

Technische Universität München

Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für

Ernährung, Landnutzung und Umwelt

- Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie -

Charakterisierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Referenzstämmen hinsichtlich β -Laktam-Antibiotika Resistenz,

Pathogenitätsfaktoren und Wachstum im Kollagengel

Stefanie Bernadette Böllner

Technische Universität München

Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für

Ernährung, Landnutzung und Umwelt

- Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie -

**Charakterisierung von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)
Referenzstämmen hinsichtlich β -Laktam-Antibiotika Resistenz,
Pathogenitätsfaktoren und Wachstum im Kollagengel**

Stefanie Bernadette Böllner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Liebl
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 16.03.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 18.05.2015 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IX
TABELLENVERZEICHNIS	XII
1 Einleitung	1
1.1 Mikrobiologie der Staphylokokken	1
1.2 Epidemiologie und Pathogenese von <i>S. aureus</i>	1
1.3 Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	2
1.3.1 Virulenzassoziierte Exoproteine	3
1.3.2 Toxine	4
1.3.3 Regulation von <i>S. aureus</i> Exoproteinen.....	6
1.4 <i>S. aureus</i> Zellwandsynthese	10
1.5 Auftreten und Unterscheidung von MRSA-Stämmen in Deutschland	12
1.5.1 “Community-“ und “hospital-acquired” MRSA (CA-MRSA und HA-MRSA)	14
1.5.2 “Livestock-associated” (LA)-MRSA–ST398	16
1.6 Antibiotika und Resistenzmechanismen	16
1.6.1 Mechanismus und Regulation der Penicillin-Resistenz: β -Laktamase.....	17
1.6.2 Mechanismus der Methicillin-Resistenz: PBP2a.....	19
1.6.3 Mechanismus der Vancomycin-Resistenz	22
1.7 Behandlung von Patienten mit <i>S. aureus</i> und MRSA-Kolonisation oder Infektion	24
1.8 Typisierung von MRSA-Stämmen	24
1.8.1 Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST)	25
1.8.2 <i>spa</i> -Typisierung	25
1.9 SCCmec-Klassifizierung	26
1.9.1 <i>ccr</i> -Genkomplex	26
1.9.2 <i>mec</i> -Genkomplex	26

1.10 Ziele dieser Arbeit.....	29
2 Material und Methoden.....	30
2.1 Bakterienstämme	30
2.2 Oligonukleotide	31
2.3 Nährmedien	33
2.3.1 Medien für die Kultivierung von Bakterien (<i>S. aureus</i>)	33
2.3.2 Zellkulturmedien.....	34
2.4 Antibiotika.....	34
2.5 Antikörper	35
2.6 Staphylokokken-Proteine.....	36
2.7 Enzyme.....	36
2.8 Molekularbiologische Fertigprodukte (Kits).....	36
2.9 Puffer und Lösungen	37
2.9.1 Gelelektrophorese	37
2.9.2 SDS-PAGE (Laemmli, 1970)	37
2.9.3 Coomassie Färbung.....	38
2.9.4 Western Blot (Immunoblot).....	38
2.9.5 Phosphatpuffer	39
2.9.6 RNA Extraktion	40
2.9.7 Bead capture Assay.....	40
2.9.8 Paraformaldehyd (PFA)-Fixierlösung	40
2.10 Geräte.....	41
2.11 Laborchemikalien, Proteine und Fertigprodukte (Kits).....	42
2.12 Verbrauchsmaterialien.....	44
2.13 Mikrobiologische Methoden	44
2.13.1 Kultivierungsverfahren	44
2.13.2 Bakterienstammhaltung	44

2.13.3	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach der E-Test Methode	45
2.13.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	45
2.13.5	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	46
2.13.6	Agarosegelelektrophorese	46
2.13.7	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	46
2.13.8	Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (cfu)	47
2.13.9	hyBeads [®] Streptavidin-Assay	47
2.13.10	Bestimmung der Heterogenität einer MRSA Population.....	48
2.14	Molekularbiologische Methoden	49
2.14.1	Isolierung genomischer DNA	49
2.14.2	Photometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	49
2.14.3	Sequenzierung von DNA	49
2.14.4	Messung der relativen Hydrolyserate von Nitrocefin durch β -Laktamase	49
2.14.5	RNA-Extraktion	50
2.14.6	Quantitative PCR (RT-qPCR).....	51
2.15	Biochemische und analytische Methoden	53
2.15.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.15.2	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung.....	54
2.15.3	Western Blot/Immunoblot	54
2.15.4	Exoprotein-Analyse von <i>S. aureus</i> Stämmen	55
2.16	Methoden zur phänotypischen Analyse von <i>S. aureus</i> Stämmen.....	56
2.16.1	3D-Kollagengel.....	56
2.16.2	Immunofluoreszenzfärbung in 3D-Kollagengelen.....	57
2.16.3	Vitalfärbung von Bakterien.....	58
2.17	Zellbiologische Methoden.....	58
2.17.1	Lagerung von monoklonalen Hybridoma-Zellen.....	59
2.17.2	Auftauen von Zellen	59
2.17.3	Kultivierung von monoklonalen Hybridoma-Zellen	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Vergleich der PBP2a-Produktion von MRSA-Referenzstämmen.....	60

3.1.1	Anreicherung von <i>S. aureus</i> mit magnetischen Sa-Beads	60
3.1.2	Untersuchungen zur Wachstumsrate von MRSA-Stämmen.....	63
3.1.3	Einfluss von NaCl auf die Induktion von PBP2a.....	66
3.1.4	Enzymatischer Zellaufschluss mit PRF-119.....	67
3.1.5	PBP2a-Nachweis von MRSA-Stämmen unter verschiedenen Wachstums- und Lysebedingungen	68
3.2	Molekularbiologischer Hintergrund von HA-MRSA-Referenzstämmen	72
3.2.1	Genetische Diversität der <i>mec</i> - und <i>bla</i> -Region in MRSA-Stämmen	72
3.2.2	Hydrolyse von Nitrocefin durch β -Laktamasen der MRSA-Referenzstämme...	76
3.2.3	Ausprägung der Oxacillinresistenz von MRSA-Referenzstämmen.....	79
3.2.4	Vergleichende quantitative Analyse der <i>mecA</i> -Transkription mit der PBP2a-Proteinproduktion	82
3.3	Genetischer Hintergrund eines <i>mecA</i> PCR-positiven, Oxacillin-sensitiven <i>S. aureus</i> (OS-MRSA)	85
3.4	Exoprotein- und SERAM-Untersuchungen von MRSA-Referenzstämmen	88
3.4.1	Exoprotein-Analyse	88
3.4.2	Wachstum im 3D-CoG System.....	94
3.4.3	Wachstum im 3D-CoG/F System	97
3.4.4	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im 3D-CoG und 3D-CoG/F.....	100
4	Diskussion	120
4.1	Charakterisierung von repräsentativen MRSA-Referenzstämmen und Optimierung des Nachweis von PBP2a.....	120
4.1.1	Genetische Charakterisierung der MRSA-Referenzstämme.....	120
4.1.2	Wachstum von MRSA-Stämmen unter Anwesenheit von Oxacillin.....	124
4.1.3	Einfluss von Mec- und Bla-Regulatoren auf <i>blaZ</i> - und <i>mecA</i> -Expression.....	126
4.1.4	Anreicherung von MRSA für den MRSA-Schnellnachweis	129
4.1.5	Optimierung der Wachstumsbedingungen.....	130
4.1.6	Induktion von PBP2a durch erhöhte Osmolarität des Wachstumsmediums	130
4.1.7	Verbesserung der Sensitivität von PBP2a-Immunoblots	131
4.2	Genetischer Ursache von <i>mecA</i> PCR-positiven, Oxacillin-sensitiven Staphylokokken	134

4.3	Exoprotein-Untersuchungen von MRSA-Referenzstämmen.....	136
4.3.1	SDS-PAGE und Immunoblot-Exoprotein-Muster von MRSA-Stämmen	136
4.3.2	Wachstumsverhalten von MRSA-Stämmen im 3D-CoG und 3D-CoG/F	139
4.3.3	Nachweis von Emp und Efb bei <i>S. aureus</i> im 3D-CoG.....	141
4.3.4	Nachweis von Emp und Efb bei <i>S. aureus</i> im 3D-CoG/F mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	142
5	Zusammenfassung/Summary.....	147
5.1	Zusammenfassung	147
5.2	Summary.....	150
6	Literatur.....	152
7	Anhang	174
	Danksagung.....	177

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Δ	Delta
agr	Engl.: “ <i>accessory gene regulator</i> ”
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bla-	Genotypisch negative <i>bla</i> -Region
bla+	Vollständige <i>bla</i> -Region vorhanden
bp	Basenpaare
BSA	Engl.: “ <i>Bovine Serum Albumin</i> ”
CA	Engl.: “ <i>Community-Acquired</i> ”
cfu	Engl.: “ <i>colony-forming units</i> “
Clf	Engl.: “ <i>Clumping factor</i> ”
CLSM	Engl.: “ <i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> ”
Coa	Koagulase
CoG	Kollagengel
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
dest.	Destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ECDC	Engl.: “ <i>European Center for Disease Prevention and Control</i> ”
ECL	Engl.: “ <i>Enhanced Chemiluminescence</i> ”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Efb	Extrazelluläres Fibrinogen-bindendes Protein
Emp	Extrazelluläre Matrix bindendes Protein
EtOH	Ethanol
FCS	Engl.: “ <i>Fetal Calf Serum</i> ”
FnBP	Fibronectin-bindendes Protein
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
HA	Engl.: “ <i>Hospital-Aquired</i> ”
IF	Immunfluoreszenz

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

IS	Insertionssequenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MAM	Engl: “ <i>Microcolony Associated Meshwork</i> ”
mec*	<i>mecI</i> - und <i>mecRI</i> -Gen defekt
mec+	Vollständige, funktionale <i>mec</i> -Region
MHA	Mueller-Hinton Agar
MHB	Engl: “Mueller-Hinton Broth”
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLST	Multilokus Sequenz-Typisierung
mRNA	Engl; „ <i>messenger RNA</i> “
MRSA	Methicillin-resistenter <i>S. aureus</i>
MRSA-BAR	MRSA Epidemiestamm Barnim
MRSA-BER	MRSA Epidemiestamm Berlin
MRSA-DM	MRSA Epidemiestamm Dänemark
MRSA-GB	MRSA Epidemiestamm Großbritannien
MRSA-KG	MRSA Epidemiestamm Klonale Gruppe III
MRSA-KLN	MRSA Epidemiestamm Köln
MRSA-ND	MRSA Epidemiestamm Norddeutschland
MRSA-RH	MRSA Epidemiestamm Rheinhessen
MRSA-SD	MRSA Epidemiestamm Süddeutschland
MRSA-SP	MRSA Epidemiestamm Spanien
MRSA-WI	MRSA Epidemiestamm Wien
MSCRAMM	Engl: “ <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule</i> ”
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>S. aureus</i>
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NRZ	Nationales Referenzzentrum
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PAP	Populationsanalyse-Profil
PBP	Penicillin-binde-Protein
PBS	Engl: Phosphat buffered saline
PCR	Engl.: “ <i>Polymerase chain reaction</i> “
PFA	Paraformaldehyd
PRP	Penicillinase-resistente Penicilline
PVL	Panton-Valentine Leukozidin
qRT-PCR	Quantitative Real-Time PCR
rHyr	Relative Hydrolyserate
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Engl.: “ <i>rounds per minute</i> “
RT	Raumtemperatur
Sae	<i>S. aureus</i> Exoprotein
Sbi	Immunglobulin-bindendes Protein
SCC	Engl.: “ <i>Staphylococcal cassette chromosome</i> ”
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERAM	Engl: “ <i>Secretable expanded repertoire adhesive molecules</i> “
sp.	Spezies
spa	<i>Staphylococcus</i> Protein A
ssp.	Subspezies
ST	Sequenztyp
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N’-Tetramethyldiamin
T _M	Schmelztemperatur
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-Diol
TSST-1	Toxisches Schock Syndrom Toxin-1
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernacht-Kultur
UV	Ultraviolett
vWbp	Von-Willebrand-Faktor-bindendes Protein
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Western Blot

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Übersicht zum Aufbau und zur Signaltransduktion des Zwei-Komponenten Systems SaeRS	7
Abbildung 1.2: Übersicht zum Aufbau und zur Signaltransduktion im <i>agr</i> -Regulationssystem....	8
Abbildung 1.3: Einteilung und Charakteristika der Penicillin-binde-Proteine (PBPs) von <i>S. aureus</i>	12
Abbildung 1.4: Anteil invasiver <i>S. aureus</i> Isolate mit Methicillin-Resistenz im Jahr 2012 nach EU-Ländern	13
Abbildung 1.5: Übersicht der direkt beteiligten Gene zur Expression einer β -Laktam Resistenz.....	18
Abbildung 1.6: Übersicht der Kreuzregulation von <i>mecA</i> und <i>blaZ</i>	21
Abbildung 2.1: 3D-Kollagengel-Verteilung in einem Napf einer 8-Well-Mikrotiterplatte zur Kultivierung von Staphylokokken	57
Abbildung 3.1: Aufbau eines magnetischen Sa-Beads mit gebundenem biotinylierten <i>S. aureus</i> spezifischen Phagenprotein und dessen Bindung an <i>S. aureus</i>	61
Abbildung 3.2: Wachstumskurven der MRSA-Referenzstämmen in LB-Flüssigmedium	63
Abbildung 3.3: Wachstumsverhalten von MRSA-RH ohne und mit Oxacillin.....	66
Abbildung 3.4: PBP2a-Immunoblot von MRSA-RH bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen	67
Abbildung 3.5: PBP2a-Immunoblot von MRSA-RH nach Inkubation mit PRF-119.....	68
Abbildung 3.6: Übersicht des Versuchsablaufs zum Nachweis von PBP2a ohne und mit 10 ng/ml Oxacillin bzw. ohne und mit 230 μ g/ml PRF-119.....	70
Abbildung 3.7: PBP2a-Immunoblot von MRSA-Stämmen unter verschiedenen Wachstums- und Lysebedingungen	70
Abbildung 3.8: Übersicht der Genorganisation des <i>mec</i> - und <i>ccr</i> -Genkomplex der MRSA-Referenzstämmen	74
Abbildung 3.9: Darstellung der relativen Hydrolyserate (rHyr) von <i>blaZ</i> -positiven MRSA-Referenzstämmen mit Nitrocefin als Substrat.....	78
Abbildung 3.10: Populationsanalyseprofile (PAP) der deutschen MRSA-Referenzstämmen für Oxacillin	80

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.11: Populationsanalyseprofil (PAP) von MRSA-Stämmen ohne und mit Präselektion (PS) mit Oxacillin.....	81
Abbildung 3.12: PBP2a-Immunoblot zum Nachweis der PBP2a-Produktion von MRSA-WI und MRSA-BAR.....	82
Abbildung 3.13: Analyse der <i>mecA</i> -Transkription und Produktion von PBP2a für elf deutsche MRSA-Referenzstämme in Abhängigkeit von Oxacillin in LB-Medium	84
Abbildung 3.14: Antibiotika-Hemmhöhe von <i>S. aureus</i> Patientenisolat GH-B13_35223	86
Abbildung 3.15: Schematische Übersicht der Genorganisation der <i>mec</i> -Region von OS-MRSA GH-B13_35223 im Vergleich zu einer SCCmec-Kassette II	87
Abbildung 3.16: Aminosäure-Teilsequenz von PBP2a.....	87
Abbildung 3.17: SDS-PAGE der Kulturüberstandsproteine von MSSA Newman und den MRSA-Referenzstämmen in der exponentiellen (A) und stationären (B) Wachstumsphase	89
Abbildung 3.18: Nachweis der SERAM Proteine Coa (A) und vWbp (B) im Kulturüberstand der exponentiellen und stationären Wachstumsphase von MSSA Newman und den MRSA-Referenzstämmen mittels Immunoblot.....	92
Abbildung 3.19: Nachweis der SERAM Proteine Emp (A) und Efb (B) im Kulturüberstand der exponentiellen und stationären Wachstumsphase von MSSA Newman und den MRSA-Referenzstämmen mittels Immunoblot.....	93
Abbildung 3.20: Mikrokolonie-Durchmesser von MSSA Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG	95
Abbildung 3.21: Mikrokolonie-Morphologie von MSSA Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG (Hellfeldkanal, CLSM).....	96
Abbildung 3.22: Mikrokolonie-Durchmesser von MSSA Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG/F.....	98
Abbildung 3.23: Mikrokolonie-Morphologie von MSSA Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG/F (Hellfeldkanal, CLSM)	99
Abbildung 3.24: Fluoreszenzmikroskopie des Vitalitätsgrades von Mikrokolonien von <i>S. aureus</i> Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG nach 16 h mittels CLSM (Z-Ebene).....	102

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 3.25: Direkter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von <i>S. aureus</i> Antigenen mit anti-Sau im 3D-CoG nach 16 h mittels CLSM (Z-Ebene).....	103
Abbildung 3.26: Indirekter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Emp in <i>S.</i> <i>aureus</i> Mikrokolonien im 3D-CoG.....	106
Abbildung 3.27: Indirekter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb in <i>S. aureus</i> Mikrokolonien im 3D-CoG.....	107
Abbildung 3.28: Fluoreszenzmikroskopie des Vitalitätsgrades von Mikrokolonien von <i>S. aureus</i> Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG/F nach 16 h mittels CLSM (Z-Ebene).....	110
Abbildung 3.29: Direkter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von <i>S. aureus</i> Antigenen mit anti-Sau im 3D-CoG/F nach 16 h mittels CLSM (Z-Ebene)	111
Abbildung 3.30: Indirekter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Emp in <i>S.</i> <i>aureus</i> Mikrokolonien im 3D-CoG/F.....	113
Abbildung 3.31: Indirekter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb in <i>S. aureus</i> Mikrokolonien im 3D-CoG/F.....	114
Abbildung 3.32: Phasenkontrast- und immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung Pseudokapsel und MAM bzw. Emp/Efb-Produktion von <i>S. aureus</i> Patientenisolaten im 3D-CoG/F mittels CLSM	119
Abbildung 4.1: Übersicht zur Genorganisation der <i>mec</i> -Region der MRSA-Referenzstämmen .	123
Abbildung 4.2: Schematische Übersicht zur Mikrokolonie-Morphologie und Emp-/Efb- Produktion von <i>S. aureus</i> im 3D-CoG und 3D-CoG/F nach 16 h Wachstum ..	146
Abbildung 7.1: Aminosäuresequenz-Vergleich von BlaZ verschiedener MRSA-Stämme	174
Abbildung 7.2: Aminosäuresequenz-Vergleich von BlaI verschiedener MRSA-Stämme	175
Abbildung 7.3: Aminosäuresequenz-Vergleich von BlaR1 verschiedener MRSA-Stämme	176

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i> und deren Wirkung	3
Tabelle 1.2: Übersicht der Exoproteine von <i>S. aureus</i>	9
Tabelle 1.3: Vorkommen von virulenz- und fitnessassoziierten Eigenschaften in CA-MRSA und HA-MRSA.....	15
Tabelle 1.4: Genetische Organisation der <i>mec</i> -Region als Basis für die Einteilung in <i>mec</i> - Klassen	27
Tabelle 1.5: Zusammensetzung von SCCmec-Typen durch die Kombination aus <i>ccr</i> -Typ und <i>mec</i> -Klasse.....	28
Tabelle 2.1: Verwendete MRSA-Stämme.....	30
Tabelle 2.2: Verwendete MSSA-Stämme	31
Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung der <i>mec</i> -Kassette	31
Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung der <i>bla</i> -Kassette	32
Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Antikörper und die verwendete Konzentration	35
Tabelle 2.6: Verwendete Staphylokokken-Proteine (His-Taq)	36
Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Enzyme	36
Tabelle 2.8: Verwendete Geräte.....	41
Tabelle 2.9: Verwendete Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Biochemikalien	42
Tabelle 2.10 PCR-Reaktionsansatz	45
Tabelle 2.11: PCR-Reaktionsprogramm	46
Tabelle 2.12: DNase Verdau	51
Tabelle 2.13: Oligonukleotide und Sonden zur Durchführung der RT-qPCR.....	51
Tabelle 2.14: Reaktionskomponenten zur reversen Transkription.....	52
Tabelle 2.15: Verwendete Lösungen zur Durchführung der RT-qPCR ^a	53
Tabelle 2.16: Verwendeter Zyklus zur Durchführung der RT-qPCR	53
Tabelle 2.17: Verwendete Puffer und Lösungen zur Herstellung von Polyacrylamidgelen	54
Tabelle 3.1: Bindung von Staphylokokken Reinkulturen an Sa-Beads	62
Tabelle 3.2: Anreicherung von MRSA-SP aus verschiedenen Mischkulturen	62

