mit einer Größe von 107 AS die kleinsten bekannten Efflux-Pumpen. Beispiele dafür sind QacD/Smr oder QacG/H, welche ebenfalls Resistenz gegenüber quaternären Ammoniumverbindungen und Ethidiumbromid vermitteln (114,115).

Generell gesehen, gibt es mehrere Gründe für die Ausbildung von Resistenzen. So konnte u. a. gezeigt werden, dass eine anhaltende Exposition mit subinhibitorischen Konzentrationen von Bioziden (284) oder Antibiotika bei Bakterien eine Unempfindlichkeit auf niedriger Stufe auslösen kann, welche wiederum zu einer höheren und stabilen Unempfindlichkeit führen könnte (22). Folglich könnte eine unsachgemäße Desinfektion, z.B. durch die Verwendung von ungeeigneten Bioziden, inadäquate Konzentrationen und Einwirkzeiten oder die Anwesenheit von Schmutzstoffen, die Entstehung von Resistenzen fördern (251,284). Darüber hinaus konnte Russell zeigen, dass der Selektionsdruck durch niedrige Konzentrationen von Chlorhexidin Stämme hervorbringen kann, die resistenter gegenüber Antibiotika sind (251). Das Auftreten von Kreuzresistenzen zwischen Bioziden und Antibiotika stellt ebenfalls keinen Einzelfall dar (4,29,252,277-281). So konnten auch Sidhu *et al.* feststellen, dass Benzalkoniumchlorid-unempfindliche Staphylokokken resistenter gegenüber einigen Antibiotika sind als Benzalkoniumchlorid-empfindliche Staphylokokken (263).

2.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus-Spezies sind Gram-positive, fakultativ anaerobe und unbewegliche Kokken mit einem Durchmesser von 0,8-1,2 µm (Abb. 2-I). Sie sind nicht-sporulierend und das Genom ist in einem zirkulären Chromosom von 2,4 - 2,8 Mbp organisiert (170). Das Genom setzt sich aus Prophagen, Plasmiden und Transposons zusammen und weist mit 30-35 % einen geringen GC-Gehalt auf. Der Gattung *Staphylococcus*, welche zur Familie der *Staphylococcaceae* gehört, werden mittlerweile 42 Spezies und Subspezies zugeordnet (81). Aufgrund ihrer Fähigkeit, Blutplasma zu koagulieren, werden Staphylokokken in Koagulase-positive und Koagulase-negative Staphylokokken unterschieden.

Der Gattungsname *Staphylococcus* geht auf den schottischen Chirurgen Sir Alexander Ogston zurück, welcher 1883 traubenförmige Bakterienhaufen aus eitrigen Abszessen isolierte (214). Die Benennung des Speziesnamen *Staphylococcus aureus* wiederum erfolgte ein Jahr später

durch Rosenbach. Dieser konnte *S. aureus* als Erster kultivieren und wählte den Speziesnamen aufgrund der goldgelben bis orangenen Pigmentierung der Kolonien (250).

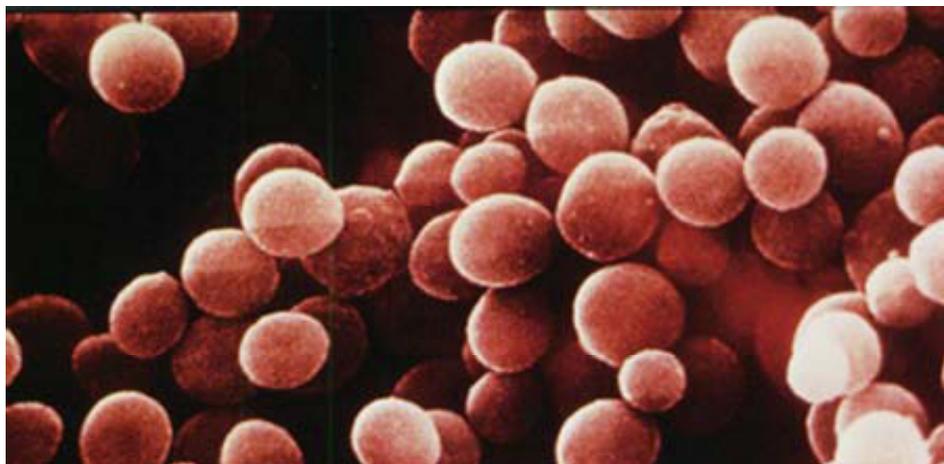


Abb. 2-1: *Staphylococcus aureus*
Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Staphylococcus aureus*. Quelle: Visuals Unlimited (<http://www.visualsunlimited.com/c/visualsunlimited>)

2.2.1 Vorkommen und Bedeutung von *S. aureus*

2.2.1.1 Kolonisierung mit *S. aureus*

Der Mensch gilt als ein natürliches Reservoir für *S. aureus*. In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass etwa 20 % (12-30 %) der Menschheit ständig mit *S. aureus* kolonisiert sind, 30 % (16-70 %) sind temporäre Träger und 50 % (16-69 %) werden nie kolonisiert (67,120,146,208). Dabei besiedelt *S. aureus* bevorzugt den Nasen-Rachen-Raum, kann sich von dort aber auf andere Bereiche der Haut wie z.B. Hände, Axilla, Perianalbereich und die Schleimhäute ausbreiten. Bei Menschen mit Diabetes Typ I (291), Dialysepatienten, Menschen mit intravenösem Drogenproblem (146) und chirurgischen Patienten (305) liegt eine höhere Besiedlungswahrscheinlichkeit vor. Die Besiedlungsrate bei Klinikpersonal ist ebenfalls erhöht (306) und eine Übertragung erfolgt häufig über die Hände des medizinischen Personals (2). Aufgrund dessen gilt *S. aureus* als einer der am häufigsten auftretenden Krankenhauskeime. Andererseits kann eine Besiedlung des eigenen Körpers mit *S. aureus* vor dem Krankenhausaufenthalt ebenfalls eine Quelle für Infektionen darstellen (304). So konnten von Eiff *et al.* zeigen, dass der Genotyp von Bakteriämie-verursachenden *S. aureus*-Isolaten zu 80 % mit den nasal kolonisierenden Stämmen der jeweiligen Patienten übereinstimmte (300). Aus diesem Grund ist eine Sanierung der nasalen Kolonisierung durch

Mupirocin zu empfehlen, da u. a. die Wahrscheinlichkeit von Wundinfektionen abnimmt (243,291).

Die Häufigkeit von sowohl „community-acquired“ als auch der im Krankenhaus erworbenen *S. aureus*-Infektionen steigt stetig an, jedoch mit unveränderter Mortalität. Dennoch, die Behandlung dieser Infektionen gestaltet sich aufgrund des Aufkommens von multiresistenten Stämmen sehr schwer (170). Der Mensch bildet jedoch nicht das einzige Reservoir von *S. aureus*, denn auch Haustiere und Nutztiere sind häufig besiedelt (296). Aber auch außerhalb des Wirts z.B. in Staub, Erde, Wasser und anderen Umgebungen kann *S. aureus* unter Umständen für mehrere Monate überleben (43).

2.2.1.2 Intrazelluläres Überleben von *S. aureus*

Nach langer und intensiver Forschung an *S. aureus* stellte sich heraus, dass der Erreger in Zellen eindringen kann und intrazellulär für eine unbestimmte Zeit überleben kann. *S. aureus* invadiert und überlebt nicht nur in Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten und Keratinozyten, sondern auch in professionellen Phagozyten wie Makrophagen und Neutrophilen (100,151).

Die intrazelluläre Persistenz ermöglicht es *S. aureus* vermutlich, sich der Wirkung des Immunsystems zu entziehen und vor Antibiotika geschützt zu sein. Außerdem könnte die intrazelluläre Nische als Reservoir für chronische und immer wiederkehrende Infektionen dienen (78).

Die Invasion von *S. aureus* folgt dem Reißverschlußmechanismus, indem die Bakterien nicht direkt an die Rezeptoren der Wirtszellen binden, sondern indirekt mittels Faktoren, z.B. der extrazellulären Matrix. Dabei heften sich *S. aureus* durch Fibronectin Bindeproteine (FnBPs) über gebundenes Fibronectin an das Wirtszellintegrin $\alpha_5\beta_1$ an, worauf es zur F-Aktinreorganisation und zur Aufnahme der Staphylokokken kommt (267). Die FnBP-vermittelte Invasion stellt jedoch nicht den einzigen Invasions-Mechanismus dar. Der Stamm Newman besitzt aufgrund einer Mutation keine funktionellen FnBPs (105), kann aber trotzdem in Wirtszellen durch einen Eap-vermittelten Mechanismus eindringen (124) (Abb. 2-II).

Nach der Invasion von Wirtszellen befinden sich *S. aureus* in einem Autophagosom. Dies konnte durch das Vorhandensein einer Doppelmembran nachgewiesen werden. Diese Autophagosomen säuern sich in der Anwesenheit von *S. aureus* nicht an, da der Erreger die autophagosomale Reifung und die Fusion mit Lysosomen inhibiert (260). *S. aureus* könnte

aber auch aus dem Autophagosom in das Zytoplasma gelangen und den Wirtszelltod auslösen. Sowohl ein Caspase-abhängiger programmierter Zelltod (Apoptose) (10) als auch eine Nekrose durch α -Toxin (68,111) werden als Gründe für den Wirtszelltod nach der Invasion von *S. aureus* angesehen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht alle *S. aureus*-Stämme fähig sind, nach der Invasion den Tod der Wirtszelle auszulösen und diese Eigenschaft scheint mit der Virulenz der jeweiligen Stämme zu korrelieren (150).

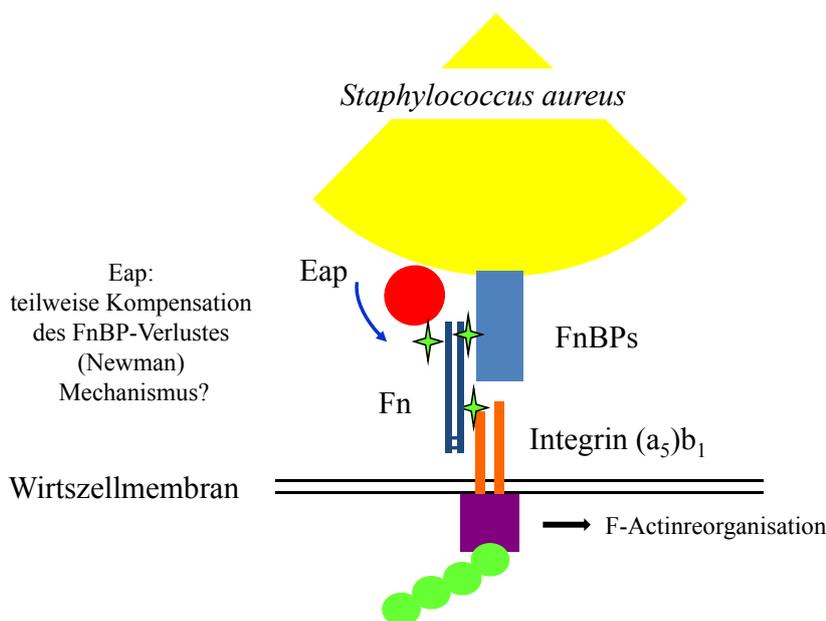


Abb. 2-II: Invasionsmechanismus von *S. aureus*

Modifiziert nach B. Sinha *et al.*, *Thromb. Haemost.* 2005; 94:266-277.

Fn : Fibronectin, FnBPs : Fibronectinbindeproteine, Eap : extracelluläres Adhärenzprotein

Die FnBPs heften sich über gebundenes Fn an das Wirtszellintergrin $\alpha_5\beta_1$ an, worauf es zu einer F-Aktinreorganisation kommt und somit zur Aufnahme von *S. aureus*. Der Mechanismus der Eap-vermittelten Aufnahme ist jedoch noch unbekannt.

Die veränderten Umweltbedingungen nach der Invasion von Wirtszellen haben auch Änderungen in der Genexpression zur Folge. Innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Invasion kommt es zur Hemmung von Genen, die am Metabolismus, am Nährstofftransport und der Zellwandsynthese beteiligt sind. Im Gegenzug erhöht sich die Expression von Virulenzgenen und Genen, die in der Neutralisierung von freien Radikalen und an der Eisenaufnahme beteiligt sind. Sechs Stunden nach der Invasion startet die Transkription von Metabolismus-Genen und die Bakterien beginnen wieder, sich zu replizieren.

Der Stamm 6850, an welchem diese Studie durchgeführt wurde, löste keine Wirtszell-Zytotoxizität aus, sondern überlebte in A549 Zellen bis zu zwei Wochen (77). Nicht nur die Bakterien zeigen eine veränderte Genexpression aufgrund der intrazellulären Lebensweise, sondern auch in Endothelzellen konnten transkriptionelle Veränderungen festgestellt werden, nachdem diese *S. aureus* aufgenommen hatten. Dabei wurden dabei viele Gene identifiziert, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden (181).

SCVs (small colony variants) sind eine langsam wachsende Sub-Population von *S. aureus*, die sich sowohl durch eine fehlende Pigmentierung und Hämolyse-Aktivität als auch durch eine erhöhte Resistenz gegen Aminoglycoside und β -Lactame auszeichnet (235-237). In den letzten Jahren wurden SCVs vermehrt in Verbindung mit persistenten und rezidivierenden Infektionen wie chronische Osteomyelitis gebracht (236). Dabei könnte die intrazelluläre Persistenz der SCVs eine entscheidende Rolle spielen.

Rifampicin, Clindamycin und Chinolone können gegen intrazelluläre Staphylokokken eingesetzt werden, allerdings entwickeln diese sehr schnell Resistenzen, wenn Rifampicin nicht in Kombination mit anderen Antibiotika eingesetzt wird (78).

2.2.2 *S. aureus* als Krankheitserreger

2.2.2.1 Infektionen

Das Spektrum von *S. aureus* verursachten Infektionen reicht von harmlosen Hautinfektionen bis hin zu lebensbedrohlicher Endokarditis. Allerdings nimmt die Häufigkeit der von dem fakultativen Krankheitserreger *S. aureus* verursachten Infektionen weltweit ständig zu (104,161,163). Ausgehend von eitrigen Erkrankungen wie Wundinfektionen, Abszessen und Furunkeln kann die Infektion sich hämatogen auf andere Körperregionen ausbreiten und durch diese septische Metastasenbildung zu Folgeinfektionen wie Endokarditis, Osteomyelitis oder Hirn- und Lungenabszessen führen (170). Von zunehmender Bedeutung sind außerdem Fremdkörper-assoziierte Infektionen, bei denen Implantate und Katheter kolonisiert und mit einem Biofilm überzogen werden. Dies kann zu Infektionen wie Bakteriämien (273) und Endokarditis führen. So konnte die Verwendung von endovaskulären Kathetern als häufigste Quelle für die nosokomiale Endokarditis abgeleitet werden, die eine Mortalitätsrate von ca. 50 % aufweist (70).

2.2.2.2 Toxikosen

Das „staphylococcal scalded skin syndrome“ (SSSS) wird durch Exfoliative Toxine (ET) ausgelöst und das Krankheitsbild reicht von lokaler Blasenbildung bis hin zu großflächiger Exfoliation (158,159). ET spalten Desmoglein-1 und hindern dadurch die Desmosomen daran, eine Verbindung zwischen Zellen der Epidermis-Schichten auszubilden (66). Dies könnte dem Erreger helfen, sich in tiefer liegendem Gewebe auszubreiten (3).

Das „toxic shock syndrome“ (TSS) wird meist durch das als Superantigen wirkende „toxic shock syndrome toxin-1“ (TSST-1) ausgelöst. TSS äußert sich durch hohes Fieber, Hypotension, Multiorganschädigung, Schock, Übelkeit, Myalgie und Ausschlag, der bis zum Abschälen der Haut an Händen und Füßen führen kann (71,287). Ursprünglich wurde das TSS in den USA bei Frauen im Zusammenhang mit der Benutzung von Tampons beschrieben (71). Mittlerweile wird das TSS häufiger als Folge von lokalen *S. aureus*-Infektionen beobachtet (72).

Staphylokokken-Enterotoxine (SE) sind weltweit der häufigste Grund für Lebensmittelvergiftungen, welche meist durch nicht angemessene Lagerung von Lebensmitteln entstehen (118). Die meist selbstlimitierende Intoxikation ist durch Symptome wie Erbrechen, Übelkeit, Fieber, Durchfall und abdominale Schmerzen und Krämpfe charakterisiert, welche nach einer kurzen Inkubationszeit (2-6 h) auftreten (7). SE wirken aber auch als Superantigene (vgl. 2.2.4.4.1) und weisen eine hohe Resistenz gegenüber Hitze und gastrointestinalen Proteasen wie Pepsin auf (7).

2.2.3 Therapie und Resistenzen

Bevor für die Behandlung Antibiotika zur Verfügung standen, verliefen ungefähr 90 % der von *S. aureus* verursachten Bakteriämien tödlich (270). Durch den Einsatz von Penicillin G in den 1940igern, konnte die Mortalität in hohem Maße gesenkt werden. Allerdings wurden kurz danach die ersten Antibiotika-resistenten Stämme beschrieben. β -Lactam-Antibiotika wie Penicillin, Cephalosporin und Carbapeneme binden die Penicillinbindeproteine (PBPs) und verhindern dadurch die Quervernetzung benachbarter Peptidoglykanstränge (vgl. 2.2.4.1). Ursache dafür ist die sterische Ähnlichkeit zwischen der Amidbindung im β -Lactamring und der Acyl-D-Alanyl-D-Alanyl-Struktur in der Pentapeptidkette, welche die Bindungsstelle der PBPs darstellt. Die Bindung der β -Lactame resultiert im Stopp der Peptidoglykan-Biosynthese und der damit verbundenen Autolyse der Staphylokokken.

Die Resistenz gegen β -Lactame wird durch die Produktion von β -Lactamasen vermittelt. Diese Serinproteasen hydrolysieren den β -Lactamring und werden von 95 % aller klinischer *S. aureus*-Isolate gebildet.

2.2.3.1 MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)

Methicillin wurde 1959-1960 eingeführt und bereits nach kürzester Zeit wurden Methicillin-resistente Isolate beschrieben (11). Die Methicillin-Resistenz wird durch das *mecA* Gen vermittelt, welches ein Penicillin-Bindeprotein (PBP2A) mit verringerter Affinität für β -Lactame kodiert (110). *mecA* liegt auf einem mobilen genetischen Element „staphylococcal chromosomal cassette“ (SSC) *mec*, welches die Größe von 21-67 kb hat (129,143). *SCCmec* wird durch die „cassette chromosome recombinase“ Gene *ccrA/ccrB* oder *ccrC* flankiert, welche die horizontale Übertragung von *SCCmec* innerhalb einer Spezies aber auch auf andere Spezies ermöglichen (128). Momentan sind sieben verschiedene *SCCmec* Typen bekannt (314), die anhand ihrer *ccr* und ihrer *mec* Komplexe unterschieden werden (117,130,144). Es wird aber davon ausgegangen, dass noch weitere *SCCmec* Typen identifiziert werden. Der Ursprung von *SCCmec* ist unbekannt, es wird allerdings vermutet, dass koagulase-negative Staphylokokken das anfängliche Reservoir darstellten (310).

Vancomycin wurde als Reserve-Antibiotikum bei methicillin-resistenten Isolaten verwendet, allerdings kam es durch Konjugation zur Übertragung einer Vancomycin-Resistenz von Enterokokken auf *S. aureus* (207), was die Behandlung von MRSA deutlich erschwert.

2.2.4 Pathogenese und Virulenzfaktoren

Die pathogenetische Vielseitigkeit von *S. aureus* wird durch die hohe Anzahl an Virulenzfaktoren bedingt. Dabei wird zwischen offensiven und defensiven Virulenzfaktoren unterschieden. Zu den offensiven Virulenzfaktoren zählen Adhäsine, Invasine und Toxine, zu den defensiven Virulenzfaktoren die Kapsel, Immunmodulationen und Antigenvariationen. Diese Faktoren ermöglichen dem Erreger das Eindringen in den Wirt (Invasion) und das Unterlaufen der Immunabwehr (Evasion), die Schädigung des Wirts sowie die Vermehrung und weitere Ausbreitung im Wirt.

2.2.4.1 Die Zellwand von *S. aureus*

Typisch für Gram-positive Bakterien stellt Peptidoglykan oder Murein mit mindestens 50 % den Hauptbestandteil der Zellwand von Staphylokokken dar (170). Es ist ein lineares β -1,4-verknüpftes Polymer alternierender N-Acetylglucosamin (GlcNAc)- und N-Acetyl-

muraminsäure (MurNAc)-Einheiten (83,84). An jeder MurNAc-Einheit ist über das Carboxylende ein Oligopeptid, in der Regel ein Tetra-, selten ein Pentapeptid, das sogenannte „stem peptide“ angehängt. Diese „stem peptides“ sind untereinander durch kurze Interpeptidketten quervernetzt. Diese Reaktion wird durch das Enzym Transpeptidase katalysiert. Die Bindung von Penicillin und anderen β -Lactam-Antibiotika an die Transpeptidase oder aus diesem Grund auch Penicillinbindeprotein (PBP) genannt, inhibiert die Quervernetzung zweier glykangebundener Peptidketten (82). Die einzelnen Staphylokokken-Spezies unterscheiden sich in der Art der Verbindung zwischen den Muropeptiden. In *S. aureus* zum Beispiel sind sie über eine Pentaglycin-Brücke vernetzt (179). Der Quervernetzungsgrad ist bei Staphylokokken ungewöhnlich hoch, was der Zellwand eine enorme Stabilität verleiht und es Staphylokokken ermöglicht, widrige Bedingungen wie Trockenheit, Hitze oder hohe Salzkonzentrationen zu überleben. Weitere Bestandteile der Zellwand sind anionische Polymere, die in Wand- bzw. Lipoteichonsäuren unterschieden werden. Im Fall von Wandteichonsäuren sind die polymeren Bausteine kovalent an das Peptidoglykan gebunden (148), während Lipoteichonsäuren über einen Lipidanker in der Zytoplasmamembran verankert sind (58).

2.2.4.2 Adhäsine/Invasine

2.2.4.2.1 Zellwandverankerte Adhäsine

Zellwand-gebundene Adhäsine werden auch als MSCRAMMS (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) bezeichnet (74). Diese Adhäsine besitzen ein LPXTG-Motiv (203) und werden durch das Enzym Sortase kovalent an die Pentaglycin-Seitenketten des Peptidoglykans gebunden (183). Die bisher bekannten zellwandverankerten Adhäsine sind in Tab. 2-II aufgelistet. Im Anschluss werden die prominentesten Vertreter dieser Gruppe näher beschrieben.

2.2.4.2.1.1 Protein A

Protein A besteht aus vier oder fünf Domänen, welche jeweils einen Fc-Teil eines IgGs binden kann (294). Dadurch liegen die IgG-Antikörper in der falschen Orientierung, um von den Fc-Rezeptoren auf Neutrophilen erkannt zu werden. Protein A-defiziente Mutanten von *S. aureus* werden effizienter von Neutrophilen phagozytiert und zeigen eine abgeschwächte Virulenz in mehreren Tiermodellen (217,219).

Tab. 2-II: Zellwandverankerte Adhäsine

Oberflächenprotein	AS	Ligand	Quelle
Protein A (Spa)	508	Immunglobulin, von Willebrand Faktor, TNFR1	(97,109,294)
Fibronektinbindeprotein A (FnBPA)	1018	Fibronektin, Fibrinogen, Elastin	(264)
Fibronektinbindeprotein B (FnBPB)	914	Fibronektin, Fibrinogen, Elastin	(138)
Clumping Faktor A (ClfA)	933	Fibrinogen	(187)
Clumping Faktor B (ClfB)	913	Fibrinogen, Keratin	(204)
Kollagenbindeprotein (Cna)	1183	Kollagen	(222)
SdrC	947	Kalzium	(140)
SdrD	1315	Kalzium	(140,141)
SdrE	1166	Kalzium	(140)
Pls	1637	ergänzen	(185,186)
SasA	2261	unbekannt	(185,186)
SasB	937	unbekannt	(185,186)
SasC	2186	unbekannt	(185,186)
SasD	241	unbekannt	(185,186)
SasE/IsdA	354	Häm	(185,186,268)
SasF	637	unbekannt	(185,186)
SasG	1117	unbekannt	(125,185,186)
SasH	308	unbekannt	(185,186)
SasI/HarA/IsdH	895	Haptoglobin	(57,185,186,268)
SasJ/IsdB	645	Hämoglobin, Häm	(185,186,268)
SasK	211	unbekannt	(185,186)
IsdC	227	Häm	(173,184)

Die Anzahl der AS ist exemplarisch für einzelne Stämme angegeben

2.2.4.2.1.2 Fibronektin Bindeproteine (FnBP)

Neben der Adhärenz vermitteln FnBPs auch die Invasion von nicht-professionellen Phagozyten wie Epithel-, Endothelzellen und Fibroblasten (266). Die Invasion folgt dem Reißverschlußmechanismus (vgl. Abb. 2-II). Die meisten *S. aureus*-Isolate besitzen sowohl FnBPA als auch FnBPB, wobei jeder Stamm zumindest eines dieser Proteine aufweist. Die entsprechenden Gene sind im Genom benachbart, und gleichen sich in der Fibronektin-Bindedomäne, so dass von einer Genduplikation ausgegangen werden kann (224,245). Die Bindedomäne besteht aus drei bis fünf sich wiederholenden Motiven, über welche *S. aureus* an Fibronektin und Elastin binden kann (180). Außerdem wird den FnBPs eine Rolle in der PIA (polysaccharid intercellular adhesin)-unabhängigen Biofilmbildung zugeschrieben (213). Die einzelnen FnBPs unterscheiden sich jedoch auch untereinander. So binden und aktivieren FnBPAs Thrombozyten, was zu deren Aggregation führt (113). Des Weiteren scheinen FnBPAs die Bindung an T-Zellen und deren Coaktivierung auszulösen (195).

2.2.4.2.1.3 Clumping Faktoren

Der Clumping Faktor A (ClfA) wird in der Stationärphase gebildet (16), bindet Fibrinogen und überzieht die Bakterien dadurch mit einer Schutzschicht, welche die Anlagerung von Opsoninen verhindert. Der Clumping Faktor B (ClfB) wird nur bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase gebildet und bindet ebenfalls Fibrinogen (204,301) und schützt die Bakterien auf dieselbe Weise vor Opsonisierung (73).

2.2.4.2.2 Lösliche Adhäsine

Diese Gruppe von Adhäsinen wird auch als SERAM (secreted expanded repertoire adhesive molecules) bezeichnet. Da sie kein LPXTG-Motiv besitzen, werden sie nicht durch die Sortase in der Zellwand verankert, sondern von den Staphylokokken sezerniert. Da die SERAMs viele Moleküle der extrazellulären Matrix binden können, spielen sie sowohl in der Adhäsion als auch in der Invasion eine wichtige Rolle. Außerdem weisen einige dieser löslichen Adhäsine immunmodulatorische Funktion auf. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe werden im Anschluss näher beschrieben.

2.2.4.2.2.1 Extracellular adherence protein (Eap)

Eap ist ein Analogon des von Jönsson *et al.* beschriebenen Proteins Map (major histocompatibility complex class II analog protein) (137) und das korrespondierende Gen konnte in 100 % aller *S. aureus*-Isolate nachgewiesen werden (126,139). Es bindet eine Vielzahl von Matrix- und Plasmaproteinen wie z.B. Fibronectin (Fn), Fibrinogen (Fg), Vitronectin (Vn) und Kollagen (189). In Abhängigkeit des Stammes hat Eap die Größe von 60-72 kDa und besteht aus vier bis sechs einzelnen Tandem Repeat-Domänen (124).

Durch die Bildung von Oligomeren und die Rückbindung an die bakterielle Zellwand vermittelt Eap die Aggregation der Staphylokokken. Da Eap sowohl an die bakterielle Zellwand als auch an eukaryotische Komponenten binden kann, wird die Adhärenz von Staphylokokken an Epithelzellen und Fibroblasten erhöht (216). Zusätzlich besitzt Eap eine immunmodulatorische Funktion, da es ICAM-1 binden kann und somit die Aktivierung und die Diapedese von Leukozyten und die Extravasation verhindert (34). Entzündungszellen und Blutplättchen spielen in der Wundheilung eine wichtige Rolle, weil die von ihnen gebildeten Wachstumsfaktoren die Gefäßbildung regulieren (244,303). Da Eap die Chemotaxis inhibiert, könnte dieses Protein die Angiogenese indirekt behindern (35). Eap interagiert auch mit Proteinen der extrazellulären Matrix, die in der Wundheilung durch die Bildung eines

provisorischen fibrillären Netzes benötigt werden. Dadurch können verschiedene Funktionen von Gewebs- oder Gefäßzellen beeinflusst werden, die zur Induktion der Angiogenese beitragen (76,231,271). Der Stamm Newman bildet vergleichsweise große Mengen an Eap. Auf diese Weise wird der Verlust von funktionellen FnBPs ausgeglichen, welche aufgrund einer Punktmutation sezerniert werden (105).

2.2.4.2.2 Extracellular matrix binding protein (Emp)

Das Emp besitzt eine Größe von 38,5 kDa und bindet Fn, Fg, Vn und Kollagen. Das korrespondierende Gen konnte in 100 % aller getesteten *S. aureus*-Isolate nachgewiesen werden. Wie bei Eap wird vermutet, dass Emp an die Zelloberfläche von Staphylokokken rückbinden kann. Dafür sollen sowohl hydrophobe Interaktionen mit der Lipoteichonsäure als auch elektrostatische Interaktionen mit negativ geladenen Oberflächenmolekülen wie Teichonsäuren verantwortlich sein (122).

2.2.4.2.3 Extracellular fibrinogen binding protein (Efb)

Efb ist 19 kDa groß, kann Fibrinogen binden und inhibiert die Thrombozyten-Aggregation durch Bindung der α -Kette des Fibrinogens. Außerdem bindet Efb an den Komplementfaktor C3, welcher eine zentrale Rolle in allen drei Komplement-Wegen spielt, und verhindert dadurch die Komplementaktivierung und die Opsonisierung (162).

2.2.4.2.4 Koagulase (Coa)

Die 60-70 kDa große Koagulase (230) weist selbst keine Enzymaktivität auf. Erst durch die Bindung an Prothrombin entsteht ein proteolytischer Komplex, welcher die Polymerisierung von Fibrinogen zu Fibrin auslöst. Die dadurch entstehende Fibrinkapsel grenzt den Infektionsherd gegenüber der Umgebung und dem Immunsystem ab. Durch die Wirkung der Staphylokinase wird Plasminogen zu Plasmin gespalten, was wiederum die Fibrinkapsel auflösen kann und dadurch eine schubweise Ausbreitung der Infektion zur Folge hat (23,24).

2.2.4.3 Extrazelluläre Enzyme

S. aureus produziert 22 verschiedene extrazelluläre Enzyme (157), darunter Proteasen, Lipasen und Nukleasen. Diese bauen organische Makromoleküle ab, so dass der Erreger diese als Nährstoff nutzen kann und gleichzeitig vermitteln sie die Ausbreitung der Bakterien im Gewebe (170).

2.2.4.4 Immunevasion

S. aureus verfügt über mehrere Mechanismen, um das Immunsystem des Wirtes zu umgehen. Das Protein CHIPS (chemotaxis inhibitory protein of staphylococci) bindet sowohl den formylierte Peptide-Rezeptor (FPR) als auch den C5a-Rezeptor auf Neutrophilen und verhindert dadurch deren Aktivierung (50). Eap stellt ein weiteres Protein dar, welches die Chemotaxis inhibiert., wobei Eap ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) auf der Zelloberfläche von Endothelzellen bindet, blockiert es die Bindung von LFA-1 (lymphocyte-function-associated antigen-1) auf der Oberfläche von Neutrophilen. Dies verhindert die Adhäsion und die Diapedese von Leukozyten und die Extravasation (34).

Außerdem verhindern einige Faktoren die Phagozytose, wie Protein A (vgl. 2.2.4.2.1.1), die Clumping Faktoren (vgl. 2.2.4.2.1.3), die Kapsel (206,283), Efb (vgl. 2.2.4.2.2.3) und die Staphylokinase. Letztere spaltet die auf der bakteriellen Zelloberfläche gebundenen Moleküle C3b und IgG und reduziert dadurch die Phagozytose (249).

S. aureus sezerniert mit α -, β -, γ - und δ -Toxin, Leukozidin (Luk) und dem Panton-Valentine-Leukozidin (PVL) sechs zytolytische Toxine, die Leukozyten und andere Wirtszellen durch Bildung einer „ β -barrel“ Pore lysieren (73) und somit sowohl die spezifische als auch die unspezifische Immunantwort hemmen. γ -Toxin, Luk und PVL werden jeweils von zwei unabhängig sezernierten Komponenten S und F gebildet (233). Dabei kommt dem PVL eine besondere Bedeutung zu, da es mit schweren nekrotisierenden Hautinfektionen (166,232) und mit nekrotisierender hämorrhagischer Pneumonie in Verbindung gebracht wird (166).

Der Einbau von positiven Ladungen in die Zellhülle schützt die Staphylokokken vor kationischen antimikrobiellen Peptiden (CAMP) (227,228,272) und die Modifikation der Muraminsäure schützt *S. aureus* vor dem in vielen Körperflüssigkeiten vorkommenden Lysozym (14).