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.3: Zellzahlen von MRSA-Stämmen zu unterschiedlichen Wachstumszeitpunkten bei einer Ausgangszellzahl von ca. 1×10^5 cfu/ml	63
Tabelle 3.4: Zellzahlen von MRSA-Stämmen zu unterschiedlichen Wachstumszeitpunkten bei einer Ausgangszellzahl von ca. 5×10^2 cfu/ml	64
Tabelle 3.5: Übersicht zu Mindest-Zellzahlen zum PBP2a-Nachweis von MRSA-Stämmen	71
Tabelle 3.6: Typisierung und Gruppierung der MRSA-Referenzstämme	73
Tabelle 3.7: Mutationen wichtiger Genabschnitte der <i>bla</i> -Region in MRSA-Stämmen	76
Tabelle 3.8: MHK von MRSA-Referenzstämmen für Oxacillin (E-Test).....	79
Tabelle 3.9: Übersicht zur Mikrokolonien-Morphologie von <i>S. aureus</i> Stämmen nach Wachstum im 3D-CoG/F nach verschiedenen Inkubationszeiten.....	100
Tabelle 3.10: Emp- und Efb-Mikrokolonie-Färbung von Staphylokokken Stämmen zu drei verschiedenen Zeitpunkten.....	115
Tabelle 3.11: Übersicht zu Charakteristika von <i>S. aureus</i> Stämmen	116
Tabelle 3.12: Gesamt-Übersicht zu den Charakteristika der untersuchten MRSA-Referenzstämme	117
Tabelle 4.1: Übersicht zur genetischen Ausstattung der MRSA-Referenzstämme	122

1 Einleitung

1.1 Mikrobiologie der Staphylokokken

Staphylokokken gehören zur Familie der *Staphylococcaceae* (Becker *et al.*, 2014a) und sind im Durchmesser 0,5 bis 1,5 μm große, grampositive, unbewegliche, nicht sporenbildende, fakultativ anaerobe Kugelbakterien, die sich in Tetraden, Trauben, Haufen oder paarig zusammenlagern, teilweise aber auch einzeln auftreten (Madigan *et al.*, 2003). Staphylokokken wachsen in einem breitem pH-Bereich von 4,8 bis 9,4, tolerieren Salzkonzentrationen von bis zu 10 % und überleben hohe Temperaturen (60 °C für 10 Min) (Crossley *et al.*, 2009). Bis heute sind 60 Spezies und Subspezies der Gattung *Staphylococcus* beschrieben (Lamers *et al.*, 2012). Die meisten Vertreter der Gattung *Staphylococcus* sind Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) mit geringer Virulenz, zu denen beispielsweise *S. epidermidis* (Otto, 2009) und *S. pettenkoferi* (Trülzsch *et al.*, 2002) gehören. Im Gegensatz dazu ist *S. aureus* Koagulase-positiv. *S. aureus* lässt sich aufgrund von Hämolyse und der Bildung von weiß bis orangegelb pigmentierten Kolonien meist leicht identifizieren (Bannerman, 2003). Besonders im klinischen Alltag spielt *S. aureus* eine große Rolle. Insbesondere die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen unter *S. aureus* stellt ein Problem bei der Behandlung von *S. aureus* Infektionen dar. Dabei liegen zum einen Stämme vor, die mit Ausnahme von Isoxazolyl-Penicillinen gegen Penicilline durch die Bildung einer Penicillinase resistent sind. Zum anderen existieren *S. aureus* Stämme, die zusätzlich gegen β -Laktamase-stabile β -Laktam-Antibiotika wie Isoxazolyl-Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme resistent sind und deshalb als Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) oder auch als Oxacillin-resistente *S. aureus* (ORSA) bezeichnet werden.

1.2 Epidemiologie und Pathogenese von *S. aureus*

Da *S. aureus* fakultativ pathogen ist, tritt es auch als gewöhnlicher Kommensale des Menschen auf. Es wird angenommen, dass bis zu einem Drittel der Bevölkerung permanent von *S. aureus* im Nasenvorhof kolonisiert ist, ohne Symptomatik aufzuweisen (Weidenmaier *et al.*, 2012). Ein

weiteres Drittel ist vorübergehend mit *S. aureus* besiedelt (Gorwitz *et al.*, 2008, Peacock *et al.*, 2001). Nur ein Drittel der Bevölkerung ist dauerhaft frei von *S. aureus* (Foster, 2004). Die unterschiedlichen Besiedlungsmuster hängen von einer Reihe individueller Faktoren wie Alter, Geschlecht, genetischen Faktoren (humanes Leukozyten-Antigen-System (HLA)-Muster), Grunderkrankungen (*Diabetes mellitus*, chronische Ekzeme, atopische Diathese) und Hospitalisierung ab (RKI, Stand 2014). Die bisher meist nosokomiale Übertragung findet entweder endogen, durch Hautkontakt mit infizierten Personen oder durch Kontakt mit kontaminierten Gegenständen statt (Chambers und Deleo, 2009). Oftmals werden neben der Nase und dem Nasenrachenraum insbesondere durch Autoinokulation auch der Pharynx, das Perineum und die Haut von Händen und Unterarmen kolonisiert, meist jedoch ohne eine Infektion auszulösen (Wertheim *et al.*, 2005). Wenn die natürliche Haut- oder Schleimhautbarriere allerdings z.B. durch einen operativen Eingriff, eine Wunde oder einen Katheter verletzt wird, kann *S. aureus* in den Wirt eindringen und eine lokal-oberflächliche, eine tief-invasive oder auch eine systemische Infektion hervorrufen (Kluytmans *et al.*, 1997). Einschränkungen der Immunabwehr begünstigen zusätzlich die Invasion und Ausbreitung des Erregers. Die häufigsten Krankheitsbilder sind Sepsis, Endokarditis, Furunkel und Karbunkel, Pneumonien, sowie abszedierende Weichteilprozesse und Osteomyelitis (Lowy, 1998).

1.3 Virulenzfaktoren von *S. aureus*

Um sich vor der Wirtsabwehr zu schützen, verfügt *S. aureus* über eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, die die Ausbreitung und Vermehrung der Bakterien im Wirt begünstigen. Dazu gehören neben den Adhäsinen und Invasinen, zytolytische Toxine (α -, β -, γ -Hämolysin, Pantone-Valentine Leukozidin), Superantigene (Enterotoxine, Toxic Shock Syndrome Toxin-1), Protein A (Bindung von Antikörpern an der Fc-Domäne), verschiedene Enzyme (Proteasen, Hyaluronidasen, Lipasen, Nukleasen) und Immunevasionsfaktoren (Staphylokinase, Aureolysin) (Bartlett und Hulten, 2010) (vgl. Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Virulenzfaktoren von *S. aureus* und deren Wirkung

Virulenzfaktor	Wirkung	Literatur
Oberflächenproteine und Adhäsine	Adhäsion an Polymeroberflächen und Gewebe	(Foster <i>et al.</i> , 2014)
Invasine (Leukozidin, Hyaluronidasen, Kinasen)	Invasion in Zellen	(Gravet <i>et al.</i> , 1998)
Protein A, Kapsel	Antiphagozytotisch	(Cedergren <i>et al.</i> , 1993, Deisenhofer, 1981, Peacock <i>et al.</i> , 2002)
Katalase	Überleben in Phagozyten	
Protein A, Koagulase, Clumping Factor	Evasion der Immunantwort des Wirtes	(Peacock <i>et al.</i> , 2002, Wertheim <i>et al.</i> , 2008)
Exotoxine: Hämolysine, Leukozidin, PVL (Panton Valentine Leukozidin), Leukotoxin, Enterotoxine, Superantigene	Zytotoxisch	(Gravet <i>et al.</i> , 1998, Kaneko und Kamio, 2004, Peacock <i>et al.</i> , 2002) (Peacock <i>et al.</i> , 2002, Prevost <i>et al.</i> , 1995)
Natürliche und erworbene Resistenzen gegen Antibiotika	Therapieresistenz	(Lim und Strynadka, 2002, Livermore, 2000)

1.3.1 Virulenzassoziierte Exoproteine

Für die Kolonisierung der Haut und Schleimhäute, sowie nach Invasion und Ausbreitung im Gewebe benötigen Infektionserreger Adhäsionsproteine (Foster *et al.*, 2014). Diese können zellspezifisch wirken oder die Interaktion mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) vermitteln. Zusätzlich werden auch virulenz-assoziierte Proteine sezerniert, die enzymatische Aktivität haben (Lipasen, Proteasen) oder Wirtsproteine aktivieren (z.B. Koagulase, Coa). Bei *S. aureus* wird die Adhäsion durch verschiedene Exoproteine vermittelt, die sich in zwei Gruppen einteilen lassen: Sekretierte, Zellwand-verankerte und sekretierte/oberflächenassoziierte Proteine (vgl. Tabelle 1.2). Die Gruppe der Zellwand-verankerten Proteine wird auch als „*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*“ (MSCRAMMs) bezeichnet (Chavakis *et al.*, 2005, Foster *et al.*, 2014). Sie werden entweder über ein C-terminales LPXTG-Aminosäuren-Motiv Sortase-vermittelt oder über einen Lipidanker mit dem Peptidoglykan der Zellwand verankert (Schneewind und Missiakas, 2012). Die exponierten Proteindomänen können mit unterschiedlichen Komponenten des Wirts interagieren, wie z.B. mit Fibronectin und Fibrinogen.

Bisher wurden 21 MSCRAMMS beschrieben, zu denen die Fibronectin-bindenden Proteine A (FnbpA) und B (FnbpB), die Fibrinogen/Fibrin-bindenden Proteine (ClfA, ClfB) und das Kollagen-bindende Protein (Cna) gehören (Foster *et al.*, 2014). Ein weiteres verankertes Protein ist das *Staphylococcus* Protein A (Spa), das IgG an der Fc-Region bindet. Diese Art der Antikörperbindung verhindert die Opsonierung und anschließende Phagozytose von *S. aureus* durch Neutrophile (Cedergren *et al.*, 1993, Falugi *et al.*, 2013, Kobayashi und DeLeo, 2013). Die Gruppe der sekretieren/oberflächenassoziierten Adhäsine wird als „*secretable expanded repertoire adhesive molecules*“ (SERAMs) bezeichnet. Die Proteine dieser Gruppe werden alle aus der Zelle sekretiert und bleiben entweder über nicht-kovalente Bindungen mit der Zellwand assoziiert oder sie werden in den Kulturüberstand abgegeben. Zu den SERAMs zählen Fibrinogen/Fibronectin-bindende Proteine, wie das extrazelluläre Adhärenzprotein (Eap), das extrazelluläre Matrix-bindende Protein (Emp) und das extrazelluläre Fibrinogen-bindende Protein (Efb) (Chavakis *et al.*, 2005, Hussain *et al.*, 2001). Darüber hinaus gehören die Prothrombin-aktivierenden Proteine Von-Willebrand-Faktor-bindende Protein (vWbp) und Koagulase (Coa) zur Gruppe der SERAMs (Bjerketorp *et al.*, 2004, Friedrich *et al.*, 2003). vWbp und Coa können die Fibrinbildung im Wirt steuern, indem sie an die N-terminale Domäne des Prothrombins binden. Dadurch kann die Thrombinprotease gezielt im Sinne des Erregers aktiviert werden. Das gebildete Fibrinnetz umschließt die Bakterien, wodurch diese vom Immunsystem des Wirts schwer erkannt werden können. Auf diese Weise wird die intrinsische Koagulationskaskade umgangen, die normalerweise bei Kontakt mit Bakterien aktiviert wird (Frick *et al.*, 2007). Bei der intrinsischen Kaskade sind im Gegensatz zur Fibrinbildung durch vWbp oder Coa eine Vielzahl an Koagulationsfaktoren (XII, XI, IX, VIII und V) beteiligt. Diese aktivieren den zentralen Faktor X, wodurch Prothrombin in seine aktive Form Thrombin umgewandelt wird. Thrombin ist schließlich für die Konversion von Fibrinogen zu Fibrin verantwortlich (Adams und Bird, 2009). Durch den Umbau des Moleküls wird eine Verlängerung und laterale Aggregation des Fibrins möglich, wodurch sich ein Fibrinnetz bildet (Ariens, 2013), das die Bakterien umgibt und deren Ausbreitung verhindert.

1.3.2 Toxine

Wie in Tabelle 1.1 (S. 3) aufgeführt, verfügt *S. aureus* über eine Vielzahl von Exotoxinen, die zur Virulenz beitragen. Die als Superantigen wirkenden Staphylokokken-Enterotoxine (SEA bis SEE

und SEG bis SEI) spielen aufgrund ihrer Hitzestabilität bei Lebensmittelvergiftungen eine große Rolle (Pinchuk *et al.*, 2010). Ein weiteres Exotoxin von *S. aureus* ist das TSST-1, das ebenfalls als Superantigen wirkt. Durch die als Superantigen wirkenden Toxine werden Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen zu einer massiven Ausschüttung an Zytokinen veranlasst. Die klassische T-Zellaktivierung erfolgt antigenvermittelt, bei der Antigen-präsentierende Zellen (APZ) aufgenommene Antigene mithilfe von Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC) Klasse II-Molekülen den Antigen-spezifischen T-Zellrezeptoren der T-Zellen präsentieren. Diese Interaktion führt zur T-Zellaktivierung mit nachfolgender Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Die als Moduline fungierenden Toxine stellen als „Brückenproteine“ die Vernetzung von MHC II und T-Zellrezeptor her und verursachen einen Antigen-unspezifischen Kontakt zwischen APZ und T-Zelle (Ortega *et al.*, 2010), wodurch T-Zellen aktiviert werden, was zur Beteiligung von bis zu 10 % der gesamten T-Zellpopulation entsprechen kann (Boehnke und Zollner, 1999). Dies führt aufgrund der großen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen meist zu hohem Fieber mit vaskulärer, myokardialer und pulmonaler Beteiligung bis hin zum toxischen Schock.

Die bei *S. aureus* Infektionen auftretenden rezidivierenden Abszesse (chronische Staphylokokken-Infektionen, „Furunkulosen“) und nekrotisierender Pneumonien bzw. nekrotisierender Faszitiden sind mit der Produktion des Panton-Valentine Leukozidin (PVL) assoziiert und wurde erstmals 1932 in London von Panton und Valentine beschrieben. Neben porenbildenden Zytolysinen wie α -, β - oder γ -Toxin, ist das PVL ein sehr gut untersuchtes Toxin von *S. aureus*, auch wenn dieses nur von wenigen *S. aureus* Stämmen gebildet wird. PVL ist in erster Linie für neutrophile Granulozyten zytotoxisch, etwas weniger für Monozyten und Makrophagen und nicht toxisch für Lymphozyten (Panton *et al.*, 1932). Die molekulare Ursache für die toxische Selektivität von PVL gegenüber manchen Zelltypen ist jedoch noch nicht geklärt. PVL wird durch einen Prophagen kodiert und stellt ein Zwei-Komponenten porenbildendes Exotoxin dar, das aus den Protein-Untereinheiten LukS-PV und LukF-PV besteht (Diep *et al.*, 2006, Panton *et al.*, 1932). Die Bindung von LukS-PV an die Zellwand von Immunzellen, führt die weitere Bindung von LukF-PV und LukS-PV herbei, bis sich ein Hetero-Oktamer bildet, das sich 1:1 aus LukF-PV und LukS-PV zusammensetzt und schließlich eine Pore in der Membran der betroffenen Zelle bildet. Durch den unkontrollierten Efflux von Kaliumionen bzw. Influx von Kalziumionen wird die Lyse der Zelle verursacht (Jayasinghe und Bayley, 2005).

1.3.3 Regulation von *S. aureus* Exoproteinen

Eine Vielzahl an Virulenzfaktoren wird durch Zwei-Komponenten-Systeme reguliert. Gut untersuchte Beispiele für Zwei-Komponenten-Systeme in *S. aureus* sind das SaeRS- und das „*accessory gene regulator*“ (*agr*)-Regulationssystem, die die u.a. die Produktion von Coa, alpha-Hämolyisin (Hla), extrazellulärem Adhärenzprotein Eap und Fibronektin-bindenden Proteine regulieren. Das SaeRS-Regulationssystem wird vom *sae*-Operon kodiert, das aus vier Genen besteht: *saeP*, *saeQ*, *saeR* und *saeS* (Giraud *et al.*, 1999). Bei den Proteinen SaeP und SaeQ handelt es sich um ein Lipoprotein bzw. ein Membranprotein, deren Funktionen noch nicht eindeutig geklärt sind. Das *saeS*-Gen kodiert für eine Histidinkinase (HK), die im aktivierten Zustand SaeR phosphoryliert. SaeR ist ein „*response regulator*“ (RR)-Protein, das im phosphorylierten Zustand die Transkription einer Vielzahl an Zielgenen steuert (Bronner *et al.*, 2004). Bei den Zielgenen wird zwischen Klasse I-Genen, zu denen *coa*, *fnbpA*, *emp* und *eap* gehören und Klasse II-Gene (z. B. *hla* und *hly*) unterschieden. Zur Expression von Genen der Klasse I muss ein hohes Level an phosphoryliertem SaeR (SaeR-P) vorliegen, während für die Expression von Klasse II-Genen ein niedriges Level an SaeR-P ausreicht. SaeR-P bindet zudem an Promotor 1 (P1), wodurch die Transkriptionsrate des *saePQRS* Operons steigt. Durch die vermehrte Produktion an SaeP und SaeQ wird auf bisher ungeklärte Weise die Phosphorylierung von SaeR durch SaeS verhindert (Jeong *et al.*, 2011). Das *saeS*-Gen von *S. aureus* Newman weist im Kodon 18 eine Punktmutation auf, die einen Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin verursacht. Diese Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivität von SaeS, wodurch das *saePQRS* Regulationssystem ständig aktiv ist. Dadurch steigt auch die Transkriptionsrate der Zielgene (Klasse I und II) (Mainiero *et al.*, 2010), wodurch insbesondere in der exponentiellen Wachstumsphase vermehrt Virulenzfaktoren (z.B. Exoproteine) gebildet werden (Harraghy *et al.*, 2005).