2.2.4.4.1 Superantigene

Enterotoxine und das TSST-1 wirken als Superantigene. Diese binden außerhalb der Antigenbindungsstelle an ein MHC-II-Molekül und gleichzeitig an die V β -Region eines T-Zellrezeptors, ebenfalls außerhalb der Antigenbindungsstelle (51). Die Antigen-unabhängige Vernetzung bewirkt die Aktivierung von bis zu 25 % aller T-Zellen (127) und führt dadurch zu einer massiven Freisetzung von inflammatorisch wirksamen Zytokinen und zum toxischen Schock (198). Als Folge kommt es zu einer Expansion reaktiver T-Zellen,

welche entweder anergisch werden oder durch Apoptose eliminiert werden (116). Hohe Dosen von Superantigenen führen auch zu B-Zell-Apoptose (276). Da durch Superantigene sowohl die T- als auch die B-Zell-Immunantwort beeinträchtigt wird, ist die Immunabwehr deutlich herabgesetzt.

2.2.4.5 Biofilmbildung

Biofilme kommen in allen Ökosystemen vor und die darin enthaltenen Bakterien bilden 99,99 % der vorhandenen Biomasse (46). Die Biofilmmatrix besteht im Allgemeinen aus Mikrokolonien, Wasserkanälen, einer Mischung von Zellen und extrazellulären Polymeren (z.B. Polysaccharide, Glykoproteine und Proteine) (46).

Auch für Staphylokokken wurde die Fähigkeit Biofilme auszubilden nachgewiesen. Dabei erfolgt die Biofilmbildung in zwei Schritten: Zunächst adhären einzelne Zellen an eine Oberfläche. Aus diesen Zellen entwickelt sich durch fortschreitendes Wachstum ein einschichtiger Zellrasen. Diese sogenannte Primäradhäsion wird durch die Ladung und die Oberflächenhydrophobizität der Zellhülle vermittelt. An diesem ersten Schritt der Biofilmbildung sind sowohl oberflächenassoziierte Proteine, z.B. Atl, als auch Teichonsäuren beteiligt. Der zweite Schritt ist durch kumulatives Wachstum der adhären Staphylokokken gekennzeichnet, was schließlich zur Ausbildung eines mehrschichtigen Biofilms führt. Hierbei ist das sogenannte „polysaccharid intercellular adhesin“ (PIA) von Bedeutung, da es den Kontakt zwischen den Bakterien herstellt. PIA besteht aus mindestens 130 β -1-6 verknüpften N-acetylglucosaminoglykan-Einheiten, von denen 15-20 % deacetyliert und deshalb als positiv geladen vorliegen (172). Das für die PIA-Synthese verantwortliche *ica*-Operon setzt sich aus vier ORFs (*icaABCD*) und dem negativen Regulatorgen *icaR* zusammen (98). Entsprechende Analysen ergaben die Existenz des *ica*-Operons sowohl in *S. epidermidis* als auch in fast allen getesteten *S. aureus*-Stämmen (47). Darüber hinaus zeigte sich, dass *ica*-defiziente Mutanten der beiden Spezies zwar zur Adhärenz befähigt sind, jedoch keinen mehrschichtigen Biofilm aufbauen können (47).

Die *ica*-Expression ist abhängig von unterschiedlichen Umweltbedingungen und scheint durch σ^B kontrolliert zu sein (147,241). Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass Staphylokokken einen PIA-unabhängigen Biofilm ausbilden können. Dabei spielen das „biofilm associated protein“ (Bap) (49), das „*S. aureus* surface protein“ (SasG) (45) und die Fibronectin-Bindeproteine (FnBPA/B) (213) eine entscheidende Rolle.

Als weitere Einfluss nehmende Faktoren wurden hohe Osmolarität, hohe Temperaturen und subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika identifiziert, welche die *ica*-Expression und die Biofilmbildung in *S. epidermidis* erhöhten, in *S. aureus* jedoch nicht (242). Lediglich anaerobe Wachstumsbedingungen führten in beiden Spezies zu einer gesteigerten *ica*-Expression (48). Diese Unterschiede lassen vermuten, dass die Regulation der Biofilmbildung Spezies-spezifische Unterschiede aufweist.

Innerhalb eines Biofilms sind Nährstoffe, Abfallstoffe und Signalmoleküle ungleichmäßig verteilt. In der Folge sind die im Biofilm assoziierten Bakterien in Bezug auf ihre Proteinsynthese und Atmungsaktivität sehr heterogen, was die Bekämpfung solcher Zellverbände sehr erschwert (121,311).

2.2.4.5.1 Resistenz durch Biofilm

Bakterien in Biofilmen sind zwischen 10- und 1000-mal resistenter gegenüber antimikrobiellen Substanzen als planktonisch lebende Bakterien (69,101,205,238). Dies liegt u. a. daran, dass diese Substanzen durch die Polysaccharid- oder Proteinschicht des Biofilms daran gehindert werden, zu den Bakterien vorzudringen. Allerdings demonstrierten Dunne *et al.*, dass Vancomycin und Rifampicin Biofilme effizient durchdringen können (61). Die erhöhte Resistenz resultiert demnach eher aus dem durch Nährstoff- und Sauerstoffmangel bedingten verringerten Wachstum innerhalb des Biofilms (292,293), da manche Antibiotika aktive Zellteilung oder einen aktiven Metabolismus benötigen, um ihre Wirkung zu entfalten (119). Darüber hinaus könnte der enge Kontakt innerhalb eines Biofilms den Austausch von mobilen genetischen Elementen, die u. a. Resistenzen gegenüber Antibiotika kodieren, fördern (87). Außerdem könnte die Aktivierung von Quorum Sensing-Systemen und die vermehrte Bildung von „multiple drug resistance“ (MDR)-Pumpen ein Rolle bei der Resistenz spielen (174). Aber auch degradative Enzyme und neutralisierende Stoffe können die Wirksamkeit von antimikrobiellen Substanzen verringern (93).

2.2.5 Stressantwort und Genregulation

2.2.5.1 Stressantwort

S. aureus ist ideal an sich ändernde Umweltbedingungen angepasst (43), da der Erreger schnell und spezifisch auf Wirts- oder Umweltstimuli (20,37,157,209) wie z.B. osmotischen Stress oder Stress durch Oxidantien, extreme pH-Werte und Temperaturen reagiert (43). Dafür nutzt *S. aureus* ein ausgeklügeltes Signaltransduktions-, Stress- und Regulatorsystem, darunter mit *agr* mindestens ein Quorum Sensing-System (26).

So ist *S. aureus* befähigt, in Medien mit NaCl-Konzentrationen über 1,7 M zu wachsen (289). Um dem hohen Turgordruck zu widerstehen, werden die Interpeptidbrücken des Peptidoglykans verkürzt, was vermutlich die mechanische Stabilität der Bakterienzelle erhöht (298). Andererseits wird *S. aureus* zwar schnell durch Säure mit einem pH-Wert von 2 abgetötet, kann aber selbst eine Säureresistenz gegen pH 2 entwickeln, wenn der Mikroorganismus zuvor einem nicht-letalen sauren pH-Wert ausgesetzt wurde (30). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unbekannt.

Außerhalb des Wirtes oder in Abszessen kann es zu Nährstoffmangel kommen. Die Limitierung von Glucose oder anderer Nährstoffe führt nach zwei Tagen bei 37 °C zum Absterben von 99 % der Bakterienpopulation. Die überlebenden Bakterien bleiben aber bis zu mehreren Monaten wachstumsfähig und zeichnen sich durch eine geringere Größe und geringere Anzahl von Teilungssepten aus. Darüber hinaus besitzen sie eine erhöhte Resistenz gegen Säure, oxidativem Stress und lytische Enzyme, so dass von einer Kreuzresistenz gegen mehrere Stressarten ausgegangen werden kann. Außerdem dienen die toten Bakterien den Überlebenden als Nährstoffquelle (302).

S. aureus reagiert aber auch auf Stress, der durch subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika ausgelöst wird. So konnten Ohlsen *et al.* eine bis zu 30-fach erhöhte Produktion von α -Toxin durch subinhibitorische Konzentration von Methicillin bei MRSA-Isolaten nachweisen (215). Des Weiteren konnte für Florfenicol eine gesteigerte mRNA Expression von *fnbA*, *fnbB*, *coa*, *emp*, und *eap* nachgewiesen werden (21).

Geiger *et al.* zeigten, dass H₂O₂ und subinhibitorische Konzentrationen von α -Defensin den Promotor P1 des *sae*-Systems aktivieren können. Diese Substanzen vermitteln normalerweise die Abtötung von Bakterien durch Phagozyten. Durch die Aktivierung des *sae*-Systems in *S. aureus* werden Gene, die an der Adhäsion, der Immunmodulation und an der Toxizität

beteiligt sind (155,165,247), vermehrt exprimiert und so könnte das *sae*-Regulon zur Abtötung von PMNs (polymorphonuclear neutrophils) beitragen (79). Das *sae*-System kann aber auch durch Glycopeptide und β -Laktame aktiviert werden (155), wohingegen Clindamycin dieses inhibiert (210). Aber auch funktionelle Unterschiede konnten durch subletale Konzentrationen von Antibiotika festgestellt werden. So fördern Aminoglycoside die Adhärenz von *S. aureus* FDA 209P an HeLa-Zellen (193,194).

Die Fähigkeit, Stressbedingungen zu überleben, geht einher mit der vermehrten Expression von Stressantwort-Genen und korreliert mit der Virulenz in *S. aureus*, da Regulatoren wie SarA nicht nur an der Säureresistenz oder der Hitzeschock-Stressantwort, sondern auch über co-regulatorische Elemente an der Bildung von Virulenzfaktoren beteiligt sind (43). So ist es nicht verwunderlich, dass unter Stressbedingungen, meist am Beispiel von subinhibitorischen Antibiotika gezeigt, die Expression einer Vielzahl an Genen, darunter auch Virulenzgene, gesteigert ist (18,19,21,54,80,112,155,156,193,194,215,295). Für Desinfektionsmittel hingegen sind sehr wenige Daten verfügbar. Chang *et al.* zeigten, dass hypochlorige Säure, ein in der Desinfektion von Badewasser verwendetes Oxidants, die Transkription von *S. aureus* beeinflusst. Unter anderem kam es zu einer gesteigerten Expression von mehreren Virulenzfaktoren, wie Exotoxine, Hämolysine, Leukozidine, Koagulase und Adhäsinen (31).

2.2.5.2 Genregulation

S. aureus verfügt über 124 ORFs, die Transkriptionsregulatoren kodieren, darunter 63 Regulatoren mit einem „helix-turn-helix“-Motiv, 31 Regulatoren ohne ein bekanntes DNA-Bindemotiv, 17 Zweikomponenten-Systeme, Anti-Terminatoren, Repressoren, *sarA*-Homologe und Sigmafaktoren (157).

2.2.5.2.1 Sigmafaktoren

Alternative Sigmafaktoren sind essentielle, abtrennbare Untereinheiten der prokaryotischen RNA-Polymerase (145) und ergänzen das Core-Enzym ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) zum Holoenzym (σ RNAP). Das Holoenzym erkennt spezifisch Promotorsequenzen und initiiert dadurch die RNA-Synthese, während das Core-Enzym die meisten zur Transkription von DNA in RNA erforderlichen Reaktionen katalysiert. In normal wachsenden Bakterien unterliegt die Transkription der meisten Gene dem sogenannten Housekeeping σ -Faktor.

Parallel dazu besitzen viele Bakterien weitere σ -Faktoren, die spezifische Erkennungssequenzen binden und Gene transkribieren, die unter speziellen Bedingungen wie z.B. Stress

benötigt werden (103). Über die Regulation durch Sigmafaktoren können Bakterien zeitgleich die Transkription einer Vielzahl an Genen starten, die weitverteilt im Chromosom liegen. Im Fall von *S. aureus* sind neben dem Housekeeping-Sigmafaktor σ^A , drei weitere Sigmafaktoren, σ^B , σ^H und σ^S beschrieben. Dabei wird σ^H eine Rolle in der genetischen Kompetenz zugeschrieben (200), während σ^B als Regulator von elementaren zellulären Prozessen und der generellen Stressantwort und Virulenzfaktoren diskutiert wird. σ^S wird als Stationärphasen-Sigmafaktor angesehen, welcher auch an der Stressantwort und Virulenz beteiligt sein soll (262).

2.2.5.2.1.1 Der alternative Sigmafaktor σ^B

S. aureus war der erste Gram-positive Mikroorganismus, in welchem σ^B beschrieben wurde (309). Mittlerweile konnten Bischoff *et al.* 251 Gene mittels Microarray-Analyse identifizieren, die durch σ^B kontrolliert werden (16), darunter Virulenzfaktoren (65,85,142,153,316) und regulatorische Elemente (16,17,176,282). Des Weiteren wurde die Beteiligung von σ^B an der Glycopeptid- und Methicillinresistenz (15,234,265), an der Biofilmbildung (241), der Invasion von Osteoblasten (202) sowie an der allgemeinen Stressantwort (30,85,152,153) demonstriert.

Die Aktivität von σ^B ist in zwei Signalkaskaden organisiert. Unter normalen Wachstumsbedingungen liegt σ^B in einem Komplex mit dem Anti- σ -Faktor RsbW vor und ist dadurch inaktiv. Parallel phosphoryliert RsbW den Anti-Anti σ -Faktor RsbV, wodurch dessen Bindung an RsbW inhibiert wird. Werden die Bakterien jedoch gestresst, wird RsbV durch RsbU dephosphoryliert, infolgedessen RsbV den Anti- σ -Faktor RsbW bindet. Dies wiederum führt zur Auflösung des RsbW- σ^B -Komplexes, so dass σ^B als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann (261) (Abb. 2-III).

Die genetische Organisation des σ^B -Operons in Staphylokokken gleicht dem von *Bacillus subtilis* und die korrespondierenden Gene erfüllen ähnliche Funktionen (261). Doch im Gegensatz zu *B. subtilis*, wo σ^B die Aufgabe eines Stationärphasen-Sigmafaktors übernimmt (25), wurde die Aktivität von σ^B in *S. aureus* bereits in der exponentiellen Phase, mit einem Maximum in der späten exponentiellen Phase, nachgewiesen (85). Im Vergleich zu *B. subtilis* resultierte in *S. aureus* ein ATP-Mangel oder die Zugabe von Ethanol ebenfalls nicht in der σ^B -Aktivierung (218). Aus diesem Grund wurde in *S. aureus* auf die Beteiligung von σ^B eher an elementaren zellulären Prozessen, wie dem Aufbau der Zellhülle, dem Membrantransport, dem intermediären Metabolismus und an der Virulenz geschlossen (218).

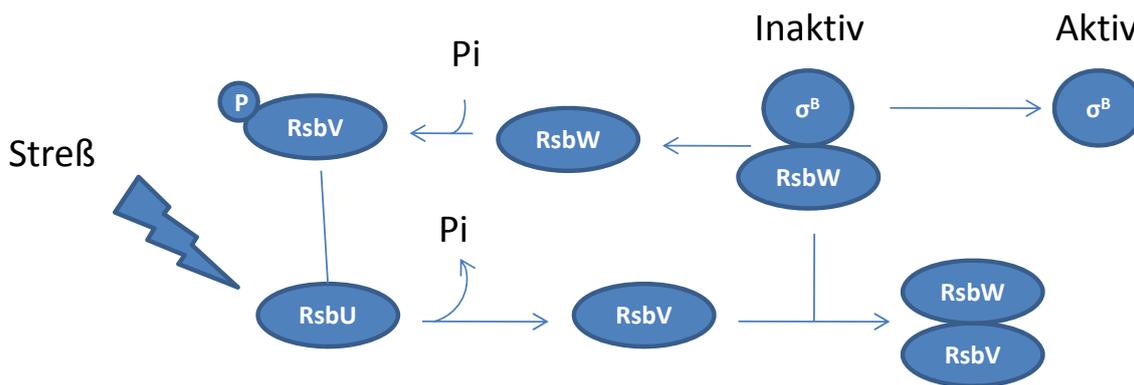


Abb. 2-III: Die Organisation der σ^B -Aktivität

σ^B : Alternativer Sigmafaktor σ^B , RsbW: Anti- σ -Faktor, RsbV: Anti-Anti σ -Faktor, RsbU: Phosphatase, Pi: anorganische Phosphat

Unter normalen Wachstumsbedingungen ist σ^B an RsbW gebunden und dadurch inaktiv. RsbW phosphoryliert außerdem RsbV, wodurch dessen Bindung an RsbW inhibiert wird. Unter Stress wird RsbV durch RsbU dephosphoryliert, worauf RsbV an RsbW bindet. Dies führt zur Auflösung des RsbW- σ^B -Komplexes und zur Aktivierung von σ^B .

Bischoff *et al.* beschrieben weiterhin einen Einfluss von σ^B auf die Resistenz gegenüber Antibiotika, deren Zielstruktur die Zellwand darstellt (15). Morikawa fand heraus, dass eine Überexpression von σ^B die Dicke der Zellwand erhöht und gleichzeitig zu einer unregelmäßigen Zellform führt (201). Die Transkription des σ^B -Operons wird durch drei unterschiedliche Promotoren kontrolliert, von denen zwei durch Stress wie Hitze, hohe Osmolarität, hohen und niedrigen pH-Wert aktiviert werden. Dies wiederum induziert u. a. die Expression des Staphyloxanthin-Operons, des alkalischen Schock Proteins 23 und der Thermonuclease (153). Dadurch schützt sich *S. aureus* vor schädlichen Umwelteinflüssen. So überraschte es nicht, dass σ^B -defiziente Mutanten unfähig waren, auf Säurestress zu reagieren. Außerdem zeigten sie eine verringerte Resistenz gegenüber oxidativen Stress und Hitze (30,153). Die Beteiligung von σ^B an der Pathogenität ist noch umstritten, da in Tiermodell-Studien Mutationen in σ^B keinen nachweislichen Effekt auf die Pathogenität von *S. aureus* hatten (30,65). Jonsson *et al.* jedoch fanden heraus, dass σ^B von *S. aureus* benötigt wird, um im Mausmodell Sepsis und Arthritis auszulösen (136) und in einer weiteren Studie konnten Lorenz *et al.* zeigen, dass der funktionelle Verlust von σ^B in einer verringerten Virulenz bei Katheter-bedingten Infektionen resultierte (169).

2.2.5.2.2 Zweikomponenten-Systeme

Bakterielle Zweikomponenten-Systeme bestehen meist aus einer transmembranen Sensor-Histidinkinase und einem zytosolischen Response Regulator. Aufgrund eines äußeren Signals autophosphoryliert die Sensor-Histidinkinase an dem namensgebenden Histidin. Diese Phosphatgruppe wird auf ein Aspartat des Response Regulators übertragen, was dessen Aktivierung zur Folge hat. Der aktivierte Regulator greift in der Regel in die Genexpression ein. Die Mehrheit der Response Regulatoren sind Transkriptionsfaktoren, die mit Promotor-Bereichen in Wechselwirkung treten und dadurch die Transkription beeinflussen (196,275). Inzwischen sind 17 putative Zweikomponenten-Systeme in *S. aureus* bekannt, von denen *agr*, *saeRS*, *srrAB*, *arlSR* und *lytRS* am besten untersucht sind (157). Im Anschluss werden jedoch nur *agr* und *saeRS* genauer beschrieben.

2.2.5.2.2.1 Agr (Accessory gene regulator)

Der *agr*-Locus besteht aus fünf Genen (*agrABCD* und *hld*), es werden aber nur zwei funktionelle Transkripte abgeleitet (RNAII, RNAIII), welche unter der Kontrolle von zwei Promotoren (P2, P3) stehen (226). Dabei gilt RNAIII als der Effektor des Agr-Systems (131,212), obwohl auf diesem Transkript ebenfalls das δ -Hämolyisin, welches in der Regulation keine Rolle spielt, kodiert wird (131). Die Genprodukte AgrC und AgrA bilden ein Zweikomponenten-System (211).

Während der exponentiellen Wachstumsphase wird ausgehend von *agrD* ein Propeptid gebildet. Über die proteolytische Spaltung des Propeptids durch das membranständige AgrB entsteht das reife AIP (autoinducing peptide), welches meist aus sieben bis neun Aminosäuren aufgebaut ist (134,315). Der *agr*-Locus wird aktiviert, wenn die AIP-Konzentration einen Schwellenwert erreicht, welcher eine Bakteriendichte von ca. 10^8 - 10^9 Bakterien/ml benötigt.

Diese Art von Regulationsmechanismus wird Quorum Sensing genannt (75). AIP akkumuliert extrazellulär und bindet an die Sensor-Histidinkinase AgrC, was wahrscheinlich zur Phosphorylierung des Response Regulators AgrA führt (133). Daraufhin kann AgrA die Promotoren P2 und P3 binden oder mit anderen Faktoren interagieren (27). RNAIII ist der pleiotrope Effektor des Agr-Systems und besitzt eine Halbwertszeit von 15 min (131). RNAIII kann die Transkription der Zielgene direkt oder indirekt durch Regulation von Transkriptionsregulatoren wie SarT und SarS (190,259,282) initiieren (Abb. 2-IV).

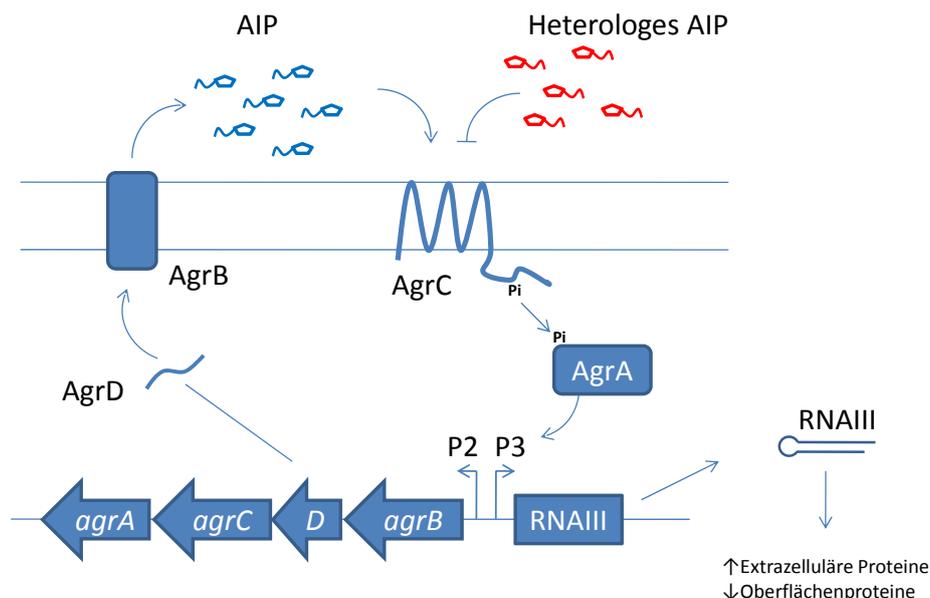


Abb. 2-IV: Das Quorum Sensing-System Agr

AIP: autoinducing peptide, P: Promotor

Aus AgrD entsteht durch eine AgrB-abhängige Proteolyse das Signalpeptid AIP. Dieses aktiviert ab einer bestimmten Konzentration das Zweikomponenten-System AgrC/AgrA, wodurch die Promotoren P2 und P3 aktiviert werden und der Transkriptionsregulator RNAIII exprimiert wird. Heterologe AIPs inhibieren die Aktivierung des Agr-Systems.

Zu den Zielgenen des Agr-Systems gehören die meisten extrazellulären Proteine (Aktivierung) und viele Oberflächenproteinen (Inhibierung) (212,255). Der Mechanismus der Transkriptionsregulation durch den Effektor des Systems, RNAIII, ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise bildet RNAIII stabile Sekundärstrukturen in der DNA, welche Proteinbindestellen darstellen (212). Ebenso könnte RNAIII an Transkriptionsfaktoren binden und deren allosterische Modifikation bewirken (5) oder die Stabilität der Transkripte der entsprechenden Zielgene verändern (209).

Der *agr*-Locus ist innerhalb der Staphylokokken nur teilweise konserviert. Der hypervariable Anteil hat zur Folge, dass verschiedene Staphylokokken-Spezies unterschiedliche AIPs synthetisieren (171). Dieser Polymorphismus des *agr*-Locus geht auf die Spezies-spezifischen Unterschiede in Bezug auf *agrB*, *agrD* und *agrC* zurück und führt zur Einteilung der Staphylokokken in verschiedene *agr*-Gruppen (132,133). Dabei unterscheiden sich nicht nur die AIPs der Staphylokokken-Spezies wie z.B. *S. aureus* und *S. epidermidis*, sondern auch innerhalb der Spezies *S. aureus* können vier *agr*-Gruppen unterschieden werden (132,133). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung der AIPs an den eigenen AgrC-Rezeptor durch AIPs einer heterologen *agr*-Gruppe inhibiert wird und damit die Signaltransduktion und die

Aktivierung des *agr*-Systems unterbrechen. Diese Inhibierung führt zwar nicht zu einer Wachstumshemmung, jedoch zu einer Modulation der Virulenzeigenschaften. Dies könnte eine Strategie sein, über welche bereits etablierte Bakterien eine Neuinfektion von ähnlichen Keimen verhindern, indem sie die Regulationssysteme der anderen Spezies inhibieren (133). In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass die gleichzeitige nasale Kolonisierung durch verschiedene *S. aureus*-Stämme sehr selten ist. Wurde eine nasale Co-Kolonisierung nachgewiesen, gehörten die Stämme stets der gleichen *agr*-Gruppe an (96). Obwohl die Korrelation zwischen Virulenz und *agr*-Gruppe diskutiert wird, konnte diese bisher nicht gezeigt werden (225).

2.2.5.2.2.2 Sae-Operon

Giraud *et al.* beschrieb als Erster den *sae*-Locus und demonstrierte die verringerte Virulenz einer *sae*-defizienten Mutante (92). Das *sae*-Regulon besteht aus 4 ORFs (*saePQRS*), wobei die Komponenten SaeR und SaeS starke Sequenzhomologien zu dem Response Regulator und zu der Sensor-Histidinkinase eines klassischen Zweikomponenten-Systems aufweisen (89) (Abb. 2-VII). Die upstream von *saeR* und *saeS* gelegenen ORFs spielen innerhalb des *sae*-Operons eine wichtige Rolle. Die genaue Funktion der korrespondierenden Proteine ist jedoch noch nicht bekannt. Das Genprodukt SaeQ weist eine N-terminale Signalpeptid-Sequenz sowie vier transmembrane Bereiche auf, besitzt aber keine Homologie zu bekannten Proteinen, jedoch Ähnlichkeiten zu einem Transporter (210). SaeP besitzt weder ein Signalpeptid noch hydrophobe Bereiche und zeigt ebenfalls keine Homologie zu bekannten Proteinen (274). Es konnten vier einander überlappende *sae*-Transkripte (T1-T4) nachgewiesen werden (1,79,94,274), die wahrscheinlich unter der Kontrolle von zwei unterschiedlichen Promotoren (P1 und P2) stehen (1,79), aber alle denselben Terminator downstream von *saeS* besitzen (94,274) (Abb. 2-V).

T3 (*saeR* und *saeS*) wird durch den Promotor P2 initiiert und wird schon in der frühen exponentiellen Wachstumsphase transkribiert, nimmt aber während der mittleren exponentiellen Wachstumsphase ab. Erst dann werden die Transkripte T1, T2 und T4 von Promotor P1 ausgehend gebildet. Dabei entspricht T1 der Länge des gesamten Locus (Abb. 2-V). Demzufolge könnte T1 zu T2 (*saeQ*, *saeR* und *saeS*) prozessiert werden. T4 könnte ebenfalls aus der Prozessierung von T1 entstehen oder ein eigenes Transkript darstellen. Die Gene *saeR* und *saeS* werden während der kompletten Wachstumsphase transkribiert, anfangs

von Promotor P2 ausgehend und später von Promotor P1 (1), wobei letzterer durch SaeRS autoinduziert wird.

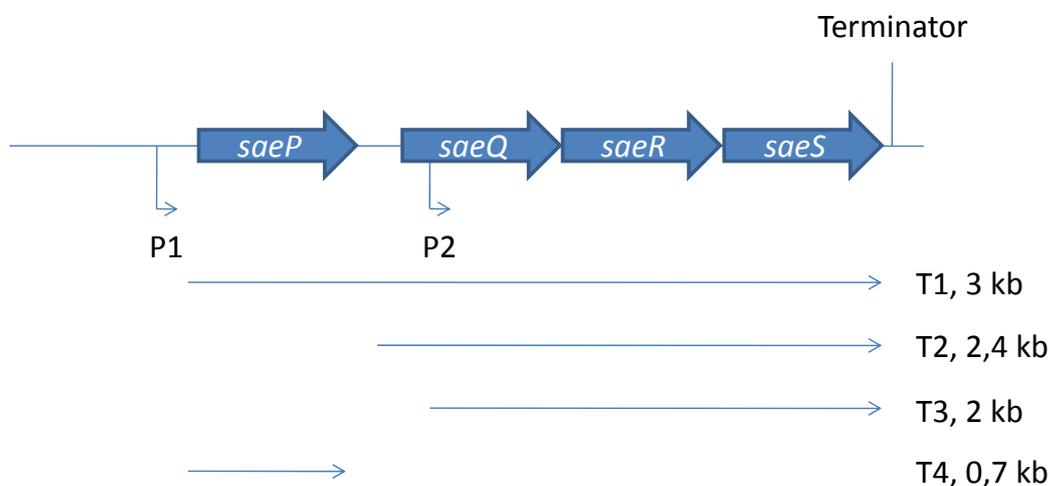


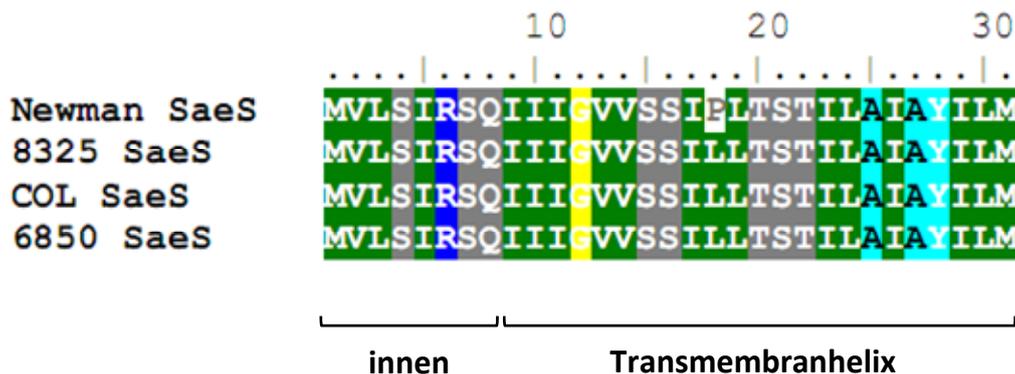
Abb. 2-V: Genetischer Aufbau des *sae*-Operons

Das *sae*-Operon besteht aus 4 ORFs. Die 4 überlappenden Transkripte (T1-4) werden in der frühen exponentiellen Wachstumsphase ausgehend von Promotor P2 transkribiert und danach von Promotor P1 ausgehend.

SaeRS wird als transkriptionaler Regulator beschrieben (90). Entsprechende Experimente deckten jedoch auf, dass Mutationen in *saeRS* keinen nachweislichen Einfluss auf die Transkription von *agr*, *sigB*, *sarA* oder *rot* hatten (90,95,164). Diese Beobachtungen charakterisieren das Sae-System als einen zentralen untergeordneten Effektor innerhalb des regulatorischen Netzwerks. Wie auch andere bakterielle Regulationssysteme (z.B. Agr) ist auch das Sae-System autoreguliert (79,247).

Eine Besonderheit stellt das Sae-System des Stammes Newman dar. Hier resultiert ein Aminosäureaustausch (Prolin für Leucin an Position 18) (Abb. 2-VI) in der ersten Transmembran-Domäne der Sensor-Histidinkinase SaeS (6) (Abb. 2-VII) in der konstitutiven Aktivierung des Sae-Systems (1,79,274). Adhikari *et al.* vermuteten, dass durch diesen Aminosäureaustausch (L18P) die α -helikale Struktur der Sensor-Histidinkinase SaeS in eine „ β -sheet“ Struktur umgewandelt wird (1).

In der Folge produziert der Stamm Newman im Vergleich zu anderen *S. aureus* Stämmen große Mengen des *sae*-Transkriptes (274). Steinhuber *et al.* konnten in SaeS von Stamm Newman einen zweiten Aminosäureaustausch feststellen (274), doch bei dem sequenzierten Stamm handelte es sich um einen Subklon (persönliche Mitteilung Christiane Wolz).

**Abb. 2-VI: Proteinsequenzvergleich**

Die Proteinsequenz der Sensorhistidin-Kinase SaeS der *S. aureus*-Stämme 8325, COL und 6850 sind identisch. Nur der Stamm Newman besitzt in der Transmembranhelix einen Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin.

Das Sae-System wird durch Phagozytose-Effektormoleküle wie H_2O_2 und subinhibitorische Konzentrationen von α -Defensin aktiviert, welche zu Veränderungen in der Membran führen könnten. Die Aktivierung des Sae-Systems könnte zur Umgehung des Immunsystems und zur Zerstörung von PMNs nach der Phagozytose führen (79,108). Zusätzlich zu Immunmodulation und Toxizität ist das Sae-Operon an der Expression von Adhäsinen beteiligt. Eine Sae-Aktivierung führt zur Transkription vieler unterschiedlicher Virulenzfaktoren wie Hämolyse, Koagulase, FnBPs und Eap (90,108,247,274). Aus diesem Grund wurde die Wirkung verschiedener Antibiotika auf das Sae-System intensiv untersucht. Dabei zeigte sich, dass subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika das Sae-Operon entweder aktivieren, wie z.B. Glycopeptide oder β -Lactame (155), oder aber inhibieren wie z.B. Clindamycin (210). In einigen *S. aureus*-Stämmen aktiviert Agr die *sae*-Transkription, wohingegen σ^B diese inhibiert (79,91,210). Die Interaktion mit anderen Regulatoren sowie die Transkriptionspegel dieser Regulatoren unterliegen jedoch starken Stammunterschieden (94,155,210,247).

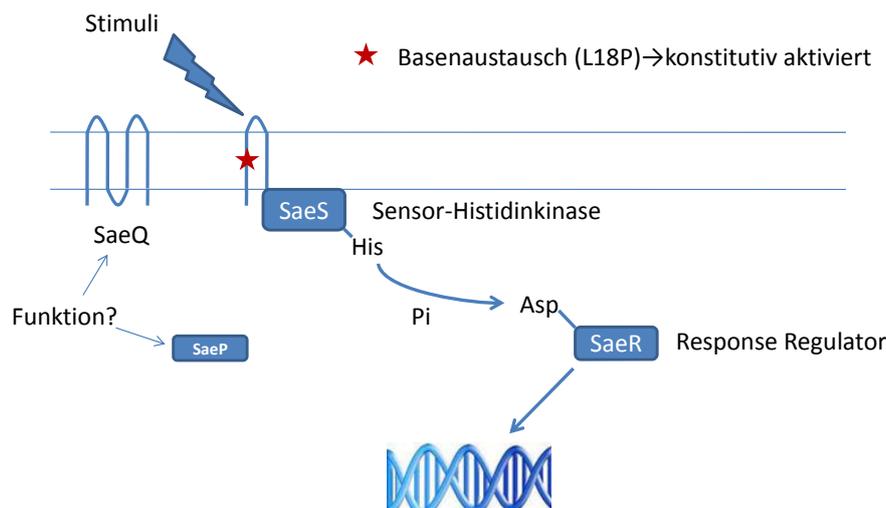


Abb. 2-VII: Das Zweikomponenten-System SaeRS

Aufgrund externer Stimuli kommt es zur Autophosphorylierung der Sensorhistidin-Kinase SaeS. Dies führt Phosphorylierung und Aktivierung des Response Regulators SaeR. Der aktivierte Regulator kann nun die Genexpression beeinflussen. Die Funktionen der zusätzlichen Proteine SaeQ und SaeP sind noch unbekannt.

2.2.5.2.3 Transkriptionsfaktoren

Die Übertragung von Umweltsignalen durch transmembrane oder intrazelluläre Rezeptoren auf den Effektor oder das Zielgen benötigt intrazelluläre Transkriptionsfaktoren. Die Response Regulatoren von Zweikomponenten-Systemen sind pleiotrope Transkriptionsfaktoren. Diese DNA-bindenden Proteine mit einer „winged helix-turn-helix“-Struktur gehören zu einer großen und ständig wachsenden Gruppe.

2.2.5.2.3.1 Der Transkriptionsfaktor SarA und seine Homologe

1992 wurde mit SarA erstmals ein pleiotroper Transkriptionsfaktor in *S. aureus* beschrieben (40). Inzwischen wurden mehrere SarA Paraloge wie SarR-V, SarX-Z, MgrA und Rot (repressor of toxins) identifiziert, welche alle aufgrund von Genduplikationen entstanden sind (8,177). SarA selbst ist ein DNA-bindendes Protein, das als Homodimer an AT-reiche Erkennungssequenzen an die Promotoren der Zielgene bindet (41).

Das *sarA*-Operon ist aus drei überlappenden Transkripten aufgebaut, die wiederum über drei verschiedene Promotoren (P1, P2 und P3) kontrolliert werden (13,175). Während die *sarA*-Transkription von P1 und P2 durch σ^A initiiert wird, ist der Promotor P3 σ^B -abhängig. Der Bezug des SarA-Operons zu mehreren Sigmafaktoren erlaubt die Expression von *sarA* unter allen Wachstumsbedingungen. Dabei erfolgt eine P1- und P2-induzierte

sarA-Transkription bis in die exponentielle Phase, wohingegen P3 die Expression von *sarA* in der späten exponentiellen und der stationären Phase oder während Stress reguliert (176). Da SarA durch mehrere Faktoren reguliert wird, ist die Expression in der späten exponentiellen Phase am größten (175). Darüber hinaus aktiviert SarA seine eigene Expression und wird durch SarR inhibiert. Aufgrund seiner Affinität zu dem P2 und P3 Promotor des *agr*-Locus wird SarA als Aktivator von *agr* beschrieben. Diese Funktion des pleiotropen Transkriptionsfaktors induziert nicht nur die vermehrte Expression von RNA II und III, sondern beeinflusst somit auch indirekt die Synthese *agr*-abhängiger Virulenzfaktoren (*agr*-abhängiger Weg) (38,199). SarA kann aber auch direkt an konservierte Regionen (Sar-Boxes) in den Promotoren einiger Zellwand-assoziiierter Proteine (Protein A, FnBPs, Cna) und Exoproteine (α -Toxin, γ -Hämolyisin, δ -Hämolyisin) binden (*agr*-unabhängiger Weg) (41,60).

2.3 Ziel der Arbeit

Subinhibitorische oder subletale Konzentrationen von Antibiotika erhöhen die Expression einer Vielzahl an Genen bei *S. aureus*, darunter auch Virulenzgene. Für Desinfektionsmittel hingegen ist die Datenlage im Hinblick auf den Effekt von subinhibitorischen oder subletalen Konzentrationen sehr begrenzt. Hypochlorige Säure, ein in der Desinfektion von Badewasser verwendetes Oxidants, beeinflusst die Transkription von *S. aureus*. Unter anderem kommt es zu einer gesteigerten Expression von mehreren Virulenzfaktoren, wie Exotoxine, Hämolyisine, Leukozidine, Koagulase und Adhäsinen.

Da durch Staphylokokken verursachte Infektionen ein zunehmendes Problem darstellen, sollte in dieser Arbeit die Stressantwort von *S. aureus*, speziell gegen subletale Konzentrationen des Desinfektionsmittels Perform, untersucht werden. Hierbei sollten sowohl molekularbiologische und biochemische Parameter wie die Proteinexpression analysiert, als auch davon abhängige Funktionen charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterien, Plasmide und Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide sind in den (Tab. 3-I/Tab. 3-II/Tab. 3-III) zusammengefasst.

Tab. 3-I: Verwendete Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Quelle/Referenz
<u>S. aureus</u>		
Newman	Wildtyp	Duthie und Lorenz (62)
AS3	Newman <i>sae</i> ::Tn917 (Em ^r)	Goerke <i>et al.</i> (95)
ALC355	Newman <i>agr</i> :: <i>tetM</i>	Wolz <i>et al.</i> (307)
ALC637	Newman <i>sar</i> ::Tn917 LTV1	Wolz <i>et al.</i> (308)
Newman-29	Newman <i>sae</i> :: <i>kanA</i>	Geiger <i>et al.</i> (79)
DU5886	Newman <i>fnbA</i> ::Tc ^r , <i>fnbB</i> ::Em ^r	Greene <i>et al.</i> (99)
mAH12	Newman <i>eap</i> ::Ery ^r	Hussain <i>et al.</i> (123)
MS64	Newman <i>sigBI</i> (Am), Tc ^r	Senn <i>et al.</i> (261)
UAMS-1	Wildtyp, Osteomyelitis Isolat	Gillapsy <i>et al.</i> (88)
Cowan I	Wildtyp	ATCC 12598
COL	Wildtyp, MRSA SCC <i>mec</i> I	Dyke <i>et al.</i> (63)
6850	Wildtyp	Balwit <i>et al.</i> (9)
Phillips	Wildtyp	Patti <i>et al.</i> (221)
ISP479C	8325-4 Derivat	Pattee <i>et al.</i> (220)
ISP479R	8325-4, <i>rsbU</i> repariert	Toledo-Arana <i>et al.</i> (288)
ISP479R-29	ISP479R <i>sae</i> :: <i>kanA</i>	Geiger <i>et al.</i> (79)
<u>S. carnosus</u>		
TM 300	Wildtyp	Schleifer und Fischer (256)

Tab. 3-II: Plasmide

Name	Eigenschaften	Quelle/Referenz
pCWSAE28	<i>saePQRS</i> _{ISP479C} in pCL84 kloniert	Mainiero (vgl. 3.4.5)
pCWSAE33	<i>saePQRS</i> _{Newman} in pCL84 kloniert	Mainiero (vgl. 3.4.5)
pCG7	Sae P1 Promotor-lacZ Fusion, Integrationsvektor	Geiger <i>et al.</i> (79)

Tab. 3-III: Oligonukleotide für die qRT-PCR

Name	Primer Sequenz (5'-3')
eapRT For	AAG CGT CTG CCG CAG CTA
eapRT Rev	TGC ATA TGG AAC ATG GAC TTT AGA A
saeRT For	AAA CTT GCT TGA TAA TGC GCT AAA
saeRT Rev	GTT CTG GTA TAA TGC CAA TAC CTT CA
gyrB For	TTA GTG TGG GAA ATT GTC GA
gyrB Rev	CCG CCG AAT TTA CCA CCA GC
16S rRNA For	CCA TAA AGT TGT TCT CAG TT
16S rRNA Rev	CAT GTC GAT CTA CGA TTA CT

Tab. 3-IV: Oligonukleotide für die Sequenzierung

Name	Primer Sequenz (5'-3')
SaeS-Seq-Up	GCT TGT AAT TAT TGT CGT TAA GG
SaeS-Seq-DW	GTA TTA AGG AAT TTG AGT TAT TGT GG

3.2 Geräte und Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Antibiotika wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Die benötigten Enzyme wurden bei Invitrogen (Gibco), Hybaid oder New England Biolabs (NEB) bestellt. Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien, Biochemikalien, Materialien und Geräte wurden von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech, Applichem, BioRad, Eppendorf, Gibco, Greiner, MWG, Roth, Sigma-Aldrich und NEB bezogen.

Die benutzten Geräte sind in Tab. 3-V aufgelistet.

Tab. 3-V: Geräteliste

Gerät	Hersteller/Vertrieb
Absaugpumpe	Ilmvac
Analysenwaage	Ohaus Navigator, Sartorius
Autoklav	MM Selectomat S2000, Fedegari; DSL 666-1-FD; Holzner
Automatikpipette	Gilson, Eppendorf
Brutschränke	Heraeus
Cleanbench	Hera safe, Heraeus
DNA/RNA-Messung	Spectrophotometer ND-100, NanoDrop
Durchflusszytometer	FACScalibur, BD
Durchlaufkühler	Fryka
ELISA-Reader	Genios, Tecan
Elektrophoresekammer für Agarose-Gele	Sub-Cell GT, BioRad
Elektrophoresekammer für SDS-Gele	Mini Protean III, BioRad
Feinwaage	Chyo, Sartorius; ABT 120-5DM; Kern
Fluoreszenz Mikroskop	Imager.Z1, Zeiss
Gefrierschränke	Liebherr; -86C ULT Freezer, Thermo Forma
Geldokumentationsanlage	UVT-28MP, Herolab
Heizblock	Liebisch
Kühlschränke	Liebherr
Kühlzentrifugen	Megafuge 1.0 R, Biofuge 15 R, Heraeus
LightCycler	Roche
Lumineszenz Spektrometer	LS50B Perkin Elmer
Magnetrührer	MR 3001, Heidolph
Mikrowelle	MWS 1820 Duo, Bauknecht
pH-Elektrode	Sen Tix61, WTW
pH-Meter	pH 530, WTW
Photometer	U-2000 Spectrophotometer, Hitachi
Pipet Boy	Accu-jet, Brand
Schüttler	Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific; Certomat H, B. Braun
Schwenker	Phero-Shaker, Biotec-Fischer
Spannungsgeräte	Power Pac 300 und 2000; Power Supply Model Xi und 500/1000 (BioRad), Consort
Spektrophotometer	Nanodrop, Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	T3, Biometra
Tischzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus
Ultraschallgerät	Sonifier 450, Branson
Vortexer	REAX 2000, Heidolph
Wasserbadinkubator	Memmert
Wippe	Duomax 1030, Heidolph
Zellaufschluss	Thermo Savant FastPrep FP120, SLM Instruments/Thermo Spectronic; FastPrep-24; MP

3.3 Medien, Medienzusätze und Wachstumsbedingungen

Für die Herstellung aller Lösungen und Medien wurde Ampuwa®-Wasser (Fresenius Kabi Deutschland GmbH) verwendet.

Die Zusammensetzung der Medien, Medienzusätze und Lösungen ist im Folgenden kurz beschrieben.

3.3.1 Medien:

TSB (Trypticase soy broth)	17 g Trypton 3 g Sojamehlpepton 2,5 g D-Glucose 5 g NaCl 2,5 g K ₂ HPO ₄ ad 1000 ml H ₂ O _{dest.} , pH 7 (+/- 0,2)
MHB (Müller Hinton Bouillon)	2 g Fleischextrakt 17,5 g Caseinhydrolysat 1,5 g Stärke ad 1000 ml H ₂ O _{dest.}

3.3.2 Medienzusätze:

(alle Lösungen wurden sterilfiltriert und dem auf <50 °C abgekühlten Medien zugeführt)

Erythromycin	10 µg/ml Endkonzentration Stammlösung 10 mg/ml in EtOH Aufbewahrung -20 °C
Kanamycin	10 µg/ml Endkonzentration Stammlösung 25 mg/ml in H ₂ O _{dest.} Aufbewahrung -20 °C
Tetracyclin	10 µg/ml Endkonzentration Stammlösung 10 mg/ml in EtOH Aufbewahrung -20 °C

3.3.3 Desinfektionsmittel:

3.3.3.1 Perform[®]

Perform[®] ist ein Vertreter aus der Gruppe der Oxidationsmittel und setzt sich aus 20 % Pentakalium bis-(peroxymono)sulfat bis (sulfat) (KPMS), 15 % Natriumbenzoat, 10 % Weinsäure, 5-15 % anionischen Tensiden (SDS), 5 % Seife sowie 5 % Phosphonat und Duftstoffen zusammen. Beim Lösen des Granulates in Wasser setzt das Sauerstoffdepot KPMS bei Kontakt mit organischen Säuren, bzw. deren Derivaten Natriumbenzoat und Weinsäure, reaktiven Sauerstoff frei, der durch seine oxidierende Wirkung desinfizierend wirkt. Perform zeichnet sich nicht nur durch seine gute Reinigungswirkung, sondern auch durch sein breites Wirkspektrum aus (persönliche Mitteilung Frank-Albert Pitten).

[http://www.schuelke-mayr.com/download/pdf/cde_lde_Perform_prod\(2\).pdf](http://www.schuelke-mayr.com/download/pdf/cde_lde_Perform_prod(2).pdf)

3.3.3.2 Incidin Plus

Incidin Plus gehört zur Produktgruppe der Glucoprotamine und besteht zu 50 % aus Glucoprotamin, zu 5-15 % aus nicht-ionischen Tensiden und zu weiteren 5-15 % aus aromatischem Alkohol. Glucoprotamin ist ein Alkylaminderivat und entsteht bei der Umsetzung von L-Glutaminsäure und Kokosalkylpropylen-1,3-diamin (53). Ähnlich wie quaternäre Ammoniumverbindungen wirkt Incidin Plus auf die bakterielle Membran als Tensid (persönliche Mitteilung Bernhard Meyer).

3.3.4 Wachstumsbedingungen

Das Wachstum der Bakterien erfolgte bei 37 °C und die Flüssigkulturen wurden durch Schütteln bei 200 rpm ausreichend belüftet. Wenn möglich, wurden den Medien geeignete Antibiotika zugesetzt bzw. Platten mit geeigneten Antibiotika verwendet.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Präparation

Um die RNA aus den Bakterien gewinnen zu können, wurden die ÜNK des entsprechenden Bakterienstammes 1:50 auf frisches TSB-Medium überimpft und bis zu einer $OD_{600}=0,8 - 1,0$ bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Anschließend wurden 5 ml dieser Kultur für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml RLT-β-Mercaptoethanol-Gemisch (100:1) resuspendiert und in ein Crusher-Tube überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte

mechanisch durch drei Schritte in der FastPrep (Speed 6,5; 45 s) mit dazwischenliegender Kühlung auf Eis. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 s) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und Ethanol in gleichen Teilen zugegeben. Anschließend wurde die RNA unter Verwendung des RNeasy-Mini-Kits von Qiagen präpariert.

Nach der Isolierung wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden 39 µl der RNA-Probe mit 1 µl DNase (10 U/µl, Qiagen), 5 µl 3 M NaAcetat, 5 µl 0,05 M MgSO₄ versetzt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl RLT-β-Mercaptoethanol-Gemisch und weiteren 300 µl Ethanol erfolgte die Aufreinigung der RNA erneut mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits, wobei allerdings auf den RW1-Schritt verzichtet wurde. Im Anschluss daran folgte eine Überprüfung des Reinheitsgrades der RNA über Gelelektrophorese sowie über PCR mit Nona- bzw. Hexa-Random-Primern, um den vollständigen Verdau der enthaltenen DNA zu kontrollieren.

3.4.2 cDNA-Synthese

Der Umschrieb von RNA zu cDNA erfolgte nach dem Qiagen-Omniscript-System. Zunächst wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe des Nanodrop-Spektrophotometers bestimmt. Anschließend wurden 2 µg RNA in insgesamt 12 µl DEPC-Wasser aufgenommen und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Alle weiteren Arbeiten wurden strikt auf Eis durchgeführt: Nach der Inkubation wurden dem RNA-Ansatz Hexa/Nona-Random-Primer (0,5 µl, 100 µM, Sigma-Aldrich), RNase-Inhibitor/RNAGuard (1 µl, 10 U/µl, Amersham), dNTPs (2 µl, 5mM, Sigma), RT-Puffer (2 µl, 10x, Qiagen) und Reverse Transkriptase Omniscript (1 µl, 10 U/µl, Qiagen) zugegeben. Es folgten 90 min Inkubation bei 37 °C. Die Aufreinigung erfolgte über das PCR-Purification-Kit von Qiagen.

3.4.3 LightCycler

Die Bestimmung der Transkriptionsrate spezifischer Gene erfolgte mit dem RT-PCR-LightCycler-System von Roche. Zunächst wurde die Konzentration der cDNA mittels Nanodrop gemessen. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der cDNA hergestellt, so dass ein Gesamtvolumen von jeweils 7,4 µl Wasser eine Gesamtmenge an 50 ng, 25 ng bzw. 5 ng cDNA enthielt. Zu jeder Verdünnungsreihe der cDNA wurden 10 µl ABsolute™ QPCR SYBR® Green Capillary Mixes (AB-Gene) und jeweils 1,3 µl 5'- und 3'-Primer (300 nM) (Tab. 3-III) gegeben. Das Gemisch wurde in die Glaskapillaren (Roche) für den Light Cycler

überführt und kurz abzentrifugiert, um die Lösung auf den Boden der Kapillaren zu senken. Die Proben wurden in das Kapillaren-Karussell gestellt und der Light Cycler gestartet. Soweit nicht anders vermerkt, erfolgte die RT-PCR nach folgendem Programm:

Schritt	T [°C]	Zeit	Zyklenzahl	Abschluss
Enzymaktivierung	95	15 min	1	None
Denaturierung	95	15 s	40	None
Hybridisierung	56	20 s	40	Single
Elongation	72	20 s	40	None
Schmelzkurve*	95	5 s	1	None
	45	1 min	1	None
	95	5 s	80	Continuous
Kühlung	40	30 s	1	None

* Temperaturerhöhung 0,1 °C pro Sekunde

Die Quantifizierung der Transkriptionsraten wurde mit Hilfe des Programms ND-1000 (Roche) durchgeführt. Die dabei bestimmten Crossing Points und Slopes jeder PCR-Reaktion wurden in der Formel von Pfaffl (229) verwendet, um das Genexpressionslevel des Zielgens zu quantifizieren. Dieses wurde als Verhältnis zwischen Kontrollbedingungen und veränderten Bedingungen errechnet. Als Referenzgen wurde das Housekeeping-Gen *16S-rRNA* herangezogen.

3.4.4 Promotoraktivitäts-Assay

Die für dieses Experiment verwendeten Stämme trugen den Integrationsvektor pCG7, welcher ein promotorloses *spoVG/lacZ*-Gen beinhaltet, dem der *sae*-Promotor P1 vorangestellt wurde (79). Auf diese Weise konnte die β -Galactosidase-Aktivität und somit auch die Aktivität des *sae*-Promotors P1 durch das Fluoreporter Galactosidase Quantitation Kit (Invitrogen) bestimmt werden. Dazu wurden ÜNK 1:50 in frischem TSB-Medium verdünnt und 2 h bei 37 °C und 200 rpm wachsen gelassen. Es wurden immer unabhängige Doppelansätze angezogen. Jeweils 1 ml OD 1 wurde 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) nach Sørensen gelöst. Anschließend wurden die Bakterien in Crusher-Tubes überführt und in einem Homogenisator für 11 s bei Tempo 6500 rpm lysiert. Jeweils 10 μ l dieser Lysate wurden in Triplikaten in eine weiße 96-well Platte (Nunc) pipettiert und 100 μ l „Working solution“ mittels einer Mehrkanalpipette

zugegeben. Nach einer Inkubation für 30 min im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 0,2 M Na₂CO₃ abgestoppt und die entstehende Fluoreszenz wurde innerhalb von 10 min mit einem Lumineszenz Spektrometer (Perkin Elmer LS50B) gemessen. Die Quantifizierung der β-Galactosidase (Sigma-Aldrich) erfolgte mittels einer Standardreihe, welche durch eine logarithmische Verdünnung aus einer 10⁴ ng β-Galactosidase-Lösung in 11 Verdünnungsschritten hergestellt wurde.

Der Promotoraktivitäts-Assay wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Tübingen unter Anleitung von Tobias Geiger durchgeführt.

Arbeitslösungen:

Phosphatpuffer nach Sörensen

Lösung A

0,67 M KH₂PO₄

Lösung B

0,67 M Na₂HPO₄ x 2H₂O

9,85 ml Lösung A und 40,15 ml Lösung B mischen ergibt 0,67 M Phosphatpuffer (pH 7,4)
37,5 ml Phosphatpuffer und 212,5 ml H₂O_{dest.} ergibt 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4)

Reaktionspuffer

0,1 M Phosphatpuffer

1 mM MgCl₂

45 mM β-Mercaptoethanol

Substrat Reagenz

40 mM 3-carboxy-umbelliferyl β-D-Galactopyranosid (CUG) in Reaktionspuffer

Working solution

1,1 mM CUG in Reaktionspuffer

3.4.5 Konstruktion der *sae* Komplementanten

Das *saePQRS*-Operon wurde mit den Oligonukleotiden (*sae*-1U GCG TGA ATT CTT ATT GTG GCA AAA GGT TT und *sae*-3515L CCC CGA ATT CCT GTA TGC CGC CTA ATA AT) und der DNA aus Stamm Newman und ISP479C amplifiziert. Die daraus gewonnenen PCR-Produkte wurden in einen EcoRI-geschnittenen Integrationsvektor pCL84 kloniert,

woraus die Plasmide pCWSAE33 und pCWSAE28 resultierten. Die Plasmide wurden durch Sequenzierungen des gesamten Inserts überprüft und in den Restriktions-negativen *S. aureus* Stamm RN4220 transformiert. Anschließend wurden die Plasmide in die *sae*-defizienten Mutanten Newman-29 und ISP479C-29 mittels Phagen θ 11 transduziert. Dadurch wurde das gesamte *saePQRS*-Operon in das Chromosom von *sae*-defizienten Mutanten integriert.

Die Konstruktion dieser Mutanten wurde von Markus Mainiero am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Tübingen durchgeführt.

3.4.6 PCR (Polymerase-chain-reaktion)

Die PCR-Reaktion wurde für die Standardanwendungen entweder mit der Taq-DNA-Polymerase (NEB) nach Herstellerangaben angesetzt. Die Denaturierungstemperatur für die DNA betrug 94° C (45 s/Zyklus), die Elongationstemperatur 72° C. Die Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer/DNA-Komplexe, wobei für jedes hybridisierende AT-Paar 2° C und für jedes hybridisierende GC-Paar 4° C angenommen wurden (bei unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Primer wurde die niedrigere Temperatur als Hybridisierungstemperatur benutzt, 45 s/Zyklus). Es wurden jeweils 34 Zyklen angesetzt, die Polymerisierungsdauer richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, wobei pro 1000 bp 1 min Elongation gerechnet wurde. Am Ende wurde der Ansatz automatisch auf 4° C abgekühlt.

PCR-Ansatz (50 μ l):

Ampuwa®-steril	38,5 μ l
Template	3 μ l
dNTP (100 pmol)	1 μ l
Oligonukleotid 5' (10 μ M)	1 μ l
Oligonukleotid 3' (10 μ M)	1 μ l
10x ThermoPol-Buffer	5 μ l
Taq DNA Polymerase	0,5 μ l

3.4.7 DNA-Sequenzierung

Das für die Sequenzierung verwendete Protokoll basiert auf der von Sanger *et al.* beschriebenen Methode (254). Dabei wurde das zu analysierende Material als PCR-Produkt bereitgestellt. 1 μ l des PCR-Produktes wurde dann mit 1 μ l des jeweiligen Sequenzierprimers

(100 μM) und 2 μl Puffer versetzt und der Ansatz mit 5 μl sterilem ultrareinen H_2O auf ein Volumen von 9 μl ergänzt. Die eigentliche Untersuchung dieser Proben wurde im DNA-Labor des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie durchgeführt. Dabei erfolgte die Sequenzier-Reaktion mit dem Big dye Terminator v1.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers. Im Anschluss wurden die Proben mit Hilfe des automatischen Sequenzierers ABI 3130 Genetic Analyzers (Applied Biosystems) analysiert. Die endgültigen Sequenzen wurden als Computerdateien zur Verfügung gestellt.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Gesamtzellextrakt

Zur Herstellung eines Gesamtzellextraktes wurden 50 ml trypticase soy broth (TSB)-Medium, bei Bedarf mit Antibiotika, mit frischer ÜNK des Stammes 1:50 beimpft und die Kultur bis zu einer $\text{OD}_{600} = 1,5$ bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm angezogen. Anschließend wurde ein Volumen, welches 1 ml einer $\text{OD}_{600} = 1,5$ entsprach entnommen und abzentrifugiert (5 min, 13000 rpm, RT). Das resultierende Pellet wurde in 40 μl 5x Laemmlipuffer resuspendiert und 30 min bei 100 °C aufgeköcht. Alternativ konnte das Pellet nach der Zentrifugation auch vor Zugabe des 5x Laemmlipuffers bei -20 °C weggefroren werden.

3.5.2 Auftrennung von Proteinen über SDS-Gele (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der im Gesamtzellextrakt enthaltenen Proteine erfolgte in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse in Anlehnung an die von Laemmli beschriebene Methode (160). Die für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) benötigten Lösungen wurden entsprechend den Angaben des Laborhandbuches (253) hergestellt. Die Zusammensetzung der gefertigten Gele ist der Tab. 3-VII zu entnehmen

Für die SDS-PAGE wurde das eindimensionale System der Firma BioRad (Mini Protean III) verwendet. In Vorbereitung für die Auftrennung wurden die in 2.1 gewonnenen Pellets mit 40 μl 5x Laemmlipuffer versetzt und für 30 min bei 100 °C denaturiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden jeweils 12 μl der Proben auf das Gel aufgetragen. Dabei wurden die Proteine zunächst mit 80 V in das Sammelgel eingebracht und nach dem Erreichen des Trenngels mit 120 V weiter aufgetrennt. Der Lauf wurde beendet, nachdem die blaue Probenpufferfront das Ende des Trenngels erreicht hatte. Die Größenordnung der Proteinbanden wurde durch das Mitführen eines Markers (Prestained Marker, 6-175 kDa bzw.

7-175 kDa, NEB) ermöglicht. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend über eine Silberfärbung visualisiert.

Arbeitslösungen:

Lösung B
50 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8
4 ml 10 % SDS
46 ml H₂O_{dest.}
Lagerung RT

Lösung C
75 ml 2 M Tris/HCl pH 8,8
4 ml 10 % SDS
21 ml H₂O_{dest.}
Aufbewahrung RT

Rotiphorese® Gel 30 (Roth)
Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1

Ammoniumpersulfat (APS) 10 %

10x SDS-Laufpuffer
30,2 g Tris
188 g Glycerin
ad 900 ml H₂O_{dest.}
100 ml 10 % SDS
pH 8,3 überprüfen
Aufbewahrung RT

5x Laemmlipuffer
Lösung 1
1,1 g SDS
0,42 g EDTA
0,17 g Na₂H₂PO₄*H₂O
1,1 ml β-Mercaptoethanol
auf pH 7,2 einstellen
ad 10 ml H₂O_{dest.}

Lösung 2

20 mg Bromphenolblau

10 ml 50 % Glycerin

Lösung 1 und 2 in gleichen Teilen

miteinander mischen

Tab. 3-VII: Zusammensetzung der verwendeten SDS-PAGE-Gele

Trenngel 12 %		Sammelgel 5 %	
Lösung B	2,5 ml	Lösung C	1,25 ml
Gel 30	4 ml	Gel 30	650 µl
H ₂ O _{dest.}	3,45 ml	H ₂ O _{dest.}	3,07 ml
APS	50 µl	APS	25 µl
TEMED	15 µl	TEMED	15 µl

Die Angaben beziehen sich auf die Herstellung von 2 Gelen (7 cm x 10 cm).

3.5.3 Silberfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine in Anlehnung an das Protokoll von Rabilloud *et al.* silbergefärbt (240). Dazu wurden die Gele zunächst für mindestens 1 h in der Fixierlösung geschwenkt. Nach einem Waschschrift von mindestens 20 min in 30 % EtOH wurden die Gele für 1 min in Oxidierer inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe zu je 1 min in H₂O_{dest.} und die Färbung in Silbernitrat für 30-120 min. Für die Entwicklung der gefärbten Proteine wurden die Gele erneut mit H₂O_{dest.} für 2 mal 30 s gewaschen und anschließend so lange in Entwicklerlösung inkubiert, bis die Proteine gut sichtbar wurden (2-10 min). Die Entwicklung der Gele wurde durch Waschen in EDTA-Lösung (13,7 g/l) abgestoppt.

Arbeitslösungen:

Fixierer:

50 % EtOH

12 % Essigsäure

38 % H₂O_{dest.}

Oxidierer:

66 µl Formaldehyd (37 %)

25 µl Na₂S₂O₃ (43 % in H₂O_{dest.})ad 100 ml H₂O_{dest.}

Silbernitratlösung:	66 µl Formaldehyd (37 %) 0,2 g AgNO ₃ ad 100 ml H ₂ O _{dest.}
Entwickler:	50 µl Formaldehyd (37 %) 1,8 µl Na ₂ S ₂ O ₃ (43 % in H ₂ O _{dest.}) 6g Na ₂ CO ₃ ad 100 ml H ₂ O _{dest.}

3.5.4 Tryptischer Verdau und LC-MS/MS-Analyse

Die Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einer 1:1-Mixtur aus 1 % Na-Ferrocyanid und 1,6 % Na-Thiosulfat entfärbt. Nach einem Waschschrift mit Wasser erfolgten Reduktion, Alkylierung und Trypsinverdau mit Hilfe des Digest pro MS liquid handling-Systems (Intavis AG). Die tryptischen Peptide wurden mit 50 % Acetonitril/0,1 % TFA aus den Gelstücken extrahiert, fast bis zur völligen Trocknung vakuumzentrifugiert und anschließend zu einem Volumen von 30 µl mit 0,1 % TFA verdünnt. Von jeder Probe wurden 25 µl mit dem nano HPLC-System (Ultimate, Dionex), welches an ein ESI QTOF Hybrid-Massenspektrometer (Allied Biosystems) gekoppelt ist, analysiert. Dafür wurden die Proben auf eine C18 Sammelsäule (Inertsil, LC Packings) gegeben (Flussrate: 20 µl/min; 0,1 % TFA). Die Peptide wurden mit einer Analyse-Säule (75 µm x 150 mm; gefüllt mit Inertsil 3 µm C18-Material) (LC Packings) bei einer Flussrate von 200 nl/ min eluiert und aufgetrennt. Dieser Schritt wurde in einem Gradienten aus Puffer A (0,1 % Ameisensäure, 5 % Acetonitril) und Puffer B (0,1 % Ameisensäure, 80 % Acetonitril) wie folgt durchgeführt: 0-2 min: 5 % B, 2- 50 min: 5-40 % B, 50-60 min: 40-60 % B, 60-63 min: 60-90 % B. Die Analyse-Säule war mit einem nano-ESI-Emitter (New Objectives) verbunden. Eine Spannung von 2000 V wurde aufgebaut und der QTOF-Operationsmodus auf positive Ionen eingestellt. Ein MS Übersichts-Scan (0,7 s) erfolgte zuerst, dann wurde ein informationsabhängiger Produkt-Ionen-Scan (3 s) durchgeführt.

3.5.5 Identifikation von MS/MS-Spektren anhand von Datenbankrecherchen

Mit den erhaltenen, unidentifizierten MS/MS-Spektren wurde eine mittels Mascot Software (Matrix Science) eine Datenbanksuche in NCBIInr durchgeführt (taxonomischer Filter:

Bakterien). Die Massentoleranz wurde auf 1,1 Da für MS und 0,1 Da für MS/MS gesetzt. Die Proteine, welche von einem Einzelpeptid erkannt wurden, sind in den Tabellen aufgelistet, falls folgende Kriterien erfüllt waren: 1) der Ergebniswert übertrifft den Mascot Homologie-Schwellenwert, 2) manuelle Interpretation der Fragmentspektren resultierte in einem durchgängigen Stück aus mindestens vier Aminosäuren, 3) Mascot-basierte Datenbank-recherchen mit diesem Aminosäuren-Stück ergaben dasselbe Protein.