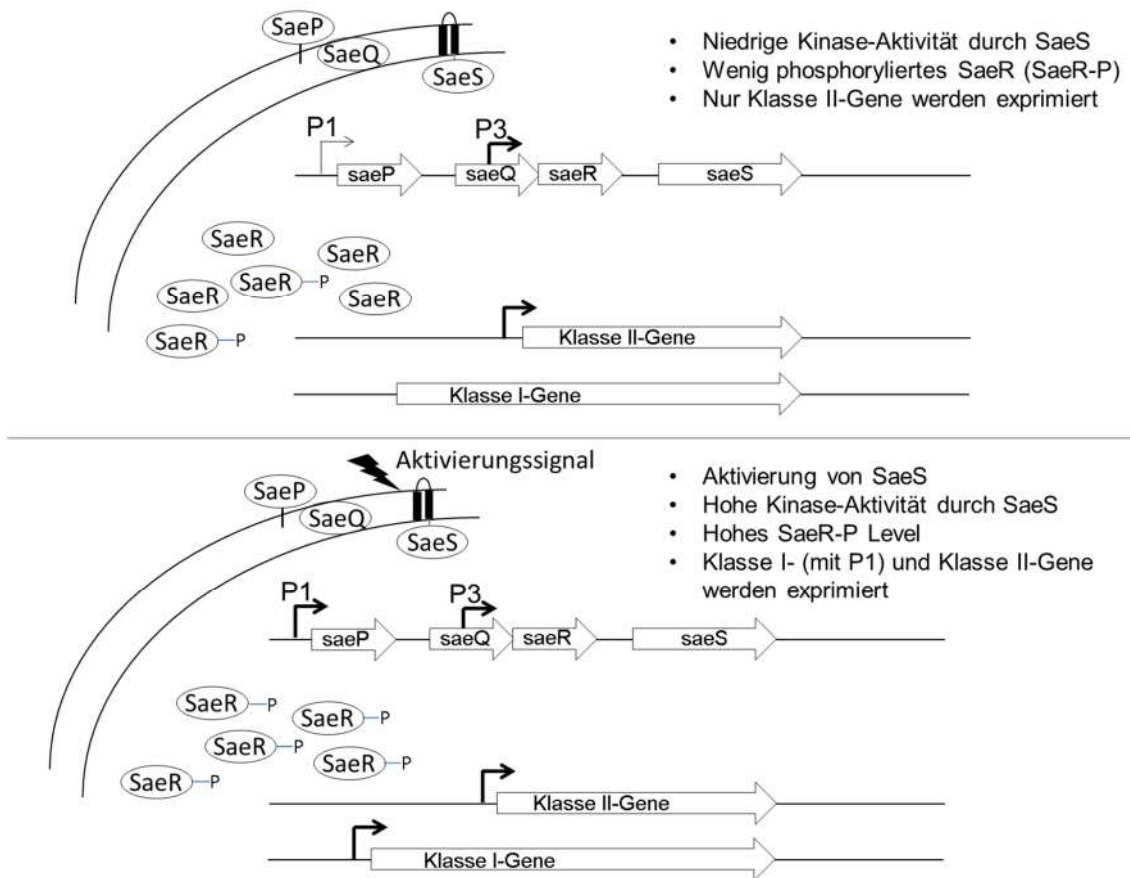


Abbildung 1.1: Übersicht zum Aufbau und zur Signaltransduktion des Zwei-Komponenten Systems SaeRS

Im inaktivierten Zustand wird *saeRS* vom Promotor 3 (P3) transkribiert. SaeS hat im inaktivierten Zustand nur geringe Kinase-Aktivität, weshalb nur geringe Mengen an SaeR-P vorliegen. Es werden nur Klasse II-Gene exprimiert. Durch Aktivierung von SaeS (z. B. durch subinhibitorische Konzentrationen von β -Laktam-Antibiotika) steigt die Anzahl an SaeR-P. Die Folge ist eine vermehrte Expression von Klasse I-, Klasse II-Genen und des *saePQRS*-Operons (durch Promotor 1 (P1)).

Das *agr*-Regulationssystem setzt sich aus zwei divergenten Transkriptionseinheiten zusammen, die durch die Promotoren 2 (P2) bzw. 3 (P3) gesteuert werden. P2 kodiert für *agrB*, *agrD*, *agrC* und *agrA*, deren Transkription für die Aktivierung von P3 nötig ist (Abbildung 1.2). AgrD wird durch das Membranprotein AgrB modifiziert und exportiert. Extrazelluläres AgrD fungiert als „*autoinducing peptide*“ (AIP). Sobald ein Schwellenwert an AIP überschritten ist, wird die Membran-assoziierte Histidin-Kinase AgrC aktiviert, die einen Phosphatrest auf den „*response regulator*“ AgrA überträgt (Bronner *et al.*, 2004). Im phosphorylierten Zustand bindet AgrA an die Zielpromotoren P2 und P3, wodurch die Expression des *agrABCD*-Operons bzw. der RNAIII

induziert wird. RNAIII imitiert die Produktion von Toxinen (z. B. α -Toxin, β -Hämolyisin, TSST-1), während die Produktion von Oberflächenproteinen wie Protein A, Koagulase und Fibronektin-bindenden Proteinen reprimiert wird (Novick und Jiang, 2003).

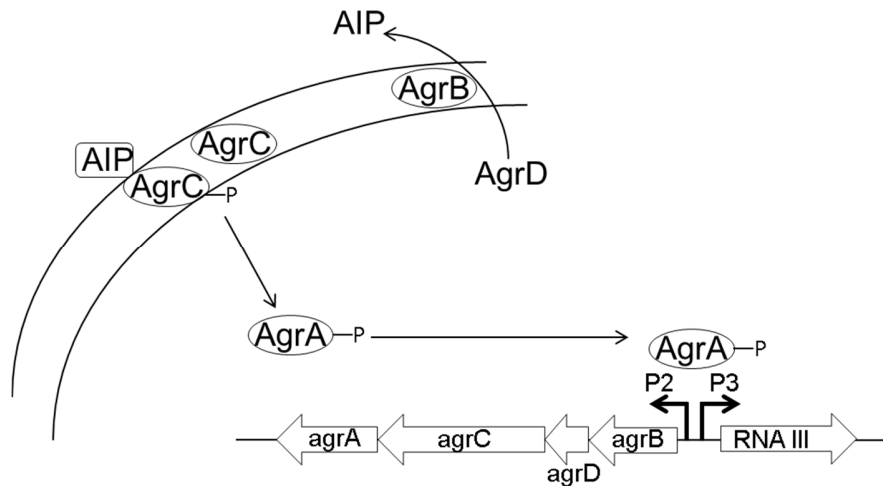


Abbildung 1.2: Übersicht zum Aufbau und zur Signaltransduktion im *agr*-Regulationssystem

Das *agr*-Regulationssystem wird durch die Promotoren 2 (P2) bzw. 3 (P3) gesteuert werden. P2 kodiert für vier Gene: *agrB* (Membranprotein zum Export von AgrD), *agrD* (im modifizierten Zustand ein „autoinducing peptide“ (AIP)), *agrC* (Membran-assoziierte Histidin-Kinase) und *agrA* („response regulator“, der die Transkription der durch P2 und P3 gesteuerten Gene aktiviert). Wenn ein Schwellenwert an AIP erreicht ist (bei hoher Zelldichte), wird durch Bindung von AIP an AgrC die Trans-Phosphorylierung des Histidins am AgrC ausgelöst. Durch Übertragung des Phosphatrests von AgrC auf AgrA verändert sich die Konformation von AgrA, so dass eine Bindung an P2 bzw. P3 ermöglicht wird. Die Expression von RNAIII wird durch P3 initiiert und führt zur Produktion von Exotoxinen. Die Produktion von Oberflächenproteinen (z. B. SERAM-Proteine) wird reprimiert.

EINLEITUNG

Tabelle 1.2: Übersicht der Exoproteine von *S. aureus*

Sekretierte-zellwandverankerte Proteine (MSCRAMMs)	Protein-bezeichnung	Zielstruktur des Wirts	Literatur
Fibronektin bindendes Protein A und B	FnBPA, FnBPB	Fibronektin, Fibrinogen	(Roche <i>et al.</i> , 2004, Wann <i>et al.</i> , 2000)
Kollagen bindendes Adhäsion	Cna	Kollagen Typ I und IV	(Patti <i>et al.</i> , 1992, Symersky <i>et al.</i> , 1997, Zong <i>et al.</i> , 2005)
<i>S. aureus</i> Oberflächenprotein	Sas	extrazelluläre Matrix	
Clumping Faktor A und B	ClfA, ClfB	Fibrinogen	(McDevitt <i>et al.</i> , 1994, McDevitt <i>et al.</i> , 1997)
<i>S. aureus</i> Protein A	Spa	F _c -Teil von Immunglobulinen, vWF, TNF α -Rezeptor 1	(Hartleib <i>et al.</i> , 2000, Uhlen <i>et al.</i> , 1984)
Sekretierte/oberflächen-assoziierte Proteine (SERAMs)			
Koagulase	Coa	Prothrombin, Fibrinogen	(Burlak <i>et al.</i> , 2007, Watanabe <i>et al.</i> , 2009, Watanabe <i>et al.</i> , 2005)
Extrazelluläres Fibrinogen bindendes Protein	Efb	Fibrinogen Komplement Faktor C3	(Lee <i>et al.</i> , 2004, Palma <i>et al.</i> , 1998)
Extrazelluläres Fibrinogen bindendes Protein	Efb	Fibrinogen	(Boden und Flock, 1994)
Extrazelluläre Matrix bindendes Protein	Emp	Fibrinogen, Fibronektin, Kollagen	(Hussain <i>et al.</i> , 2001)
Extrazelluläres Adhäsionsprotein	Eap	Fibrinogen, Fibronektin, Prothrombin, eukaryotische Zelloberflächen, Staphylokokken-Zellen	(Hussain <i>et al.</i> , 2008, Scriba <i>et al.</i> , 2008)
Von Willebrand Faktor bindendes Protein	vWbp	Von-Willebrand-Faktor (vWF), Prothrombin	(Bjerketorp <i>et al.</i> , 2002)

1.4 *S. aureus* Zellwandsynthese

Die Zellwand von *S. aureus* enthält eine dicke Peptidoglykanschicht, die auch Mureinschicht genannt wird. Peptidoglykanvorläufer zum Aufbau der Zellwand bestehen aus dem Disaccharid-Pentapeptid N-Acetylglukosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (MurNAc). Essentiell für die Zellwandbiosynthese von *S. aureus* sind vier Penicillinbinde-Proteine (PBP), die in der zytoplasmatischen Membran der bakteriellen Zellwand verankert sind (Reynolds, 1988) und in vielen Mikroorganismen die letzten Schritte der Peptidoglykan-Biosynthese und –Quervernetzung katalysieren (s. Abbildung 1.3). Generell sind PBP extrazelluläre, an der äußeren Seite der zytoplasmatischen Membran verankerte Enzyme, die aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten zur Familie der ASPRE („*active-site serine penicillin recognizing enzymes*“) zusammengefasst werden (Frere et al., 1988). Diese lassen sich wiederum in zwei große Gruppen einteilen: Niedermolekulare (LMW, „*low molecular weight*“) PBPs und hochmolekulare (HMW, „*high molecular weight*“) PBPs (Joris et al., 1988). Ein Merkmal dieser Proteinfamilie ist die einzigartige Signatur drei konservierter Aminosäuremotive. Motiv 1 besteht aus SXXK, mit einem Serin im aktiven Zentrum. Motiv 2 besteht aus (S/Y)X(N/C) und Motiv 3 aus (K/H)(T/S)G. Diese drei Motive treten in der Primärstruktur aller Mitglieder dieser Familie in der aufgeführten Reihenfolge und mit ähnlichem Abstand zueinander auf. Nach Faltung werden diese Motive in räumliche Nähe zueinander gebracht und bilden ein katalytisch aktives Zentrum (Ghuysen, 1997, Kelly et al., 1998). Allen PBPs gemeinsam ist die Quervernetzung der Glykanketten über ihre Pentapeptide durch Transpeptidase-Aktivität (Izaki et al., 1968, Strominger et al., 1967). Die Aufgabe von PBP2 besteht darüber hinaus darin, bestehende Glykanketten, die sich abwechselnd aus N-Acetylglukosamin und N-Acetylmuraminsäure zusammensetzen, durch Transglykosidase-Aktivität zu verlängern. In *S. aureus* kommen insgesamt vier PBPs (PBP1-4) vor. Methicillinresistente Stämme enthalten zusätzlich das PBP2a, das zu den HMW-PBP der Klasse B gehört und in Abschnitt 1.6.2, S. 19 näher beschrieben wird. PBP4 (45 kDa) ist das einzige LMM-PBP ist. PBP4 ist über den C-Terminus in der Zellmembran verankert und besitzt nur Transpeptidase-Aktivität (Wyke et al., 1981). Alle anderen PBPs besitzen neben der Transpeptidase-Aktivität noch andere enzymatische Eigenschaften (z.B. PBP2 mit Transglykosidase-Aktivität) und sind N-terminal in der Zytoplasmamembran verankert (Ghuysen, 1990). Die C-terminale Domäne der

HMM-PBPs, PBP1 (85 kDa), PBP2 (81 kDa) und PBP3 (75 kDa) besitzt wie die von PBP4 Transpeptidase-Aktivität mit Penicillin-binde Eigenschaften. Die Bindung von Penicillinen an die Transpeptidase hängt damit zusammen, dass β -Laktam-Antibiotika Strukturanaloga von dem Substrat der Transpeptidase, dem D-Ala-D-Ala-Rest sind. Da die β -Laktam-Antibiotika und der D-Ala-D-Ala-Rest an derselben Position eine Amidbindung besitzen, kommt es zur chemischen Bindung der β -Laktam-Antibiotika an das aktive Serin der PBPs. Nach Spaltung des β -Laktam-Rings entsteht ein stabiles, schlecht hydrolysierbares Azylenzym, dessen aktives Zentrum blockiert ist (Tipper und Strominger, 1965). Die bakteriellen Zellwandkomponenten werden zwar weiter gebildet, aber nicht mehr quervernetzt (Wise und Park, 1965). Im Gegensatz zu LMM-PBPs sind PBP1, PBP2 und PBP3 auch an der N-terminalen Domäne enzymatisch aktiv, auf die die Bindung von β -Laktam-Antibiotika keinen Einfluss nimmt. Auf diese Weise wird nur die Transpeptidase-Aktivität von β -Laktam-Antibiotika inhibiert, während die N-terminale Transglykosidase von PBP2 nicht betroffen ist (Herzberg und Moul, 1987). Je nach Funktionseigenschaften des N-Terminus werden die HMM PBPs in Klasse A und Klasse B unterschieden. Während PBPs der Klasse A, zu denen PBP2 gehört, am N-Terminus eine Glykosyltransferase besitzen, spielt der N-Terminus von PBPs der Klasse B (PBP1, PBP3) eine Rolle in der Zellmorphogenese. Mit welchen Proteinen dabei genau Interaktionen bestehen, ist bisher allerdings noch unklar.

PBP3 scheint, wie PBP4, kein essentielles Protein zu sein, da Mutanten weder verlangsamtes Wachstum, noch eine Veränderung der Zellwand oder Abnahme der Methicillin-Resistenz aufweisen (Curtis *et al.*, 1980, Pinho *et al.*, 2000). Möglicherweise übernimmt PBP1, die Funktion von PBP3, wie dies beispielweise für PBP1A und PBP1B in *E. coli* nachgewiesen wurde (Spratt und Jobanputra, 1977). PBP1 und PBP2 scheinen hingegen für das Wachstum von *S. aureus* essentiell zu sein (Pereira *et al.*, 2009, Pinho *et al.*, 2001).

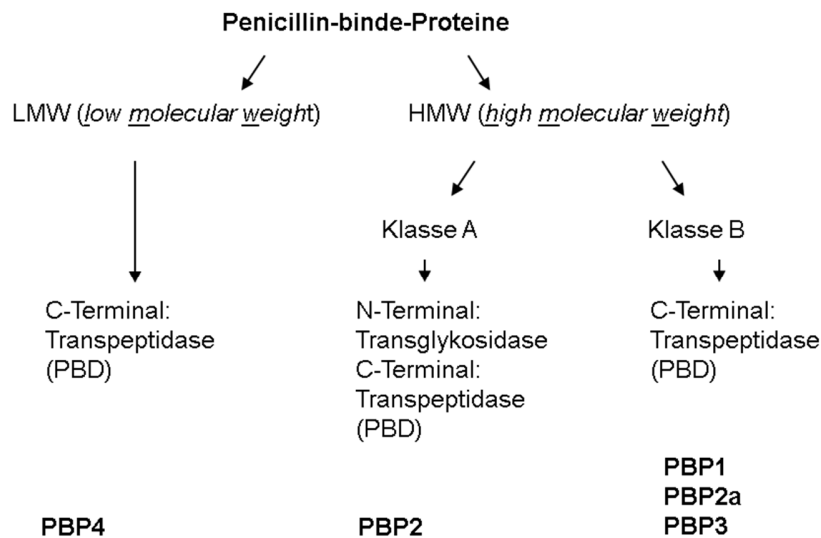


Abbildung 1.3: Einteilung und Charakteristika der Penicillin-binde-Proteine (PBPs) von *S. aureus* (PBD: Penicillin-binde Domäne).

1.5 Auftreten und Unterscheidung von MRSA-Stämmen in Deutschland

MRSA-Stämme unterscheiden sich von anderen *S. aureus* Stämmen darin, dass sie ein „*Staphylococcal cassette chromosome*“ (SCC) *mec*-Element erworben haben, auf dem u.a. das *mecA*-Gen liegt, welches das Penicillin-binde-Protein (PBP) 2a kodiert. PBP2a (78 kDa) hat eine sehr niedrige Affinität zu β -Laktam-Antibiotika und vermittelt deshalb Resistenz gegen diesen Antibiotikatyptyp (siehe Abschnitt 1.6.2, S. 19). Laut „*European Center for Disease Prevention and Control*“ (ECDC) waren 2012 in Deutschland 15,4 % der *S. aureus* Isolate Methicillin-resistent. Das Auftreten von MRSA in Europa variiert zwischen den einzelnen Ländern stark. Im Allgemeinen liegt der prozentuale Anteil an MRSA in nördlich gelegenen Ländern niedriger, als in südlichen oder süd-östlichen Ländern (vgl. Abbildung 1.4), wobei der Durchschnittsanteil bezogen auf die Bevölkerungszahl 2012 bei etwa 17,8 % lag (ECDC, Stand März 2014). Zur Einteilung in MRSA-Linien wird die Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) angewandt, bei der sieben Haushaltsgene sequenziert werden. Verschiedene Sequenzen sprechen für verschiedene Allele des jeweiligen Haushaltsgens (Palavecino, 2007), so dass sich für jeden Stamm ein bestimmtes Allelprofil bzw. ein bestimmter Sequenztyp (ST) ergibt, wodurch jeder Stamm charakterisiert werden kann (detaillierte Beschreibung zur MLST siehe Abschnitt 1.8.1, S. 25).

Basierend auf Daten des Robert Koch Instituts in Berlin treten in deutschen Krankenhäusern bestimmte klonale MRSA-Sequenztypen häufiger auf als andere. So kommen die Sequenztypen ST22 („Barnim-Epidemiestamm“) und ST225 („Rhein Hessen-Epidemiestamm“) im gesamten Bundesgebiet häufiger als MRSA vom Sequenztyp ST8, ST45 („Berliner-Epidemiestamm“) und ST228 („Süddeutscher-Epidemiestamm“) vor (RKI, 2013). Der Sequenztyp ST239 („Wiener-Epidemiestamm“) kommt in Deutschland zwar nur selten vor, ist aber weltweit gesehen weit verbreitet und besitzt im Vergleich zu anderen auftretenden Stämmen ein breites Resistenzspektrum. Vor 1990 wurden die meisten MRSA von hospitalisierten Patienten indiziert, weshalb man von „*hospital-acquired*“ (HA) MRSA-Stämmen spricht, während in den Jahren danach auch vermehrt MRSA-Infektionen auftraten, ohne dass Patienten vorher Kontakt zu medizinischen Einrichtungen hatten. Bei solchen Stämmen spricht man von „*community-acquired*“ (CA) MRSA-Stämmen. Seit einigen Jahren werden als dritte Quelle von MRSA landwirtschaftliche Betriebe genannt, was zum Terminus „*livestock-associated*“ (LA) MRSA geführt hat (Wendlandt *et al.*, 2013).