Die LC-MS/MS-Analyse und die Identifikation von MS/MS-Spektren wurden von Armin Bosserhoff am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg durchgeführt.

3.6 Phänotypische Tests

3.6.1 MHK/MBK-Bestimmung

Um die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Perform und SDS zu ermitteln wurde ein Reihenverdünnungstest der beiden Substanzen durchgeführt. Jeweils von einer Konzentration von 1 % (w/v) ausgehend wurde eine serielle 1:1 Verdünnung in TSB-Medium in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. 100 µl der zu testenden Konzentrationen wurden in einer 96-Well-Platte mit jeweils 100 µl einer zuvor auf $OD_{600} = 0,5$ eingestellten Bakteriensuspension gemischt. Zusätzlich wurden eine Positivkontrolle (ohne Perform und SDS) und eine Negativkontrolle (ohne Bakterien) angesetzt. Anschließend wurde die 96-Well-Platte für 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Trübung der Wells dokumentiert, von jeder zu testenden Konzentration nach Resuspendierung 100 µl auf einer Blutagarplatte ausplattiert und am Folgetag die gewachsenen Kolonien dokumentiert. Die MHK stellt dabei die geringste Konzentration dar, bei welcher keine Trübung feststellbar war und die MBK steht für die geringste Konzentration, bei welcher keine Kolonien detektierbar waren.

3.6.2 Biofilm-Assay

ÜNK wurden 1:200 in frischem Medium verdünnt und jeweils 200 µl/Well in eine sterile 96-Well Zellkulturplatte (Sarstedt) pipettiert. Nach einer 24 stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Platten dreimal ausgeschüttet und anschließend dreimal auf Papiertüchern ausgeklopft. Nach einem Waschschrift mit 200 µl $H_2O_{dest.}$ /Well wurde die Platte erneut dreimal ausgeschüttet und anschließend dreimal auf Papiertüchern ausgeklopft. Der Biofilm wurde nun durch Lufttrocknung fixiert und anschließend mit 200 µl 0,1 % Safraninlösung in

H₂O/Well für 15 min gefärbt. Nach weiterem dreimaligem Ausschütten und Ausklopfen wurde die Platte erneut mit 200 µl H₂O_{dest.}/Well gewaschen und anschließend dreimal ausgeschüttet und ausgeklopft. Nach einem weiteren Lufttrocknungs-Schritt wurde der Biofilm mit 200 µl 10 % SDS in H₂O_{dest.}/Well gelöst und nach Auflösung der entstehenden Blasen im ELISA-Reader (Genios, Tecan) bei 490 nm/620 nm gemessen.

3.6.3 Quantitativer Suspensionsversuch

Dieses Verfahren ist eine Standardmethode der DGHM und dient der quantitativen Bestimmung des Reduktionsvermögens von Desinfektionsmitteln, wobei die Effektivität der Desinfektion als Reduktionsfaktor errechnet wird und die Abnahme der CFU in log₁₀-Stufen angibt.

Der Prüfkeim wurde in 20 ml TSB-Medium ÜN bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Am Folgetag wurde daraus die Prüfsuspension auf OD₆₀₀=1,5 in TSB-Medium eingestellt. Dies entspricht bei Staphylokokken einer Keimzahl von 1,5*10⁹-5*10⁹/ml.

1 ml der Prüfsuspension wurde zu 8 ml des Desinfektionsmittels und 1 ml Wasser standardisierter Härte (WSH) zugegeben und nach Ablauf der Einwirkzeit (EWZ) wurde die Wirkung des Desinfektionsmittels durch Zugabe von 1 ml der Desinfektionsmittel-Prüfsuspension-Lösung zu 9 ml eines geeigneten Neutralisationsmittels für 5 min abgestoppt. Es folgten 1:10 Verdünnungen in Verdünnungslösung, von welchen die Verdünnungen 10⁰-10⁻³ auf CASO-Agar ausplattiert wurden. Die sich daraus ergebenden CFU wurden als CFU DM (Desinfektionsmittel) bezeichnet.

Für jede Einwirkzeit wurde auch eine Kontrolle (K1) zur Berechnung der Ausgangskeimzahl durchgeführt. Dazu wurde 1 ml der Prüfsuspension 9 ml WSH zugegeben und nach Ablauf der EWZ wurde wiederum 1 ml dieses Ansatzes zu 9 ml Neutralisationsmedium zugegeben und für die Neutralisationszeit von 5 min inkubiert. Es folgten weitere 1:10 Verdünnungsschritte in Verdünnungslösung, von welchen die Verdünnungen 10⁻⁵-10⁻⁶ zweifach auf CASO-Agar ausplattiert wurden.

Eine weitere Kontrolle (K2) bestimmt die Effektivität der Neutralisation. Dazu musste aus einer Lösung, bestehend aus 8 ml Desinfektionsmittel und 2 ml WSH, 1 ml dieser Lösung zu 8 ml Neutralisationsmedium zugegeben werden. Nach Ablauf der 5 min Neutralisationszeit wurde dem Gemisch 1 ml einer zuvor 10⁻⁴ verdünnten Prüfsuspension zugegeben. Nach Ablauf der längsten EWZ folgte eine 1:10 Verdünnung in Verdünnungslösung von welchen die Verdünnungen 10⁻⁶-10⁻⁷ zweifach auf CASO-Agar ausplattiert wurden.

In einer zusätzlichen Kontrolle (K3) wurde die Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels getestet. Dazu wurden einem Lösung aus 8 ml Neutralisationsmedium und 1 ml WSH 1 ml einer zuvor 10^{-4} verdünnten Prüfsuspension zugegeben. Nach Ablauf der 5 min Neutralisationszeit folgte eine 1:10 Verdünnung in Verdünnungslösung von welchen die Verdünnungen 10^{-6} - 10^{-7} zweifach auf CASO-Agar ausplattiert wurden.

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl erfolgte durch Verdünnung der Prüfsuspension in TSB-Medium, von welchen die Verdünnungen 10^{-6} - 10^{-7} zweifach auf CASO-Agar ausplattiert wurden. Die CASO-Agarplatten wurden bei 37 °C ÜN inkubiert und anschließend ausgezählt.

Auswertung:

Für die Auswertung wurden nur Platten ausgezählt, deren CFU zwischen 15 und 300 lag.

Die Reduktionsfaktoren, d.h. die Abnahme der CFU in \log_{10} -Stufen je EWZ wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\log_{10} \text{RF} = \log_{10} (\text{CFU K1}) - \log_{10} (\text{CFU DM})$$

CFU K1: Mittelwert der CFU pro ml ohne Einwirkung des Desinfektionsmittels

CFU DM: Mittelwert der CFU pro ml nach Einwirkung des Desinfektionsmittels

Die CFU-Werte der Kontrollen K2 und K3 sollten sich nicht von der Gesamtkeimzahl unterscheiden.

Arbeitslösungen:

Desinfektionsmittel	0,01 % Incidin Plus in WSH
Verdünnungslösung	1 g Caseinpepton, tryptisch verdaut (Difco) 8,5 g NaCl ad 1000 ml Ampuwa pH 7,0 (+/- 0,2) bei RT lösen und autoklavieren
Wasser standardisierter Härte (WSH)	Lösung A 4,22 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ 6,12 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ bei RT lösen und autoklavieren

Lösung B

1,75 g NaHCO₃

ad 50 ml H₂O_{bidest}

sterilfiltrieren (Porengröße 0,22 µm)

6 ml Lösung A mit 8 ml Lösung B mischen,

ad 1000 ml H₂O_{bidest}, pH 7,0 (+/- 0,2)

Neutralisationsmittel:

30 ml Tween 80

30 g Saponin

1 g Cystein

1 g Histidin

ad 1000 ml Ampuwa

pH 7,0 (+/- 0,2)

bei RT lösen und autoklavieren

3.7 Zellkulturarbeiten

3.7.1 Zellpassagierung

Für die Invasionsversuche wurden 293-Zellen (DSMZ) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Zell-Linie aus humanen embryonalen Nierenzellen, die als Focus für Infektionen beim Menschen und bei Mäusen dienen können. Die verwendeten 293-Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Cellstar Tissue Culture Flask, Greiner) mit Vollmedium (10 % FCS + 50 U/ml Penicillin + 50 µg/ml Streptomycin in DMEM-rot, Gibco, Invitrogen) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Um die Zellen zu waschen, wurde das vorhandene Vollmedium zunächst aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen anschließend in 5 ml PBS vorsichtig geschwenkt. Dabei wurde eine Verletzung des Zellmonolayers vermieden, indem das Medium nur bei invertierter Zellkulturflasche zugefügt und abgesaugt wurde. Die adhärenen Zellen wurden durch Zugabe von Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen) vereinzelt. Für eine maximale Benetzung wurden zunächst 2 ml zugegeben und 1,5 ml sofort wieder abgesaugt. Nach ca. 1 min Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zusätzlich durch Klopfen mechanisch abgelöst. 9,5 ml vorgewärmtes Vollmedium, welches Antitrypsin und Ca²⁺ Ionen enthielt, stoppte die Wirkung des Trypsin-EDTA ab. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer 10 ml serologischen Pipette resuspendiert. Dabei wurden Blasenbildung und Turbulenzen vermieden. Nach einer 1:5 Verdünnung in frischem Vollmedium und anschließender

Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wuchsen die Zellen innerhalb von 3 bis 4 Tagen zu einem konfluenten Zellrasen heran und wurden in diesem Stadium erneut passagiert.

3.7.2 Zellzahlbestimmung und Ausplattierung in 24-Well Platten

Die Zellen wurden wie bei der Zellpassagierung abgelöst und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach geeigneter Verdünnung wurden die Zellen nach Zugabe von 0,4 %iger Trypanblau-Lösung (Gibco) in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Da Trypanblau nur durch die Zellmembran toter Zellen diffundiert, kann auf diese Weise zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden. Nach geeigneter Verdünnung wurden die Wells einer Mikrotiterplatte (24 Well Culture Cluster, Costar) mit jeweils $3 \cdot 10^5$ Zellen/ml befüllt.

3.7.3 Fluoreszenzfärbung von Bakterien mit FITC

50 ml einer Bakterienkultur wurden 2 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von Perform oder SDS angezogen (37 °C, 200 rpm) und anschließend abzentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4 °C). Es folgte ein Waschschrift mit 5 ml PBS. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Pellets in 3 ml FITC (Fluoreszein-5-isothiocyanat)-Lösung resuspendiert und für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Färbung folgte ein weiterer Waschschrift in PBS. Die gefärbten Bakterien wurden nach Zentrifugation (5 min, 4000 rpm, 4 °C) in 1 % HSA in PBS aufgenommen und auf eine OD₅₄₀ = 1 eingestellt.

Arbeitslösungen:

FITC-Puffer

Lösung A

0,42 g NaHCO₃
ad 10 ml H₂O_{dest.}

Lösung B

0,53 g Na₂CO₃
ad 10 ml H₂O_{dest.}

5,8 ml Lösung A mit 10 ml Lösung B mischen

FITC-DMSO-Lösung

1 mg/ml FITC (Pulver) in DMSO

G1 = R1 definiert. Unter Einbeziehung des Fl-3-Kanals wurde R2 so festgelegt, dass nur Propidiumiodid-negative Zellen enthalten waren. Entsprechend wurde Gate 2 mit G2 = R1 + R2 definiert. Die Messung der FITC-Fluoreszenz erfolgte im G2-gegateten Fl-1-Kanal und enthielt folglich diejenige Zellpopulation, die in R1 enthalten und Propidiumiodid-negativ war. M1 wurde definiert als der Bereich, der *events* mit höherem Fl-1-Signal als die Negativ-Kontrolle (nur Zellen) umfasste. Als Maß für die Invasivität wurde die zellassoziierte Fluoreszenz angenommen, die durch die Invasion von FITC-markierten Bakterien bedingt war. Hierzu wurde die nichtstandardisierte Fluoreszenzeinheit (AFU, *arbitrary fluorescence unit*) errechnet aus dem Produkt des prozentualen Anteils der Zellen „% gated“ in M1 und des durchschnittlichen Fl-1-Signals der *events* (*mean*). Um sicherzustellen, dass Abweichungen im Fl-1-Signal nicht auf Unterschiede bei der FITC-Markierung der Bakterien zurückzuführen sind, wurde das Signal der Wirtszellen auf die Fluoreszenz der Bakterien normalisiert.

Entsprechend berechnete sich die AFU nach folgender Formel:

$$1 \text{ AFU} = \frac{\text{„mean der Fl-1 Werte“}_{\text{Zellen}} \times \text{„\% gated in M“}_{\text{Zellen}}}{\text{„mean der Fl-1 Werte“}_{\text{Bakterien}} \times 100}$$

Die Invasivität wurde im Vergleich zum Referenzstamm Cowan I angegeben und stellt jeweils den Mittelwert aus den Duplikaten dar. Mindestens drei Experimenten wurden gemittelt und die SEM (standard error of the mean) errechnet.

3.7.6 Lysostaphin Protektions Versuch

Den 293-Zellen wurde nach einem Waschschrift mit vorgewärmtem Invasionsmedium 500 µl Invasionsmedium zugegeben. Es folgte die Zugabe von 50 µl einer auf OD₅₄₀ = 1 eingestellten Bakteriensuspension (Inokulum). Nach der Sedimentationsphase (1 h, 4 °C) wurden die Zellen für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert (Invasionsphase). Die Abtötung der extrazellulären Bakterien erfolgte durch Zugabe von 500 µl einer 40 µg/ml Lysostaphin (AMBI)-Lösung in PBS und Inkubation für 20 min bei 37 °C. Lysostaphin ist eine Endopeptidase, welche spezifisch die Staphylokokken typische Interpeptidbrücke des Peptidoglykans, bestehend aus einer Pentaglycinbrücke, zwischen dem dritten und vierten Glycin spaltet und dadurch die Staphylokokken lysiert (154,257,286). Anschließend wurde mit 1 ml vorgewärmtem Invasionsmedium gewaschen. Die Inkubation mit 1 ml H₂O_{dest.} für 5 min bei 37 °C führte zur Lyse der Wirtszellen. Nach Überführung der Zelllysate in

Eppendorf-Gefäße wurden serielle Verdünnungen mit 1 % HSA in PBS in log₁₀-Schritten durchgeführt. Drei bis vier geeignete, aufeinanderfolgende Verdünnungen wurden auf einem transparenten Nährboden ausplattiert. Dabei diente die Ausplattierung des verwendeten Verdünnungsmediums als Kontaminations-Kontrolle. Das Inokulum wurde ebenfalls in geeigneten Verdünnungsstufen ausplattiert und die CFU nach Inkubation (ÜN, 37 °C) bestimmt. Der Quotient aus dem Mittelwert der Zellysate und des Inokulums ergab den Anteil an intrazellulären Bakterien.

3.8 Statistische Analysen

Für die Ermittlung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige t-Test vom Typ 3 herangezogen, da die Ergebnisse teilweise ungleichmäßige Varianzen aufwiesen.

3.9 Software-Applikationen und Web-Adressen

Tab. 3-VIII: Verwendete Web-Adressen

Web-Adresse	Beschreibung
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Suche nach DNA- und Protein-Homologien
http://blast.jcvi.org/cmrb-blast/	Suche nach DNA- und Protein-Homologien
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez	Literatur-Recherche
http://pfam.sanger.ac.uk/	Domänen-Analyse
http://smart.embl-heidelberg.de/	Domänen-Analyse
http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	Signalsequenz-Identifizierung
http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/TMHMM2.0b.guide.php	Identifizierung von Transmembran-Domänen

Tab. 3-IX: Verwendete Software-Applikationen

Software-Name	Beschreibung
Microsoft Office Word 2007	Textverarbeitung
Microsoft Office PowerPoint 2007	Grafikprogramm
Microsoft Office Excel 2007	Tabellenkalkulation
Gimp	Bildbearbeitung
Reference Manager	Verwaltung von Literaturverzeichnissen
CellQuest Pro	Durchflusszytometrische Auswertung
LightCycler Software 3.5.3	RT-PCR-Auswertung
Zeiss AxioVision	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

4 Ergebnisse

4.1 MHK/MBK-Bestimmung

Um die minimale Hemmkonzentrationen und die minimale bakterizide Konzentrationen von Perform und SDS zu bestimmen, wurden die zu untersuchenden Stämme mittels eines Reihenverdünungstestes in unterschiedlichen Konzentrationen von Perform und SDS inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurde die Trübung der Ansätze dokumentiert und die geringste Konzentration, in welcher keine Trübung festgestellt werden konnte, als die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Hier zeigte sich für alle untersuchten Stämme (Newman, 6850, ISP479C und COL) kein Unterschied. Die MHK für Perform betrug 0,125 % und die MHK von SDS betrug 0,015625 % (Tab. 4-I). Nach der MHK-Bestimmung wurden jeweils 100 µl der jeweiligen Ansätze auf Blutagarplatten ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die geringste Konzentration, bei welcher keine Kolonien feststellbar waren, als die minimale bakterizide Konzentration (MBK) bestimmt. Die MBK von SDS betrug bei allen untersuchten Stämmen 0,125 %. Die MBK von Perform betrug bei den Stämmen Newman und ISP479C 0,25 %. Der Stamm 6850 zeigte mit einer MBK von 0,5 % eine höhere Resistenz gegenüber Perform als die anderen untersuchten Stämme. Als sensibelster Stamm stellte sich COL heraus, welcher eine MBK von 0,125 % aufweist.

Tab. 4-I: MHK/MBK-Bestimmung von Perform und SDS.

Stämme	Perform		SDS	
	MHK	MBK	MHK	MBK
Newman	0,125	0,25	0,015625	0,125
6850	0,125	0,5	0,015625	0,125
ISP479C	0,125	0,25	0,015625	0,125
COL	0,125	0,125	0,015625	0,125

Die Angaben der MHK/MBK-Bestimmung beziehen sich auf % (w/v)

4.2 Perform in subletalen Konzentrationen verändert differentiell das Proteinmuster

Um zu testen, wie sich subletale Konzentrationen des Desinfektionsmittels Perform auf eine Reihe gut untersuchter *S. aureus* Stämme (COL, ISP479C, 6850 und Newman) auswirken, wurden diese Bakterien in An- bzw. Abwesenheit von 0,04 % Perform bis in ihre

logarithmische Wachstumsphase kultiviert und die Proteinmuster der jeweiligen Gesamtzellextrakte mittels SDS-PAGE verglichen. Es zeigte sich, dass sich das Expressionsprofil der mit Perform behandelten Bakterien deutlich von denen der unbehandelten Proben unterschied. Allerdings waren diese Änderungen im Bandenprofil Stamm-spezifisch. Während für den Stamm Newman nach einer Anzucht in performhaltigem Medium eine vermehrte Expression einzelner Proteinbanden beobachtet werden konnte, zeigten die anderen untersuchten *S. aureus*-Stämme (COL, ISP479C und 6850) dagegen eine meist rückläufige Expression einzelner Proteinbanden nach der Perform-Behandlung (Abb. 4-I).

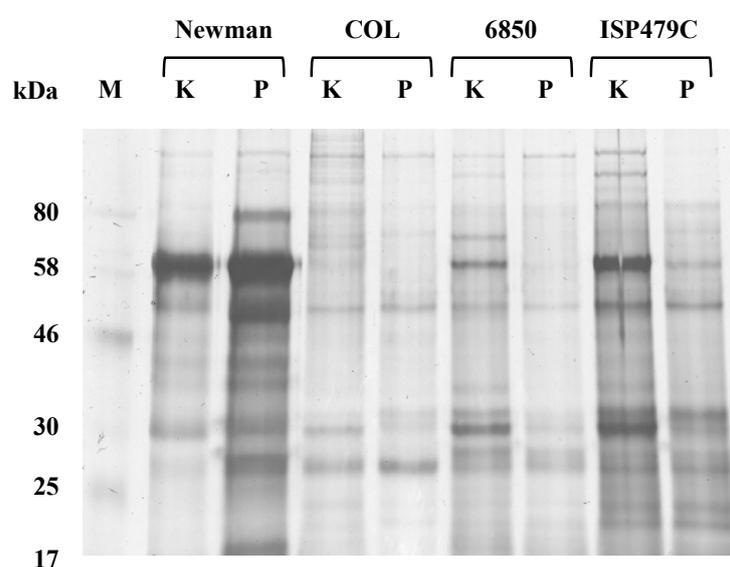


Abb. 4-I: Perform in subletalen Konzentrationen verändert differentiell das Proteinmuster
SDS-PAGE (12 %) der Gesamtzellextrakte der *S. aureus* Stämmen Newman, COL, 6850 und ISP479C;
M: Proteinmarker, K: Kontrolle, P: 0,04 % Perform

Eine Analyse der am stärksten differentiell exprimierten Proteinbanden mittels Massenspektrometrie ergab, dass Eap, LukFS, ein putatives Staphylokokken Enterotoxin, LukNS, γ -Hämolyisin component C, Efb und CHIPS in Anwesenheit von Perform vermehrt exprimiert wurden. Da die Expression dieser Proteine bekanntermaßen durch das Sae-System reguliert wird (108,247,248), wurde im Anschluss auf die gleiche Weise das Proteinmuster einer *sae*-defizienten *S. aureus* Stamm Newman Mutante analysiert. Wie in der Abb. 4-II zu erkennen ist, wurden die für den Wildtyp identifizierten Proteinbanden in einer Δ *sae*-Mutante in An- bzw. Abwesenheit von Perform nicht differentiell exprimiert (Abb. 4-II). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die durch Perform vermittelte Veränderung in der Proteinexpression *sae*-abhängig ist.

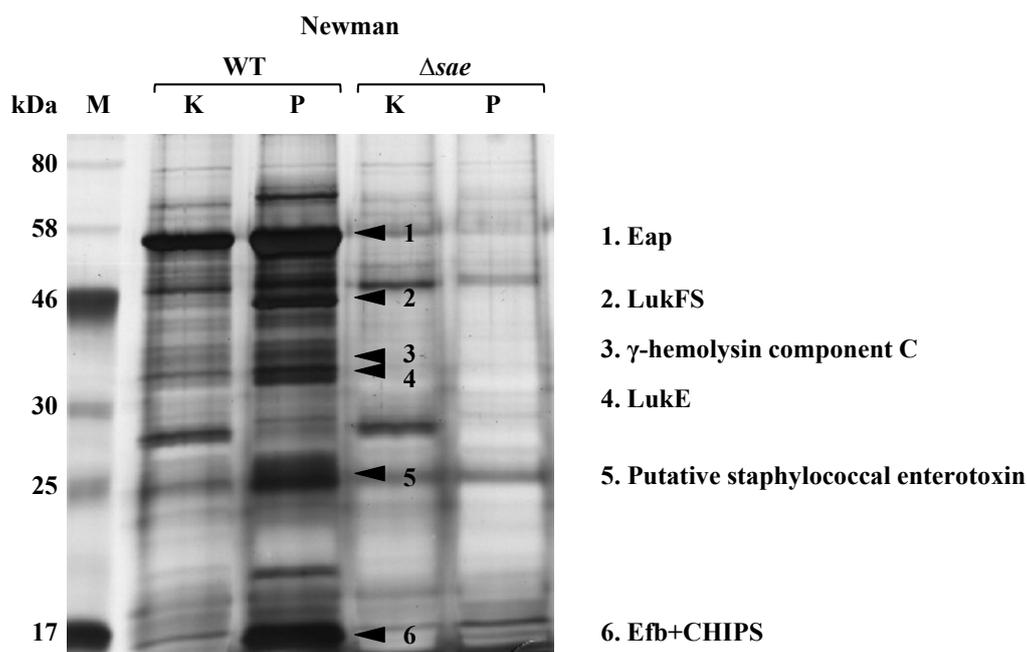


Abb. 4-II: Die Änderungen des Proteinmusters im *S. aureus* Stamm Newman durch Perform sind *sae*-abhängig
 SDS-PAGE (12 %) der Gesamtzellextrakte der *S. aureus* Stämmen Newman und Newman Δ *sae*;
 M: Proteinmarker, K: Kontrolle, P: 0,04 % Perform

4.3 SDS ist verantwortlich für das veränderte Proteinmuster

Da Perform ein Gemisch aus verschiedenen Substanzen darstellt (vgl. 3.3.3), sollte ermittelt werden, welche der in Perform beinhalteten Substanzen für die deutliche Veränderung des Proteinmusters verantwortlich ist. Die in Perform enthaltenen Substanzen Kaliumperoximonosulfat, Natriumbenzoat und Weinsäure produzieren durch die Lösung des Desinfektionsmittels in Wasser reaktive Sauerstoff-Spezies (persönliche Mitteilung Frank-Albert Pitten). Da das Sae-System durch Sauerstoffradikale aktiviert wird (79), wurde vermutet, dass diese drei Substanzen für die Veränderung des Proteinmusters verantwortlich sind. In der Folge wurde *S. aureus* Newman mit den in Perform beinhalteten Substanzen einzeln und in Kombination im Medium kultiviert und deren Einfluss auf die Proteinexpression über SDS-PAGE analysiert. Die daraus resultierenden Proteinmuster zeigen, dass nur SDS, mit der in Perform enthaltenen Konzentration, das Proteinmuster analog zu der Perform-Inkubation verändert (Abb. 4-III). Daraufhin wurden weitere, nicht in Perform enthaltene Detergenzien wie Triton X-100 oder Tween 20 getestet. Allerdings bewirkten diese keine Veränderung des Bandenmusters.

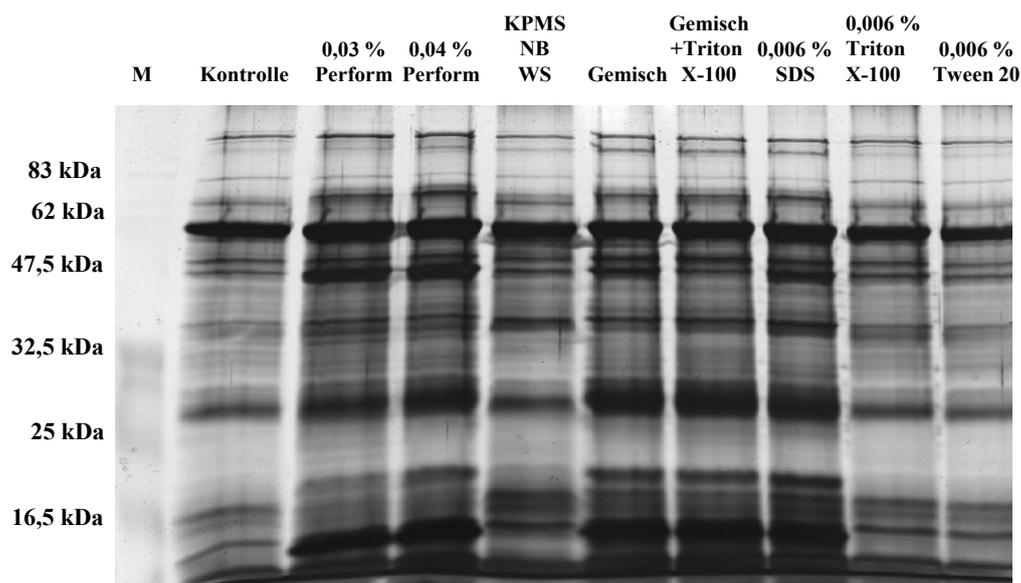


Abb. 4-III: SDS ist verantwortlich für das veränderte Proteinmuster

SDS-PAGE (12 %) der Gesamtzellextrakte des *S. aureus* Stammes Newman.

M: Proteinmarker; KPMS: Kaliumperoxymonosulfat, NB: Natriumbenzoat; WS: Weinsäure; Gemisch: KPMS + NB + WS + SDS.

Die Behandlung mit ROS-produzierenden Substanzen wie Paraquat und KPMS zeigte ebenfalls kein Perform-typisches Proteinmuster (Abb. 4-IV), was vermuten lässt, dass Perform eine sauerstoffunabhängige Stressantwort auslöst.

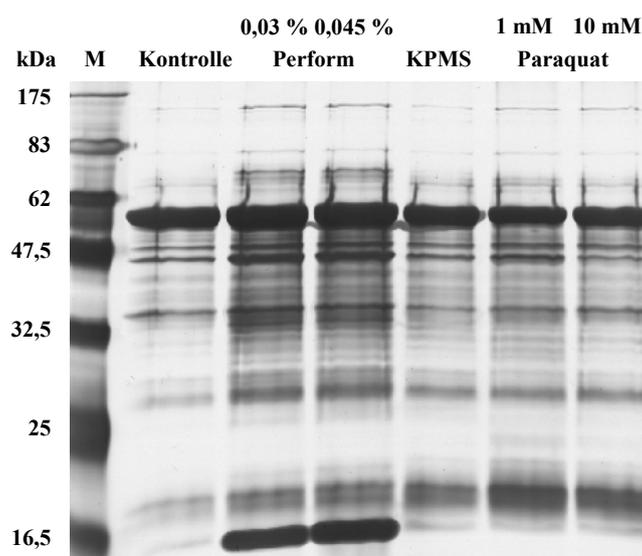


Abb. 4-IV: Das veränderte Proteinmuster durch Perform ist unabhängig von Sauerstoffstress

SDS-PAGE (12 %) der Gesamtzellextrakte des *S. aureus* Stammes Newman.

M: Proteinmarker; KPMS: Kaliumperoxymonosulfat

4.4 Das veränderte Bandenmuster wird nicht durch Solubilisierung verursacht

Um im Weiteren zu zeigen, dass die durch Perform induzierte Veränderung des Proteinprofils auf eine differentielle Proteinexpression und nicht auf eine durch das anionische Detergenz SDS vermittelte verstärkte Solubilisierung der Proteine zurückzuführen ist, wurde die Transkription und Translation und dadurch die Proteinneusynthese der Bakterien vor der Perform- bzw. SDS-Behandlung mit Rifampicin bzw. Tetracyclin gehemmt. Außerdem wurden zuvor mechanisch lysierte und autoklavierte Bakterien mit Perform und SDS behandelt.

Das Proteinprofil der daraus gewonnenen Gesamtzellextrakte stimmte jedoch nicht mit dem Bandenmuster überein, welches in vorangegangenen Experimenten durch Perform- oder SDS-Behandlung hervorgerufen wurde (Abb. 4-V). Aus diesem Grund kann eine Solubilisierungsreaktion als Ursache für die erhöhte Proteinexpression nach Perform- oder SDS-Behandlung ausgeschlossen werden. Stattdessen kann von einem aktiven Mechanismus ausgegangen werden, welchem lebende Staphylokokken zu Grunde liegen.

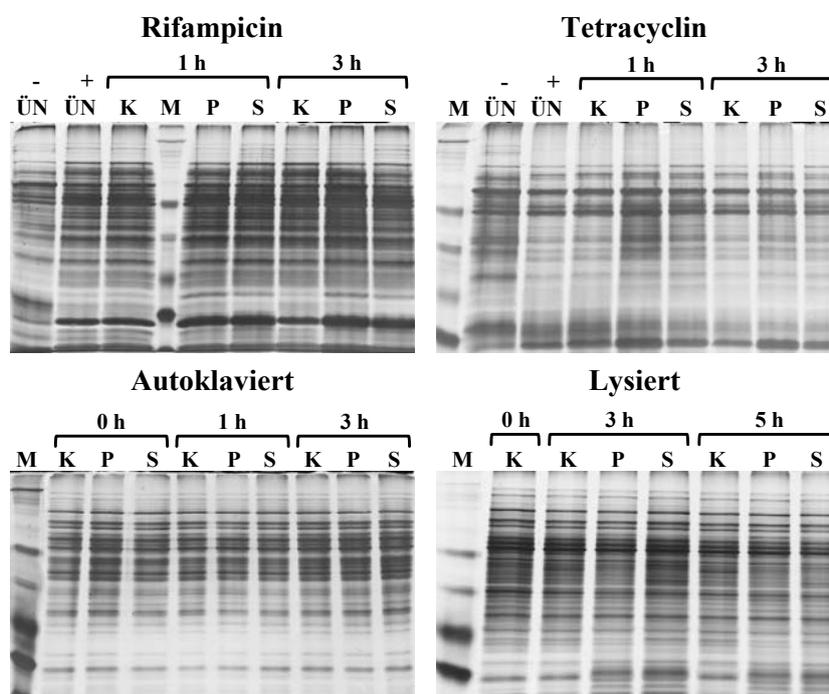


Abb. 4-V: Das veränderte Proteinmuster ist nicht die Folge einer Solubilisierung

SDS-PAGE (12 %) der Gesamtzellextrakte des *S. aureus* Stammes Newman.

M: Proteinmarker; K: Kontrolle; P: 0,04 % Perform; S: 0,006 % SDS;

Rifampicin Endkonzentration: 1 mg/ml, Tetracyclin Endkonzentration: 200µg/ml

4.5 Perform und SDS erhöhen die Transkription von *saeS* und *eap*

Um die gesteigerte Expression von Eap infolge subletaler Konzentrationen von Perform und SDS näher zu untersuchen, wurden qRT-PCRs durchgeführt. Hierüber konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *eap* in Anwesenheit von Perform und SDS im Medium um das 7-fache gesteigert war, während für *saeS* eine 2,5-fach erhöhte Transkriptionsrate nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-VI). Als Referenzgen wurde 16S-rRNA herangezogen. Versuche mit *gyrB* ergaben ähnliche Ergebnisse.

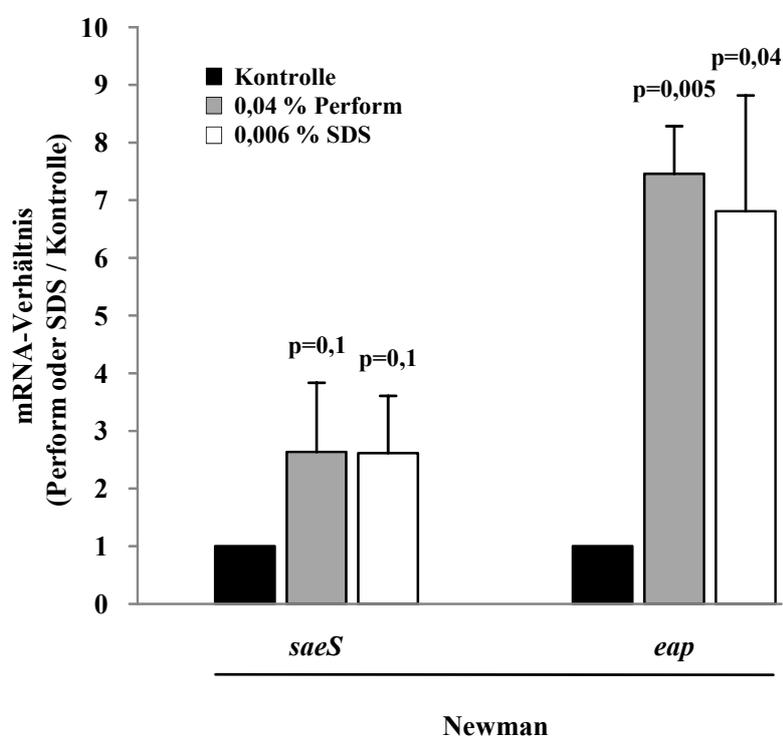


Abb. 4-VI: Perform und SDS erhöhen die Transkription von *saeS* und *eap*

Transkriptions-Analyse mittels qRT-PCR des Stammes Newman. Als interne Kontrolle wurde 16S rRNA mitgeführt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde mit den entsprechenden Kontrollbedingungen errechnet.

4.6 Perform und SDS erhöhen die Aktivität des *sae*-Promotors P1

Die Perform- bzw. SDS-vermittelte Aktivierung der *saeS*-Transkription wurde durch Reporteragen-Experimente untersucht. Hierzu wurde der *sae*-Promotor P1 mit einem promotorlosen *lacZ*-Gen fusioniert und die Promotoraktivität über die β -Galactosidase-Aktivität gemessen (79).

Nach der Inkubation von *S. aureus* Newman pCG7 mit Perform und SDS wurde im Vergleich zu unbehandelten Bakterien ein Anstieg der P1-Aktivität um 33 % bzw. 42 % nachgewiesen (Abb. 4-VII). Interessanterweise zeigten zwei weitere getestete Stämme (UAMS-1 und ISP479R) eine verringerte P1 Promotoraktivität nach Wachstum in Perform und SDS (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen erneut die Stamm-spezifischen Unterschiede durch Inkubation mit Perform und SDS und bestätigen die Ergebnisse vorangegangener Experimente, welche die Besonderheit des Stammes Newman auf Proteinebene darstellten (Abb. 4-I).

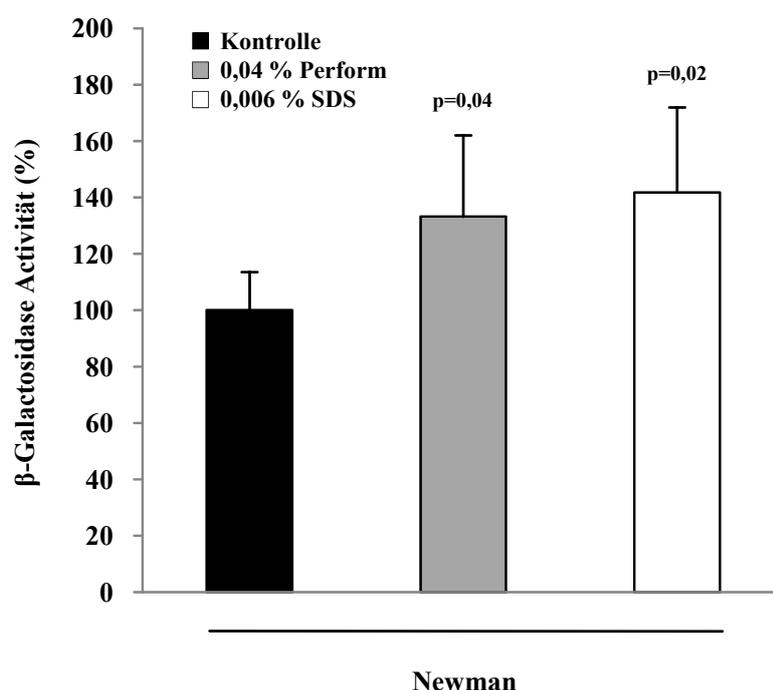


Abb. 4-VII: Perform und SDS erhöhen die Aktivität des *sae*-Promotors P1

Promotoraktivität-Assay des Stammes Newman. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten aus jeweils zwei unabhängigen Kulturen, die in Triplikaten analysiert wurden. Die statistische Signifikanz wurde mit den entsprechenden Kontrollbedingungen errechnet.

4.7 In Gegensatz zu anderen Stämmen erhöhen Perform und SDS die Invasivität des Stammes Newman

Das extrazelluläre Eap ist neben seiner immunmodulatorischen Eigenschaften auch in seiner Funktion für die Adhärenz und Invasion charakterisiert (123,189,216). Daher sollte getestet werden, ob sich die durch Perform induzierte gesteigerte Eap-Expression auch auf die Invasion von *S. aureus* Newman auswirkt.

Ein entsprechender Invasions-Assay mit FITC-markierten Bakterien deckte auf, dass die Invasivität von *S. aureus* Newman durch die Perform- bzw. SDS-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Bakterien signifikant erhöht war (Abb. 4-VIII). Als Negativkontrolle wurde der *Staphylococcus carnosus* Stamm TM300 verwendet. Der Stamm Newman invadierte 293-Zellen unter Kontrollbedingungen zu 10,7 %. Durch Behandlung mit subletaler Konzentration von Perform und SDS konnte die Invasivität auf 26,8 % bzw. 34,6 % gesteigert werden.

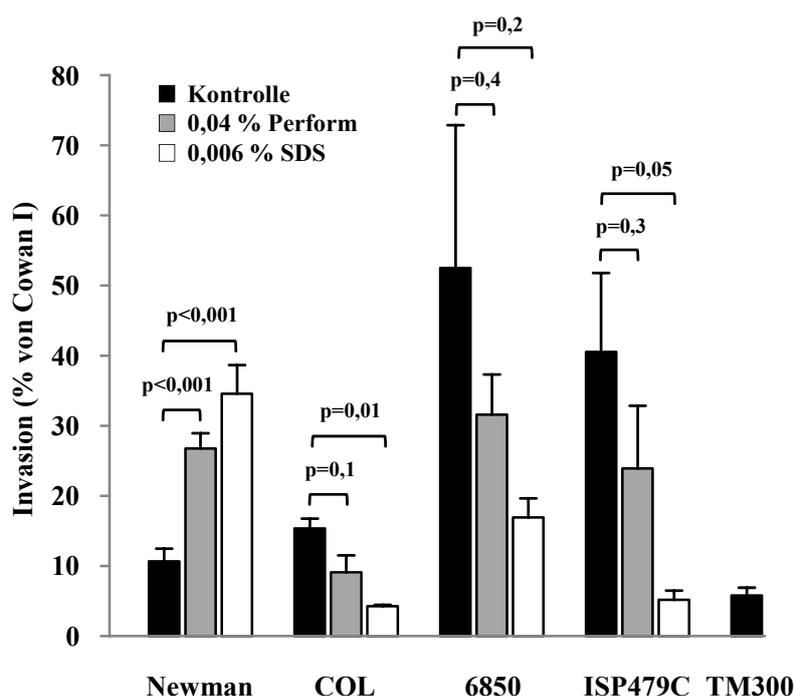


Abb. 4-VIII: Perform und SDS erhöhen die Invasivität des Stammes Newman

Invasions-Assay der *S. aureus* Stämme Newman, COL, 6850 und ISP479C. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden und sind als relative Invasivität im Vergleich zu Stamm Cowan I angegeben. Die statistische Signifikanz wurde in jedem Stamm mit der jeweiligen Kontrollbedingung errechnet.

Im Gegensatz dazu zeigten andere getestete *S. aureus* Wildtyp-Stämme (COL, 6850 und ISP479C) nach Inkubation mit Perform und SDS jedoch eine verringerte Invasivität (Abb. 4-VIII). So ließ sich für den *S. aureus* Stamm COL unter Kontrollbedingungen eine Invasivität von 15,3 % nachweisen, während nach Perform- und SDS-Behandlung die Invasivität auf 9,1 % und 4,3 % sank. Die Invasivität von Stamm 6850 lag unter Kontrollbedingungen bei 52,5 %, nach der Inkubation mit Perform und SDS jedoch nur noch bei 31,6 % und 16,9 %. Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut das spezifische Verhalten des Stammes Newman nach Perform- und SDS-Behandlung im Vergleich mit anderen *S. aureus* Wildtypen, welches bereits in den vorhergegangenen Experimenten beobachtet wurde.

Um die durchflusszytometrischen Ergebnisse zu bestätigen, wurden Lysostaphin Protektions Versuche durchgeführt. Es zeigte sich, dass auch in diesen Versuchen eine gesteigerte Invasivität des Stammes Newman nach Inkubation mit Perform und SDS festgestellt werden konnte. Die unbehandelten Kontrollbakterien invadierten die Wirtszellen zu 0,93 ‰. Durch Perform- und SDS-Behandlung konnte dieser Wert auf 4,26 ‰ und 9,02 ‰ gesteigert werden (Abb. 4-IX). Die *sae*-defiziente Mutante des Stammes Newman war fast nicht invasiv. Auch die Inkubation mit Perform und SDS resultierte in keiner wesentlichen Steigerung der Invasivität. Somit bestätigen die Lysostaphin Protektions Versuche die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (vgl. Abb. 4-VIII).

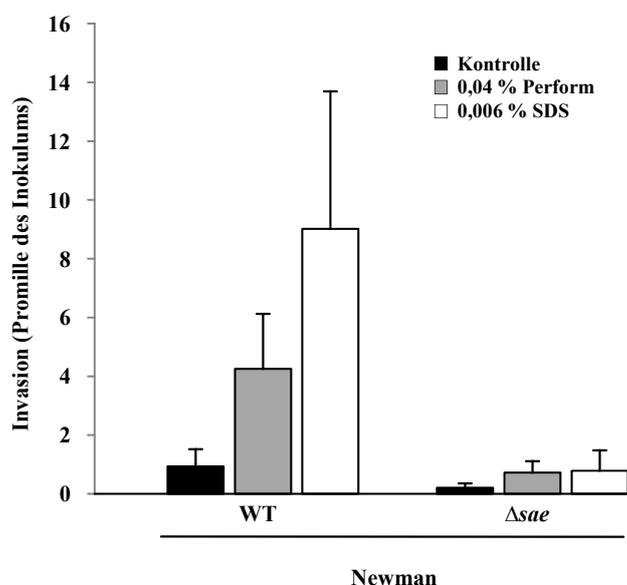


Abb. 4-IX: Perform und SDS erhöhen im Lysostaphin Protektions Versuch die Invasivität des Stammes Newman

Lysostaphin Protektions Versuch der *S. aureus* Stämme Newman Wildtyp und Newman Δsae . Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden und sind als Invasion in Promille des Inokulums angegeben.

4.8 Die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman durch Perform und SDS ist Eap-abhängig

Im Folgenden sollte der direkte Einfluss von Eap auf die veränderten Invasioneigenschaften analysiert werden. Dementsprechend wurde eine Δeap -Mutante des Stammes Newman im Invasions-Assay getestet.

Die unbehandelte Δeap -Mutante zeigte eine Invasivität von 9,3 %. In der Gegenwart von Perform erhöhte sich der Wert auf 17,2 %. Die Inkubation mit SDS führte zu einer Invasivität von 8,1 % (Abb. 4-X). Da die Invasionswerte der Δeap -Mutante nach der Inkubation mit Perform und SDS deutlich unter denen des Wildtyps lagen, liegt die Vermutung nahe, dass die gesteigerte Invasivität durch die Perform- und SDS- Behandlung Eap vermittelt wird. Eine Mutante ohne Fibronektinbindeproteine (FnBPs) zeigte unter Kontrollbedingungen eine Invasivität von 8,7 %. Durch die Behandlung mit Perform und SDS stieg die Invasivität auf 20,9 % und 41,9 % (Abb. 4-X). Dieses Verhalten der $\Delta fnbAB$ -Mutante ähnelt dem des Wildtyps. Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass die FnBPs bei der Invasivität von Stamm Newman keine entscheidende Rolle spielen. Dies geht vermutlich darauf zurück, dass sie nicht in der Zellwand verankert werden, sondern in das Medium sezerniert werden.

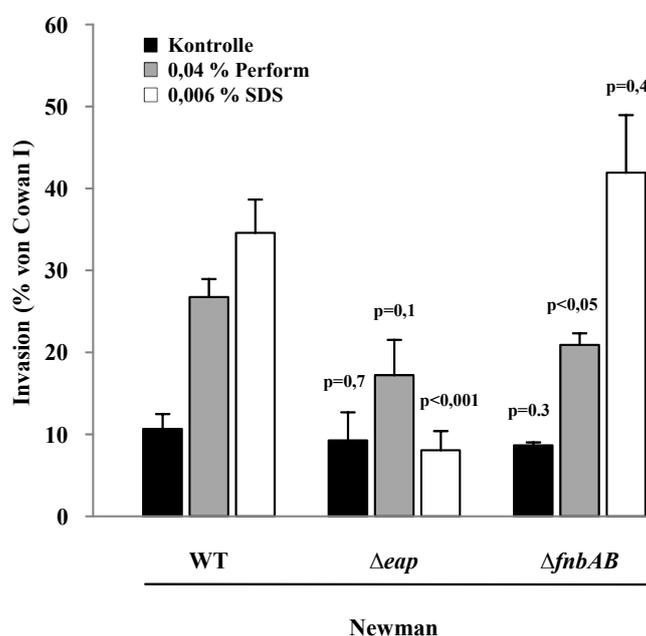


Abb. 4-X: Die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman durch Perform und SDS ist Eap-abhängig

Invasions-Assay der *S. aureus* Stämme Newman Δeap und Newman $\Delta fnbAB$. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden und sind als relative Invasivität im Vergleich zu Stamm Cowan I angegeben. Die statistische Signifikanz der einzelnen Bedingungen in jedem Stamm wurde der entsprechenden Bedingung des Wildtyps errechnet.

4.9 Die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman ist in der stationären Wachstumsphase noch ausgeprägter

Da nicht auszuschließen war, dass der Effekt von Perform und SDS auf die Invasivität des Stammes Newman abhängig von der exponentiellen Wachstumsphase war, wurden Kontrollexperimente mit ÜNK durchgeführt, denen ebenfalls subletale Konzentrationen von Perform und SDS zugegeben wurde. In diesen Experimenten zeichnete sich ein noch deutlicherer Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und den mit Perform und SDS behandelten Ansätzen ab. So erhöhte sich die Invasivität des Newman Wildtyps von 15,3 % auf 304 % und 232,1 % durch Inkubation mit Perform und SDS (Abb. 4-XI). Die Newman Δeap -Mutante zeigte unbehandelt eine Invasivität von 16,6 %. Wie auch in exponentiell wachsenden Kulturen erhöhte sich auch in den ÜNK die Invasivität auf 38 % nach Perform-Behandlung. Die Inkubation mit SDS hingegen reduzierte die Invasivität auf 10,4 % (Abb. 4-XI). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman nach Inkubation mit Perform und SDS abhängig von der exponentiellen Wachstumsphase war, sondern einem generellen Effekt entspricht.

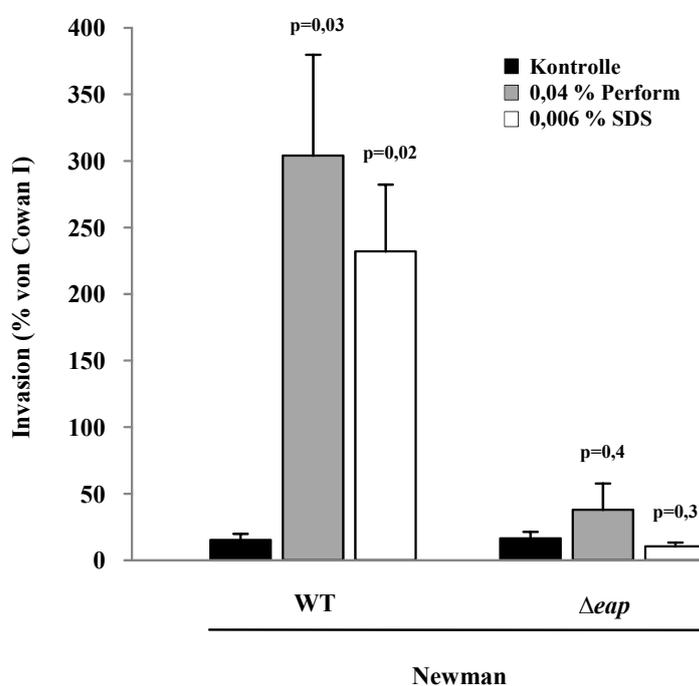


Abb. 4-XI: Die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman ist in der stationären Wachstumsphasen noch ausgeprägter

Invasions-Assay der *S. aureus* Stämme Newman WT und Newman Δeap . Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden und sind als relative Invasivität im Vergleich zu Stamm Cowan I angegeben. Die statistische Signifikanz wurde in jedem Stamm mit der jeweiligen Kontrollbedingung errechnet.

4.10 Perform und SDS verändern die Aggregatgröße

Wie aus der Literatur bekannt, vermittelt Eap durch die Rückbindung an die bakterielle Zelloberfläche die Bildung von Zellaggregaten (216). Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von FITC-markierten Staphylokokken des Stammes Newman zeigt sich eine deutlich gesteigerte Aggregatgröße nach Inkubation mit Perform oder SDS im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 4-XII). Die beobachtete Aggregatbildung war jedoch durch Ultraschallbehandlung reversibel.

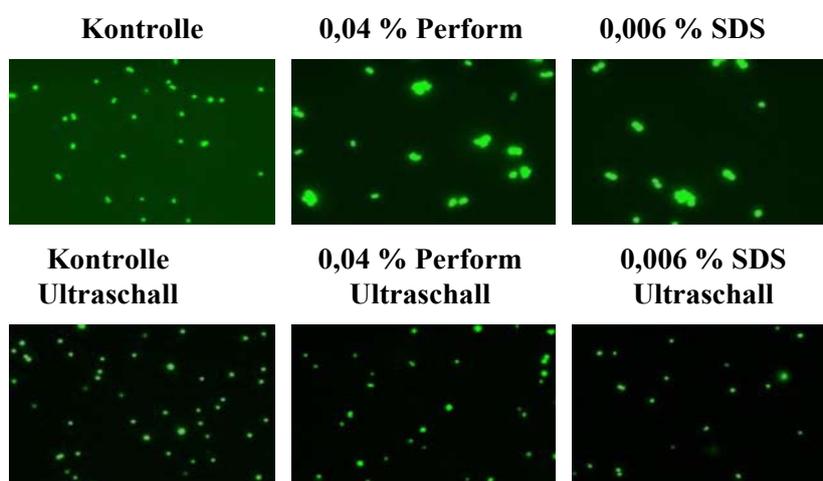


Abb. 4-XII: Perform und SDS verändern die Aggregatgröße

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von FITC-markierten Staphylokokken des Stammes Newman.

4.11 Die veränderte Aggregatgröße ist nicht der Grund für die gesteigerte Invasivität

Den Beobachtungen der vorangegangenen Experimente zufolge, tendieren mit Perform oder SDS behandelte Staphylokokken des Stammes Newman zur Ausbildung größerer Zellaggregate im Vergleich zu unbehandelten Bakterien (Abb. 4-XII). Um diesen Phänotypen als Ursache der gesteigerten Invasivität unter diesen Bedingungen auszuschließen zu können, wurden Kontrollexperimente mit ultraschallbehandelten und unbehandelten Bakterien durchgeführt. Stamm Newman ohne Ultraschallbehandlung zeigte unter Kontrollbedingungen eine Invasivität von 10,7 %, nach Perform- bzw. SDS-Behandlung 26,8 % und 34,6 %. Nach der Ultraschallbehandlung war die Kontrolle zu 13,2 %, die Perform- und SDS-behandelten Bakterien zu 25,8 % und 21,3 % invasiv (Abb. 4-XIII). Darüber hinaus ergab die Analyse,

dass sich die Invasivität der Kontroll- bzw. Perform- Bakterien trotz der Ultraschallbehandlung kaum veränderte. Im Vergleich dazu wurde die Invasivität der mit SDS inkubierten Bakterien durch die Ultraschallbehandlung stärker beeinflusst, aber auch dieser Effekt war nicht signifikant. Infolgedessen kann ausgeschlossen werden, dass die größeren Zellaggregate der Grund für die gesteigerte Invasivität nach Perform- und SDS-Behandlung sind.

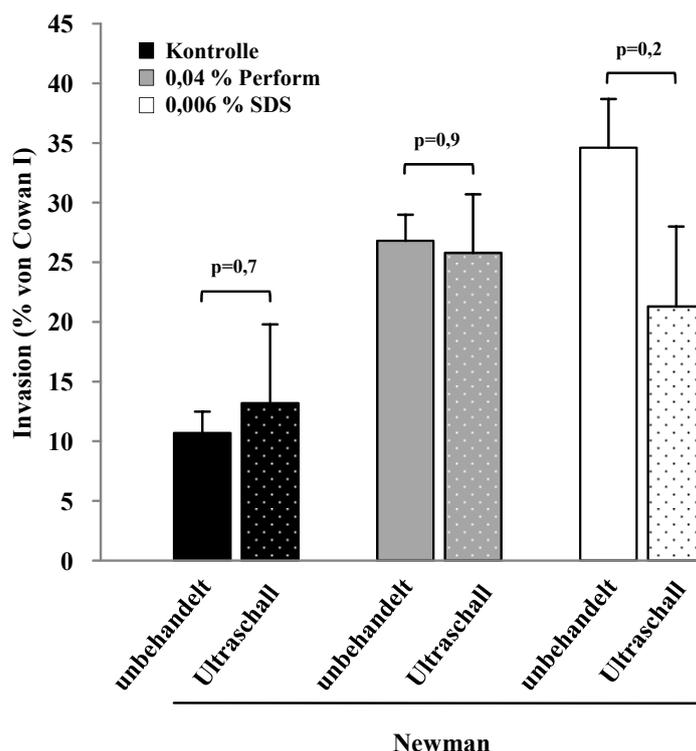


Abb. 4-XIII: Die veränderte Aggregatsgröße ist nicht der Grund für die gesteigerte Invasivität
 Invasions-Assay des *S. aureus* Stammes Newman mit und ohne Ultraschallbehandlung. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden und sind als relative Invasivität im Vergleich zu Stamm Cowan I angegeben. Die statistische Signifikanz der einzelnen Bedingungen wurde mit der entsprechenden unbehandelten Bedingung errechnet.

4.12 Perform und SDS verändern differentiell die Biofilmbildung

Linares *et al.* konnten zeigen, dass subletale Konzentrationen von Antibiotika die Biofilmbildung von Bakterien induzieren können (167). Da viele Gemeinsamkeiten in der Wirkung von Antibiotika und Desinfektionsmitteln bekannt sind, sollte getestet werden, ob auch Perform oder SDS eine derartige Auswirkung auf die Biofilmbildung haben.

Es zeigte sich, dass der Stamm Newman mit Perform im Medium deutlich mehr Biofilm bildete als unter Kontrollbedingungen. Für die *S. aureus* Wildtyp-Stämme 6850 und Cowan I konnte ebenfalls eine gesteigerte Biofilmbildung nach Perform-Behandlung nachgewiesen werden. Dahingegen zeigte der Stamm Phillips nach der Inkubation mit Perform eine geringere Biofilmbildung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 4-XIV).

Interessanterweise wirkte sich eine SDS-Behandlung der Wildtyp-Stämme kaum (Newman, 6850) oder inhibierend auf die Biofilmproduktion aus. Diese heterogene Wirkung von Perform und SDS auf die Biofilmbildung spiegelt erneut die bereits beobachteten Stammunterschiede wieder (vgl. Abb. 4-I/Abb. 4-VIII).

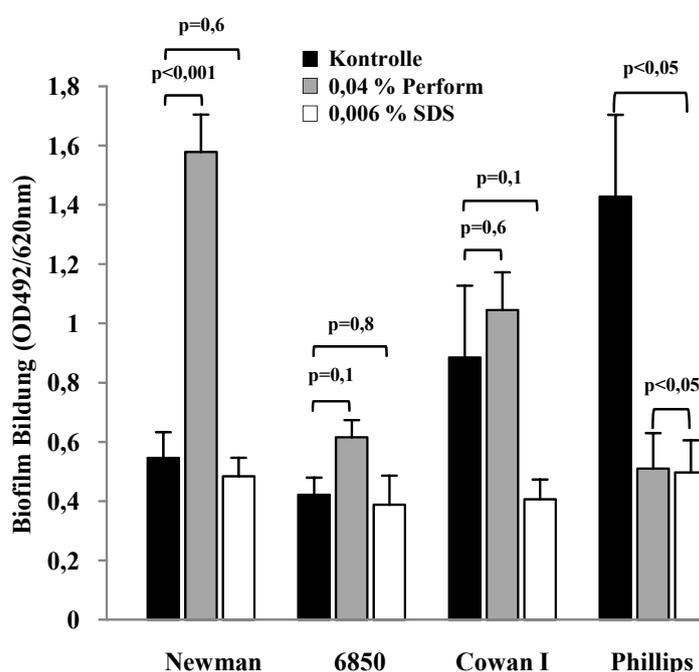


Abb. 4-XIV: Perform und SDS verändern differentiell die Biofilmbildung

Biofilm-Assay der *S. aureus* Stämme Newman, 6850, Cowan I und Phillips. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in mindestens zehnfachen Ansätzen durchgeführt wurden. Die statistische Signifikanz wurde in jedem Stamm mit der jeweiligen Kontrollbedingung errechnet.

4.13 Die globalen Regulatoren Agr, SarA und SigB spielen bei der Invasivität unter Einfluss von Perform und SDS keine entscheidende Rolle

In vorangegangenen Experimenten wurde lediglich die Bedeutung des Sae-Systems auf die Invasivität nach Inkubation mit Perform und SDS untersucht. Doch auch dem Sae-System übergeordnete Regulatoren wie der alternative Sigmafaktor SigB, das Quorum Sensing-

System Agr und der Transkriptionsfaktor SarA sollten auf ihr Potential, die Invasivität des *S. aureus* Stammes Newman unter Einwirkung von Perform und SDS zu beeinflussen, getestet werden. Dazu wurden Invasions-Assays mit den entsprechenden Knockout-Mutanten durchgeführt. Dabei wurde für die *agr*- und *sarA*-defizienten Mutanten unter Kontrollbedingungen eine Invasionsrate von 8 % und 14,1 % bestimmt. Die Invasivität erhöhte sich mit Perform auf 22,2 % und 27,5 % und durch SDS auf 24,1 % und 23,7 % (Abb: 4-XV). Somit konnte ein statistisch signifikanter Unterschied nach SDS-Behandlung zwischen der Invasivität des Wildtyps und der *sarA*-defizienten Mutante festgestellt werden. Eine Mutante, in der der alternative Sigmafaktor SigB inaktiviert worden war, zeichnete sich durch eine Invasivität von 6,4 % aus. Dahingegen führte die Behandlung mit Perform und SDS zur Erhöhung der Invasivität auf 36,8 % und 49,2 %. Insgesamt betrachtet zeigten zwar alle Regulatormutanten den gleichen Trend wie der Wildtyp, jedoch erreichten die Δagr - und die $\Delta sarA$ -Mutanten nach Inkubation mit Perform oder SDS nicht das Niveau des Wildtyps. Die $\Delta sigB$ -Mutante jedoch hatte die Fähigkeit die gesteigerte Invasivität durch Perform und SDS zusätzlich zu erhöhen, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

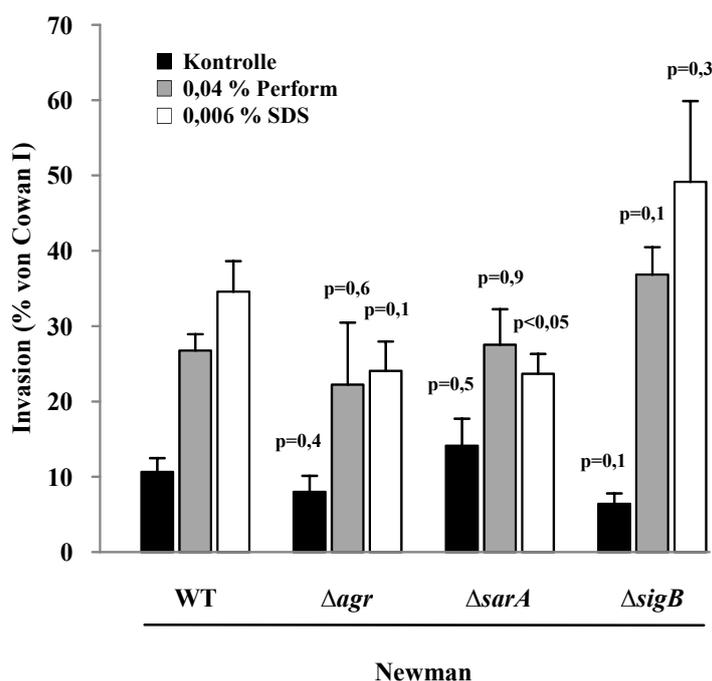


Abb: 4-XV: Die globalen Regulatoren AGR, SarA und SigB spielen bei der Invasivität unter Einfluss von Perform und SDS keine entscheidende Rolle

Invasions-Assay der *S. aureus* Stämme Newman WT, Newman Δagr , Newman $\Delta sarA$ und Newman $\Delta sigB$. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden und sind als relative Invasivität im Vergleich zu Stamm Cowan I angegeben. Die statistische Signifikanz der einzelnen Bedingungen in jedem Stamm wurde der entsprechenden Bedingung des Wildtyps errechnet.

4.14 Der alternative Sigmafaktor σ^B und die Wachstumsphase beeinflussen die Resistenz gegen Incidin Plus

Um den Einfluss der Wachstumsphase und den des alternativen Sigmafaktors σ^B in Stamm Newman im Bezug auf die Desinfektion durch 0,01 % Incidin Plus-Lösung zu testen, wurden quantitative Suspensionsversuche durchgeführt. Die Effektivität der Desinfektion wird als Reduktionsfaktor (RF) angegeben und stellt die CFU-Abnahme in \log_{10} -Stufen pro Einwirkzeit (EWZ) dar. Für alle drei getesteten EWZ (30, 60 und 90 min) zeigte sich die gleiche Tendenz. Der resistanteste Stamm, d.h. der Stamm mit den geringsten RF, war der Wildtyp Newman in der Stationärphase (Newman WT_{stat.}). Dieser wies nach 90 min einen RF von 2 auf (Abb. 4-XVI). Gefolgt wurde dieser Stamm von Newman $\Delta sigB$ in der Stationärphase (Newman $\Delta sigB$ _{stat.}) bei welchem sich nach 90 min EWZ ein RF von 3,1 ergab. Der Stamm Newman WT in der logarithmischen Wachstumsphase (Newman WT_{log.}) zeigte nach 90 min EWZ einen RF von 4,26. Als sensibelster Stamm stellte sich Newman $\Delta sigB$ in der logarithmischen Wachstumsphase (Newman $\Delta sigB$ _{log.}) heraus, welcher einen RF von 4,82 aufwies. Diese Ergebnisse zeigen, dass *S. aureus* Newman in der stationären Wachstumsphase resistenter gegen Incidin Plus waren als die logarithmisch wachsenden Bakterien. Des Weiteren zeigte sich, dass *sigB*-defiziente Mutanten in Stamm Newman weniger resistent waren als der entsprechende Wildtyp.

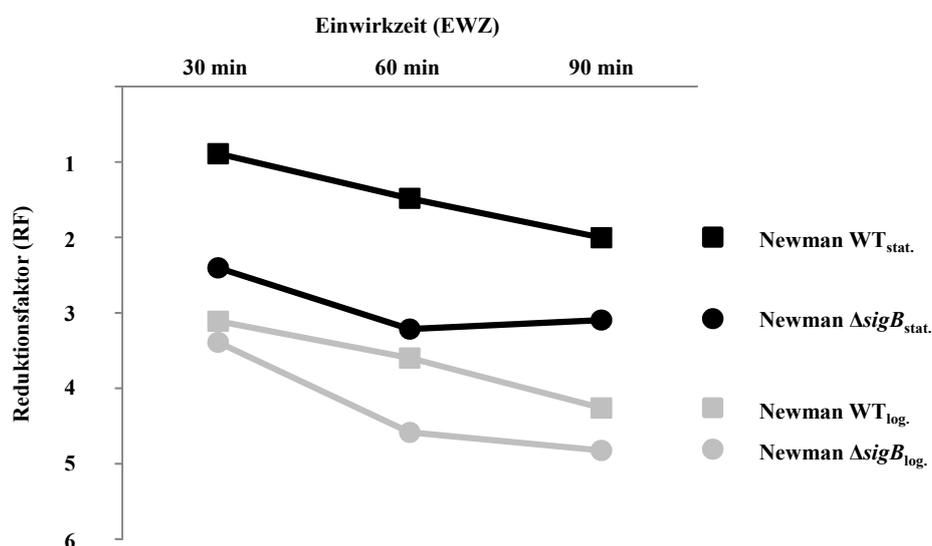


Abb. 4-XVI: Der alternative Sigmafaktor σ^B und die Wachstumsphase beeinflussen die Resistenz gegen Incidin Plus

Quantitativer Suspensionsversuch des *S. aureus* Stämme Newman WT und Newman $\Delta sigB$. Die Ergebnisse sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Der Reduktionsfaktor stellt die Abnahme der CFU um jeweils eine Zehnerpotenz dar.