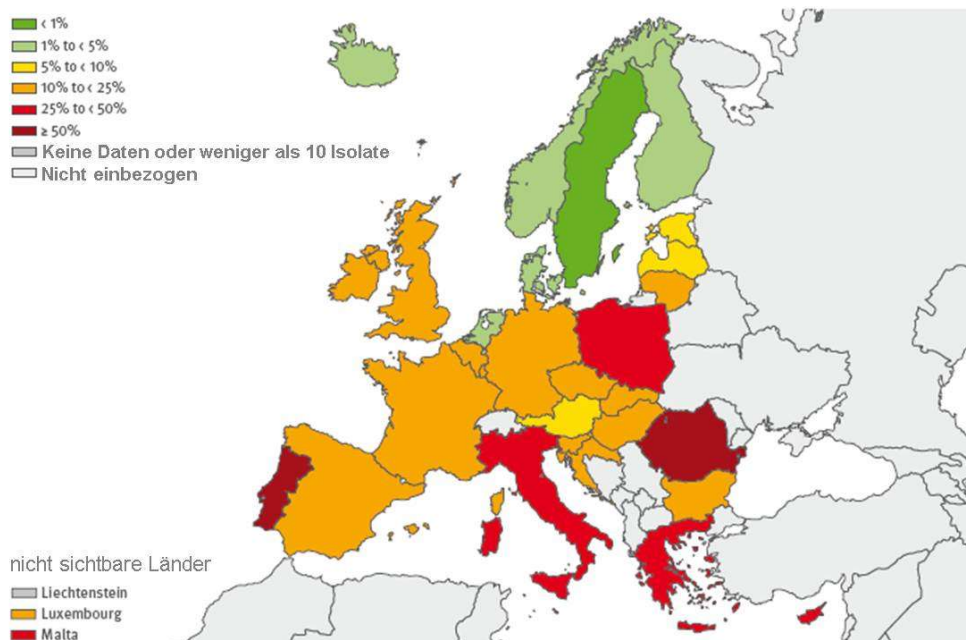


Abbildung 1.4: Anteil invasiver *S. aureus* Isolate mit Methicillin-Resistenz im Jahr 2012 nach EU-Ländern
Angaben in %. (ECDC, Stand März 2014).

1.5.1 “Community-“ und “hospital-acquired” MRSA (CA-MRSA und HA-MRSA)

Der erste CA-MRSA wurde Anfang der 1990er Jahre identifiziert, wobei vermutet wird, dass sich dieser und andere CA-MRSA-Stämme aus unterschiedlichen Vorläufer-Stämmen entwickelt haben und nicht der Klon eines einzigen HA-MRSA-Stamms sind (Udo *et al.*, 1993). Seit Anfang der 1990er Jahre treten MRSA-Infektionen in Deutschland immer häufiger auch außerhalb von Krankenhäusern auf (Layer, 2012), weshalb es aus klinisch-epidemiologischer Sicht sinnvoll ist, zwischen HA-MRSA und CA-MRSA zu unterscheiden (Robert Koch Institut). Ein MRSA-Stamm von einem Patienten, der zu einem Zeitpunkt isoliert wurde, zu dem sich der Patient nicht oder kürzer als 72 Stunden in einem Krankenhaus aufgehalten hat, wird als CA-MRSA definiert. Zudem darf der Patient im Jahr vor der Infektion keinen Krankenhausaufenthalt, keine Operation, Hämo- oder Peritonealdialyse, Katheterbehandlung oder andere medizinische subkutane Anwendungen gehabt haben (RKI, 2013). Durch die verkürzte Generationszeit und erhöhte Virulenz der meisten CA-MRSA gegenüber HA-MRSA stellen CA-MRSA-Stämme eine größere Gefahr dar, auch wenn CA-MRSA-Stämme im Gegensatz zu HA-MRSA bisher noch weitestgehend gegen Nicht- β -Laktam-Antibiotika empfindlich sind. CA-MRSA-Stämme unterscheiden sich nicht nur phäno- sondern auch genotypisch von HA-MRSA-Stämmen (vgl. Tabelle 1.3). Während HA-MRSA-Stämme im Allgemeinen zu einem der SCCmec-Typen I-IV gehören, moderate Mengen an Enterotoxinen, PSM (*Phenol-Soluble Modul*in) und TSST-1 sezernieren, tragen CA-MRSA-Stämme meist eine SCCmec-Kassette vom Typ IV oder V und produzieren erhöhte Mengen an Toxinen (vgl. Tabelle 1.3). Der Grund hierfür liegt darin, dass das Agr („*accessory gene regulator*“) Zwei-Komponenten System eine Vielzahl an Virulenzfaktoren reguliert, zu denen u.a. PSMs, aber auch Adhäsionsproteine zählen und CA-MRSA im Vergleich zu HA-MRSA eine höhere Agr-Aktivität aufweisen (Li *et al.*, 2009, Queck *et al.*, 2009). Zudem besitzen CA-MRSA-Stämme häufig die co-transkribierten Gene *lukF-PV* und *lukS-PV*, die für das Panton-Valentine Leukozidin (PVL) kodieren (Vandenesch *et al.*, 2003). Die von diesen Genen kodierten Toxine lysieren humane neutrophile Granulozyten und sind verantwortlich für die speziellen Krankheitsbilder, wie Haut- und Weichgewebsabszesse, sowie nekrotisierende Pneumonien (Labandeira-Rey *et al.*, 2007). Die für HA-MRSA typischen Manifestationen wie Osteomyelitis, Sepsis und Endokarditis kommen bei CA-MRSA-Infektionen hingegen eher selten vor (Zimmerli, 2005). An medizinischer Bedeutung hat der CA-MRSA-Stamm USA300 gewonnen, der sich

aufgrund seiner genetischen Ausstattung weit verbreiten konnte. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf Gene, die auf dem ACME („*arginine catabolic mobile element*“) liegen und bisher nur im Stamm USA300 nachgewiesen werden konnten (Diep *et al.*, 2008). Da Arginin von Makrophagen und anderen Phagozyten zur Synthese von Stickstoffmonoxid-Radikalen zur Abwehr von Bakterien benötigt wird, könnten Arginin-metabolisierende Bakterien einen Vorteil haben. Ein entscheidendes Gen für die weite Verbreitung von Stamm USA300 könnte zudem das *speG*-Gen sein, das eine Spermidin N-Acetyltransferase kodiert (Joshi *et al.*, 2011). Während andere *S. aureus* Stämme sensitiv auf Polyamine wie Spermidin reagieren, kann der CA-MRSA-Stamm USA300 die vom Menschen gebildeten Polyamine mithilfe des SpeG Proteins detoxifizieren und somit das Überleben von USA300 auf der menschlichen Haut begünstigen.

Tabelle 1.3: Vorkommen von virulenz- und fitnessassoziierten Eigenschaften in CA-MRSA und HA-MRSA

Faktor	Funktion	Vorkommen
<i>Virulenzfaktoren</i>		
α -Toxin	Zytolysin	In allen CA-MRSA; erhöhte Produktion im Vergleich zu HA-MRSA
PSM α Peptide	Zytolysin, Leukozidin	Alle CA-MRSA; erhöhte Produktion im Vergleich zu HA-MRSA
PVL	Zytolysin, Leukozidin	Manche CA-MRSA (mit USA300)
Zwei-Komponenten-System <i>agr</i>	Virulenzregulator	In allen CA-MRSA; erhöhte Produktion im Vergleich zu HA-MRSA
<i>Fitness</i>		
SpeG	N-Spermidin-Acetyltransferase: Detoxifizierung von wirtseigenen toxischen Polyaminen	Nur in CA-MRSA Stamm USA300
ACME	Arginin Abbau, Verhinderung der NO-Radikal Bildung	Nur in CA-MRSA Stamm USA300

Nach Otto, 2013

1.5.2 “Livestock-associated” (LA)-MRSA–ST398

Die ersten bekannten Fälle von MRSA-besiedelten Nutztieren traten in Schweinen auf und gehörten zum bis dahin eher seltenen Sequenztyp ST398, der auch als CC398 oder Schweine-MRSA bezeichnet wird (Armand-Lefevre *et al.*, 2005, Voss *et al.*, 2005). Später wurde der MRSA-Stamm ST398 auch in anderen Ländern und anderen Zuchttieren nachgewiesen. Die Kolonisierung mit MRSA ST398 wurde auch beim Menschen nachgewiesen, wie Studien mit Personen zeigten, die in nahem Kontakt mit Schweinen arbeiten (Armand-Lefevre *et al.*, 2005). Wie in Schweinen verläuft eine Kolonisierung mit MRSA ST398 auch beim Menschen meist ohne Infektion. In einzelnen Fällen wurden jedoch sowohl in Schweinen als auch bei Menschen mit Abwehrschwäche Infektionen durch LA-MRSA nachgewiesen (Kadlec *et al.*, 2009, Lozano *et al.*, 2011). Studien belegen, dass auch bei kurzzeitigem Kontakt mit MRSA ST398 kolonisierten Schweinen oder Kälbern, diese ST398-Stämme auf den Menschen übertragen werden können. Bleibt es jedoch bei einem bis wenigen Kontakten, ist MRSA ST398 häufig nach 24 h nicht mehr nachweisbar (van Cleef *et al.*, 2011). Die Herkunft des landwirtschaftlich-assoziierten MRSA-Stamms wurde anhand von 89 ST398 Isolaten von Tieren und Menschen aus 19 Ländern von vier Kontinenten untersucht. Vermutlich stammt der LA-MRSA-Stamm ST398 von einem humanen MSSA-Stamm ab, der bei Übertragung vom Menschen auf Nutztiere die humanspezifischen, phagenvermittelten Virulenzgene verloren und Methicillin- und Tetrazyklin-Resistenzgene erworben hat (Price *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu CA-MRSA tragen LA-MRSA in der Regel keine Gene für PVL oder TSST-1 und nur selten Enterotoxin-Gene. Multiresistenzen konnten allerdings auch in LA-MRSA-Stämmen nachgewiesen werden (Argudin *et al.*, 2011, Fessler *et al.*, 2010, Kadlec *et al.*, 2009).

1.6 Antibiotika und Resistenzmechanismen

Mehr als 95 % der *S. aureus* Isolate haben derzeit eine Penicillinase vermittelte Resistenz (Lowy, 2003). Methicillin- bzw. multiresistente *S. aureus* treten in ca. 20 % aller klinischen *S. aureus* Isolate auf (RKI, 2013). Die Transkription der Gene, die für Penicillin-Resistenz (*blaZ* → BlaZ) und für Methicillin-Resistenz (*mecA* → PBP2a) verantwortlich sind, wird von den Regulationssystemen BlaR1-BlaI und MecR1-MecI kontrolliert (siehe Abbildung 1.5, S. 18 und Abbildung 1.6, S. 21) (Clarke und Dyke, 2001, Hiramatsu *et al.*, 1992). Diese beiden Systeme, die

sich in besonderer Weise in ihrer Struktur und Funktion ähneln, werden im Folgenden näher dargestellt.

1.6.1 Mechanismus und Regulation der Penicillin-Resistenz: β -Laktamase

Bevor die ersten Antibiotika entwickelt wurden, lag die Mortalität von Patienten, mit systemischer *S. aureus* Infektion (Pneumonie, Sepsis, u.a.) bei ca. 80 % (Skinner und Keefer, 1941). Durch einen Zufall entdeckte der schottische Bakteriologe Alexander Fleming 1928, dass Kulturen des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* eine bakterizide Substanz produzieren. Fleming nannte die Substanz Penicillin, das damit zu den erst beschriebenen Antibiotika gehört (Fleming, 1929). Mit dem klinischen Einsatz von Penicillin um 1940 konnte die Sterblichkeitsrate von *S. aureus* Infektionen vorerst drastisch reduziert werden, da über 94 % der Stämme Penicillin-empfindlich waren (Medeiros, 1997). Penicillin gehört zur Gruppe der β -Laktam-Antibiotika, denen ein β -Laktam-Ring (instabiler stickstoffhaltiger Vierring) gemeinsam ist. Dieser β -Laktam-Ring ist strukturähnlich zum D-Ala-D-Ala-Rest des Peptidoglykan-Bausteins, dem Substrat der Transpeptidasen (Waxman und Strominger, 1983). Aufgrund der hohen Affinität der β -Laktam-Antibiotika gegenüber PBPs konkurrieren die Antibiotika mit den Peptidoglykan-Bausteinen um das aktive Zentrum der Transpeptidase. Durch Spaltung des β -Laktam-Rings bildet sich ein β -Laktam-PBP-Azyl Adukt, das im Gegensatz zu dem natürlichen Enzym-Substrat-Komplex sehr stabil ist und eine irreversible Hemmung der Enzymaktivität verursacht, sodass eine Quervernetzung des Mureins verhindert wird (Tipper und Strominger, 1965). Die dadurch entstehende Akkumulation von Peptidoglykanvorläufern hat zudem den Effekt, dass Autolysine aktiviert werden, die einen Abbau der bereits bestehenden Zellwand zur Folge haben (Antignac *et al.*, 2007). Für *S. aureus* sind 13 Autolysine bekannt, von denen drei näher charakterisiert sind (Atl, Aaa/Sle1, LytM). Atl ist ein bifunktionales Autolysin das proteolytisch in zwei autolytische Enzyme, N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase und N-Acetylglucosaminidase gespalten wird (Oshida *et al.*, 1995). Durch die Spaltung von Verbindungen im Peptidoglykan der Zellwand, kann die Zelle dem osmotischen Druck auf Dauer nicht Stand halten und lysiert (Izaki *et al.*, 1968, Tomasz, 1979). Da β -Laktam-Antibiotika den Zellwandaufbau und nicht die Proteinbiosynthese stören, wirken sie nur auf proliferierende Bakterien.

Zwei Jahre nach Einführung des Penicillins wurden bereits die ersten *S. aureus* Stämme identifiziert, die aufgrund des Erwerbs einer Penicillinase Penicillin-resistent wurden. Um 1948 waren bereits 50 % der Staphylokokken-Isolate Penicillin-resistent. Penicillinasen gehören zu den β -Laktamasen, die nach Größe, Substrat-Spezifität und Sequenz-Homologie in vier Klassen (A-D) unterschieden werden (Nielsen und Lampen, 1982): Metallo-(Zn^{2+})- β -Laktamasen gehören zur Klasse B. Klasse A, C und D β -Laktamasen wirken wie Serin-Proteasen. Durch den katalytisch aktiven Serin-Rest im aktiven Zentrum der β -Laktamasen wird der stickstoffhaltige Viererring der β -Laktam-Antibiotika hydrolysiert, wodurch der β -Laktam-Ring gespalten wird. (Ambler, 1980). β -Laktamasen von *S. aureus* gehören zur Klasse A und werden entweder über einen Lipidanker an die Membran gebunden oder sie werden in den Kulturüberstand abgegeben (Nielsen und Lampen, 1982). Die β -Laktamasen von *S. aureus* können in drei β -Laktamase-Typen unterschieden werden: β -Laktamase-Typ A und C haben ähnliche hohe Enzymaktivität und sind plasmidal kodiert, während β -Laktamasen vom Typ B chromosomal kodiert sind und schwächere Enzymaktivität aufweisen (Richmond, 1965, Rosdahl, 1985). Bei allen drei β -Laktamase-Typen wird das für die β -Laktamasen kodierende *blaZ*-Gen von zwei stromaufwärts liegenden Genen reguliert, dem *blaI*- und *blaR1*-Gen (Voladri und Kernodle, 1998, Wang *et al.*, 1991) (s. Abbildung 1.5). BlaR1 ist ein Signal-transduzierendes Membranprotein, das β -Laktame als Agonist erkennt und eine Signalkaskade induziert. BlaI ist ein Repressor-Protein, das an zwei Regionen zwischen dem *blaZ*- und *blaR1*-Gen bindet und damit eine Transkription der Genregion verhindert (Gregory *et al.*, 1997, Hackbarth und Chambers, 1993).

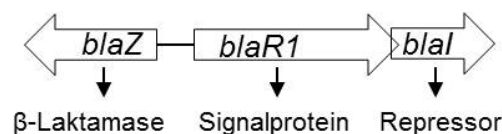


Abbildung 1.5: Übersicht der direkt beteiligten Gene zur Expression einer β -Laktam Resistenz

Binden β -Laktam-Antibiotika an die C-terminale membranständige Domäne von BlaR1, wird das Serin der Sensorregion von BlaR1 acetyliert, wodurch das Protein eine Konformationsänderung erfährt (Golemi-Kotra, 2003). Daraufhin wird die Aminosäuren Arg-293 und Arg-294 im Bereich einer Zinkprotease in der zytoplasmatischen N-Domäne von BlaR1 autoproteolytisch gespalten (Zhang *et al.*, 2001). Die nun aktive Protease BlaR1* spaltet den dimeren Repressor BlaI, wodurch

die Gentranskription von *blaZ*, *blaR1* und *blaI* dereprimiert wird (Lewis *et al.*, 1999). Die beschriebenen Prozesse laufen dabei innerhalb von Minuten nach Exposition mit β -Laktam-Antibiotika ab.

1.6.2 Mechanismus der Methicillin-Resistenz: PBP2a

Als Reaktion auf die zunehmende Resistenz der bisher verwendeten β -Laktame, wurde 1959 das von der Firma Beecham entwickelte, semisynthetische, Penicillinase-resistente Penicillin-Derivat Methicillin eingeführt, das sich nicht mehr durch β -Laktamasen inaktivieren lässt, da diese aufgrund einer Konformationsänderung nicht mehr an den β -Laktamring des Methicillins gelangen. Methicillin ist nur parenteral anwendbar, relativ toxisch und hat zudem eine geringe *In-vitro*-Aktivität auf Penicillinase-bildende Staphylokokken. Aus diesem Grund wurde es später durch andere, besser verträglichere Isoxazolyl-Penicilline wie Oxacillin, Cloxacillin, Dicloxacillin und Flucloxacillin ersetzt. Diese sind gut wasserlöslich, oral anwendbar und unterscheiden sich voneinander in pharmakokinetischer Hinsicht, nicht aber in ihrer antibakteriellen Aktivität (Stille *et al.*, 2006). Nur wenige Jahre nach Einführung von Methicillin, traten Methicillin-resistente *S. aureus* Stämme auf, die das *mecA*-Gen erworben hatten, das für das 78 kDa große PBP2a-Proteins kodiert (Jevons *et al.*, 1963). Eine Ausbreitung von MRSA erfolgte in den 80er Jahren insbesondere in den Mittelmeerländern, 10 Jahre später dann u.a. auch in Deutschland. Von 1995 bis 2001 stieg der MRSA Anteil in Deutschland an *S. aureus* Isolaten von zunächst 8 % auf etwa 20 %. In den Niederlanden und in skandinavischen Ländern blieb der prozentuale Anteil an MRSA von *S. aureus* unter 2 %, wohingegen der MRSA-Anteil in den Mittelmeerländern und Großbritannien bei 40 % liegt (Witte, 2007, Witte *et al.*, 2005). Das *mecA*-Gen liegt auf einer ca. 30 - 50 kb großen Kasette der chromosomalen DNA, der sog. *mec*-Kasette, die zusätzlich auch die Gene *mecI* und *mecR1* für die *mecA*-Regulation trägt (Kondo *et al.*, 1997). Die Sequenz des *mecA*-Gens ist zwischen verschiedenen klinischen Isolaten zu > 90 % identisch und damit hoch konserviert (Chambers, 1997). Die *mec*-Kasette ist Teil eines mobilen Elements, dem „*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*“ (SCCmec-Element), das sich chromosomal in das Genom von *S. aureus* integriert hat (Deurenberg *et al.*, 2007, Shore und Coleman, 2013). Wo der Ursprung des SCCmec-Elements liegt, ist bisher unklar, jedoch wird vermutet, dass *S. aureus* das SCCmec-Element durch einen horizontalen Gentransfer von *Staphylococcus sciuri* erworben

haben könnte, da dieses Bakterium ein PBP produziert, dass zu 87,8 % mit der Aminosäuresequenz von PBP2a identisch ist (Wu *et al.*, 2001). An der Exzision und Integration des SCCmec-Elements sind die Ccr-Rekombinasen beteiligt (Katayama *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2001). Durch den *mecA*-Sequenzvergleich von 472 MRSA-Isolaten konnte nachgewiesen werden, dass dieser Gentransfer ursprünglich nur einmal stattgefunden hat und alle existierenden MRSA-Stämme von diesem Klon abstammen (Kreiswirth *et al.*, 1993).