4.15 Eine Punktmutation in *saeS* verändert die Stressantwort gegenüber Perform und SDS

Die Sequenz der Sensor-Histidinkinase *saeS* ist hoch konserviert und fast identisch in allen bisher sequenzierten *S. aureus* Stämmen (1). Die Ausnahme bildet der Stamm Newman, welcher eine Punktmutation trägt (vgl. Abb. 2-VI), die eine konstitutive Aktivierung des *sae*-Systems zur Folge hat (1,79,274). Um festzustellen, ob die funktionellen Unterschiede abhängig von der allelen Variante in Stamm Newman sind, wurden Δ *sae*-Mutanten des Stammes Newman sowohl mit der Newman spezifischen Sequenz von *sae* (*sae33/saePQRS*_{Newman}) als auch mit der üblichen Sequenz (*sae28/saePQRS*_{ISP479C}) komplementiert. Für diese Komplementierungen wurde jeweils das gesamte *saePQRS*-Operon in das Chromosom der *sae*-defizienten Mutante integriert. Die Analyse im Invasions-Assay ergab für eine Δ *sae*-Mutante eine Invasionsrate vergleichbar mit der Negativkontrolle TM300. Die Behandlung mit Perform und SDS zeigte ebenso keine Auswirkung auf die Invasivität (Abb. 4-XVII). Diese Beobachtung deckte sich mit der Wirkung von Perform und SDS auf das Proteinmuster dieser Mutante (Abb. 4-II).

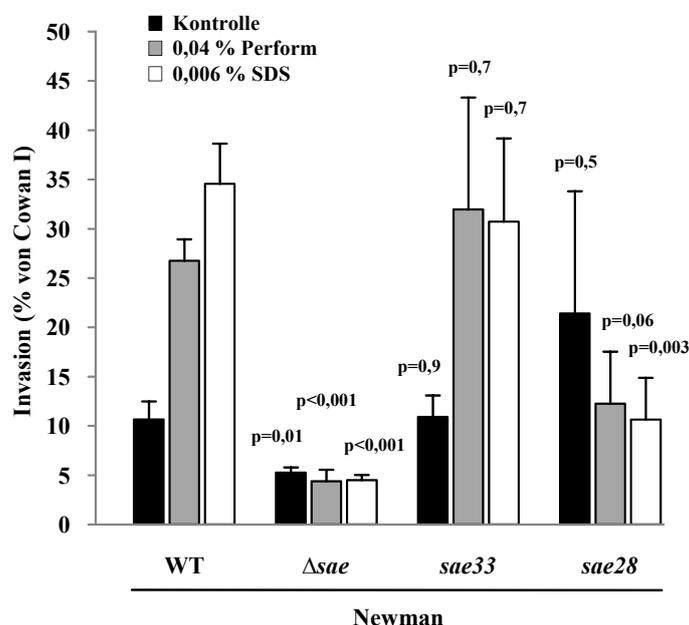


Abb. 4-XVII: Eine Punktmutation in *saeS* verändert die Stressantwort gegenüber Perform und SDS
 Invasions-Assay der *S. aureus* Stämme Newman WT, Newman Δ *sae*, Newman *sae33* und Newman Δ *sae28*. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden und sind als relative Invasivität im Vergleich zu Stamm Cowan I angegeben. Die statistische Signifikanz der einzelnen Bedingungen in jedem Stamm wurde der entsprechenden Bedingung des Wildtyps errechnet.

Nach Komplementierung der *sae*-defizienten Mutante mit dem Newman *sae*-Operon (*sae33/saePQRS_{Newman}*) konnte eine mit dem Newman Wildtyp-Stamm vergleichbare Invasionsrate beobachtet werden: Die unbehandelte *sae33*-Komplementante zeigte eine Invasivität von 10,9 % während mit Perform und SDS im Medium die Invasivität auf 32 % und 30,7 % erhöht wurde. Im Gegensatz dazu demonstrierte eine *sae*-defiziente Mutante, die mit dem *sae*-Operon von Stamm ISP479C (*sae28/saePQRS_{ISP479C}*) komplementiert wurde, eine zum Wildtyp-Niveau gesteigerte Invasivität. Im Zuge der Kultivierung mit Perform und SDS verringerte sich die Invasivität jedoch (Abb. 4-XVII).

Die Invasionsrate des Stammes ISP479C wurde unter Kontrollbedingungen auf 40,5 % bestimmt. Wie auch andere getestete Wildtyp-Stämme sank die Invasivität nach der Perform- und SDS-Behandlung auf 23,9 % und 5,2 % (Abb. 4-XVIII). Im Vergleich dazu stellte sich eine *sae*-defiziente Mutante dieses Stammes im Invasions-Assay als fast nicht invasiv dar, ähnlich wie die Δ *sae*-Mutante des Stammes Newman (vgl. Abb. 4-XVII). Dies bestätigt die postulierte Bedeutung des *sae*-Systems in Bezug auf die Invasion.

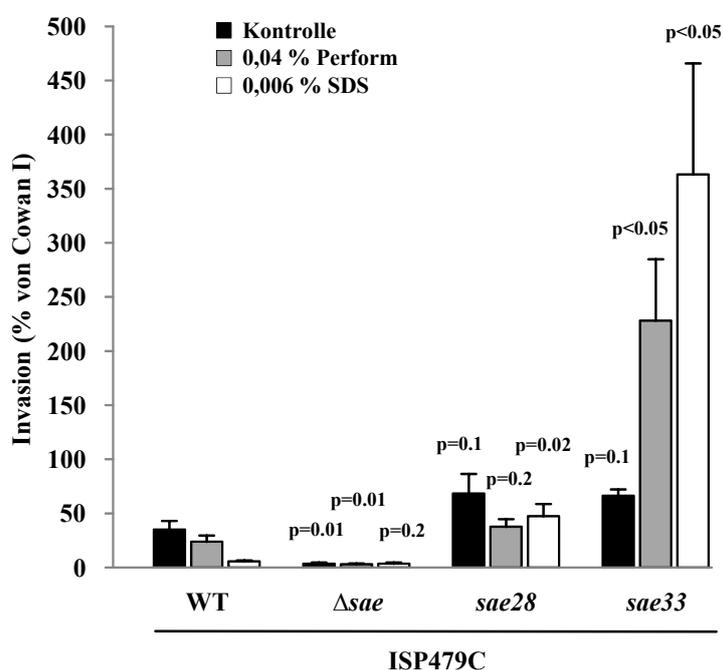


Abb. 4-XVIII: Die gesteigerte Invasivität von Stamm ISP479C ist abhängig vom Newman *sae*-Operon

Invasions-Assay der *S. aureus* Stämme ISP479C WT, ISP479C Δ *sae*, ISP479C *sae33* und ISP479C Δ *sae28*. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einschließlich SEM von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden und sind als relative Invasivität im Vergleich zu Stamm Cowan I angegeben. Die statistische Signifikanz der einzelnen Bedingungen in jedem Stamm wurde der entsprechenden Bedingung des Wildtyps errechnet.

Die Komplementante des Stammes ISP479C mit dem *sae*-Regulon von ISP479C (*sae28/saePQRS*_{ISP479C}) zeigte unter Kontrollbedingungen eine Invasivität von 55,3 %. Infolge der Perform- und SDS-Behandlung reduzierte sich die Invasivität auf 24,2 % und 34 % und verhielt sich damit ähnlich wie der entsprechende Wildtyp. Die Komplementierung des *sae*-defizienten Stammes ISP479C mit dem Newman *sae*-Operon (*sae33/saePQRS*_{Newman}) resultierte mit einer Rate von 66,2 % in einer gegenüber dem Wildtyp ISP479C gesteigerten Invasivität. Die Behandlung mit Perform und SDS erhöhte die Invasivität auf 228,2 % und 363,2 %.

Um die durchflusszytometrischen Ergebnisse und die Bedeutung des *sae*-Operons des Stammes Newman (*sae33/saePQRS*_{Newman}) besser zu verstehen, wurden Gesamtzellextrakte mittels SDS-PAGE analysiert. Die Stämme ISP479C WT und ISP479C (*sae28/saePQRS*_{ISP479C}) zeigten eine meist rückläufige Expression einzelner Proteinbanden nach der Perform- oder SDS-Behandlung (Abb. 4-XIX) (vgl. Abb. 4-I). Nur der Stamm ISP479C (*sae33/saePQRS*_{Newman}) zeichnete sich durch eine gesteigerte Expression einzelner Proteinbanden, darunter Eap, aufgrund von Perform- oder SDS-Inkubation aus und verhielt sich dadurch ähnlich wie der Newman Wildtyp (vgl. Abb. 4-I)

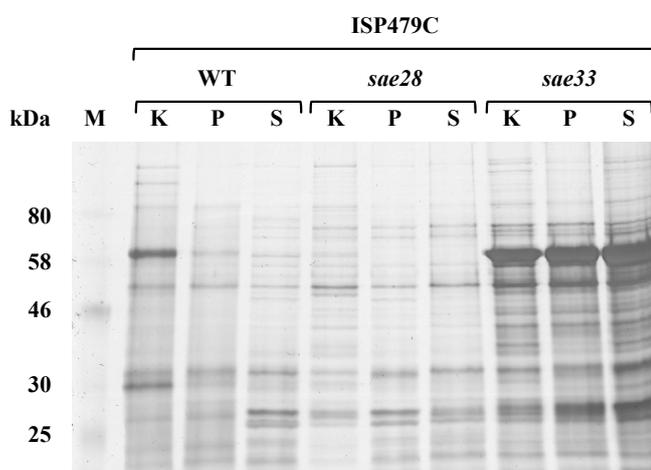


Abb. 4-XIX: Der Stamm ISP479C *sae33* zeigt den Newman Phänotyp

SDS-PAGE (12 %) der Gesamtzellextrakte der *S. aureus* Stämme ISP479C WT, ISP479C *sae28* und ISP479C *sae33*. M: Proteinmarker; K: Kontrolle; P: 0,04 % Perform; S: 0,006 % SDS

Diese Ergebnisse legen nahe, dass das *sae*-Operon des Stammes Newman (*sae33/saePQRS*_{Newman}) und dadurch auch der Aminosäureaustausch in der Sensor-Histidinkinase SaeS verantwortlich für die differentielle Proteinexpression und die dadurch gesteigerte Invasivität nach Perform- oder SDS-Behandlung ist.

5 Diskussion

S. aureus kann sich gegenüber variablen Umweltbedingungen wie z.B. Temperatur, pH-Wert, die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) oder subinhibitorischen Konzentrationen von Antibiotika sehr schnell anpassen (43). Eine Vielzahl unterschiedlicher Regulatoren wie z.B. der alternative Sigmafaktor σ^B , das Quorum Sensing-System Agr oder das Zweikomponenten-System Sae, regulieren die Genexpression der Bakterien und vermitteln somit eine schnelle Adaption an die veränderten Umweltbedingungen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie *S. aureus* auf subletale Konzentrationen von Desinfektionsmitteln reagiert. Dazu wurden mit Perform und Incidin Plus zwei geläufige Desinfektionsmittel verwendet. Perform zählt zu den Peroxidverbindungen, welche Bakterien durch die Bildung von ROS abtöten, wohingegen Incidin Plus ein Glucoprotaminderivat darstellt und ähnlich wie quaternäre Ammoniumverbindungen als Tensid auf die bakterielle Membran wirkt.

Subletale Konzentrationen von Perform (30 % der MHK; vgl. Tab. 4-I) veränderten deutlich die Proteinmuster der gut charakterisierten *S. aureus*-Stämme Newman, COL, 6850 und ISP479C. Im Gegensatz zu den Stämmen COL, 6850 und ISP479C zeigte sich im Stamm Newman eine gesteigerte Expression einzelner Proteine. Dagegen war in den anderen getesteten Stämmen die Expression dieser Proteine unverändert bzw. vermindert (Abb. 4-I). Die Analyse der im Stamm Newman vermehrt exprimierten Proteine mittels Massenspektrometrie zeigte, dass es sich mit Eap, LukFS, dem putativen Staphylokokken Enterotoxin, Luke, γ -Hämolyisin Komponente C, Efb und CHIPS hierbei ausschließlich um Proteine des *sae*-Regulons handelte (Abb. 4-II) (107,247,248). Eine *sae*-defiziente Mutante exprimierte weder in An- noch in Abwesenheit von Perform im Medium diese Proteine in korrespondierender Menge (Abb. 4-II). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die durch Perform induzierte veränderte Proteinexpression stammspezifisch ist und im Stamm Newman darüber hinaus unter Sae-Kontrolle steht.

Am Beispiel der Biofilmbildung verdeutlichen sich ebenfalls die Stammunterschiede in *S. aureus*, da Perform nur in den Stämmen Newman, 6850 und Cowan I die Biofilmbildung erhöhte, nicht jedoch im Stamm Phillips. SDS hatte keinen Einfluss auf die Biofilmbildung bzw. wirkte sich inhibierend auf diese aus (Abb. 4-XIV). In der Literatur wird diskutiert, dass extrazelluläre DNA die Biofilmbildung steigern kann (12,246,285,299). Infolgedessen wäre

eine teilweise Lyse der behandelten Bakterien ein möglicher Grund für die gesteigerte Biofilmbildung nach der Inkubation mit Perform. Da aber auch die Inkubation mit SDS zu einer Abtötung und möglichen Zelllyse der *S. aureus*-Stämme führen kann (vgl. Tab. 4-I) ist die Bedeutung von extrazellulärer DNA für die gesteigerte Biofilmbildung fraglich. Es muss folglich noch andere Faktoren geben, die die Biofilmbildung nach Perform- und SDS-Inkubation beeinflussen. Perform ist wie auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ein Vertreter der Peroxidverbindungen. Chan *et al.* konnten zeigen, dass σ^B bei *S. aureus* an der Stressantwort gegenüber H_2O_2 beteiligt ist (30). Da auch das für die PIA-Synthese verantwortliche *ica*-Operon durch den alternativen Sigmafaktor σ^B reguliert wird (147,241), wäre ein Zusammenhang von σ^B und der gesteigerten Biofilmbildung nach Perform-Behandlung denkbar. Andere Faktoren, die zur Bildung eines PIA-unabhängigen Biofilms beitragen, wie das „biofilm associated protein“ (Bap) (49), das „*S. aureus* surface protein“ (SasG) (45) und die Fibronektin-Bindeproteine (FnBPA/B) (213) könnten ebenfalls von Bedeutung sein.

Interessanterweise konnte der Effekt von Perform durch das Detergenz SDS simuliert werden (Abb. 4-III), nicht jedoch durch die ROS bildenden Substanzen Paraquat und KPMS (Abb. 4-IV). Dies lässt vermuten, dass der durch Perform ausgelöste Stress nicht sauerstoffabhängig ist, sondern durch den Inhaltsstoff SDS vermittelt wird. Ein genereller Einfluss von Detergenzien ist jedoch unwahrscheinlich, da Triton X-100 oder Tween 20 das Proteinmuster nicht beeinflussten (Abb. 4-III). Zudem konnte eine Solubilisierungs-Reaktion durch Detergenzien als Grund für das veränderte Proteinmuster nach Perform- und SDS-Behandlung ausgeschlossen werden, da die Gesamtzellextrakte sowohl nach der Inhibition von Transkription und Translation als auch nach der Zelllyse durch Hitze und Glasperlenaufschluss und anschließender Behandlung mit Perform und SDS, ein anderes Proteinmuster ergaben, als es zuvor an lebenden Bakterien beobachtet wurde (Abb. 4-V). Folglich musste es sich um einen aktiven Mechanismus handeln, welcher durch lebende Staphylokokken verursacht wird.

Als das prominenteste, in seiner Expression veränderte Protein nach Perform-Behandlung wurde Eap identifiziert und dieses wird bekanntermaßen *sae*-abhängig exprimiert (108). Die gesteigerte Expression von Eap durch Perform und SDS sowie die *sae*-Abhängigkeit wurden durch die Ergebnisse der qRT-PCR bestätigt, da sowohl für *saeS* als auch für *eap* eine erhöhte Transkriptionsrate unter dem Einfluss von Perform und SDS nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-VI).

Perform und SDS erhöhten jedoch nicht nur die Transkriptionsrate von *saeS* im Stamm Newman, sondern auch die Aktivität des *sae*-Promotors P1 (Abb. 4-VII). Andere *S. aureus*-Wildtypen zeigten jedoch eine zurückgehende P1 Promotoraktivität nach der Perform- bzw. SDS-Behandlung (Daten nicht gezeigt). Die Transkription der *sae*-Transkripte (T1, T2 und T4) startet am Promotor P1. Steinhuber *et al.* fanden heraus, dass diese Transkripte im Stamm Newman deutlich stärker exprimiert werden als in anderen Stämmen (274). Es wird vermutet, dass eine Punktmutation in der Sensor-Histidinkinase SaeS für diesen Phänotyp verantwortlich ist, welche in einem konstitutiv aktivierten *sae*-System resultiert (1,79,274). Die P1 Promotoraktivität des Stammes Newman konnte jedoch durch Perform und SDS noch zusätzlich über diese hohe Grundaktivität erhöht werden.

Für die Erhöhung der *sae*-Aktivität in Stamm Newman durch Inkubation mit Perform und SDS (Abb. 4-VII) und die damit verbundene gesteigerte Expression von Eap (Abb. 4-II/Abb. 4-VI) konnte auch eine funktionelle Veränderung festgestellt werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass die Bakterien des Stammes Newman nach Perform- und SDS-Behandlung deutlich invasiver als die Kontrollbakterien waren (Abb. 4-VIII). Für die gesteigerte Invasivität des Stammes Newman durch SDS konnte eine Dosis-Wirkungs-Kurve generiert werden, die eine maximale Invasivität zwischen 0,003 % und 0,006 % SDS aufwies (Daten nicht gezeigt). Die Validierung der durchfluss-zytometrischen Ergebnisse erfolgte durch Lysostaphin Protektions Versuche, die ebenso eine gesteigerte Invasivität durch Perform und SDS demonstrierten (Abb. 4-IX). Dieser Effekt wurde jedoch nur im Stamm Newman beobachtet; andere getestete *S. aureus*-Wildtypen zeigten nach der Inkubation mit Perform und SDS eine verringerte Invasivität.

Da die Invasion in Stamm Newman aufgrund des Verlustes funktioneller FnBPs (105) abhängig von Eap ist (106), wurden Invasions-Assays mit einer *eap*-defizienten Mutante durchgeführt. Die Δeap -Mutante und der entsprechende Wildtyp demonstrierten unter Kontrollbedingungen etwa gleiche Invasionsraten (Abb. 4-X), obwohl ein Rückgang der Invasivität in der *eap*-defizienten Mutante zu erwarten wäre. Doch der Δeap -Stamm mAH12 ist eine unvollständige Deletionsmutante und keine Knockout-Mutante, d.h. von den Tandem Repeat-Domänen des Eap könnten noch Reste vorhanden gewesen sein, die eine Restaktivität im Bezug auf die Invasion vermitteln. Durch die Inkubation mit Perform stieg die Invasivität der Mutante leicht an, blieb jedoch unter dem Niveau des Wildtyps. Nach der SDS-Behandlung zeigte sich jedoch ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen der Δeap -Mutante und dem Wildtyp, so dass insgesamt davon ausgegangen werden kann,

dass die gesteigerte Invasivität in Stamm Newman *eap*-abhängig ist. Im Zuge dieses Experimentes wurde auch eine Mutante ohne FnBPs getestet. Ähnlich wie beim Wildtyp erhöhte sich die Invasivität mit Perform und SDS im Medium (Abb. 4-X). Die $\Delta fnbAB$ -Mutante zeigte allerdings nach SDS-Behandlung eine geringere und nach Perform-Behandlung ein leicht erhöhte Invasionsrate im Vergleich zum Wildtyp. Da die Tendenz jedoch der des Wildtyps entsprach, ist anzunehmen, dass die FnBPs bei der gesteigerten Invasivität des Stammes Newman unter Einwirkung von Perform und SDS keine entscheidende Rolle spielen. Diese These wird durch den Fakt gestützt, dass die FnBPs in Stamm Newman aufgrund eines Stoppcodons nicht in der Zellwand verankert sind, sondern in das Medium sezerniert werden (105).

Da die durchflusszytometrischen Experimente mit exponentiell wachsenden Bakterien durchgeführt wurden, sollten weitere Versuche mit ÜNK, die in An- bzw. Abwesenheit von Perform und SDS angezogen wurden, durchgeführt werden. Auch in diesen Experimenten zeigte sich die gesteigerte Invasivität des Wildtyp-Stammes Newman nach der Perform- und SDS-Behandlung (Abb. 4-XI). Die beobachteten Veränderungen waren sogar noch ausgeprägter als in den exponentiell wachsenden *S. aureus*-Kulturen. Die enorme Steigerung der Invasivität durch Perform und SDS in der Stationärphase ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die *Eap*-Expression ihr Maximum in der späten exponentiellen Wachstumsphase bis zur stationären Wachstumsphase erreicht (122). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der enormen Steigerung der Invasivität um einen additiven Effekt aus der gesteigerter *Eap*-Expression durch Perform und SDS und dem Einfluss der Wachstumsphase auf die *Eap*-Expression handelt. Die *eap*-defiziente Mutante zeigte ebenso ein zu den exponentiellen Kulturen analoges Verhalten. So erhöhte sich die Invasivität nur gering durch die Inkubation mit Perform, nicht jedoch durch SDS (Abb. 4-XI). Somit kann ausgeschlossen werden, dass die gesteigerte Invasivität nach Perform- und SDS-Behandlung nur in der exponentiellen Wachstumsphase zu beobachten ist, sondern auch in der stationären Wachstumsphase.

Aus der Literatur geht hervor, dass sezerniertes *Eap* an die bakterielle Zelloberfläche rückbinden kann und somit die Bildung von Aggregaten fördert (216). Da sowohl auf Proteinebene als auch im Bezug auf die Transkription eine gesteigerte *Eap*-Expression festgestellt werden konnte (vgl. Abb. 4-II/Abb. 4-VI), sollten fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Den Ergebnissen zufolge bildeten Perform- und SDS-behandelte Staphylokokken des Stammes Newman größere Aggregate als die

Kontrollbakterien (Abb. 4-XII). Diese Beobachtungen bestätigen die Daten anderer Arbeitsgruppen (216). Durch anschließende Ultraschallbehandlung konnten die Bakterien der Aggregate vereinzelt werden. Dabei zeigte sich, dass die gesteigerte Aggregatgröße als Grund für die erhöhte Invasivität des Stammes Newman durch Perform und SDS jedoch ausgeschlossen werden kann, da sich die Bakterien mit und ohne Ultraschallbehandlung nicht statistisch signifikant in ihrer Invasivität unterschieden (Abb. 4-XIII). Der Grund für die gesteigerte Invasivität ist folglich vielmehr in der erhöhten Expression von Eap zu suchen als in der dadurch bedingten Zunahme der Aggregatgröße.

Da der Stamm Newman nach der Perform- und SDS-Behandlung als einziger der getesteten Wildtypen erhöhte Invasionsraten aufwies (Abb. 4-VIII), wird vermutet, dass die spezifische Reaktion des Stammes Newman abhängig von der Sequenz der Sensor-Histidinkinase SaeS ist, da Stamm Newman im Gegensatz zu den anderen getesteten Stämmen dort einen Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin an Position 18 besitzt (Abb. 2-VI) (1,79,274). Der Rest des *sae*-Operons ist identisch zwischen Stamm Newman und den anderen getesteten Stämmen. Somit sollte der Austausch des *sae*-Operons zwischen den Stämmen Newman und ISP479C die Bedeutung des *sae*-Operons offenlegen.

Die Komplementierung einer *sae*-defizienten Mutante des Stammes Newman mit dem gesamten *sae*-Operon des Stammes Newman (*sae33/saePQRS*_{Newman}) zeigte wie der Wildtyp eine erhöhte Invasivität nach der Inkubation mit Perform und SDS (Abb. 4-XVII). Hingegen die Komplementierung einer *sae*-defizienten Mutante des Stammes Newman mit dem *sae*-Operon aus dem Stamm ISP479C (*sae28/saePQRS*_{ISP479C}) ergab einen Phänotyp, welcher nach der Inkubation mit Perform und SDS verminderte Invasionswerte aufwies und sich somit wie der Stamm ISP479C und die anderen getesteten Wildtypen verhielt (vgl. Abb. 4-VIII). Dieses Resultat lässt vermuten, dass die gesteigerte Invasivität durch Perform und SDS abhängig vom *sae*-Operon des Stammes Newman ist und somit auch abhängig vom Basenaustausch in der Sensor-Histidinkinase SaeS. Die *sae*-defiziente Mutante des Stammes Newman war fast nicht invasiv. Dieses Ergebnis ist konsistent mit früheren Arbeiten (274) und bestätigt die essentielle Rolle des *sae*-Systems für die Invasivität.

Die Komplementierung der *sae*-defizienten Mutante des Stammes ISP479C mit dem gesamten *sae*-Operon aus Stamm ISP479C (*sae28/saePQRS*_{ISP479C}) resultierte in einem Stamm, welcher sich ähnlich wie der entsprechende Wildtyp verhielt und nach der Inkubation mit Perform und SDS verringerte Invasionswerte zeigte (Abb. 4-XVIII). Durch die

Transformation des kompletten *sae*-Operons von Stamm Newman (*sae33/saePQRS_{Newman}*) in den Stamm ISP479C, konnte jedoch der Newman-spezifische Phänotyp, d.h. gesteigerte Invasivität durch Inkubation mit Perform und SDS, im Stamm ISP479C erzeugt werden (Abb. 4-XVIII). Die im Vergleich zu Stamm Newman nochmals gesteigerte Invasivität von Stamm ISP479C (*sae33/saePQRS_{Newman}*) ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass nicht nur Eap, sondern auch die FnBPs durch das Sae-System hochreguliert werden (155,274). Da der Stamm ISP479C im Gegensatz zu Stamm Newman funktionelle FnBPs besitzt, könnte dies der Grund für die enorme Steigerung der Invasivität durch die Inkubation mit Perform und SDS sein. Wie auch im Stamm Newman war die *sae*-defiziente Mutante des Stammes ISP479C kaum invasiv.

Durch den Austausch des *sae*-Operons konnte gezeigt werden, dass sich der Stamm Newman (*sae28/saePQRS_{ISP479C}*) wie der Stamm ISP479C und somit wie alle weiteren getesteten Wildtyp-Stämme verhielt und nach Perform und SDS-Behandlung ein verringertes Invasions-Niveau aufwies. Im Gegensatz dazu verhielt sich der Stamm ISP479C (*sae33/saePQRS_{Newman}*) wie der Stamm Newman und demonstrierte gesteigerte Invasionsraten durch den Einfluss von Perform oder SDS. Doch nicht nur im Bezug auf die Invasivität wies der Stamm ISP479C (*sae33/saePQRS_{Newman}*) den Newman-spezifischen Phänotyp auf. Auch auf Proteinebene wurde eine vergleichbare gesteigerte Expression mehrerer Proteine, darunter Eap, nachgewiesen (Abb. 4-XIX). Daraus ist ersichtlich, dass die Newman-spezifische Sequenz und somit die der Aminosäureaustausch in der Sensor-Histidinkinase verantwortlich ist für die veränderte Stressantwort, welche in einer gesteigerten Invasivität nach der Perform- und SDS-Behandlung resultiert.

Obwohl die globalen Regulatoren in ihrer Funktion stark untereinander verknüpft sind, konnten in dieser Arbeit keine bedeutsamen oder direkten Effekte als Reaktion auf Perform oder SDS beobachtet werden (Abb. 5-I). Knockout-Mutanten von *agr*, *sarA* und *sigB* zeigten ebenfalls wie der Newman Wildtyp eine gesteigerte Invasivität nach der Perform- und SDS-Behandlung (Abb: 4-XV). Eine *sarA*-defiziente Mutante zeigte nach Inkubation mit SDS einen statistisch signifikant geringeren Invasionswert als der Wildtyp nach SDS-Behandlung. Dieses Ergebnis ist konsistent mit früheren Berichten, wonach die Expression der meisten *sae*-abhängigen Gene positiv durch *sarA* beeinflusst wird (27,60,95,258,316). In einigen Stämmen scheint auch *agr* das *sae*-System zu aktivieren, jedoch durch einen noch unbekanntem Mechanismus (91,94,210). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die Invasionsraten der Δagr und $\Delta sarA$ -Mutante nach der Perform-

und SDS-Behandlung kaum unterscheiden. Somit kann auch ein Einfluss des *agr*-Systems nicht generell ausgeschlossen werden, obwohl es im Vergleich zum Wildtyp keinen signifikanten Unterschied in der Invasion gab.

Die Invasionswerte einer *sigB*-defizienten Mutante waren im Vergleich zum Wildtyp nach der Behandlung mit Perform und SDS erhöht. Allerdings waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant, bestätigen aber frühere Erkenntnisse, wonach *sigB* die Expression von *sae*-abhängigen Genen negativ beeinflusst (16,39,94,258,316,317). Die *sae*-Regulation unterliegt jedoch starken Stammunterschieden (94,155,210,247), aus diesem Grund können die Ergebnisse eines einzelnen Stammes nicht ohne Weiteres generalisiert werden.

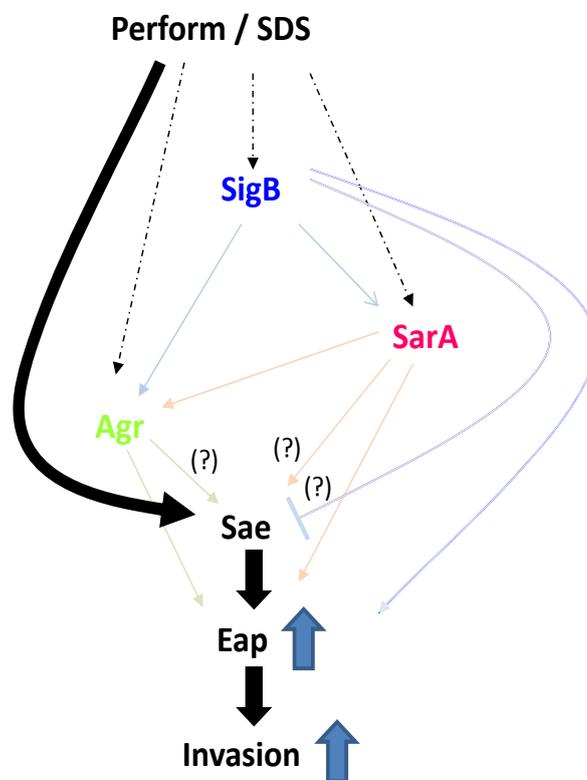


Abb. 5-I: Regulation der Sae-Aktivierung durch Perform und SDS im Stamm Newman

Perform und SDS aktivieren das Sae-Zweikomponenten-System wodurch die Eap-Expression und in der Folge die Invasivität des Stammes Newman gesteigert wird. Andere globale Regulatoren sind dabei von geringerer Bedeutung.

Im Gegensatz zur Invasivität in Abhängigkeit von Perform und SDS, wobei der alternative Sigmafaktor σ^B keine entscheidende Rolle zu spielen scheint, konnte von quantitativen Suspensionsversuchen abgeleitet werden, dass σ^B einen Einfluss auf die Resistenz gegen Incidin Plus hat. Der resistanteste getestete Stamm war der Newman Wildtyp in der stationären Wachstumsphase, gefolgt von der $\Delta sigB$ -Mutante in der stationären

Wachstumsphase und dem Newman Wildtyp in der logarithmischen Wachstumsphase. Als sensibelster Stamm gegen Incidin Plus stellte sich die $\Delta sigB$ -Mutante in der logarithmischen Wachstumsphase heraus (Abb. 4-XVI). Watson *et al.* stellten fest, dass Bakterien nach längerer Zeit unter Nährstoffmangel resistenter gegen Säure, oxidativen Stress und lytische Enzyme sind und sie gehen von einer Kreuzresistenz gegen mehrere Stressarten aus (302). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen des quantitativen Suspensionsversuches, da die Bakterien in der stationären Wachstumsphase resistenter gegen Incidin Plus sind als die entsprechenden Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase. Gleichzeitig zeigte sich, dass $sigB$ -defiziente Mutanten sensibler gegenüber Incidin Plus waren als die korrespondierenden Wildtypen in der gleichen Wachstumsphase. Da der alternative Sigmafaktor σ^B an einer Vielzahl von Stressbedingungen wie z.B. Hitze, hohe Osmolarität oder der Änderung des pH-Wertes beteiligt ist, könnte die Aktivierung des $sigB$ -Regulons auch eine Resistenz gegenüber dem Desinfektionsmittel Incidin Plus vermitteln. Incidin Plus wirkt ähnlich wie quaternäre Ammoniumverbindungen oder Alkohol, indem die bakterielle Membran geschädigt und Proteine denaturiert werden (persönliche Mitteilung Bernhard Meyer). In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass Ethanol in *B. subtilis* zu einer σ^B -Aktivierung führte, jedoch nicht in *S. aureus* (218). Außerdem übernimmt in *B. subtilis* σ^B die Aufgabe eines Stationärphasen-Sigmafaktors (25), wohingegen dies in *S. aureus* allerdings nicht der Fall zu sein scheint, da die Aktivität von σ^B bereits in der exponentiellen Phase, mit einem Maximum in der späten exponentiellen Phase, nachgewiesen wurde (85). Folglich scheint die erhöhte Resistenz des Wildtyps eher die Konsequenz der durch den alternativen Sigmafaktor σ^B vermittelten Stressresistenz zu sein als der Einfluss von σ^B durch die stationäre Wachstumsphase.

Interessanterweise konnte im Stamm Newman die *sae*-Aktivität und die davon abhängigen Funktionen durch die Perform- und SDS-Behandlung deutlich gesteigert werden, obwohl dieser Stamm bereits eine stark gesteigerte Grundaktivität des *Sae*-Operons besitzt (274). Dies widerspricht früheren Studien, in welchen die *sae*-Aktivität im Stamm Newman aufgrund eines Basenaustausches (Abb. 2-VI), welcher eine konstitutive Aktivität des *sae*-Operons zur Folge hat, für nicht weiter steigerbar angesehen wurde (1,79,274). Doch sowohl auf Proteinebene als auch im Bezug auf die Transkription, die Promotoraktivität und die Invasion konnten deutliche Unterschiede durch die Perform- und SDS-Behandlung im Stamm Newman festgestellt werden. Dies beweist entgegen der bisherig vorherrschenden These, dass die hohe Grundaktivität des *sae*-Systems noch weiter erhöht werden kann.

Ebenfalls berücksichtigt werden sollte, dass an der zusätzlichen Aktivierung des SaeRS Zweikomponenten-Systems im Stamm Newman die gleichermaßen zum *sae*-Operon gehörenden Proteine SaeP und SaeQ involviert sein könnten. Die Funktionen dieser Proteine sind bis heute noch nicht aufgeklärt, es wird allerdings vermutet, dass diese Proteine Auswirkungen auf den *saeRS*-abhängigen Regulationsmechanismus haben (210,274). Adhikari *et al.* konnten zeigen, dass die Einfügung eines Transposons in *saeP* im *S. aureus*-Stamm 8325 die Promotoraktivität des Promotors P1 erhöhte, die Exoprotein-Produktion steigerte und somit einen Phänotyp ergab, der dem Stamm Newman entsprach. Diese Beobachtung verdeutlicht die wichtige Rolle der zusätzlichen Proteine SaeP und SaeQ innerhalb des Zweikomponenten-Systems SaeRS. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass SaeQ, welches wie auch die Sensor-Histidinkinase SaeS ein Transmembranprotein darstellt (Abb. 2-VII) (210,274), die Funktion eines zusätzlichen Sensors hat. Dieser könnte über das im Zytoplasma lokalisierte SaeP (274) in die Regulation eingreifen. Da auch das Quorum Sensing-System Agr ein Zweikomponenten-System darstellt, bei welchem die zusätzlichen Proteine eine entscheidende Funktion aufweisen, wäre dies auch für das Sae-System denkbar.

Außerdem wäre vorstellbar, dass das Detergenz SDS Konformationsänderungen in der Proteinstruktur der Sensor-Histidinkinase SaeS in Stamm Newman ausgelöst. Adhikari *et al.* vermuten, dass durch den Aminosäureaustausch (L18P) die α -helikale Struktur der Sensor-Histidinkinase SaeS in eine „ β -sheet“ Struktur umgewandelt wird (1). Folglich könnte durch den Einfluss von SDS die SaeS-Proteinstruktur im Stamm Newman zusätzlich verändert werden und somit das konstitutiv aktivierte Sae-System empfänglich für eine zusätzliche Aktivierung machen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen u. a., welchen Effekt Mutationen von nur einer Aminosäure auf die Funktion der entsprechenden Proteine haben können. Ein Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin an Position 18 innerhalb der Sensor-Histidinkinase SaeS des Sae-Systems in Stamm Newman (Abb. 2-VI) (1,79,274) verursacht eine konstitutive Aktivierung des Sae-Systems, welche wie gezeigt aber noch zusätzlich steigerbar ist (Abb. 4-I/Abb. 4-VI/Abb. 4-VII/Abb. 4-VIII). In der Folge wurde die Expression mehrerer Virulenzfaktoren erhöht (1). Dies verdeutlicht, welche folgenreichen Auswirkungen einzelne Mutationen auf die Eigenschaften von Mikroorganismen haben können. Drake *et al.* zeigten, dass die Wahrscheinlichkeit einer Mutation bei ca. 1:300 pro Genom und Replikation liegt. Diese Mutationen können sowohl Basen-Substitutionen, wie in dem Sensor-Histidinkinase-

kodierenden Gen *saeS*, als auch Basen-Deletionen oder Basen-Additionen darstellen (55,56). Mutationen können den Verlust funktioneller Proteine zur Folge haben oder sogar letal wirken. Am Beispiel des Stammes Newman zeigt sich jedoch, dass die Mutation in *saeS* für die gesteigerte Expression mehrerer Virulenzfaktoren verantwortlich ist und somit einen Vorteil für dieses Bakterium darstellen könnte. Denn durch den Verlust funktioneller FnBPs (105) ist der Stamm Newman auf andere Adhäsine oder Invasine wie Eap angewiesen (106), welches durch die Mutation in *saeS* und der damit verbundenen konstitutiven Aktivierung des Sae-Systems vermehrt exprimiert wird.

Außerdem sollte mit Desinfektionsmitteln sorgsam umgegangen werden, denn aufgrund inadäquater Konzentrationen oder falscher Anwendung von Desinfektionsmitteln können Bakterien Unempfindlichkeiten auf niedriger Stufe entwickeln, welche wiederum zu einer höheren und stabilen Unempfindlichkeit gegenüber diesen Wirkstoffen führen könnten (22,251,284). Da Bakterien die gleichen Resistenzmechanismen gegen Biozide wie gegen Antibiotika benutzen, könnte es als eine Folge von unsachgemäßer Desinfektion zur Verbreitung von Resistenzen gegenüber Antibiotika kommen (4,33,252,277-281).

Transwell-Assays könnten die Wirkung von Perform und SDS auf *S. aureus* weitergehend charakterisieren. In solchen Experimenten wird untersucht, wie stark Substanzen oder Bakterien Immunzellen chemotaktisch anlocken und diese zu einer Migration durch eine Membran bringen. Da die Inkubation mit Perform zu einer gesteigerten Expression von mehreren Proteinen mit immunmodulatorischer Funktion führte, liegt die Vermutung nahe, dass die Behandlung mit Perform und SDS die Migration der Immunzellen inhibiert.

In dieser Arbeit wurden gut untersuchte *S. aureus*-Laborstämme verwendet, deren Genom sequenziert ist und dementsprechend bereits Mutanten verfügbar sind. Es wäre jedoch interessant zu testen, welchen Einfluss subletale Konzentrationen von unterschiedlichen Desinfektionsmitteln auf klinische *S. aureus*-Isolate haben, da diese häufiger mit Desinfektionsmitteln in Kontakt kommen und eine Änderung der Virulenzeigenschaften in klinischen Isolaten schwerwiegende Auswirkungen haben könnte.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die vorliegenden Daten dazu beitragen, die Virulenzmechanismen im Stamm Newman und speziell die Rolle des Sae-Systems, aber auch die generelle Genregulation besser zu verstehen und zu analysieren. Einige Defekte im Stamm Newman sind bekannt, wie z.B. die Sekretion der FnBPs. Dies führt zu einer deutlich verringerten zellulären Invasivität (105). Dies spielt vermutlich bei der Pathogenese der

Endokarditis eine Rolle, da gezeigt werden konnte, dass nur FnBP-positive Bakterien imstande waren, nach Kolonisierung die benachbarten Endothelzellen zu invadieren (239). Außerdem weist die in dieser Arbeit untersuchte Sensor-Histidinkinase SaeS eine Mutation auf, die zur veränderten Virulenzfaktor-Expression führt. Der in dieser Arbeit verwendete *S. aureus*-Stamm Newman stellt jedoch keinen Subklon dar, denn die Mutation in der Sensor-Histidinkinase SaeS konnte in vielen weiteren Newman-Stämmen durch Sequenzierung festgestellt werden (persönliche Mitteilung Christiane Wolz). Trotzdem ist Stamm Newman einer der virulentesten Stämme im murinen Bakteriämie-Modell (persönliche Mitteilung Knut Ohlsen). Dies könnte zumindest teilweise abhängig sein von der Punktmutation in SaeS mit konstitutiver Aktivierung. Die vorliegende Arbeit hat *saeS* als zentralen Schalter bezüglich der Stressantwort in Stamm Newman gegenüber dem Desinfektionsmittel Perform und dessen Inhaltstoff SDS charakterisiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Aktivierung des Sae-Systems noch zusätzlich steigerbar ist. Somit könnten diese Daten dazu führen, die Virulenzmechanismen von *S. aureus* und deren Regulation weiter zu untersuchen, und so zum Verständnis zur *S. aureus*-Pathogenese beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Adhikari, R. P. and R. P. Novick.** 2008. Regulatory organization of the staphylococcal *sae* locus. *Microbiology* **154**:949-959.
2. **Albrich, W. C. and S. Harbarth.** 2008. Health-care workers: source, vector, or victim of MRSA? *Lancet Infect. Dis.* **8**:289-301.
3. **Amagai, M., N. Matsuyoshi, Z. H. Wang, C. Andl, and J. R. Stanley.** 2000. Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat. Med.* **6**:1275-1277.
4. **Andrews, J. M.** 2001. The development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing. *J Antimicrob. Chemother.* **48**:29-42.
5. **Arvidson, S. and K. Tegmark.** 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med. Microbiol.* **291**:159-170.
6. **Baba, T., T. Bae, O. Schneewind, F. Takeuchi, and K. Hiramatsu.** 2008. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands. *J. Bacteriol.* **190**:300-310.
7. **Balaban, N. and A. Rasooly.** 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* **61**:1-10.
8. **Ballal, A., B. Ray, and A. C. Manna.** 2009. *sarZ*, a *sarA* family gene, is transcriptionally activated by MgrA and is involved in the regulation of genes encoding exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **191**:1656-1665.
9. **Balwit, J. M., van Langevelde P., J. M. Vann, and R. A. Proctor.** 1994. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **170**:1033-1037.
10. **Baran, J., K. Weglarczyk, M. Mysiak, K. Guzik, M. Ernst, H. D. Flad, and J. Pryjma.** 2001. Fas (CD95)-Fas ligand interactions are responsible for monocyte apoptosis occurring as a result of phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**:1287-1297.
11. **Barber, M.** 1963. Methicillin-resistant Staphylococci. *J Clin Pathol* **308-311**.
12. **Barken, K. B., S. J. Pamp, L. Yang, M. Gjermansen, J. J. Bertrand, M. Klausen, M. Givskov, C. B. Whitchurch, J. N. Engel, and T. Tolker-Nielsen.** 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **10**:2331-2343.
13. **Bayer, M. G., J. H. Heinrichs, and A. L. Cheung.** 1996. The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **178**:4563-4570.
14. **Bera, A., R. Biswas, S. Herbert, and F. Götz.** 2006. The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infect. Immun.* **74**:4598-4604.
15. **Bischoff, M. and B. Berger-Bächi.** 2001. Teicoplanin stress-selected mutations increasing σ^B activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1714-1720.
16. **Bischoff, M., P. Dunman, J. Kormanec, D. Macapagal, E. Murphy, W. Mounts, B. Berger-Bächi, and S. Projan.** 2004. Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* σ^B regulon. *J Bacteriol* **186**:4085-4099.
17. **Bischoff, M., J. M. Entenza, and P. Giachino.** 2001. Influence of a functional *sigB* operon on the global regulators *sar* and *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**:5171-5179.
18. **Bisognano, C., W. L. Kelley, T. Estoppey, P. Francois, J. Schrenzel, D. Li, D. P. Lew, D. C. Hooper, A. L. Cheung, and P. Vaudaux.** 2004. A RecA-LexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **279**:9064-9071.

19. **Bisognano, C., P. E. Vaudaux, D. P. Lew, E. Y. Ng, and D. C. Hooper.** 1997. Increased expression of fibronectin-binding proteins by fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:906-913.
20. **Blevins, J. S., A. F. Gillaspay, T. M. Rechten, B. K. Hurlburt, and M. S. Smeltzer.** 1999. The Staphylococcal accessory regulator (*sar*) represses transcription of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesin gene (*cna*) in an *agr*-independent manner. *Mol. Microbiol.* **33**:317-326.
21. **Blickwede, M., R. Goethe, C. Wolz, P. Valentin-Weigand, and S. Schwarz.** 2005. Molecular basis of florfenicol-induced increase in adherence of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:315-323.
22. **Bloomfield, S. F.** 2002. Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. *J Appl. Microbiol.* **92**:144S-157S.
23. **Bokarewa, M. and A. Tarkowski.** 2004. Human α -defensins neutralize fibrinolytic activity exerted by staphylokinase. *Thromb. Haemost.* **91**:991-999.
24. **Bokarewa, M. I., T. Jin, and A. Tarkowski.** 2006. *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *Int J Biochem. Cell Biol.* **38**:504-509.
25. **Boylan, S. A., A. Rutherford, S. M. Thomas, and C. W. Price.** 1992. Activation of *Bacillus subtilis* transcription factor σ^B by a regulatory pathway responsive to stationary-phase signals. *J Bacteriol* **174**:3695-3706.
26. **Bronner, S., H. Monteil, and G. Prevost.** 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:183-200.
27. **Bronner, S., P. Stoessel, A. Gravet, H. Monteil, and G. Prevost.** 2000. Variable expressions of *Staphylococcus aureus* bicomponent leucotoxins semiquantified by competitive reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3931-3938.
28. **Broxton, P., P. M. Woodcock, and P. Gilbert.** 1983. A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* ATCC 8739. *J Appl. Bacteriol* **54**:345-353.
29. **Brumfitt, W., S. Dixon, and J. M. Hamilton-Miller.** 1985. Resistance to antiseptics in methicillin and gentamicin resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **1**:1442-1443.
30. **Chan, P. F., S. J. Foster, E. Ingham, and M. O. Clements.** 1998. The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor σ^B controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J Bacteriol* **180**:6082-6089.
31. **Chang, M. W., F. Toghrol, and W. E. Bentley.** 2007. Toxicogenomic response to chlorination includes induction of major virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Environ. Sci. Technol.* **41**:7570-7575.
32. **Chaplin, C. E.** 1952. Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants. *J Bacteriol* **63**:453-458.
33. **Chapman, J. S.** 2003. Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation* **51**:133-138.
34. **Chavakis, T., M. Hussain, S. M. Kanse, G. Peters, R. G. Bretzel, J. I. Flock, M. Herrmann, and K. T. Preissner.** 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med.* **8**:687-693.
35. **Chavakis, T., K. Wiechmann, K. T. Preissner, and M. Herrmann.** 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**:278-285.
36. **Chawner, J. A. and P. Gilbert.** 1989. Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. *J Appl. Bacteriol* **66**:253-258.
37. **Cheung, A. L., A. S. Bayer, G. Zhang, H. Gresham, and Y. Q. Xiong.** 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **40**:1-9.
38. **Cheung, A. L., M. G. Bayer, and J. H. Heinrichs.** 1997. *sar* Genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAIII in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **179**:3963-3971.

-
39. **Cheung, A. L., Y. T. Chien, and A. S. Bayer.** 1999. Hyperproduction of alpha-hemolysin in a *sigB* mutant is associated with elevated SarA expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **67**:1331-1337.
 40. **Cheung, A. L., J. M. Koomey, C. A. Butler, S. J. Projan, and V. A. Fischetti.** 1992. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:6462-6466.
 41. **Chien, Y., A. C. Manna, S. J. Projan, and A. L. Cheung.** 1999. SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for *sar*-dependent gene regulation. *J Biol. Chem.* **274**:37169-37176.
 42. **Clapp, P. A., M. J. Davies, M. S. French, and B. C. Gilbert.** 1994. The bactericidal action of peroxides; an E.P.R. spin-trapping study. *Free Radic. Res.* **21**:147-167.
 43. **Clements, M. O. and S. J. Foster.** 1999. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **7**:458-462.
 44. **Collier, P. J., A. J. Ramsey, P. Austin, and P. Gilbert.** 1990. Growth inhibitory and biocidal activity of some isothiazolone biocides. *J Appl. Bacteriol* **69**:569-577.
 45. **Corrigan, R. M., D. Rigby, P. Handley, and T. J. Foster.** 2007. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiology* **153**:2435-2446.
 46. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:711-745.
 47. **Cramton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, and F. Götz.** 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* **67**:5427-5433.
 48. **Cramton, S. E., M. Ulrich, F. Götz, and G. Doring.** 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **69**:4079-4085.
 49. **Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, and J. R. Penades.** 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**:2888-2896.
 50. **de Haas, C. J., K. E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W. J. Van Wamel, E. C. Heezius, M. J. Poppelier, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp.** 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp. Med.* **199**:687-695.
 51. **Dellabona, P., J. Peccoud, J. Kappler, P. Marrack, C. Benoist, and D. Mathis.** 1990. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* **62**:1115-1121.
 52. **Denyer, S. P.** 1995. Mechanisms of action of antimicrobial biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation* **36**:227-245.
 53. **Disch, K.** 1994. Glucoprotamine-a new antimicrobial substance. *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **195**:357-365.
 54. **Doss, S. A., G. S. Tillotson, and S. G. Amyes.** 1993. Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on the virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Appl. Bacteriol* **75**:123-128.
 55. **Drake, J. W.** 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**:7160-7164.
 56. **Drake, J. W., B. Charlesworth, D. Charlesworth, and J. F. Crow.** 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics* **148**:1667-1686.
 57. **Dryla, A., D. Gelbmann, von Gabain A., and E. Nagy.** 2003. Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Mol. Microbiol.* **49**:37-53.
 58. **Duckworth, M., A. R. Archibald, and J. Baddiley.** 1975. Lipoteichoic acid and lipoteichoic acid carrier in *Staphylococcus aureus* H. *FEBS Lett.* **53**:176-179.
 59. **Dukan, S., S. Belkin, and D. Touati.** 1999. Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**:311-316.
-

-
60. **Dunman, P. M., E. Murphy, S. Haney, D. Palacios, G. Tucker-Kellogg, S. Wu, E. L. Brown, R. J. Zagursky, D. Shlaes, and S. J. Projan.** 2001. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the *agr* and/or *sarA* loci. *J Bacteriol* **183**:7341-7353.
 61. **Dunne, W. M., Jr., E. O. Mason, Jr., and S. L. Kaplan.** 1993. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2522-2526.
 62. **Duthie, E. S. and L. L. Lorenz.** 1952. Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *J. Gen. Microbiol.* **6**:95-107.
 63. **Dyke, K. G., M. P. Jevons, and M. T. Parker.** 1966. Penicillinase production and intrinsic resistance to penicillins in *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **1**:835-838.
 64. **Eklund, T.** 1985. The effect of sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid on the protonmotive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. *J Gen. Microbiol.* **131**:73-76.
 65. **Entenza, J. M., P. Moreillon, M. M. Senn, J. Kormanec, P. M. Dunman, B. Berger-Bächi, S. Projan, and M. Bischoff.** 2005. Role of σ^B in the expression of *Staphylococcus aureus* cell wall adhesins ClfA and FnbA and contribution to infectivity in a rat model of experimental endocarditis. *Infect. Immun.* **73**:990-998.
 66. **Epstein E Jr.** 2000. Split stories converge at desmoglein 1. *Nat. Med.* **6**:1213-1214.
 67. **Eriksen, N. H., F. Espersen, V. T. Rosdahl, and K. Jensen.** 1995. Carriage of *Staphylococcus aureus* among 104 healthy persons during a 19-month period. *Epidemiol. Infect.* **115**:51-60.
 68. **Essmann, F., H. Bantel, G. Totzke, I. H. Engels, B. Sinha, K. Schulze-Osthoff, and R. U. Jänicke.** 2003. *Staphylococcus aureus* α -toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death. Differ.* **10**:1260-1272.
 69. **Evans, R. C. and C. J. Holmes.** 1987. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:889-894.
 70. **Fernandez-Guerrero, M. L., C. Verdejo, J. Azofra, and G. M. de.** 1995. Hospital-acquired infective endocarditis not associated with cardiac surgery: an emerging problem. *Clin. Infect. Dis.* **20**:16-23.
 71. **Fisher, R. F., H. C. Goodpasture, J. D. Peterie, and D. W. Voth.** 1981. Toxic shock syndrome in menstruating women. *Ann. Intern. Med.* **94**:156-163.
 72. **Fitzgerald, J. R., D. E. Sturdevant, S. M. Mackie, S. R. Gill, and J. M. Musser.** 2001. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:8821-8826.
 73. **Foster, T. J.** 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:948-958.
 74. **Foster, T. J. and M. Höök.** 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **6**:484-488.
 75. **Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg.** 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**:269-275.
 76. **Gahmberg, C. G.** 1997. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:643-650.
 77. **Garzoni, C., P. Francois, A. Huyghe, S. Couzinet, C. Tapparel, Y. Charbonnier, A. Renzoni, S. Lucchini, D. P. Lew, P. Vaudaux, W. L. Kelley, and J. Schrenzel.** 2007. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC. Genomics* **8**:171.
 78. **Garzoni, C. and W. L. Kelley.** 2009. *Staphylococcus aureus*: new evidence for intracellular persistence. *Trends Microbiol.* **17**:59-65.
 79. **Geiger, T., C. Goerke, M. Mainiero, D. Kraus, and C. Wolz.** 2008. The virulence regulator Sae of *Staphylococcus aureus*: Promoter activities and response to phagocytosis-related signals. *J. Bacteriol.* **190**:3419-3428.
 80. **Gemmell, C. G. and M. McLeod.** 1992. The effect of roxithromycin on the virulence of gram-positive cocci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:67S-70S.
-

-
81. **Ghebremedhin, B., F. Layer, W. König, and B. König.** 2008. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* **46**:1019-1025.
 82. **Ghuysen, J. M.** 1991. Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**:37-67.
 83. **Ghuysen, J. M. and J. L. Strominger.** 1963. Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. I. Preparation of fragments by enzymatic hydrolysis. *Biochemistry* **2**:1110-1119.
 84. **Ghuysen, J. M. and J. L. Strominger.** 1963. Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. II. Separation and structure of disaccharides. *Biochemistry* **2**:1119-1125.
 85. **Giachino, P., S. Engelmann, and M. Bischoff.** 2001. σ^B activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**:1843-1852.
 86. **Gilbert, P., E. G. Beveridge, and P. B. Crone.** 1977. The lethal action of 2-phenoxyethanol and its analogues upon *Escherichia coli* NCTC 5933. *Microbios* **19**:125-141.
 87. **Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. Deboy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson, and C. M. Fraser.** 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* **187**:2426-2438.
 88. **Gillaspy, A. F., S. G. Hickmon, R. A. Skinner, J. R. Thomas, C. L. Nelson, and M. S. Smeltzer.** 1995. Role of the accessory gene regulator (*agr*) in pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Infect. Immun.* **63**:3373-3380.
 89. **Giraud, A. T., A. Calzolari, A. A. Cataldi, C. Bogni, and R. Nagel.** 1999. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**:15-22.
 90. **Giraud, A. T., A. L. Cheung, and R. Nagel.** 1997. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* **168**:53-58.
 91. **Giraud, A. T., C. Mansilla, A. Chan, C. Raspanti, and R. Nagel.** 2003. Studies on the expression of regulatory locus *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **46**:246-250.
 92. **Giraud, A. T., C. G. Raspanti, A. Calzolari, and R. Nagel.** 1994. Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can. J. Microbiol.* **40**:677-681.
 93. **Giwerzman, B., E. T. Jensen, N. Hoiby, A. Kharazmi, and J. W. Costerton.** 1991. Induction of β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1008-1010.
 94. **Goerke, C., U. Fluckiger, A. Steinhuber, V. Bisanzio, M. Ulrich, M. Bischoff, J. M. Patti, and C. Wolz.** 2005. Role of *Staphylococcus aureus* global regulators *sae* and σ^B in virulence gene expression during device-related infection. *Infect. Immun.* **73**:3415-3421.
 95. **Goerke, C., U. Fluckiger, A. Steinhuber, W. Zimmerli, and C. Wolz.** 2001. Impact of the regulatory loci *agr*, *sarA* and *sae* of *Staphylococcus aureus* on the induction of α -toxin during device-related infection resolved by direct quantitative transcript analysis. *Mol. Microbiol.* **40**:1439-1447.
 96. **Goerke, C., M. Kümmel, K. Dietz, and C. Wolz.** 2003. Evaluation of intraspecies interference due to *agr* polymorphism in *Staphylococcus aureus* during infection and colonization. *J. Infect. Dis.* **188**:250-256.
 97. **Gomez, M. I., A. Lee, B. Reddy, A. Muir, G. Soong, A. Pitt, A. Cheung, and A. Prince.** 2004. *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nat. Med.* **10**:842-848.
 98. **Götz, F.** 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* **43**:1367-1378.
 99. **Greene, C., D. McDavitt, P. Francois, P. E. Vaudaux, D. P. Lew, and T. J. Foster.** 1995. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fmb* genes. *Mol. Microbiol.* **17**:1143-1152.
-

100. **Gresham, H. D., J. H. Lowrance, T. E. Caver, B. S. Wilson, A. L. Cheung, and F. P. Lindberg.** 2000. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol.* **164**:3713-3722.
101. **Gristina, A. G., C. D. Hobgood, L. X. Webb, and Q. N. Myrvik.** 1987. Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials* **8**:423-426.
102. **Grkovic, S., M. H. Brown, N. J. Roberts, I. T. Paulsen, and R. A. Skurray.** 1998. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J Biol. Chem.* **273**:18665-18673.
103. **Gruber, T. M. and C. A. Gross.** 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:441-466.
104. **Grundmann, H., M. Ires-de-Sousa, J. Boyce, and E. Tiemersma.** 2006. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* **368**:874-885.
105. **Grundmeier, M., M. Hussain, P. Becker, C. Heilmann, G. Peters, and B. Sinha.** 2004. Truncation of fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* strain Newman leads to deficient adherence and host cell invasion due to loss of the cell wall anchor function. *Infect. Immun.* **72**:7155-7163.
106. **Haggar, A., M. Hussain, H. Lonnie, M. Herrmann, A. Norrby-Teglund, and J. I. Flock.** 2003. Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **71**:2310-2317.
107. **Harraghy, N., M. Hussain, A. Haggar, T. Chavakis, B. Sinha, M. Herrmann, and J. I. Flock.** 2003. The adhesive and immunomodulating properties of the multifunctional *Staphylococcus aureus* protein Eap. *Microbiology* **149**:2701-2707.
108. **Harraghy, N., J. Kormanec, C. Wolz, D. Homerova, C. Goerke, K. Ohlsen, S. Qazi, P. Hill, and M. Herrmann.** 2005. *sae* is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology* **151**:1789-1800.
109. **Hartleib, J., N. Köhler, R. B. Dickinson, G. S. Chhatwal, J. J. Sixma, O. M. Hartford, T. J. Foster, G. Peters, B. E. Kehrel, and M. Herrmann.** 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* **96**:2149-2156.
110. **Hartman, B. and A. Tomasz.** 1981. Altered penicillin-binding proteins in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**:726-735.
111. **Haslinger, B., K. Strangfeld, G. Peters, K. Schulze-Osthoff, and B. Sinha.** 2003. *Staphylococcus aureus* α -toxin induces apoptosis in peripheral blood mononuclear cells: role of endogenous tumour necrosis factor- α and the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol.* **5**:729-741.
112. **Hawkey, P. M.** 2008. Pre-clinical experience with daptomycin. *J Antimicrob. Chemother.* **62**:iii7-14.
113. **Heilmann, C., S. Niemann, B. Sinha, M. Herrmann, B. E. Kehrel, and G. Peters.** 2004. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *J. Infect. Dis.* **190**:321-329.
114. **Heir, E., G. Sundheim, and A. L. Holck.** 1998. The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**:49-56.
115. **Heir, E., G. Sundheim, and A. L. Holck.** 1999. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J Appl. Microbiol.* **86**:378-388.
116. **Herman, A., J. W. Kappler, P. Marrack, and A. M. Pullen.** 1991. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:745-772.
117. **Hiramatsu, K., L. Cui, M. Kuroda, and T. Ito.** 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **9**:486-493.
118. **Holmberg, S. D. and P. A. Blake.** 1984. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA* **251**:487-489.
119. **Hoyle, B. D. and J. W. Costerton.** 1991. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res.* **37**:91-105.
120. **Hu, L., A. Umeda, S. Kondo, and K. Amako.** 1995. Typing of *Staphylococcus aureus* colonising human nasal carriers by pulsed-field gel electrophoresis. *J Med. Microbiol.* **42**:127-132.

121. **Huang, C. T., K. D. Xu, G. A. McFeters, and P. S. Stewart.** 1998. Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1526-1531.
122. **Hussain, M., K. Becker, von Eiff C., J. Schrenzel, G. Peters, and M. Herrmann.** 2001. Identification and characterization of a novel 38.5-kilodalton cell surface protein of *Staphylococcus aureus* with extended-spectrum binding activity for extracellular matrix and plasma proteins. *J. Bacteriol.* **183**:6778-6786.
123. **Hussain, M., A. Hagggar, C. Heilmann, G. Peters, J. I. Flock, and M. Herrmann.** 2002. Insertional inactivation of Eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infect. Immun.* **70**:2933-2940.
124. **Hussain, M., A. Hagggar, G. Peters, G. S. Chhatwal, M. Herrmann, J. I. Flock, and B. Sinha.** 2008. More than one tandem repeat domain of the extracellular adherence protein of *Staphylococcus aureus* is required for aggregation, adherence, and host cell invasion but not for leukocyte activation. *Infect. Immun.* **76**:5615-5623.
125. **Hussain, M., M. Herrmann, von Eiff C., F. Perdreau-Remington, and G. Peters.** 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* **65**:519-524.
126. **Hussain, M., von Eiff C., B. Sinha, I. Joost, M. Herrmann, G. Peters, and K. Becker.** 2008. *eap* Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **46**:470-476.
127. **Irwin, M. J. and N. R. Gascoigne.** 1993. Interplay between superantigens and the immune system. *J. Leukoc. Biol.* **54**:495-503.
128. **Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, and K. Hiramatsu.** 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1323-1336.
129. **Ito, T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu.** 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1449-1458.
130. **Ito, T., X. X. Ma, F. Takeuchi, K. Okuma, H. Yuzawa, and K. Hiramatsu.** 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2637-2651.
131. **Janzon, L. and S. Arvidson.** 1990. The role of the δ -lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* **9**:1391-1399.
132. **Jarraud, S., G. J. Lyon, A. M. Figueiredo, L. Gerard, F. Vandenesch, J. Etienne, T. W. Muir, and R. P. Novick.** 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**:6517-6522.
133. **Ji, G., R. Beavis, and R. P. Novick.** 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**:2027-2030.
134. **Ji, G., R. C. Beavis, and R. P. Novick.** 1995. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:12055-12059.
135. **Jones, R. D.** 1999. Bacterial resistance and topical antimicrobial wash products. *Am. J. Infect. Control* **27**:351-363.
136. **Jonsson, I. M., S. Arvidson, S. Foster, and A. Tarkowski.** 2004. Sigma factor B and RsbU are required for virulence in *Staphylococcus aureus*-induced arthritis and sepsis. *Infect. Immun.* **72**:6106-6111.
137. **Jönsson, K., D. McDevitt, M. H. McGavin, J. M. Patti, and M. Höök.** 1995. *Staphylococcus aureus* expresses a major histocompatibility complex class II analog. *J. Biol. Chem.* **270**:21457-21460.
138. **Jönsson, K., C. Signäs, H. P. Müller, and M. Lindberg.** 1991. Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur. J. Biochem.* **202**:1041-1048.

139. **Joost, I., D. Blass, M. Burian, C. Goerke, C. Wolz, von Müller L., K. Becker, K. Preissner, M. Herrmann, and M. Bischoff.** 2009. Transcription analysis of the extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* in authentic human infection and in vitro. *J. Infect. Dis.* **199**:1471-1478.
140. **Josefsson, E., K. W. McCrea, E. D. Ni, D. O'Connell, J. Cox, M. Höök, and T. J. Foster.** 1998. Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **144 (Pt 12)**:3387-3395.
141. **Josefsson, E., D. O'Connell, T. J. Foster, I. Durussel, and J. A. Cox.** 1998. The binding of calcium to the B-repeat segment of SdrD, a cell surface protein of *Staphylococcus aureus*. *J Biol. Chem.* **273**:31145-31152.
142. **Karlsson, A. and S. Arvidson.** 2002. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor *sarA*. *Infect. Immun.* **70**:4239-4246.
143. **Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu.** 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1549-1555.
144. **Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu.** 2001. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1955-1963.
145. **Kazmierczak, M. J., M. Wiedmann, and K. J. Boor.** 2005. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:527-543.
146. **Kluytmans, J., van Belkum A., and H. Verbrugh.** 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:505-520.
147. **Knobloch, J. K., S. Jager, M. A. Horstkotte, H. Rohde, and D. Mack.** 2004. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor σ^B by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect. Immun.* **72**:3838-3848.
148. **Kojima, N., Y. Araki, and E. Ito.** 1983. Structure of linkage region between ribitol teichoic acid and peptidoglycan in cell walls of *Staphylococcus aureus* H. *J Biol. Chem.* **258**:9043-9045.
149. **Kramer, A., G. Daeschlein, B. Chergui, and H. Wagenvoort.** 2005. Grundlagen der Krankenhaushygiene, p. 15-25. *In Hygiene-Prüfungswissen für Pflege- und Gesundheitsfachberufe.*
150. **Krut, O., O. Utermohlen, X. Schlossherr, and M. Krönke.** 2003. Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect. Immun.* **71**:2716-2723.
151. **Kubica, M., K. Guzik, J. Koziel, M. Zarebski, W. Richter, B. Gajkowska, A. Golda, A. Maciag-Gudowska, K. Brix, L. Shaw, T. Foster, and J. Potempa.** 2008. A potential new pathway for *Staphylococcus aureus* dissemination: the silent survival of *S. aureus* phagocytosed by human monocyte-derived macrophages. *PLoS. ONE.* **3**:e1409.
152. **Kullik, I., I and P. Giachino.** 1997. The alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. *Arch. Microbiol.* **167**:151-159.
153. **Kullik, I., P. Giachino, and T. Fuchs.** 1998. Deletion of the alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J. Bacteriol.* **180**:4814-4820.
154. **Kumar, J. K.** 2008. Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**:555-561.
155. **Kuroda, H., M. Kuroda, L. Cui, and K. Hiramatsu.** 2007. Subinhibitory concentrations of β -lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol. Lett.* **268**:98-105.
156. **Kuroda, M., H. Kuroda, T. Oshima, F. Takeuchi, H. Mori, and K. Hiramatsu.** 2003. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **49**:807-821.