Das PBP2a-Protein gehört zu den HMW-PBPs der Klasse B, die lediglich Transpeptidase-, aber keine Transglykosidase-Aktivität aufweisen. Aufgrund dessen ist die Transglykosidase-Aktivität von PBP2 für den Zellwandaufbau notwendig (Pinho *et al.*, 2001). PBP2a ist N-terminal durch einen Transmembrananker mit der Zellmembran verbunden, dem sich eine Domäne mit unbekannter Funktion und eine C-terminale Transpeptidase-Domäne anschließt. Letztere hat ein für PBP-Transpeptidasen typische Tertiärstruktur. Im Fall von PBP2a liegt das aktive Zentrum jedoch mit dem nukleophilen Serin (403) auf einer α -Helix, die eine enge Furche formt, wodurch im Vergleich zu anderen PBPs die Bindungsmöglichkeiten von β -Laktam-Antibiotika stark herabgesetzt werden (Lim und Strynadka, 2002). Aufgrund der Kombination aus schwacher Affinität von PBP2a gegenüber β -Laktam-Antibiotika, einer hohen Dissoziationskonstante und der extrem langsamen Acylierungseffizienz ($0,2 - 0,001 \text{ s}^{-1}$) wird die Transpeptidase-Aktivität von PBP2a im Gegensatz zu den anderen vier PBPs von *S. aureus* kaum durch β -Laktam-Antibiotika beeinträchtigt. Auf diese Weise kann PBP2a die Transpeptidase-Aktivität der anderen PBPs übernehmen und den Zellwandaufbau gewährleisten (Fuda *et al.*, 2004, Lu *et al.*, 1999). Wie das *blaZ*-Gen wird auch das *mecA*-Gen im Vergleich zu seinen Regulatorgenen *mecI* und *mecR1* divergent transkribiert (s. Abbildung 1.6). Der homodimere Repressor MecI unterdrückt durch Bindung an eine Palindromregion zwischen der nicht-kodierenden Genregion von *mecA* und *mecR1* konstitutiv die Expression von *mecA*, wie auch die des Operons von *mecI* und *mecR1* (Safó *et al.*, 2006, Sharma *et al.*, 1998). Die Aufhebung der Repression geschieht durch Spaltung des MecI-Proteins, wenn die Metalloprotease-Domäne von MecR1 durch ein Antibiotikum aktiviert wird. MecR1 ist ein Membranprotein mit extrazellulärer β -Laktam-Bindedomäne, die bei Bindung eines β -Laktam-Antibiotikums zur Konformationsänderung führt (Marrero *et al.*, 2006). Daraufhin wird eine Auto-Proteolyse der intrazellulären Proteasedomäne induziert, was zu einer Aktivierung von MecR1 und einer damit einhergehenden Spaltung von MecI führt. Die Folge ist eine

Derepression von *mecA*, als auch des *mecI-mecR1* Operons (Mallorqui-Fernandez *et al.*, 2004). Vor kurzem wurde das Vorhandensein eines *mecR2*-Gens in MRSA-Stämmen des SCCmec-Typs II und III beschrieben (Arede *et al.*, 2012). Laut Arede *et al.* wird das stromaufwärts von *mecI* liegende *mecR2*-Gen zusammen mit den anderen *mec*-Regulatoren co-transkribiert und dadurch die *mecA*-Expression verbessert.

Aufgrund der hohen Aminosäuren-Homologie von MecI/BlaI und MecR1/BlaR1 ist es möglich, dass MecI bzw. BlaI von BlaR1 bzw. von MecR1 gespalten wird, wodurch eine „Kreuzregulation“ zustande kommt (Hackbarth und Chambers, 1993, Ryffel *et al.*, 1992, Ubukata *et al.*, 1989). Zunächst wurde angenommen, dass BlaR1 die Bindung zwischen MecI und dessen Bindestelle nicht aufheben kann, genauso wenig wie MecR1, BlaI spalten kann (McKinney *et al.*, 2001). Kürzlich konnte hingegen gezeigt werden, dass BlaR1 ausreichend ist, um eine MecI vermittelte Repression von *mecA* aufzuheben (Arede *et al.*, 2013).

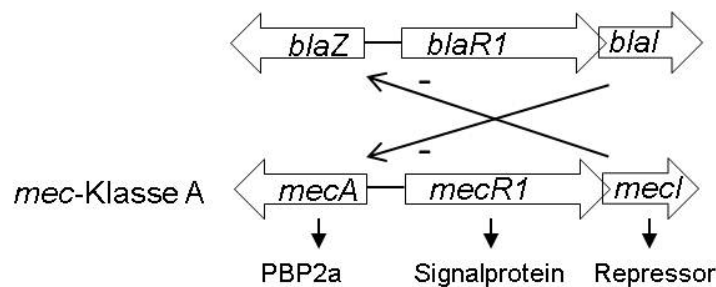


Abbildung 1.6: Übersicht der Kreuzregulation von *mecA* und *blaZ*

Die Transkription von *mecA* bzw. *blaZ* kann von MecI und BlaI reprimiert werden (Kreuzregulation).

Obwohl allen MRSA-Stämmen das für das PBP2a kodierende *mecA*-Gen gemein ist, kann sich der Phänotyp im Bezug auf die Resistenz stark unterscheiden. Manche Stämme zeigen eine heterogene Resistenz (HeR) *in vitro*, die darauf beruht, dass nur eine geringe Anzahl aller Staphylokokken einer Population (für gewöhnlich 10^{-1} bis 10^{-2}) eine phänotypische Resistenz gegenüber Oxacillin ($\leq 10 \mu\text{g/ml}$) zeigt. Bei der Mehrheit der Population lässt sich hingegen schon bei geringen Oxacillin Konzentrationen ($\geq 0,1 \mu\text{g/ml}$) die Vermehrung inhibieren. Auf der anderen Seite gibt es MRSA-Stämme mit homogener Resistenz (HoR), bei denen mehr als 10^{-2} Bakterien der Zellpopulation phänotypische Resistenz gegenüber mindestens $50 \mu\text{g/ml}$ Antibiotika ausbilden (Hartman und Tomasz, 1986). Durch subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen, die eine

Verzögerung der Wachstumsphase verursachen, können heterogene MRSA-Stämme in homogene konvertiert werden (Finan *et al.*, 2002). Der molekulare Mechanismus der Heteroresistenz ist bisher nicht aufgeklärt. Es wird diskutiert, dass durch Antibiotika eine Stressantwort ausgelöst wird, durch die die Mutationsrate steigt und Mutanten mit erhöhter Methicillin-Resistenz entstehen (Cuirolo *et al.*, 2009, Dordel *et al.*, 2014, Gutierrez *et al.*, 2013).

Neben MRSA-Stämmen, die PBP2a produzieren, treten klinische *S. aureus*-Isolate auf, die ohne das Vorhandensein von PBP2a, gegenüber Penicillinase-resistenten Penicillinen (PRP) wie Methicillin und Oxacillin, resistent sind. Liegt diese Resistenz bei 2 µg/ml oder knapp darüber, spricht man von Borderline-Stämmen. Anfangs ging man davon aus, dass der Grund hierfür allein in der Überexpression von β-Laktamasen liegt, die mit geringer Aktivität PRPs hydrolysieren können (McDougal und Thornsberry, 1986). Solche überexprimierenden *S. aureus* Stämme gehören meist zur Phagengruppe 94/96 und besitzen ein 17,2 kb großes Plasmid, das ein Gen zur Expression einer Staphylokokken-Penicillinase Typ A kodiert (Massidda *et al.*, 1996). Allerdings wurden auch Stämme identifiziert, die β-Laktamasen überproduzierten, jedoch trotzdem PRP empfindlich waren und solche, die geringe Menge an β-Laktamasen produzierten und trotzdem Borderline-Resistenzen gegenüber PRPs aufwiesen (Barg *et al.*, 1991, Valardo *et al.*, 1993). Daneben blieb der *E. coli* DH5a Stamm, in den eine überexprimierende Penicillinase eines Borderline-*S. aureus* Stamms transformiert wurde, β-Laktam-Antibiotika empfindlich (Massidda *et al.*, 1994). Dies deutet darauf hin, dass die Überexpression einer Penicillinase nicht der einzige Faktor ist, der bei Borderline *S. aureus* Stämmen eine Rolle spielt. Ein anderer Mechanismus könnte darin liegen, dass durch eine Punktmutation im PBP2 die Bindungskapazität gegenüber β-Laktamasen herabgesetzt ist (Hackbarth *et al.*, 1995).

1.6.3 Mechanismus der Vancomycin-Resistenz

Vancomycin gilt als eines der letzten Reserveantibiotika, das bei schweren MRSA-Infektionen zur Behandlung eingesetzt werden kann. Es gehört zu den Glykopeptid-Antibiotika und verhindert wie Methicillin die Quervernetzung des Peptidoglykans, aber auch die Transglykosylierung der bestehenden Peptidoglykankette mit Peptidoglykanvorläufern. Im Gegensatz zu Methicillin inhibiert Vancomycin jedoch nicht die Aktivität von PBPs, sondern bindet mit hoher Affinität an den D-Ala-D-Ala C-Terminus des Pentapeptids von Peptidoglykanvorläufern (Barna und

Williams, 1984). Auf diese Weise kann eine Transglykosylierung und Transpeptidierung der Peptidoglykanstränge verhindert werden, wodurch die Bakterienzellwand an Stabilität verliert. Das Vorkommen von Vancomycin-Resistenz in Enterokokken ist bereits seit 1988 bekannt und bereits 1992 konnten Noble *et al.* nachweisen, dass das Vancomycin-Resistenz-vermittelnde *vanA*-Gen von *Enterococcus faecalis* auf *S. aureus* übertragbar ist (Noble *et al.*, 1992). Der erste *S. aureus*-Stamm mit verminderter Vancomycin-Resistenz (VISA), der 1996 in Japan identifiziert wurde, enthielt jedoch überraschenderweise nicht das *vanA*-Gen. Der Mechanismus für die intermediäre Vancomycin-Resistenz lag vielmehr in der Induktion von Glykosyltransferasen durch das Zwei-Komponenten System *VraSR* (Kuroda *et al.*, 2004), wodurch es zur Bildung einer verdickten Zellwand kommt, in der sich Glykopeptid-Antibiotika „verfangen“ und somit die eigentliche Zieldomäne nicht erreichen (Hanaki *et al.*, 1998). Nach anerkannten Standards (z.B. NCCLS, DIN) wird von VISA-Stämmen dann gesprochen, wenn die MHK im Bereich 8-16 mg/l liegt. Dass die Übertragung des *vanA*-Gens von Enterokokken auf Staphylokokken jedoch nicht nur im Labor, sondern auch in der Natur stattfinden kann, zeigte sich 2002, als der erste bekannte Fall eines VRSA-Stamms in den USA isoliert wurde. Die hohe Resistenz gegenüber Vancomycin (MHK \geq 32 mg/l) kann durch das Vorhandensein des Transposons *Tn1546* erklärt werden, auf dem neun Gene kodiert sind. ORF1 und ORF2 sind Transposase- bzw. Resolvase-Enzyme, die für die Mobilität des Transposons von Bedeutung sind. Die Gene *vanR* und *vanS* kodieren ein induzierbares Zwei-Komponenten-System. Eine Dehydrogenase zur Herstellung von D-Laktat aus Pyruvat wird durch das *vanH*-Gen vermittelt, *vanA* kodiert für eine D-Ala-D-Laktat-Ligase, während *VanX* als D,D-Dipeptidase Vancomycin-empfindliche D-Ala-D-Ala Dipeptide abbaut, um deren Einbau in die Peptidoglykanstruktur zu verhindern. Während bekannt ist, dass das *vanY*-Gen für eine D,D-Carboxypeptidase kodiert, die von Vorläufer-Pentapeptiden das C-terminale D-Ala entfernt, ist die genaue Funktion von *vanZ* noch unklar (Weigel *et al.*, 2003). Durch das Zusammenspiel der Van-Proteine, wird das D-Ala-D-Ala des Pentapeptids an der N-Acetylmuraminsäure durch das Depsipeptid D-Ala-D-Laktat ersetzt (Bugg *et al.*, 1991). Auf diese Weise ist die Affinität von Vancomycin zum C-terminalen Ende des D-Ala-D-Laktat-Pentapeptids um das 1000-fache vermindert.

1.7 Behandlung von Patienten mit *S. aureus* und MRSA-Kolonisation oder Infektion

Bei MRSA-kolonisierten Patienten wird versucht, die Staphylokokken mit antibiotischer Nasensalbe (Mupirocin; 3x täglich über 5 Tage), ggf. Rachenspülung und antiseptischem Shampoo zu entfernen bzw. zu reduzieren. Bei Infektionen mit MRSA wird auf Reserveantibiotika zurückgegriffen, zu denen Vancomycin, Teicoplanin oder Dalfopristin gehören. Da jedoch häufig *S. aureus*-Stämme vom VISA-Typ auftreten (Hiramatsu *et al.*, 2001), wird in diesen Fällen Linezolid (Oxazolidinon), Quinupristin und Dalfopristin (Streptogramin) oder Tigezykline (Glycylzykline) verabreicht (Appelbaum und Jacobs, 2005, Gilbert *et al.*, 2011). Um die Antibiotikawirkung zu steigern, wird meist eine Kombination aus antibiotischen Wirkstoffen verschrieben, z.B. Glykopeptid-Antibiotika zusammen mit Rifampicin, Clindamycin oder Gentamicin, die die Proteinbiosynthese stören. Da die orale Aufnahme für die genannten Antibiotika, mit Ausnahme von Linezolid, aufgrund der mangelnden Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt ungeeignet ist und der Serumspiegel des verabreichten Antibiotikums überwacht werden muss, ist die parenterale Behandlung mit einem Krankenhausaufenthalt verbunden, wodurch höhere Kosten entstehen.

1.8 Typisierung von MRSA-Stämmen

Sequenzbasierte Typisierungsmethoden haben gegenüber konventionellen Typisierungen, wie der Biotypisierung anhand von bestimmten Stoffwechseleigenschaften oder der Typisierung nach Antibiotikaresistenzprofilen den Vorteil der eindeutigen Festlegung von Sequenztypen (ST) und damit der absoluten Vergleichbarkeit der Stämme. Für die Aufklärung evolutionärer Zusammenhänge, der Verbreitung und für die eindeutige Zuordnung von MRSA zu Sequenztypen, wird u.a. die Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST) eingesetzt. Deutlich geringerer Aufwand bei weitgehender Kongruenz mit den Ergebnissen von MLST ermöglicht die *Staphylococcus* Protein A-Gen (*spa*)-Typisierung, die auf dem Polymorphismus der X-Region des Protein A kodierenden Gens *spa* beruht (Aires de Sousa und de Lencastre, 2004). Die beiden Techniken werden in den folgenden Abschnitten kurz erläutert.

1.8.1 Multilokus-Sequenz-Typisierung (MLST)

Die Methode des MLST basiert auf der Sequenzanalyse von ca. 0,5 kb großen Fragmenten von sieben verschiedenen „Housekeeping“-Genen in *S. aureus*: *arcC* (Carbamatkinase), *aroE* (Shikimatdehydrogenase), *glpF* (Glycerolkinase), *gmk* (Guanylatkinase), *pta* (Phosphatacetyltransferase), *tpi* (Triosephosphat-Isomerase) und *ypjL* (Acetyl-Coenzym-A-Acetyltransferase). Diese Gene sind in *S. aureus* über das gesamte Genom verteilt und dauerhaft stabil präsent. Aufgrund dessen ist die MLST weniger für kurzfristige epidemiologische Analysen, als viel mehr für phylogenetische Studien und langfristige epidemiologische Verlaufsstudien geeignet. Mithilfe einer speziell für MLST durch Enright *et al.* optimierten PCR (Enright *et al.*, 2000) und anschließender Sequenzierung von Abschnitten der oben genannten Gene, können diese mit der MLST-Datenbank verglichen werden (<http://saureus.mlst.net>). Verschiedene Sequenzen sprechen für verschiedene Allele des jeweiligen „Housekeeping“-Gens (Palavecino, 2007), so dass sich für jeden Stamm ein bestimmtes Allelprofil bzw. ein bestimmter Sequenztyp (ST) ergibt, wodurch der Stamm charakterisiert werden kann. Zusätzlich werden die MRSA-Stämme nach ihrem klonalen Komplex (CC) eingeteilt. Stämme gehören dann zum selben CC, wenn die Sequenzen von fünf der sieben „Housekeeping“-Gene identisch sind (Enright *et al.*, 2000). Zusammen mit der SCCmec-Typisierung ergibt sich beispielsweise für den in dieser Arbeit verwendeten MRSA-Stamm ND die Bezeichnung ST247-CC8-MRSA-I, da dieser den SCCmec-Typ I trägt.

1.8.2 *spa*-Typisierung

Die *spa*-Typisierung beruht auf der Sequenzierung eines polymorphen Genabschnitts des Protein A, der Region X. Diese setzt sich aus einer variierenden Anzahl von Wiederholungen (1-27) zusammen, die zwischen 21 bp und 30 bp lang sind und mehr oder weniger starke Sequenzvariationen aufweisen (<http://spaserver.ridom.de>). Aufgrund der Anordnung der sich unterschiedlich wiederholenden Einheiten kann dann auf den *spa*-Typ rückgeschlossen werden. Wie auch für die MLST, gibt es für die *spa*-Typisierung ein PCR Protokoll (<http://spaserver.ridom.de>), nach dem die Genabschnitte mittels PCR amplifiziert werden, um anschließend sequenziert zu werden. Es hat sich gezeigt, dass bestimmte MLST-Typen mit einer limitierten Anzahl an *spa*-Typen assoziiert sind (Monecke *et al.*, 2011).

1.9 SCCmec-Klassifizierung

Bis 2014 wurden elf Haupttypen von SCCmec-Elementen (SCCmec-Typ I – XI) beschrieben und charakterisiert, die im Größenbereich von 20,9 kb bis 66,9 kb liegen (IWG-SCC, 2009, Li *et al.*, 2011, Shore und Coleman, 2013, Shore *et al.*, 2011). Die Einteilung nach SCCmec-Typen beruht auf allotypischen Unterschieden der essentiellen Genkomplexe für *ccr*-Gene (*ccr*) und *mec*-Gene (*mec*) (<http://133.242.9.96/staphylococcus.net/>).

1.9.1 *ccr*-Genkomplex

Der *ccr*-Genkomplex besteht aus einem oder zwei Rekombinasegenen, die die Mobilität des SCCmec-Elements durch präzises Ausschneiden und anschließender Integration genomischer DNA mit Integrationsstelle für SCC (ISS) ermöglichen. Bisher wurden drei phylogenetisch verschiedene *ccr*-Gene identifiziert, deren Sequenzähnlichkeit unter 50 % liegt: *ccrA*, *ccrB* und *ccrC* (Katayama *et al.*, 2000). Für die Gene von *ccrA* und *ccrB* wurden bisher vier Allotypen nachgewiesen, jedoch gibt es nur einen *ccrC* Allotyp. Allgemein werden Gene dann zu einem Allotyp gezählt, wenn sie zu mehr als 85 % Sequenzidentität haben. Dagegen haben *ccr*-Gene unterschiedlicher Allotypen nur zwischen 60 % und 82 % Sequenzidentität (<http://133.242.9.96/staphylococcus.net/>). Aus den vorkommenden Kombinationen verschiedener *ccr*-Gene und ihrer Allotypen ergeben sich die *ccr*-Typen: *ccrA1* und *ccrB1* (*ccr*-Typ 1), *ccrA2* und *ccrB2* (*ccr*-Typ 2), *ccrA3* und *ccrB3* (*ccr*-Typ 3), und *ccrA4* und *ccrB4* (*ccr*-Typ 4). Das *ccrC*-Gen (*ccr*-Typ 5) ist das bislang einzige *ccr*-Gen, das ohne zweites Rekombinasegen auftritt (vgl. Tabelle 1.5).