-
157. **Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu.** 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**:1225-1240.
 158. **Ladhani, S.** 2001. Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**:301-307.
 159. **Ladhani, S., C. L. Joannou, D. P. Lochrie, R. W. Evans, and S. M. Poston.** 1999. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:224-242.
 160. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
 161. **Laupland, K. B., D. L. Church, M. Mucenski, L. R. Sutherland, and H. D. Davies.** 2003. Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect. Dis.* **187**:1452-1459.
 162. **Lee, L. Y., M. Höök, D. Haviland, R. A. Wetsel, E. O. Yonter, P. Syribeys, J. Vernachio, and E. L. Brown.** 2004. Inhibition of complement activation by a secreted *Staphylococcus aureus* protein. *J. Infect. Dis.* **190**:571-579.
 163. **Lescure, F. X., M. Biendo, Y. Douadi, J. L. Schmit, and M. Eveillard.** 2006. Changing epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and effects on cross-transmission in a teaching hospital. *Eur. J Clin Microbiol. Infect. Dis.* **25**:205-207.
 164. **Li, D. and A. Cheung.** 2008. Repression of *hla* by *rot* is dependent on *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **76**:1068-1075.
 165. **Liang, X., C. Yu, J. Sun, H. Liu, C. Landwehr, D. Holmes, and Y. Ji.** 2006. Inactivation of a two-component signal transduction system, SaeRS, eliminates adherence and attenuates virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **74**:4655-4665.
 166. **Lina, G., Y. Piemont, F. Godail-Gamot, M. Bes, M. O. Peter, V. Gauduchon, F. Vandenesch, and J. Etienne.** 1999. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect. Dis.* **29**:1128-1132.
 167. **Linares, J. F., I. Gustafsson, F. Baquero, and J. L. Martinez.** 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:19484-19489.
 168. **Littlejohn, T. G., D. DiBerardino, L. J. Messerotti, S. J. Spiers, and R. A. Skurray.** 1991. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* **101**:59-66.
 169. **Lorenz, U., C. Hüttinger, T. Schäfer, W. Ziebuhr, A. Thiede, J. Hacker, S. Engelmann, M. Hecker, and K. Ohlsen.** 2008. The alternative sigma factor sigma B of *Staphylococcus aureus* modulates virulence in experimental central venous catheter-related infections. *Microbes. Infect.* **10**:217-223.
 170. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J Med.* **339**:520-532.
 171. **Lyon, G. J., J. S. Wright, T. W. Muir, and R. P. Novick.** 2002. Key determinants of receptor activation in the *agr* autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **41**:10095-10104.
 172. **Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs.** 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* **178**:175-183.
 173. **Mack, J., C. Vermeiren, D. E. Heinrichs, and M. J. Stillman.** 2004. In vivo heme scavenging by *Staphylococcus aureus* IsdC and IsdE proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**:781-788.
 174. **Mah, T. F. and G. A. O'Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**:34-39.
 175. **Manna, A. and A. L. Cheung.** 2001. Characterization of *sarR*, a modulator of *sar* expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**:885-896.
-

-
176. **Manna, A. C., M. G. Bayer, and A. L. Cheung.** 1998. Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **180**:3828-3836.
 177. **Manna, A. C. and A. L. Cheung.** 2006. Expression of SarX, a negative regulator of *agr* and exoprotein synthesis, is activated by MgrA in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**:4288-4299.
 178. **Marger, M. D. and M. H. Saier, Jr.** 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**:13-20.
 179. **Marraffini, L. A., A. C. Dedent, and O. Schneewind.** 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:192-221.
 180. **Massey, R. C., M. N. Kantzanou, T. Fowler, N. P. Day, K. Schofield, E. R. Wann, A. R. Berendt, M. Höök, and S. J. Peacock.** 2001. Fibronectin-binding protein A of *Staphylococcus aureus* has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cell Microbiol.* **3**:839-851.
 181. **Matussek, A., J. Strindhall, L. Stark, M. Rohde, R. Geffers, J. Buer, E. Kihlström, P. E. Lindgren, and S. Löfgren.** 2005. Infection of human endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces transcription of genes encoding an innate immunity response. *Scand. J Immunol.* **61**:536-544.
 182. **Mayer, S., M. Boos, A. Beyer, A. C. Fluit, and F. J. Schmitz.** 2001. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob. Chemother.* **47**:896-897.
 183. **Mazmanian, S. K., G. Liu, H. Ton-That, and O. Schneewind.** 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* **285**:760-763.
 184. **Mazmanian, S. K., E. P. Skaar, A. H. Gaspar, M. Humayun, P. Gornicki, J. Jelenska, A. Joachimiak, D. M. Missiakas, and O. Schneewind.** 2003. Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**:906-909.
 185. **Mazmanian, S. K., H. Ton-That, and O. Schneewind.** 2001. Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **40**:1049-1057.
 186. **Mazmanian, S. K., H. Ton-That, K. Su, and O. Schneewind.** 2002. An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:2293-2298.
 187. **McDevitt, D., P. Francois, P. Vaudaux, and T. J. Foster.** 1994. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **11**:237-248.
 188. **McDonnell, G. and A. D. Russell.** 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**:147-179.
 189. **McGavin, M. H., D. Krajewska-Pietrasik, C. Ryden, and M. Höök.** 1993. Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity. *Infect. Immun.* **61**:2479-2485.
 190. **McNamara, P. J., K. C. Milligan-Monroe, S. Khalili, and R. A. Proctor.** 2000. Identification, cloning, and initial characterization of *rot*, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**:3197-3203.
 191. **Meurer, R.** 2000. Die bakteriologische Ära und ihre Auswirkungen auf die Trinkwasserversorgung-Max von Pettenkofer und Robert Koch, p. 52-53. *In* Wasserbau und Wasserwirtschaft in Deutschland.
 192. **Mitchell, B. A., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1998. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:475-477.
 193. **Miyake, Y., A. Kohada, I. Fujii, M. Sugai, and H. Suginaka.** 1989. Aminoglycosides enhance the adherence of *Staphylococcus aureus* to HeLa cells. *J Antimicrob. Chemother.* **23**:79-86.
 194. **Miyake, Y., A. Kohada, M. Sugai, and H. Suginaka.** 1991. Mechanism of aminoglycoside enhancement of *Staphylococcus aureus* adherence to HeLa cells. *J Antimicrob. Chemother.* **28**:811-817.
 195. **Miyamoto, Y. J., E. R. Wann, T. Fowler, E. Duffield, M. Höök, and B. W. McIntyre.** 2001. Fibronectin binding protein A of *Staphylococcus aureus* can mediate human T lymphocyte adhesion and coactivation. *J Immunol.* **166**:5129-5138.
-

-
196. **Mizuno, T.** 1997. Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4**:161-168.
 197. **Möllenhoff, H. and E. Fobbe.** 2005. Geschichtliche Entwicklung, p. 93-99. *In* Hygiene für Pflegeberufe.
 198. **Monday, S. R. and G. A. Bohach.** 2001. Genes encoding staphylococcal enterotoxins G and I are linked and separated by DNA related to other staphylococcal enterotoxins. *J Nat. Toxins.* **10**:1-8.
 199. **Morfeldt, E., K. Tegmark, and S. Arvidson.** 1996. Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **21**:1227-1237.
 200. **Morikawa, K., Y. Inose, H. Okamura, A. Maruyama, H. Hayashi, K. Takeyasu, and T. Ohta.** 2003. A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes Cells* **8**:699-712.
 201. **Morikawa, K., A. Maruyama, Y. Inose, M. Higashide, H. Hayashi, and T. Ohta.** 2001. Overexpression of sigma factor, σ^B , urges *Staphylococcus aureus* to thicken the cell wall and to resist β -lactams. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**:385-389.
 202. **Nair, S. P., M. Bischoff, M. M. Senn, and B. Berger-Bächi.** 2003. The σ^B regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts. *Infect. Immun.* **71**:4167-4170.
 203. **Navarre, W. W. and O. Schneewind.** 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **14**:115-121.
 204. **Ni Eidhin D., S. Perkins, P. Francois, P. Vaudaux, M. Höök, and T. J. Foster.** 1998. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **30**:245-257.
 205. **Nickel, J. C., I. Ruseska, J. B. Wright, and J. W. Costerton.** 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:619-624.
 206. **Nilsson, I. M., J. C. Lee, T. Bremell, C. Ryden, and A. Tarkowski.** 1997. The role of staphylococcal polysaccharide microcapsule expression in septicemia and septic arthritis. *Infect. Immun.* **65**:4216-4221.
 207. **Noble, W. C., Z. Virani, and R. G. Cree.** 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**:195-198.
 208. **Nouwen, J. L., A. Ott, M. F. Kluytmans-Vandenbergh, H. A. Boelens, A. Hofman, van Belkum A., and H. A. Verbrugh.** 2004. Predicting the *Staphylococcus aureus* nasal carrier state: derivation and validation of a "culture rule". *Clin Infect. Dis.* **39**:806-811.
 209. **Novick, R. P.** 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* **48**:1429-1449.
 210. **Novick, R. P. and D. Jiang.** 2003. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology* **149**:2709-2717.
 211. **Novick, R. P., S. J. Projan, J. Kornblum, H. F. Ross, G. Ji, B. Kreiswirth, F. Vandenesch, and S. Moghazeh.** 1995. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **248**:446-458.
 212. **Novick, R. P., H. F. Ross, S. J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth, and S. Moghazeh.** 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* **12**:3967-3975.
 213. **O'Neill, E., C. Pozzi, P. Houston, H. Humphreys, D. A. Robinson, A. Loughman, T. J. Foster, and J. P. O'Gara.** 2008. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J Bacteriol* **190**:3835-3850.
 214. **Ogston, A.** 1883. Micrococcus poisoning. *J Anat Physiol* **17**:24-58.
 215. **Ohlsen, K., W. Ziebuhr, K. P. Koller, W. Hell, T. A. Wichelhaus, and J. Hacker.** 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on a-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2817-2823.
-

-
216. **Palma, M., A. Hagggar, and J. I. Flock.** 1999. Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *J. Bacteriol.* **181**:2840-2845.
217. **Palmqvist, N., T. Foster, A. Tarkowski, and E. Josefsson.** 2002. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microb. Pathog.* **33**:239-249.
218. **Pané-Farré, J., B. Jonas, K. Förstner, S. Engelmann, and M. Hecker.** 2006. The σ^B regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**:237-258.
219. **Patel, A. H., P. Nowlan, E. D. Weavers, and T. Foster.** 1987. Virulence of protein A-deficient and α -toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect. Immun.* **55**:3103-3110.
220. **Pattee, P. A.** 1981. Distribution of Tn551 insertion sites responsible for auxotrophy on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *J. Bacteriol.* **145**:479-488.
221. **Patti, J. M., T. Bremell, D. Krajewska-Pietrasik, A. Abdelnour, A. Tarkowski, C. Ryden, and M. Höök.** 1994. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect. Immun.* **62**:152-161.
222. **Patti, J. M., H. Jonsson, B. Guss, L. M. Switalski, K. Wiberg, M. Lindberg, and M. Höök.** 1992. Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J Biol. Chem.* **267**:4766-4772.
223. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**:575-608.
224. **Peacock, S. J., N. P. Day, M. G. Thomas, A. R. Berendt, and T. J. Foster.** 2000. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibit diversity in *fnb* genes and adhesion to human fibronectin. *J Infect.* **41**:23-31.
225. **Peacock, S. J., C. E. Moore, A. Justice, M. Kantzanou, L. Story, K. Mackie, G. O'Neill, and N. P. Day.** 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70**:4987-4996.
226. **Peng, H. L., R. P. Novick, B. Kreiswirth, J. Kornblum, and P. Schlievert.** 1988. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **170**:4365-4372.
227. **Peschel, A., R. W. Jack, M. Otto, L. V. Collins, P. Staubitz, G. Nicholson, H. Kalbacher, W. F. Nieuwenhuizen, G. Jung, A. Tarkowski, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp.** 2001. *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp. Med.* **193**:1067-1076.
228. **Peschel, A., M. Otto, R. W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung, and F. Götz.** 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol. Chem.* **274**:8405-8410.
229. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**:e45.
230. **Phonimdaeng, P., M. O'Reilly, P. W. O'Toole, and T. J. Foster.** 1988. Molecular cloning and expression of the coagulase gene of *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Gen. Microbiol.* **134**:75-83.
231. **Plow, E. F., T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J. W. Smith.** 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol. Chem.* **275**:21785-21788.
232. **Prevost, G., P. Couppie, P. Prevost, S. Gayet, P. Petiau, B. Cribier, H. Monteil, and Y. Piemont.** 1995. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med. Microbiol.* **42**:237-245.
233. **Prevost, G., B. Cribier, P. Couppie, P. Petiau, G. Supersac, V. Finck-Barbancon, H. Monteil, and Y. Piemont.** 1995. Panton-Valentine leucocidin and γ -hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun.* **63**:4121-4129.
234. **Price, C. T., V. K. Singh, R. K. Jayaswal, B. J. Wilkinson, and J. E. Gustafson.** 2002. Pine oil cleaner-resistant *Staphylococcus aureus*: reduced susceptibility to vancomycin and oxacillin and involvement of SigB. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5417-5421.
-

-
235. **Proctor, R. A., B. Kahl, von Eiff C., P. E. Vaudaux, D. P. Lew, and G. Peters.** 1998. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect. Dis.* **27**:S68-S74.
236. **Proctor, R. A., van Langevelde P., M. Kristjansson, J. N. Maslow, and R. D. Arbeit.** 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect. Dis.* **20**:95-102.
237. **Proctor, R. A. and von Humboldt A.** 1998. Bacterial energetics and antimicrobial resistance. *Drug Resist. Updat.* **1**:227-235.
238. **Prosser, B. L., D. Taylor, B. A. Dix, and R. Cleeland.** 1987. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:1502-1506.
239. **Que, Y. A., J. A. Haefliger, L. Piroth, P. Francois, E. Widmer, J. M. Entenza, B. Sinha, M. Herrmann, P. Francioli, P. Vaudaux, and P. Moreillon.** 2005. Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J. Exp. Med.* **201**:1627-1635.
240. **Rabilloud, T., G. Carpentier, and P. Tarroux.** 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9**:288-291.
241. **Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker, and W. Ziebuhr.** 2000. Alternative transcription factor σ^B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol* **182**:6824-6826.
242. **Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3357-3363.
243. **Reagan, D. R., B. N. Doebbeling, M. A. Pfaller, C. T. Sheetz, A. K. Houston, R. J. Hollis, and R. P. Wenzel.** 1991. Elimination of coincident *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage with intranasal application of mupirocin calcium ointment. *Ann. Intern. Med.* **114**:101-106.
244. **Rhee, J. S., M. Black, U. Schubert, S. Fischer, E. Morgenstern, H. P. Hammes, and K. T. Preissner.** 2004. The functional role of blood platelet components in angiogenesis. *Thromb. Haemost.* **92**:394-402.
245. **Rice, K., M. Huesca, D. Vaz, and M. J. McGavin.** 2001. Variance in fibronectin binding and *fib* locus polymorphisms in *Staphylococcus aureus*: identification of antigenic variation in a fibronectin binding protein adhesin of the epidemic CMRSA-1 strain of methicillin-resistant *S. aureus*. *Infect. Immun.* **69**:3791-3799.
246. **Rice, K. C., E. E. Mann, J. L. Endres, E. C. Weiss, J. E. Cassat, M. S. Smeltzer, and K. W. Bayles.** 2007. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:8113-8118.
247. **Rogasch, K., V. Rühmling, J. Pané-Farré, D. Höper, C. Weinberg, S. Fuchs, M. Schmudde, B. M. Bröker, C. Wolz, M. Hecker, and S. Engelmann.** 2006. Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* **188**:7742-7758.
248. **Rooijackers, S. H., M. Ruyken, J. van Roon, K. P. van Kessel, J. A. van Strijp, and W. J. Van Wamel.** 2006. Early expression of SCIN and CHIPS drives instant immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol.* **8**:1282-1293.
249. **Rooijackers, S. H., W. J. Van Wamel, M. Ruyken, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp.** 2005. Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes. Infect.* **7**:476-484.
250. **Rosenbach, F. J.** 1884. Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des Menschen.
251. **Russell, A. D.** 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect. Dis.* **3**:794-803.
252. **Russell, A. D., U. Tattawasart, J. Y. Maillard, and J. R. Furr.** 1998. Possible link between bacterial resistance and use of antibiotics and biocides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2151.
253. **Sambrook, J., E. F. Fritsche, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual.
254. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**:5463-5467.
-

-
255. **Saravia-Otten, P., H. P. Müller, and S. Arvidson.** 1997. Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by *agr* and an *agr*-independent mechanism. *J Bacteriol* **179**:5259-5263.
256. **Schleifer, K. H. and U. Fischer.** 1982. Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:153-156.
257. **Schleifer, K. H. and O. Kandler.** 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* **36**:407-477.
258. **Schmidt, K. A., N. P. Donegan, W. A. Kwan, Jr., and A. Cheung.** 2004. Influences of σ^B and *agr* on expression of staphylococcal enterotoxin B (*seb*) in *Staphylococcus aureus*. *Can. J Microbiol.* **50**:351-360.
259. **Schmidt, K. A., A. C. Manna, S. Gill, and A. L. Cheung.** 2001. SarT, a repressor of α -hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**:4749-4758.
260. **Schnaith, A., H. Kashkar, S. A. Leggio, K. Addicks, M. Krönke, and O. Krut.** 2007. *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J Biol. Chem.* **282**:2695-2706.
261. **Senn, M. M., P. Giachino, D. Homerova, A. Steinhuber, J. Strassner, J. Kormanec, U. Flückiger, B. Berger-Bächli, and M. Bischoff.** 2005. Molecular analysis and organization of the σ^B operon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **187**:8006-8019.
262. **Shaw, L. N., C. Lindholm, T. K. Prajsnar, H. K. Miller, M. C. Brown, E. Golonka, G. C. Stewart, A. Tarkowski, and J. Potempa.** 2008. Identification and characterization of σ^S , a novel component of the *Staphylococcus aureus* stress and virulence responses. *PLoS. ONE.* **3**:e3844.
263. **Sidhu, M. S., E. Heir, T. Leegaard, K. Wiger, and A. Holck.** 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with β -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2797-2803.
264. **Signäs, C., G. Raucchi, K. Jönsson, P. E. Lindgren, G. M. Anantharamaiah, M. Höök, and M. Lindberg.** 1989. Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:699-703.
265. **Singh, V. K., J. L. Schmidt, R. K. Jayaswal, and B. J. Wilkinson.** 2003. Impact of *sigB* mutation on *Staphylococcus aureus* oxacillin and vancomycin resistance varies with parental background and method of assessment. *Int J Antimicrob. Agents* **21**:256-261.
266. **Sinha, B., P. P. Francois, O. Nüsse, M. Foti, O. M. Hartford, P. Vaudaux, T. J. Foster, D. P. Lew, M. Herrmann, and K. H. Krause.** 1999. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha_5\beta_1$. *Cell Microbiol.* **1**:101-117.
267. **Sinha, B. and M. Herrmann.** 2005. Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by *Staphylococcus aureus*. *Thromb. Haemost.* **94**:266-277.
268. **Skaar, E. P. and O. Schneewind.** 2004. Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes. Infect.* **6**:390-397.
269. **Slawson, R. M., H. Lee, and J. T. Trevors.** 1990. Bacterial interactions with silver. *Biol. Met.* **3**:151-154.
270. **SMITH, I. M. and A. B. VICKERS.** 1960. Natural history of 338 treated and untreated patients with staphylococcal septicaemia (1936-1955). *Lancet* **1**:1318-1322.
271. **Springer, T. A.** 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**:301-314.
272. **Staubitz, P., H. Neumann, T. Schneider, I. Wiedemann, and A. Peschel.** 2004. MprF-mediated biosynthesis of lysylphosphatidylglycerol, an important determinant in staphylococcal defensin resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**:67-71.
273. **Steinberg, J. P., C. C. Clark, and B. O. Hackman.** 1996. Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin. Infect. Dis.* **23**:255-259.
-

-
274. **Steinhuber, A., C. Goerke, M. G. Bayer, G. Doring, and C. Wolz.** 2003. Molecular architecture of the regulatory locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **185**:6278-6286.
275. **Stock, A. M., V. L. Robinson, and P. N. Goudreau.** 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:183-215.
276. **Stohl, W., J. E. Elliott, D. H. Lynch, and P. A. Kiener.** 1998. CD95 (Fas)-based, superantigen-dependent, CD4+ T cell-mediated down-regulation of human in vitro immunoglobulin responses. *J. Immunol.* **160**:5231-5238.
277. **Suller, M. T. and A. D. Russell.** 1999. Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *J. Hosp. Infect.* **43**:281-291.
278. **Suller, M. T. and A. D. Russell.** 2000. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:11-18.
279. **Tattawasart, U., A. C. Hann, J. Y. Maillard, J. R. Furr, and A. D. Russell.** 2000. Cytological changes in chlorhexidine-resistant isolates of *Pseudomonas stutzeri*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:145-152.
280. **Tattawasart, U., J. Y. Maillard, J. R. Furr, and A. D. Russell.** 1999. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *J. Hosp. Infect.* **42**:219-229.
281. **Tattawasart, U., J. Y. Maillard, J. R. Furr, and A. D. Russell.** 2000. Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *Int J. Antimicrob. Agents* **16**:233-238.
282. **Tegmark, K., A. Karlsson, and S. Arvidson.** 2000. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **37**:398-409.
283. **Thakker, M., J. S. Park, V. Carey, and J. C. Lee.** 1998. *Staphylococcus aureus* serotype 5 capsular polysaccharide is antiphagocytic and enhances bacterial virulence in a murine bacteremia model. *Infect. Immun.* **66**:5183-5189.
284. **Thomas, L., J. Y. Maillard, R. J. Lambert, and A. D. Russell.** 2000. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration. *J. Hosp. Infect.* **46**:297-303.
285. **Thomas, V. C., L. R. Thurlow, D. Boyle, and L. E. Hancock.** 2008. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J. Bacteriol.* **190**:5690-5698.
286. **Tipper, D. J. and J. L. Strominger.** 1966. Isolation of 4-O- β -N-acetylmuramyl-N-acetylglucosamine and 4-O- β -N, 6-O-diacetylmuramyl-N-acetylglucosamine and the structure of the cell wall polysaccharide of *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**:48-56.
287. **Todd, J. K.** 1988. Toxic shock syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**:432-446.
288. **Toledo-Arana, A., N. Merino, M. Vergara-Irigaray, M. Debarbouille, J. R. Penades, and I. Lasa.** 2005. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, *ica*-independent biofilm in the absence of the *arlRS* two-component system. *J. Bacteriol.* **187**:5318-5329.
289. **Townsend, D. E. and B. J. Wilkinson.** 1992. Proline transport in *Staphylococcus aureus*: a high-affinity system and a low-affinity system involved in osmoregulation. *J. Bacteriol.* **174**:2702-2710.
290. **Trucksis, M., J. S. Wolfson, and D. C. Hooper.** 1991. A novel locus conferring fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **173**:5854-5860.
291. **Tuazon, C. U., A. Perez, T. Kishaba, and J. N. Sheagren.** 1975. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. An increased carrier rate. *JAMA* **231**:1272.
292. **Tuomanen, E., R. Cozens, W. Tosch, O. Zak, and A. Tomasz.** 1986. The rate of killing of *Escherichia coli* by β -lactam antibiotics is strictly proportional to the rate of bacterial growth. *J. Gen. Microbiol.* **132**:1297-1304.
293. **Tuomanen, E., D. T. Durack, and A. Tomasz.** 1986. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**:521-527.
-

-
294. Uhlen, M., B. Guss, B. Nilsson, S. Gatenbeck, L. Philipson, and M. Lindberg. 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J Biol. Chem.* **259**:1695-1702.
295. Utaida, S., P. M. Dunman, D. Macapagal, E. Murphy, S. J. Projan, V. K. Singh, R. K. Jayaswal, and B. J. Wilkinson. 2003. Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology* **149**:2719-2732.
296. van Duijkeren E., M. J. Wolfhagen, A. T. Box, M. E. Heck, W. J. Wannet, and A. C. Fluit. 2004. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:2235-2237.
297. van Veen, H. W., R. Callaghan, L. Soceneantu, A. Sardini, W. N. Konings, and C. F. Higgins. 1998. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature* **391**:291-295.
298. Vijaranakul, U., M. J. Nadakavukaren, B. L. de Jonge, B. J. Wilkinson, and R. K. Jayaswal. 1995. Increased cell size and shortened peptidoglycan interpeptide bridge of NaCl-stressed *Staphylococcus aureus* and their reversal by glycine betaine. *J Bacteriol* **177**:5116-5121.
299. Vlassov, V. V., P. P. Laktionov, and E. Y. Rykova. 2007. Extracellular nucleic acids. *Bioessays* **29**:654-667.
300. von Eiff C., K. Becker, K. Machka, H. Stammer, and G. Peters. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N. Engl. J. Med.* **344**:11-16.
301. Wann, E. R., S. Gurusiddappa, and M. Höök. 2000. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Biol. Chem.* **275**:13863-13871.
302. Watson, S. P., M. O. Clements, and S. J. Foster. 1998. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **180**:1750-1758.
303. Webb, N. J., C. R. Myers, C. J. Watson, M. J. Bottomley, and P. E. Brenchley. 1998. Activated human neutrophils express vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cytokine* **10**:254-257.
304. Weems, J. J. and L. B. Beck. 2002. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* As a Risk Factor for Skin and Soft Tissue Infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **4**:420-425.
305. Weinke, T., R. Schiller, F. J. Fehrenbach, and H. D. Pohle. 1992. Association between *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization and septicemia in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur. J Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **11**:985-989.
306. Williams, R. E. 1963. Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev.* **27**:56-71.
307. Wolz, C., D. McDevitt, T. J. Foster, and A. L. Cheung. 1996. Influence of *agr* on fibrinogen binding in *Staphylococcus aureus* Newman. *Infect. Immun.* **64**:3142-3147.
308. Wolz, C., P. Pohlmann-Dietze, A. Steinhuber, Y. T. Chien, A. Manna, van Wamel W., and A. Cheung. 2000. Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus *sar* in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **36**:230-243.
309. Wu, S., H. de Lencastre, and A. Tomasz. 1996. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J Bacteriol* **178**:6036-6042.
310. Wu, S., C. Piscitelli, de Lencastre H., and A. Tomasz. 1996. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb. Drug Resist.* **2**:435-441.
311. Xu, K. D., G. A. McFeters, and P. S. Stewart. 2000. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* **146** (Pt 3):547-549.
312. Yamada, H., S. Kurose-Hamada, Y. Fukuda, J. Mitsuyama, M. Takahata, S. Minami, Y. Watanabe, and H. Narita. 1997. Quinolone susceptibility of *norA*-disrupted *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2308-2309.
-

313. **Yoshida, H., M. Bogaki, S. Nakamura, K. Ubukata, and M. Konno.** 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* **172**:6942-6949.
314. **Zhang, K., J. A. McClure, S. Elsayed, and J. M. Conly.** 2009. Novel staphylococcal cassette chromosome *mec* type, tentatively designated type VIII, harboring class A *mec* and type 4 *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:531-540.
315. **Zhang, L., L. Gray, R. P. Novick, and G. Ji.** 2002. Transmembrane topology of AgrB, the protein involved in the post-translational modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J Biol. Chem.* **277**:34736-34742.
316. **Ziebandt, A. K., D. Becher, K. Ohlsen, J. Hacker, M. Hecker, and S. Engelmann.** 2004. The influence of *agr* and σ^B in growth phase dependent regulation of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *Proteomics.* **4**:3034-3047.
317. **Ziebandt, A. K., H. Weber, J. Rudolph, R. Schmid, D. Höper, S. Engelmann, and M. Hecker.** 2001. Extracellular proteins of *Staphylococcus aureus* and the role of SarA and σ^B . *Proteomics.* **1**:480-493.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Einheit: Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Einheit: Celsius
CD	„cluster of differentiation“
cfu	Einheit: „colony forming units“
Δ	Deletion
dNTP	desoxy Nucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Etylendiamin-Tetraacetat
Em ^r	Erythromycin-resistent
Ery ^r	Erythromycin-resistent
et al	et alii (und andere)
EtOH	Ethanol
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
g	Einheit: Gramm
h	Einheit: Stunde
HSA	“human serum albumin“
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
Isd	Iron-regulated surface determinants
kanA	Kanamycinresistenz-Gen
kb	Einheit: Kilobasenpaare
kDa	Einheit: Kilo-Dalton
l	Einheit: Liter
mg	Einheit: Milligramm
μ g	Einheit: Mikrogramm
ml	Einheit: Milliliter
μ l	Einheit: Mikroliter
Mbp	Einheit: Megabasenpaare
min	Einheit: Minute
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
NEB	„New England Biolabs“
nm	Einheit: Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“ (Offener Leserahmen)
P	Promotor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	Einheit: pondus Hydrogenii (pondus = Gewicht/hydrogenium = Wasserstoff)

Pls	“plasmin sensitive”
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction”
rpm	Einheit: „rounds per minute”
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase „polymerase chain reaction”
Sas	“ <i>Staphylococcus aureus</i> surface protein”
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sdr	„serine-aspartate repeat“
s	Einheit: Sekunde
T	Terminator
Tab.	Tabelle
Tc ^r	Tetracyclin resistant
Tn	Transposon
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Einheit: Unit
u. a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Einheit: Volt
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Andreas Schäfer
Geburtsdatum: 14. Februar 1977
Geburtsort: Filderstadt
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984 – 1988 Goldwiesen-Grundschule, Echterdingen
1988 – 1997 Philipp-Matthäus-Hahn-Gymnasium, Echterdingen
Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife

Studium

1999 – 2001 Grundstudium an der Universität Hohenheim
2001 - 2004 Hauptstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
Prüfungsfächer: Mikrobiologie, Immunbiologie,
Medizinische Mikrobiologie
2003 - 2004 Diplomarbeit: Konstruktion einer *Staphylococcus aureus*
Formylmethionin-defizienten Mutante und phänotypische
Charakterisierung einer Mutante ohne Lysyl-Phosphatidyl-
glycerol

Promotion

Seit 2005 Dissertation am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universitätsklinik Würzburg (Thema: Eine Punktmutation in
saeS ist verantwortlich für die veränderte Stressantwort von
Staphylococcus aureus Newman gegenüber Desinfektions-
mitteln) unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. B. Sinha und
Prof. Dr. J. Reidl

7.3 Publikationsliste

7.3.1 Veröffentlichungen

Hussain, M., D. Schäfer, K. M. Juuti, G. Peters, B. Haslinger-Löffler, P. I. Kuusela, B. Sinha. 2009. Expression of Pls (plasmin-sensitive) in pls-negative *Staphylococcus aureus* reduces adherence and cellular invasion and acts by steric hindrance. J Infect Dis. 200(1):107-117.

Schäfer, D., T-T. Lâm, T. Geiger, M. Mainiero, S. Engelmann, M. Hussain, A. Bosserhoff, M. Frosch, M. Bischoff, C. Wolz, J. Reidl, B. Sinha. 2009. A point mutation in the *sae* regulon of *S. aureus* strain Newman alters response to biocide exposure. J Bacteriol. 191(23):7306-14.

7.3.2 Kongressbeiträge

Schäfer, D. Stress response to biocides in *Staphylococcus aureus*

Vortrag beim Fachgruppen-Treffen Mikrobielle Pathogenität der DGHM Symposium „Mikrobielle Pathogenität“ vom 16.6–18.6.2008 (Bad Urach)

Schäfer D., L. Lam, C. Wolz, A. Bosserhoff, M. Hussain, M. Bischoff, M. Frosch, J. Reidl, B. Sinha. Stress response to biocides in *Staphylococcus aureus*.

Vortrag bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) e.V. vom 21.9.–24.9.2008 (Dresden)

Schäfer, D., T-T. Lâm, C. Wolz, S. Engelmann, M. Bischoff, M. Hussain, A. Bosserhoff, F. Pitten, M. Frosch, J. Reidl, B. Sinha. Biocide exposure increases Eap-mediated cellular invasion of *Staphylococcus aureus* strain Newman in an *sae*-dependent manner.

Posterpräsentation beim Workshop "Pathophysiology of Staphylococci" vom 28.10.–31.10.2008 (Kloster Banz, Bad Staffelstein)