1.9.2 *mec*-Genkomplex

Der *mec*-Genkomplex setzt sich aus dem *mecA*-Gen, den dazugehörigen regulatorischen Genen *mecI* und *mecRI*, sowie den damit assoziierten Insertionssequenzen (IS) zusammen. Der Prototyp Klasse A *mec* Genkomplex (*mec*-Klasse A) umfasst das *mecA*-Gen, das komplette *mecRI*-Gen und das *mecI*-Gen, die stromaufwärts von *mecA* liegen (vgl. Tabelle 1.4). Ebenfalls Teil des Genkomplexes ist die Insertionssequenz IS431 stromabwärts von *mecA*. Der Klasse B *mec*-Genkomplex (*mec*-Klasse B) setzt sich aus dem *mecA*-Gen und einem verkürztem *mecRI*-Gen

zusammen, dass durch die Insertion des IS1272-Elements stromabwärts von *mecR1* entstanden ist (vollständige Deletion von *mecI*). Stromaufwärts von *mecA* liegt die IS431. Der Klasse C *mec*-Genkomplex (*mec*-Klasse C) ist wie Klasse B *mec* aufgebaut, nur dass der verkürzte Teil des *mecR1*-Gens durch die Insertion des IS431-Elements ersetzt ist. Die vierte und bisher letzte Klasse, Klasse D *mec*-Genkomplex (*mec*-Klasse D) besteht ebenfalls aus dem *mecA*-Gen und dem verkürzten *mecR1*-Gen, allerdings fehlt die Insertionssequenz stromabwärts des *mecR1*-Gens (Katayama *et al.*, 2001; <http://133.242.9.96/staphylococcus.net/>). Anhand der *ccr*-Typen und den *mec*-Klassen ergeben sich sechs SCCmec-Typen (siehe Tabelle 1.5). Aufgrund ihrer Größe wird das SCCmec II Element (> 50 kb) eher selten von einem *S. aureus* Stamm zu einem anderen weitergegeben, während das deutlich kleinere SCCmec Element Typ IV weit häufiger transferiert wird (Schlievert *et al.*, 2010). Die Regionen, die weder zum *mec*-, noch zum *ccr* Genkomplex gehören, werden als „junkyard“ Regionen (J-Regionen) bezeichnet. Nachdem die Sequenz dieser Regionen sich auch bei MRSA-Stämmen desselben SCCmec-Typs unterscheiden kann, werden diese zur Unterscheidung in SCCmec-Subtypen herangezogen (Ito *et al.*, 2007).

Tabelle 1.4: Genetische Organisation der *mec*-Region als Basis für die Einteilung in *mec*-Klassen

<i>mec</i> -Klassen	genetische Komponenten
<i>mec</i> -Klasse A	IS431- <i>mecA</i> - <i>mecR1</i> - <i>mecI</i>
<i>mec</i> -Klasse B	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS1272
<i>mec</i> -Klasse C	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i> -IS431
<i>mec</i> -Klasse D	IS431- <i>mecA</i> - Δ <i>mecR1</i>

(<http://133.242.9.96/staphylococcus.net/>).

Tabelle 1.5: Zusammensetzung von SCCmec-Typen durch die Kombination aus *ccr*-Typ und *mec*-Klasse

SCCmec-Typen	Kombination aus <i>ccr</i> -Typ und <i>mec</i> -Klasse	Größe (in kb)
Typ I	<i>ccr</i> Typ 1 (<i>ccr</i> A1,B1) mit Klasse B <i>mec</i>	37,2
Typ II	<i>ccr</i> Typ 2 (<i>ccr</i> A2,B2) mit Klasse A <i>mec</i>	56,4
Typ III	<i>ccr</i> Typ 3 (<i>ccr</i> A3,B3) mit Klasse A <i>mec</i>	67,0
Typ IV	<i>ccr</i> Typ 2 (<i>ccr</i> A2,B2) mit Klasse B <i>mec</i>	24,2
Typ V	<i>ccr</i> Typ 5 mit Klasse C <i>mec</i>	32,8
Typ VI	<i>ccr</i> Typ 4 mit Klasse B <i>mec</i>	24,2

(<http://133.242.9.96/staphylococcus.net/>).

1.10 Ziele dieser Arbeit

MRSA treten seit mehreren Jahrzehnten auch in Deutschland vermehrt auf. Insbesondere Patienten, die Kontakt zu Einrichtungen des Gesundheitswesens hatten und/oder weiteren Risikofaktoren wie Antibiotikabehandlung, invasive medizinische Eingriffe, multiple Grunderkrankungen usw. ausgesetzt waren, sind oftmals von den als „*hospital acquired*“ (HA) bezeichneten MRSA-Infektionen bzw. -Kolonisierungen betroffen. Molekularbiologisch lassen sich HA-MRSA-Stämme klonalen Linien zuordnen. In Deutschland sind insbesondere elf solcher klonalen Linien weit verbreitet und werden deshalb als deutsche MRSA-Referenzstämme bezeichnet. Für präventive und therapeutische Maßnahmen sind schnelle Testverfahren zum MRSA- bzw. *mecA*/PBP2a-Nachweis erforderlich („*point of care diagnostics*“). Für die Prognose einer MRSA-Infektion könnte eine Pathotypisierung (Erfassung des Pathogenitätsprofil) von MRSA hilfreich sein. Diese Aspekte der Schnelldiagnostik bestimmen die Fragestellung dieser Doktorarbeit.

Im ersten Teil sollten die oben genannten Referenzstämme auf die optimalen Kulturbedingungen hinsichtlich einer maximalen Transkription von *mecA* und Produktion von PBP2a (Immunoassay) für den serologischen Nachweis untersucht werden. Hierbei wurde einerseits die *mecA*-Regulation (*mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaI*, *blaR1*) und andererseits der Grad der Heterogenität/Resistenzmuster der MRSA-Population mit dem Ziel eines Schnellnachweises von PBP2a des jeweiligen Stamms untersucht.

Im zweiten Teil sollten die MRSA-Stämme im dreidimensionalen Kollagengel (3D-CoG) analysiert werden. Das 3D-CoG ähnelt in einigen Aspekten dem interstitiellen Milieu im Gewebe (*in vivo* Simulation). Zur Analyse von MRSA-Pathogenitätsfaktoren im 3D-CoG sollten monoklonale Antikörper gegen ausgewählte SERAM-Proteine eingesetzt werden, die mithilfe von Immunfluoreszenzfärbung durch Konfokal-Mikroskopie detektiert werden können. Darüber hinaus sollte im 3D-CoG die Kulturmorphologie und nach Fibrinogen-Zugabe die Fibrinnetzbildung analysiert werden. Die im 3D-CoG identifizierten Phänotypen sollten zur besseren Differenzierung der Staphylokokken im Kontext der Pathogenität beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten und in Tabelle 2.1 aufgelisteten MRSA-Stämme stammen vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Staphylokokken (Prof. W. Witte) des Robert Koch Instituts, Wernigerode. Alle Stämme sind in Deutschland und in weiten Teilen Europas verbreitet (Witte, 1999). Des Weiteren wurden *S. aureus* Patientenisolat vom Klinikum Großhadern (LMU), sowie Referenzstämme wie *S. aureus* ATCC 6538 und *S. aureus* Newman mit einbezogen (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.1: Verwendete MRSA-Stämme

MRSA-Referenzstämme (NRZ, Wernigerode)/Abkürzung	MLST ^a	CC ^b	Referenz
Rheinessen (MRSA-RH)	ST5	CC8	Layer, 2012
Barnim (MRSA-BAR)	ST22	CC22	Enright, 2002, Ghebremedhin <i>et al.</i> , 2007, Layer, 2012
Norddeutschland (MRSA-ND)	ST247	CC8	Cookson <i>et al.</i> , 2007, Layer, 2012, Witte, 1999, Witte <i>et al.</i> , 1997
Süddeutschland (MRSA-SD)	ST228	CC5	Cookson <i>et al.</i> , 2007, Enright, 2002, Layer, 2012, Witte, 1999, Witte <i>et al.</i> , 1997
Klonale Gruppe III (MRSA-KG)	ST8	CC8	
Berlin (MRSA-BER)	ST45	CC45	(Cookson <i>et al.</i> , 2007, Enright, 2002, Layer, 2012, Witte, 1999, Witte <i>et al.</i> , 1997)
Köln (MRSA-KLN)	ST225	CC5	Nübel <i>et al.</i> , 2012
Wien (MRSA-WI)	ST239	CC8	Enright, 2002, Layer, 2012, Witte, 1999, Witte <i>et al.</i> , 1997
Spanien (MRSA-SP)	ST8	CC8	
Dänemark (MRSA-DM)	ST125	CC5	
Großbritannien (MRSA-GB)	ST36	CC30	Cookson <i>et al.</i> , 2007, Enright, 2002, Layer, 2012

^a Multilokus-Sequenz-Typ (ST)

^b Klonaler Komplex (CC)

Tabelle 2.2: Verwendete MSSA-Stämme

MSSA-Stämme	Referenz
<i>S. aureus</i> Newman	(Duthie und Lorenz, 1952)
<i>S. aureus</i> Newman <i>coa</i> (Δ <i>coa::tet</i>)	(McDevitt <i>et al.</i> , 1992)
<i>S. aureus</i> Newman <i>vWbp emp</i> * (Δ <i>emp::erm</i>)	(Johnson <i>et al.</i> , 2008)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	
Klinisches MSSA Isolat MP-3 (Blutkultur)	Klinikum Großhadern, München, (Guggenberger <i>et al.</i> , 2012)
Klinisches MSSA Isolat MP-5 (Rachenabstrich)	Klinikum Großhadern, München
Klinisches MSSA Isolat MP-6 (Rachenabstrich)	Klinikum Großhadern, München, (Guggenberger <i>et al.</i> , 2012)
Klinisches MSSA Isolat MP-9 (Abszessabstrich)	Klinikum Großhadern, München, (Guggenberger <i>et al.</i> , 2012)

*Früher als „Newman emp“ bezeichnet (Johnson *et al.*, 2008).

2.2 Oligonukleotide

Alle in Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4 aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) hergestellt und in lyophilisiertem und entsalztem Zustand erworben. Nach Auflösung in H₂O_{dest.} wurden die Oligonukleotide bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung der *mec*-Kassette

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	T _M (°C)	Referenz
<i>mecA</i> _+191for1	ATACATTGTACGTTATCGCTG	Sequenzierung von <i>mecA</i>	58	Diese Arbeit
<i>mecA</i> _1577for2	ATCAGTATTTACCTTGTCG	Sequenzierung von <i>mecA</i>	60	Diese Arbeit
<i>mecA</i> _738for3	TCCTAGAGGATAGTTACGAC	Sequenzierung von <i>mecA</i>	58	Diese Arbeit
<i>mecA</i> _154rev1	CACATATCGTGAGCAATGAAC	Sequenzierung von <i>mecA</i>	60	Diese Arbeit
<i>mecA</i> _1325rev2	CGTTACAAGATATGAAGTGGTA	Sequenzierung von <i>mecA</i>	56	Diese Arbeit
<i>mecA</i> _513rev3	GGCATCGTTCCAAAGAATGTA	Sequenzierung von <i>mecA</i>	60	Diese Arbeit
<i>mecI</i> _143for1	GCAAATGGATGGTTCGTAGG	Sequenzierung von <i>mecI</i>	60	Diese Arbeit
<i>mecI</i> _187rev1	TATGCATATGGATTTCACTGG	Sequenzierung von <i>mecI</i>	58	Diese Arbeit

MATERIAL UND METHODEN

mecR1_-218for1	TTATCTTCAATTGCATCAATAG	Sequenzierung von <i>mecR1</i>	56	Diese Arbeit
mecR1_502for2	CAAACATTGATAATCCGATGG	Sequenzierung von <i>mecR1</i>	58	Diese Arbeit
mecR1_1228for3	ATCATACTGAACAACAATGGG	Sequenzierung von <i>mecR1</i>	58	Diese Arbeit
mecR1_+40rev1	TCCCATTCTGCAGATGATAT	Sequenzierung von <i>mecR1</i>	56	Diese Arbeit
mecR1_733rev2	CACAGTCATTGTCCATCATTG	Sequenzierung von <i>mecR1</i>	60	Diese Arbeit
mecR1_1366rev3	CCTCATCTTGTCTTAAATGTT	Sequenzierung von <i>mecR1</i>	56	Diese Arbeit
truncmecR1_846for1	GCAGCACAATATTTACTAGG	Sequenzierung von <i>mecR1</i>	56	Diese Arbeit
truncmecR1_+497rev1	GGCTTCTAACGGATTCAATT	Sequenzierung von <i>mecR1</i>	56	Diese Arbeit
mecR2_-127for1	AAGATGATAACCTAAGTGAGG	Sequenzierung von <i>mecR2</i>	58	Diese Arbeit
mecR2_+37rev1	CAATTACGAACTTTGATTATCA TTTG	Sequenzierung von <i>mecR2</i>	68	Diese Arbeit

T_M bezeichnet die berechnete Schmelztemperatur in °C; for: Vorwärtsprimer; rev: Rückwärtsprimer.

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung der *bla*-Kassette

Oligonukleotide	Sequenz (5' → 3')	Anwendung	T_M (°C)	Referenz
BlaZ_+205rev1	CACCTATAATTAACCTATTCATC	Sequenzierung von <i>blaZ</i>	58	Diese Arbeit
BlaZ_475rev2	CTATCTCATATCTAACTGGAT	Sequenzierung von <i>blaZ</i>	56	Diese Arbeit
BlaZ_165for1	GATAAGAGATTTGCCTATGC	Sequenzierung von <i>blaZ</i>	56	Milheiriço <i>et al.</i> , 2011
BlaZ_698rev3	GCATATGTTATTGCTTGACC	Sequenzierung von <i>blaZ</i>	56	Milheiriço <i>et al.</i> , 2011
BlaZ_+116rev4	TCGAAAATAATAGAGGGAAAA TCAG	Sequenzierung von <i>blaZ</i>	66	Diese Arbeit
BlaZ_-26for2	ACAACCTGTAATATCGGAGGGT	Sequenzierung von <i>blaZ</i>	60	Diese Arbeit
BlaR1_+39for1	TTCATAACATCCCATTCAGCC	Sequenzierung von <i>blaR1</i>	60	Diese Arbeit
BlaR1_-59rev1	TTACAATTGTAATATCGGGTGC	Sequenzierung von <i>blaR1</i>	58	Diese Arbeit
BlaZ_79rev5	ACTCTTTGGCATGTGAACTG	Sequenzierung von <i>blaR1</i>	58	Okamoto <i>et al.</i> , 1996
BlaR1_140rev2	AATCCTGCAAGAAGAGTTAG	Sequenzierung von <i>blaR1</i>	56	Okamoto <i>et al.</i> , 1996
BlaR1_748rev3	GGACAAATCTATCGGCTTCT	Sequenzierung von <i>blaR1</i>	58	Okamoto <i>et al.</i> , 1996
BlaI_+48for1	GAGTCAAGCATAGTTTAC	Sequenzierung von <i>blaR1</i>	50	Okamoto <i>et al.</i> , 1996
BlaR1_1758rev4	TGAGTTGAGTCGCAGTATAG	Sequenzierung von <i>blaR1</i>	58	Okamoto <i>et al.</i> , 1996
BlaR1_714for2	CATGACAAATGAAGTAGAAGC	Sequenzierung von <i>blaR1</i>	56	Milheiriço <i>et al.</i> , 2011
BlaR1_1251rev5	CTTATGATTCCATGACATACG	Sequenzierung von <i>blaR1</i>	58	Milheiriço <i>et al.</i> , 2011
BlaI_+217for2	CAAGGTCTTTTGTGAACATAG	Sequenzierung von <i>blaI</i>	58	Diese Arbeit
BlaI_354for3	GTCTCGCAATTCTCAATTTTC	Sequenzierung von <i>blaI</i>	58	Diese Arbeit
BlaI_78rev1	GCTAATGAAATTGTAGTTGAA	Sequenzierung von <i>blaI</i>	54	Diese Arbeit

T_M bezeichnet die berechnete Schmelztemperatur in °C; for: Vorwärtsprimer; rev: Rückwärtsprimer.

2.3 Nährmedien

2.3.1 Medien für die Kultivierung von Bakterien (*S. aureus*)

Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien wurden mit H₂O_{dest.} angesetzt und anschließend bei 1 bar und 121 °C für 15 Min autoklaviert. Antibiotika wurden bei Bedarf nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium nach Miller)	Bacto-Trypton Bacto-Hefeextrakt NaCl	10 g/l 5 g/l 5 g/l
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g/l Bacto-Agar	
Müller Hinton-Agar (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)	MHB Bacto-Agar H ₂ O	21 g 15 g 1000 ml
Blutagarplatten (Oxoid, Wesel)	Casein Maisstärke Tiergewebe (verdaut) NaCl Hefeextrakt Rinderextrakt Schafsblut Agar	12 g 1 g 5 g 5 g 3,5 g 3 g 5 % 13,5 g
Einfriermedium	LB-Medium mit 15 % Glycerin	

2.3.2 Zellkulturmedien

Medien für die Kultivierung von monoklonalen Hybridom-Zellen

Kultivierungsmedium	Opti-MEM® Medium	500 ml
	FCS	50 ml (sterilfiltriert)
	Glutamin	5 ml (sterilfiltriert)
Einfriermedium	FCS	10 ml
	DMSO	1 ml

2.4 Antibiotika

Zur Induktion der PBP2a- bzw. β -Laktamase-Bildung wurden das Antibiotikum Oxacillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Es wurden Stammlösungen hergestellt, die 1: 100 verdünnt wurden, um die jeweilige Endkonzentration von 10 ng/ml bis 1 μ g/ml zu erreichen. Nitrocefin (Calbiochem, Darmstadt) wurde zur Messung der β -Laktamase-Aktivität in einer Konzentration von 500 μ g/ml verwendet.

2.5 Antikörper

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Antikörper und die verwendete Konzentration

Antigenspezifität	Tierspezies	Verwendete Konzentration	Quelle /Firma
Unkonjugierte Erstantikörper			
IgG ₁ anti-PBP2a	Maus	1:1000 (Stock: 9,14 mg/ml)	Abnova (Taiwan)
IgG anti-Emp (mab-Emp)		unverdünnter Zellkulturüberstand	Tobias Veit, cand. med. (laufende Promotionsarbeit)
IgG anti-Efb (mab-Efb)			
IgG anti-Coa (mab-Coa)			
IgG anti-vWbp (mab-vWbp)			
Enzymkonjugierte Sekundärantikörper			
anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat	Ziege	1:5000 (WB) (Stock: 0,8 mg/ml)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
anti-Maus IgG alkalische-Phosphatase-Konjugat		1: 5000 (WB) (Stock: 0,6 mg/ml)	
Fluorochromkonjugierte Antikörper (primär bzw. sekundär)			
anti-Maus IgG Cy3-Konjugat	Ziege	1:100 (IF) (Stock: 1 mg/ml)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FITC-konjugierter IgG gegen <i>S. aureus</i> Oberflächenproteine (anti-Sau)	Kaninchen (polyklonal)	1:100 (IF) (Stock: 4,5 mg/ml)	Abcam (Cambridge)

WB: Western Blot/Immunoblot

IF: Immunfluoreszenz

2.6 Staphylokokken-Proteine

Tabelle 2.6: Verwendete Staphylokokken-Proteine (His-Taq)

Protein / Peptid	Quelle
PBP2a	Microcoat (Bernried)
Emp (rekombinant)	Tobias Veit, cand. med. (laufende Promotionsarbeit)
vWbp (rekombinant)	
Coa (rekombinant)	
Efb (rekombinant)	

2.7 Enzyme

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Funktion	Firma
DreamTaq Polymerase	DNA-Amplifizierung	Fermentas (St. Leon Rot)
Reverse Transkriptase	Umschreibung von mRNA in cDNA	Promega (Madison, USA)
DNase I	DNA-Abbau	Machery-Nagel (Düren)
Proteinase K	Protein-Verdau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PRF-119	Bakteriophagen Endolysin	Hyglos GmbH (Bernried)
RNase	RNA-Abbau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.8 Molekularbiologische Fertigprodukte (Kits)

Molekularbiologische Kits

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das PCR Clean up, Gel-Extraction Kit Nucleo Spin Extract II (Machery-Nagel, Düren) verwendet. Für die Extraktion von DNA aus Bakterien kam das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) zum Einsatz.

Testverfahren zum immunochromatographischen Nachweis von PBP2a

Clearview Alere™ PBP2a Test (Alere, Köln)

Quantitative PCR (RT-qPCR)

GoTranscript Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA)

Maxima Probe RT-qPCR MasterMix (Fermentas, St. Leon Rot)

Differentielle fluoreszenzmikroskopische Darstellung von lebenden und toten Bakterien

Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Karlsruhe)

2.9 Puffer und Lösungen

2.9.1 Gelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM Tris
	40 mM Essigsäure
	1 mM EDTA
10 x DNA-Probenpuffer	50 % Glycerin
	0,1 M EDTA
	1 % SDS
	0,1 % Bromphenolblau
Agarose-Gel	Agarose 1,2 % in TAE-Puffer
Größenmarker	1-kb Plus DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)
Ethidiumbromid-Färbebad	1 µg Ethidiumbromid pro ml H ₂ O _{dest}

2.9.2 SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

SDS-Probenpuffer	1 M MgCl ₂	5 ml
	10 % SDS	20 ml
	Glycerin	5 ml
	β-Mercaptoethanol	2,5 ml
	Bromphenolblau	25 mg

MATERIAL UND METHODEN

	1 M Tris, pH 8,8	4,9 ml
	H ₂ O _{dest}	ad 50 ml
10 x SDS-Laufpuffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	SDS	10 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Größenmarker	Proteinstandard "BenchMark Pre-Stained" (Invitrogen, Karlsruhe)	

2.9.3 Coomassie Färbung

Coomassie Färbung	Methanol	500 ml
	Essigsäure	100 ml
	Coomassie Brilliant Blau R250	0,15 %
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Entfärbelösung	Methanol	500 ml
	Essigsäure	75 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml

2.9.4 Western Blot (Immunoblot)

10 x Blotting-Puffer	Tris	30,3 g
	Glycin	144,1 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
1 x Blotting-Puffer	10 x Puffer	100 ml
	Methanol	200 ml

MATERIAL UND METHODEN

	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
10 x PBS, pH 7,4	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄	14,4 g
	KH ₂ PO ₄	2,4 g
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
PBS-Tween	10 x PBS	10 ml
	Tween 20	0,5 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Blockierungslösung	Milchpulver	5 % in PBS-Tween
Diethanolaminstammlösung	Diethanolamin	100 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
Substratgebrauchslösung	Diethanolaminstammlösung	200 ml
	0,9 % NaCl	800 ml
	1 M MgCl ₂	100 µl
Substrate für alkalische Phosphatase	NBT	1 mg/ml H ₂ O _{dest.}
	BCIP	5 mg/ml DMF

2.9.5 Phosphatpuffer

Phosphatpuffer	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	NaH ₂ PO ₄	100 mM
	pH 7,0	

2.9.6 RNA Extraktion

Stop-Mix (Lagerung bei – 20°C)	Ethanol Roti-Aqua-Phenol	190 ml 10 ml
Tris-EDTA (TE) pH 8.0	1 M Tris pH 8,0	1 ml
	0,5 M EDTA	0,2 ml
	H ₂ O _{dest.}	ad 100 ml
Natrium-Dodecyl-Sulfat	SDS	10 % w/v
75 % Ethanol (Lagerung bei -20 °C)	Ethanol H ₂ O	75 ml 25 ml

2.9.7 Bead capture Assay

1 x TBST (pH 7,4)	Tris	6 g
	NaCl	8,75 g
	Tween 20	500 µl
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml
TBST-BSA-CaCl ₂	TBST	100 ml
	BSA	0,5 %
	CaCl ₂	10 mM
hyBeads [®] Streptavidin (Hyglos, Bernried)		

2.9.8 Paraformaldehyd (PFA)-Fixierlösung

3,7 % PFA	PFA	7,4 g
	H ₂ O	160 ml
	1 N NaOH	150 µl
ca. 30 Min bei 55-60 °C inkubieren.		
	10 x PBS	20 ml

mit 1 N HCl auf pH 7,2- 7,4 einstellen

Lagerung bei – 20 °C

2.10 Geräte

Tabelle 2.8: Verwendete Geräte

Geräte	Bezeichnung	Firma
Analysenwaagen	440-35N	Kern & Sohn (Balingen-Frommern)
Blot-Apparatur	Mini-Trans-Blot	Bio-Rad (München)
Brutschrank	Typ B-20	Hereaus (Hanau)
Elektrophoresekammer für PAGE	Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (München)
Experion Automated Electrophoresis System	701-7001	Bio-Rad (München)
Experion RNA StdSens Starter Kit	700-7111	Bio-Rad (München)
Filmentwickler	Fujifilm FPM-100A	Fuji (Düsseldorf)
Geldokumentation	GelDoc EQ	Bio-Rad (München)
Gelelektrophoresekammer	Mini-SUBR Cell GT	Bio-Rad (München)
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (CLSM)	TCS-SP5	Leica Microsystems (Wetzlar)
Lichtmikroskop	Axivert 25	Zeiss (Jena)
PCR-Cycler	Gene Amp PCR System 2700	Applied Biosystems (Darmstadt)
pH-Meter	DIGITAL-pH-Meter	Bachofer (Reutlingen)
Photometer	Ultraspec 3100 pro	Amersham Biosciences (Freiburg)
RT-qPCR-Cycler	ABI Prism	Applied Biosystems (Darmstadt)

MATERIAL UND METHODEN

Spektrophotometer	NanoDrop ND 1000	Spectronic Instruments (Rochester, United States)
Ultraschall-Applikator	Sonifier 250	Branson (Danbury)
Zentrifugen		
Kühlzentrifuge	Sigma 3K30	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
SpeedVac® System	Savant	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Standardzentrifuge	Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

2.11 Laborchemikalien, Proteine und Fertigprodukte (Kits)

Tabelle 2.9: Verwendete Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie/Biochemikalie	Firma
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Serva (Heidelberg)
Agar	BD Bioscience (Heidelberg)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Bacto-Hefeextrakt	MP Biomedicals (Ohio)
BCIP	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe)
BSA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Coomassie Brilliant Blue™ R250	Merck (Darmstadt)
DAPI	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DreamTaq-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
ECL Western Blotting Reagenz	GE Healthcare (Freiburg)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
E-Test	Biomérieux, Nürtingen
Ethanol	Roth (Karlsruhe)

MATERIAL UND METHODEN

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Fätales Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Fibrinogen aus Humanplasma	Calbiochem (Darmstadt)
FITC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Folin-Ciocalteu Reagenz	Fluka (Neu-Ulm)
Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	MP Biomedicals (Ohio)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kollagen (3 mg/ml)	Purecol, Advanced Biomatrix (San Diego)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
NaCl	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nunc 96-Well Platten 96	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Prothrombin	Merck, Darmstadt
RPMI 1640	Invitrogen (Karlsruhe)
SDS	Serva (Heidelberg)
TEMED	Biomol (Hamburg)
Trichloressigsäure (TCA)	Roth (Karlsruhe)
Trypton/Pepton (aus Casein)	Roth (Karlsruhe)

2.12 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
Blutagarplatten	Oxoid (Wesel)
Filterpapier	Whatman, Dassel
Fuji Medical X-Ray Film Super Rx	Hartenstein (Würzburg)
Immersionsöl	Zeiss (Jena)
PCR Tubes	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen (aus Plastik)	Greiner bio-one, Frickenhausen
PVDF-Star-Transfer Membran	AppliChem (Darmstadt)
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 und 20 ml)	BD, Heidelberg
Sterilfilter Millex™ (0,45 µm)	Millipore (Bedford)
StrataClean resin	Stratagene (Waldbronn)
Zellkulturflaschen	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold)
µ-slide 8 well (Napfgröße 100 mm ²)	Ibidi (Martinsried)

2.13 Mikrobiologische Methoden

2.13.1 Kultivierungsverfahren

Soweit nicht anders beschrieben erfolgte die Kultivierung der Bakterienstämme über Nacht aerob in Luria Bertani (LB) Medium bei 37 °C und 180 rpm. Antibiotika wurden wie angegeben eingesetzt (siehe auch 2.4, S. 34). Für die Kultivierung der MRSA-Stämme auf Festmedium wurden Blutagarplatten verwendet. Um die Zellzahl der Bakterien zu bestimmen, wurden LB-Agarplatten benutzt.

2.13.2 Bakterienstammhaltung

Für die Stammhaltung wurden die *S. aureus*-Stämme in 10 ml LB-Medium ÜN angezogen, bei 6000 rpm für 5 Min abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 1 ml Einfriermedium (siehe 2.3, S. 33) resuspendiert und bis auf Weiteres bei - 80 °C aufbewahrt.

2.13.3 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach der E-Test Methode

Die minimale Hemmkonzentration von Oxacillin wurde mithilfe von M.I.C. Teststreifen (Biomérieux, Nürtingen) untersucht. 100 µl einer Übernachtskultur der MRSA-Stämme wurden auf eine Bakteriendichte äquivalent zu Mc-Farland 1,0 (entspricht 3×10^8 cfu/ml) verdünnt und gleichmäßig auf Müller-Hinton Agar mit 2 % NaCl plattiert. Ein M.I.C. Teststreifen wurde mithilfe einer sterilen Pinzette auf die Agarplatte gelegt und für 24 h bei 35 °C inkubiert. Die Oxacillin-MHK (in µg/ml) wurde an der Schnittstelle der Skala und dem ellipsenförmigen Hemmhof abgelesen.

2.13.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion („*polymerase chain reaction*“, PCR) können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Für alle Reaktionen wurde die DreamTaq-Polymerase (Fermentas) verwendet. Die zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Gens komplementären Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (München) hergestellt (Tabelle 2.3, S. 31 und Tabelle 2.4, S. 32). Als Template wurde genomische DNA der Staphylokokken-Stämme eingesetzt, die mithilfe des High Pure PCR Template Preparation Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) isoliert wurde. Die Standard PCR-Reaktionsansätze sowie das PCR-Reaktionsprogramm sind Tabelle 2.10 und Tabelle 2.11 zu entnehmen.

Tabelle 2.10 PCR-Reaktionsansatz

Komponenten	10 µl Ansatz	50 µl Ansatz (für Sequenzierung)
DreamTaq- Polymerase	5 µl	25 µl
Oligonukleotide (100 pmol/µl) vorwärts/rückwärts	je 1 µl	je 2 µl
DNA	1 µl	1 µl
H ₂ O _{dest.}	2 µl	20 µl

Tabelle 2.11: PCR-Reaktionsprogramm

PCR-Schritte	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 Min	1
Deanturierung	95	30 s	30-40
Hybridisierung	$T_M \pm 2$	1 Min	
Elongation	72	1 Min / 1 kb	
Finale Elongation	72	10 Min	1

2.13.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem PCR Clean up, Gel-Extraction Kit Nucleo Spin Extract II (Machery-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 25 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ eluiert und bei 4 °C gelagert.

2.13.6 Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle können anhand ihrer Größe im elektrischen Feld mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Nukleinsäuren wandern dabei aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode und werden in Abhängigkeit ihrer Molekularmasse und Konformation (linear, zirkulär, supercoiled) aufgetrennt. Dafür wurden Gele mit 1,2 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer verwendet. Zur Bestimmung der Fragmentgröße diente ein 1 kb Plus DNA Leiter (Invitrogen). Der Gellauf wurde in horizontalen Gelkammern der Firma Bio-Rad bei 80 V für 45 - 60 Min durchgeführt. Anschließend wurden die Gele im Ethidiumbromid-Färbebad (siehe 2.9.1, S. 37) für ca. 20 Min gefärbt. Die Detektion und Dokumentation der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm.

2.13.7 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Jeweils 1 μl der zu messenden Lösung wird auf den Sensor des NanoDrop® Spektralphotometer pipettiert und nach Anweisung des Geräts verfahren. Messung von DNA war bis zu 3700 ng/ μl ohne Verdünnung möglich. Der Empfindlichkeitsbereich lag bei Nukleinsäurekonzentrationen zwischen 2 ng/ μl und 1000 ng/ μl bei ± 2 ng/ μl . Bei Konzentrationen über 100 ng/ μl müssen Abweichungen von ± 2 % angenommen werden.

2.13.8 Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten (cfu)

Zwei Proben von je 100 µl Bakterien-Flüssigkultur wurden geerntet. Dabei wurde mit 100 µl die OD₆₀₀ photometrisch bestimmt und mit den anderen 100 µl eine Verdünnungsreihe mit PBS hergestellt (1:10 Verdünnungen bis 10⁻⁶). Jeweils 100 µl von Verdünnungsstufen mit schätzungsweise 10² bzw. 10³ cfu pro 100 µl wurden auf LB-Agarplatten aufgetragen, ausplattiert und bei 37°C für mind. 16 h inkubiert. Danach erfolgte die Auszählung der Bakterienkolonien. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen konnte die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (cfu) im Ausgangsmedium berechnet werden.

2.13.9 hyBeads® Streptavidin-Assay

Zur Isolierung von *S. aureus* aus einer Mischkultur wurden magnetische hyBeads® Streptavidin (Hyglos, Bernried) mit einem Durchmesser von 1,52 µm verwendet. Sie bestehen aus hydrophilen, quervernetzten chemischen Polymeren, an die Streptavidin ligiert ist, das hochaffine Biotin-Bindungsstellen aufweist. An diese werden biotinylierte Phagenproteine gebunden, die an die Zellwandteichonsäure von *S. aureus* binden. Auf diese Weise können mit den hyBeads® Streptavidin Proteine oder Bakterien angereichert werden.

Herstellung von Sa-Beads

375 µl einer magnetischen hyBeads® Streptavidin-Suspension (8 mg/ml) wurden mit 1 ml TBST-BSA-CaCl₂ Puffers gemischt und im magnetischen Feld vom Überstand getrennt. Anschließend wurde mit 2 ml TBST-BSA-CaCl₂ Puffer gewaschen. 1 ml wurde ohne weitere Behandlung bei 4 °C gelagert (Kontroll-Beads), während zum verbleibenden Milliliter 62,5 µl eines biotinylierten, *S. aureus* spezifischen Phagenproteins (His-Js-H636_Δn82_E385Q) (48 µg/ml) zugegeben wurde, das an Zellwandteichonsäuren von *S. aureus* bindet. Diese wurde für 30 Min bei Raumtemperatur in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Dabei entsteht eine Bindung zwischen den biotinylierten *S. aureus* spezifischen Phagenprotein und den Biotin-Bindestellen der magnetischen hyBeads® Streptavidin (Sa-Beads). Durch Anlegen eines Magnetfelds wurden die Sa-Beads vom Überstand getrennt und zweimal in 1 ml TBST-BSA-CaCl₂ Puffer gewaschen und bei 4 °C aufbewahrt.

„Capture Assay“ Protokoll

Von jedem zu untersuchenden MRSA-Stamm wurden zweimal 500 µl Bakteriensuspension mit 1×10^4 cfu/ml vorgelegt. Zu einer der beiden Suspensionen wurden 62,5 µl der behandelten Sa-Beads pipettiert, zur anderen dieselbe Menge an Kontrollbeads. Beide Ansätze wurden für 45 Min bei Raumtemperatur in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Durch Anlegen eines Magnetfelds wurden die Sa-Beads/Kontrollbeads vom Überstand getrennt und durch dreimalige Zugabe von 1 ml 4 °C kaltem TBST gewaschen. Zuletzt wurde der Überstand, als auch die in 500 µl TBST resuspendierten Sa-Beads/Kontrollbeads in geeigneten Verdünnungsstufen auf LB-Agarplatten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend die cfu gezählt.

2.13.10 Bestimmung der Heterogenität einer MRSA Population

Zur Bestimmung der Heterogenität einer MRSA Population wurde eine Populationsprofil-Analyse (PAP) nach Jett *et al.* durchgeführt (Jett *et al.*, 1997). Dazu wurden 10 µl Proben der Verdünnungsstufen $10^0 - 10^{-6}$ einer ÜNK in LB-Medium (ca. 1×10^9 cfu/ml) auf LB-Agarplatten mit verschiedenen Oxacillin-Konzentrationen (0 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,75 µg/ml, 1,5 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml, 12 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml) punktweise aufgebracht. Durch Senkrechtstellen der Agarplatten laufen die nebeneinander angebrachten Bakterientropfen parallel über die Agaroberfläche zur gegenüberliegenden Seite der Platte. Alle LB-Agarplatten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert. Von Agarplatten mit der höchsten Antibiotikakonzentration mit Bakterienwachstum wurden mehrere Kolonien isoliert (präselektionierte Kolonien) und in die Stammhaltung aufgenommen bzw. für weitere Versuche in LB-Medium ohne Antibiotikum kultiviert. Mit diesen präselektionierten MRSA-Stämmen wurde erneut eine PAP (wie oben beschrieben) durchgeführt und auf Änderungen im Resistenzverhalten untersucht. Daneben wurden diese Stämme ohne und mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml Oxacillin bis zu einer OD_{600} von 0,4 in LB-Medium bei 37 °C aerob inkubiert. Durch Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und PBP2a-Nachweis durch Immunoblot wurde die PBP2a-Menge von vorselektionierten mit nicht-vorselektionierten MRSA-Stämmen verglichen.

2.14 Molekularbiologische Methoden

2.14.1 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus 500 µl Übernachtskulturen mittels des High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert. Es wurde dabei nach dem empfohlenem Protokoll von High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) für Gram-positive Bakterien verfahren. Die DNA wurde in 200 µl Elutionspuffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

2.14.2 Photometrische DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA- und RNA-Proben wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Reinheit der Probe wurde durch den Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ ermittelt. Für reine DNA ergibt sich ein Absorptionsquotient von 1,8. Ein höherer Wert als 2,0 deutet auf RNA-Bestandteile hin, ein Wert <1,8 hingegen auf Protein- oder aromatische Verunreinigungen (z.B. Phenol). Reine RNA hat einen Quotienten von 2,0.

2.14.3 Sequenzierung von DNA

Alle DNA-Sequenzierungen dieser Arbeit wurden mit entsprechenden Oligonukleotiden (Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4) von der Firma LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. PCR Produkte wurden wie unter 2.13.5 beschrieben gereinigt. Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach dem Prinzip des "Cycle Sequencing", welches auf dem nach Sanger *et al.* beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Didesoxynukleotiden basiert (Sanger *et al.*, 1997). Zur Sequenzierung wurden, neben 10-80 ng/µl PCR-Produkt (in 10 µl Volumen), die jeweiligen Oligonukleotide in einer Konzentration von 5 pmol/µl (in 4 µl Volumen) benötigt.

2.14.4 Messung der relativen Hydrolyserate von Nitrocefin durch β-Laktamase

Einige MRSA-Stämme bilden neben dem PBP2a-Protein auch eine Penicillinase (BlaZ), die Penicillinderivate durch Spaltung des β-Laktamrings inaktivieren kann. Diese β-Laktamasen werden durch die Repressoren BlaI bzw. MecI reguliert. BlaI kann ähnlich wie MecI auch *mecA* kontrollieren (McKinney *et al.*, 2001). Da sowohl die Sequenz der *bla*-Gene, als auch die der BlaI

bzw. MecI Bindestelle unter den MRSA-Stämmen variiert, wurde in diesem Versuch die relative Nitrocefin-Hydrolyserate (rHyr) durch die BlaZ- β -Laktamase ohne Oxacillin bzw. unter Einfluss von Oxacillin (10 ng/ml, 100 ng/ml) bestimmt. Als Substrat wurde das chromophore Cephalosporinsubstrat Nitrocefin (Calbiochem, Darmstadt) verwendet. Durch Spaltung des β -Laktam-Rings von Nitrocefin durch β -Laktamasen ändert sich die Farbe von gelb zu rot. Die Aktivität der β -Laktamase kann daher durch die Menge des Endprodukts (durch Messung der Farbintensität) bei 486 nm quantitativ bestimmt werden. Die MRSA-Stämme wurden ÜN bei 37°C in LB-Medium angezogen, auf eine Zellzahl von 1×10^4 cfu/ml verdünnt und bei 37°C ohne Oxacillin bzw. mit 10 ng/ml oder 100 ng/ml Oxacillin erneut ÜN bei 180 rpm inkubiert. Für die Messung der β -Laktamase Aktivität wurden 100 μ l Bakteriensuspension ($OD_{600}=1,0$) vorgelegt und zum Start der Reaktion mit 50 μ l Nitrocefin (500 μ g/ml) vermischt (Hua *et al.*, 2001). Die OD_{485} wurde über einen Zeitraum von 40 Min bei 37 °C gemessen. Anhand der Zunahme der OD_{485} -Werte wurden die Nitrocefin-rHyr durch die β -Laktamasen der MRSA-Stämme verglichen.

2.14.5 RNA-Extraktion

Für die Durchführung der RT-qPCR wurde die RNA von elf MRSA-Stämmen extrahiert. Hierzu wurde eine Hauptkultur (30 ml) mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 cfu/ml ohne Oxacillin bzw. mit 10 ng/ml oder 100 ng/ml Oxacillin angesetzt und aerob bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,4 (exponentielle Phase) wurde das Wachstum der Bakterien mit 3,75 ml Stop-Mix beendet und die Bakteriensuspension bei 4 °C für 10 Min und 3.500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 μ l H₂O aufgenommen und über Nacht bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Bakterien erst für 5 Min bei 37 °C mit Lysostaphin (50 μ g/ml) verdaut und in Folge bei 64 °C für 2 Min durch 60 μ l 10 % SDS komplett aufgeschlossen. Nach der Zugabe von 66 μ l Natriumacetat (pH 5,2) und 750 μ l Phenol wurden die Proben für 6 Min weiter bei 64°C inkubiert und in dieser Zeit ca. zehnmal invertiert, bevor sie bei 13.000 rpm und 4 °C für 15 Min erneut abzentrifugiert wurden. Die wässrige Phase wurde in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1,4 ml eines Gemisches aus Ethanol und einer wässrigen 3 M Natriumacetat-Lösung (30:1) versetzt. Nach Lagerung der Proben für 1,5 h bei -80 °C, wurden sie für 30 Min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Ethanol-Gemisch wurde vorsichtig abgenommen und das verbleibende RNA-Pellet mit 900 μ l kaltem 75%-igem Ethanol (-20 °C) gewaschen (10 Min,

13.000 rpm, 4°C). Das weiße RNA-Pellet wurde mit dem SpeedVac® System (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) Vakuum getrocknet und anschließend in 30 µl H₂O durch Schütteln bei 65 °C und 1000 rpm für 5 Min resuspendiert. Die Konzentration der gereinigten RNA wurde mit dem NanoDrop® Spektralphotometer bestimmt ($A_{260} = 1,0$ entspricht ca. 40 µg/ml RNA) und daraus die einzusetzende Menge für den DNase (Macherey-Nagel, Düren) Verdau (Tabelle 2.12) berechnet.

Tabelle 2.12: DNase Verdau

Lösung/Enzym	Menge
RNA	3 µg (in x µl)
DNase (1 U/ul)	3 µl
10 x Reaktionspuffer mit MgCl ₂	3 µl
DEPC-behandeltes H ₂ O	auf 30 µl auffüllen

2.14.6 Quantitative PCR (RT-qPCR)

Der DNase-Verdau Ansatz wurde für 30 Min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch Zugabe von 3 µl 50 mM EDTA und Erwärmung auf 65 °C für 10 Min inaktiviert. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um sicher zu gehen, dass bei der darauffolgenden reversen Transkriptase-Reaktion (vgl. 2.8) nur noch RNA und keine DNA mehr vorliegt. Als Kontrolle fand eine PCR mit den Oligonukleotiden RT-qPCR-*mecA*-for und RT-qPCR-*mecA*-rev statt (Tabelle 2.13), die positiv bewertet wurde, wenn keine Bande sichtbar war. Zusätzlich wurde die Qualität der extrahierten RNA mithilfe des Experion (automatisiertes Elektrophorese System, Bio-Rad, München) bewertet. Bei einem RNA Quality Index (RQI) > 7,0 wurde die RNA aus dem DNase Ansatz für den Reverse Transkriptase-Reaktionsschritt eingesetzt. Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgt nach Herstellerangaben des Kits „GoTranscript Reverse Transcription System“ (Promega, Madison, USA) (siehe Tabelle 2.14).

Tabelle 2.13: Oligonukleotide und Sonden zur Durchführung der RT-qPCR

Oligonukleotide	Sequenz (5'→3')
RT-qPCR- <i>mecA</i> -for	AAA GAA CCT CTG CTC AAC AAG T

MATERIAL UND METHODEN

RT-qPCR- <i>mecA</i> -rev	TGT TAT TTA ACC CAA TCA TTG CTG TT
RT-qPCR- <i>arcC</i> -for	GGT ATG ATA GGC TAT TGG TTG G
RT-qPCR- <i>arcC</i> -rev	TGT TAC GAT TGT CCC TAC AGT T
Sonden	Sequenz (5'→3')
<i>mecA</i> -Sonde	6'FAM-CC AGA TTA CAA CTT CAC GTT CAA C-TAMRA
<i>arcC</i> -Sonde	6'FAM-CTG AAA TCA ATC GCA TTT TAA CTG AAA TGA-TAMRA

Tabelle 2.14: Reaktionskomponenten zur reversen Transkription

Komponenten	Menge
RNA/Primer-Mix	
RNA	5 µg (in x µl)
Zufallsprimer	1 µl
Nuclease-freies Wasser	Auf 5 µl auffüllen
Inkubation bei 70 °C für 5 Min. Anschließend für 5 Min auf Eis abkühlen lassen	
Reverse-Transkription-Reaktionsmix	
GoScript™ 5x Reaktionspuffer	4 µl
MgCl ₂	5 µl
PCR Nukleotide Mix	1 µl
GoScript™ Reverse Transkriptase	1 µl
Nuclease-freies Wasser	4 µl

Mischung des RNA/Primer-Mix mit dem Reverse-Transkription-Reaktionsmix. Anschließend folgen Annealing- (25 °C, 5 Min), Extension- (42 °C, 60 Min) und Inaktivierungsschritt (70 °C, 15 Min).

nach „GoTranscript Reverse Transcription System“ (Promega, Madison, USA)

Zur relativen quantitativen Bestimmung der cDNA von *mecA* wurde ein Reaktionsmix zur Durchführung einer RT-qPCR mit Hilfe der TaqMan®-Technologie angesetzt. Dieser enthielt die in Tabelle 2.15 aufgelisteten Komponenten, die Oligonukleotide RT-qPCR-*mecA*-for und RT-qPCR-*mecA*-rev, sowie die zweifach markierte *mecA*-Sonde (Tabelle 2.13). Zur Normalisierung der Genexpression wurde die vorliegende cDNA des Referenzgens *arcC* analysiert, um die vorhandene Menge an *mecA*-cDNA im Verhältnis zum konstitutiv exprimierten *arcC*-Gen darstellen zu können. In diesem Fall wurden die Oligonukleotide RT-qPCR-*arcC*-for und RT-qPCR-*arcC*-rev zur Amplifizierung verwendet. Zur Detektion kam die *arcC*-Sonde zum Einsatz. Der Zyklus zur Durchführung der RT-qPCR ist Tabelle 2.16 zu entnehmen.

Tabelle 2.15: Verwendete Lösungen zur Durchführung der RT-qPCR^a

Lösung	Menge
Maxima Probe RT-qPCR Master Mix	12,5 µl
Vorwärtsprimer	1 µl (10 pmol/ µl)
Rückwärtsprimer	1 µl (10 pmol/ µl)
Sonde (Tab. 2.13)	0,5 µl (1:10 verdünnt)
ROX-Lösung ^b	0,15 µl
cDNA	1 µl (20 ng)
H ₂ O _{dest.}	8,85 µl

a) Nach Maxima Probe RT-qPCR MasterMix (Fermentas, St. Leon Rot)

b) ROX wurde als interne Referenz zur Normalisierung der Fluoreszenz-Signals verwendet. ROX hat keinen Einfluss auf die RT-qPCR.

Tabelle 2.16: Verwendeter Zyklus zur Durchführung der RT-qPCR

Vorgang	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklusanzahl
UDG-Vorbehandlung	50	2 Min	1
Initiale Denaturierung	95	10 Min	1
Denaturierung	95	15 s	40
Annealing und Extension	60	1 Min	

2.15 Biochemische und analytische Methoden

2.15.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die SDS-Gele bestehen dabei aus einem 4 % Sammelgel und einem Trenngel mit einem Acrylamidgehalt von 11 % (Tabelle 2.17). Die Proteine werden zunächst durch das Sammelgel an der Grenzfläche zum Trenngel konzentriert und dann im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Für die Herstellung der SDS-Gele wurde eine Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1) verwendet (Serva, Heidelberg). Es wurden 0,75 mm dicke Gele der Größe 8 x 7 cm verwendet. Als Proteinstandard wurde der Standard "BenchMark Pre-Stained" (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Vor dem Gellauf wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer (2.9.2, S. 37) versetzt. Das enthaltene Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken der Proteine. Durch hydrophobe Wechselwirkung binden SDS-Moleküle proportional zur Größe

des Proteins, wodurch es zur Bildung negativ geladener Proteine kommt, die im elektrischen Feld als Polyanionen zur Anode wandern können. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben vor dem Auftragen auf SDS-Gele bei 100 °C für 5 Min aufgekocht. Der Gellauf erfolgte in Mini-Protean 3 Gelkammern (Bio-Rad, München) bei konstant 80 V für 15 Min und anschließenden 180 V in 1 x SDS-Laufpuffer (2.9.2, S. 37). Nach dem Gellauf wurden die SDS-Gele in Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung fixiert und gefärbt (2.9.3, S. 38) oder für Immunoblot-Analysen (2.15.3, S. 54) eingesetzt.

Tabelle 2.17: Verwendete Puffer und Lösungen zur Herstellung von Polyacrylamidgelen

Lösungen	11 % Trenngel (10 ml)	4% Sammelgel (2,5 ml)
1 M Tris/HCl, pH 8,0	3,75 ml	-
0,25 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,25 ml
H ₂ O _{dest.}	2,2 ml	0,85 ml
30 % Acrylamid-Lösung	3,7 ml	350 µl
10 % SDS	200 µl	50 µl
10 % Ammoniumpersulfat	40 µl	15 µl
Temed	20 µl	15 µl

2.15.2 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

Nachdem Proteine mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgetrennt wurden (2.15.1, S. 53), erfolgte die Visualisierung der Proteine auf den SDS-Gelen mittels Coomassie-Färbung (Weber und Osborn, 1969). Hierfür wurden die SDS-Gele für 20 - 30 Min unter Schwenken in Coomassie-Brillant-Blau-Lösung gefärbt, wobei der Farbstoff unspezifisch an die Proteine bindet. Anschließend wurde in Entfärberlösung (2.9.3, S. 38) entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren.

2.15.3 Western Blot/Immunoblot

Um bestimmte Proteinbanden nach SDS-PAGE mittels spezifischem Antikörper nachzuweisen, wurden das Proteinbandenmuster vom SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde in einer Mini Trans-Blot Kammer der Firma Bio-Rad (München) bei konstant 80 V für 60 Min in 1 x Blotting-Puffer (2.9.4, S. 38) durchgeführt. Die PVDF-Membran wird anschließend für mind. 1 h oder ÜN in 5 %

Magermilchpulver/PBS bei 4°C abgesättigt. Der Proteinnachweis erfolgte durch Inkubation der Membran mit spezifischen Primärantikörpern (Tabelle 2.5, S. 35) für 1,5 h bei Raumtemperatur unter Schwenken. Nachdem ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges, zehnminütiges Waschen mit PBS-Tween entfernt wurden, erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase- oder alkalischer Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörper (Tabelle 2.5, S. 35) für 60 Min bei Raumtemperatur. Ungebundene Antikörper wurden wieder durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween für je 10 Min von der Membran entfernt. Die enzymatische Nachweisreaktion für Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper erfolgte mit dem „ECL Western Blotting System“ (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben. Zur Detektion der Chemilumineszenz wird Peroxidasesubstrat und Luminol zum Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper gegeben. Luminol wird durch freigesetztes Peroxid oxidiert und das Reaktionsprodukt emittiert Licht, welches auf Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Bei Sekundärantikörpern, die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt sind, wurde die Nachweisreaktion durch die Zugabe von 1 ml NBT-Lösung zu 9 ml Substratgebrauchslösung und 100 µl BCIP-Lösung durchgeführt. Die alkalische Phosphatase wandelt dabei das Nitroblautetrazolium in das rote Diformazan, und das 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat in ein blauen unlöslichen Farbstoff um, so dass die Proteine als violette Banden auf der Membran erscheinen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser abgestoppt.

2.15.4 Exoprotein-Analyse von *S. aureus* Stämmen

Die *S. aureus* Stämme (Tabelle 2.1, S. 30, Tabelle 2.2, S. 31) wurden ausgehend von einer ÜN-Kultur 1:1000 angeimpft und für die Exoprotein-Analyse der exponentiellen Phase bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 (exponentielle Phase) bei 37 °C in 35 ml LB-Medium aerob kultiviert. Für die Exoprotein-Analyse der stationären Phase wurden die *S. aureus* Stämme über Nacht (ca. 16 h) kultiviert (aerob bei 37 °C in 35 ml LB-Medium) und anschließend auf eine OD₆₀₀ von 1,2 (stationäre Phase) eingestellt. Die 35 ml Bakterien-Kulturen wurden bei 6000 rpm für 5 Min abzentrifugiert. Zum Überstand wurden 25 µl StrataClean Resin (Stratagene, Waldbronn) zugegeben und für mindestens 15 s „gevortext“. Dabei absorbieren die StrataClean Resin Kügelchen *S. aureus* Exoproteine. Anschließend wurden die absorbierten Überstandsproteine bei 2000 rpm für 1 Min abzentrifugiert (Herbert *et al.*, 2010). Das Pellet wurde in 48 µl H₂O resuspendiert und mit 12 µl 5 x -Probenpuffer versetzt und für 5 Min bei 100 °C inkubiert. Es

wurden je 10 µl Suspension auf das SDS-Gel aufgetragen (entspricht Exoproteinen aus 5,8 ml Kulturüberstand).

2.16 Methoden zur phänotypischen Analyse von *S. aureus* Stämmen

2.16.1 3D-Kollagengel

Die Staphylokokken wurden unter Schütteln über Nacht bei 37 °C in 5 ml LB-Medium angezogen und anschließend für die Inokulation der 3D-Kollagengele verwendet. Die Vorkultur wurde auf eine Zellzahl zwischen 5×10^3 cfu/ml und 1×10^4 cfu/ml eingestellt. Davon wurden 3,3 µl mit 6,6 µl Kollagenstocklösung (5 µl NaHCO₃-Lösung, 10 µl 10x MEM und 75 µl Typ I Kollagen (3 mg/ml)) vermischt und über eine Fläche von ca. 64 mm² in einem Napf einer 8-Well-Mikrotiterplatte (Ibidi, Martinsried) verteilt (Napffläche: ca. 100 mm²), so dass eine leicht konvexe Oberfläche entsteht (Abbildung 2.1). Nachdem das Kollagen für 45 Min bei 37 °C und 5 % CO₂ gelieren konnte, wurde das Kollagengel mit 150 µl Phenolrot-freiem RPMI 1640 Medium pH 7,4 (Invitrogen, Karlsruhe) überschichtet und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Soweit nicht anders angegeben wurden die 150 µl RPMI Medium mit 3 mg/ml Fibrinogen aus Humanplasma (Calbiochem, Darmstadt) und 4 µg/ml Prothrombin (Merck, Darmstadt) supplementiert (Guggenberger *et al.*, 2012). Zur Berechnung des Mikrokolonie-Durchmessers nach 4 h, 7 h und 16 h von MSSA Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG wurde der Mikrokolonie-Durchmesser bzw. die Länge der unregelmäßigen Mikrokolonien von insgesamt zehn Kolonien aus ca. 5-10 Blickfelder bei 630-facher Vergrößerung (4 h - und 7 h - Zeitpunkt) bzw. 3-4 Blickfelder bei 100-facher Vergrößerung (16 h - Zeitpunkt) gemessen.

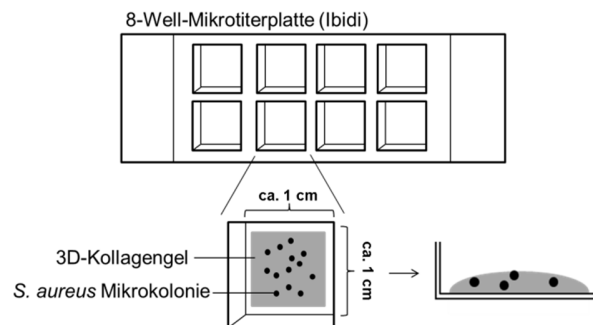


Abbildung 2.1: 3D-Kollagengel-Verteilung in einem Napf einer 8-Well-Mikrotiterplatte zur Kultivierung von Staphylokokken

2.16.2 Immunfluoreszenzfärbung in 3D-Kollagengelen

Direkte Immunfluoreszenzfärbung mit polyklonalem anti-Sau-Antikörper

Im 3D-Kollagengel gewachsene Bakterien wurden mit 3,7 % PFA (2.9.8, S. 40) fixiert und für 20 Min bei RT inkubiert. Anschließend fanden drei Waschschrte für 5 Min mit 1 x PBS unter leichtem Schwenken statt. Danach wurde für 1 h in 3 % BSA mit 5 % Kanninchenserum blockiert. Nach Entfernung der Blockierlösung wurden 150 μ l einer polyklonalen FITC-konjugierten Antikörper-Lösung (Tabelle 2.5, S. 35), die gegen *S. aureus* Oberflächenproteine gerichtet ist auf die 3D-Kollagengele gegeben und für 1,5 h bei RT inkubiert. Zuletzt wurde erneut dreimalig für 5 Min mit 1 x PBS gewaschen. Die 3D-Kollagengele wurden im Konfokalmikroskop auf Immunfluoreszenz untersucht.

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit monoklonalen Antikörpern (mab)

Wie für die direkte Immunfluoreszenzfärbung beschrieben wurden die im 3D-Kollagengel gewachsene Bakterien wurden mit 3,7 % PFA (2.9.8, S. 40) fixiert und für 20 Min bei RT inkubiert. Anschließend fanden drei Waschschrte für 5 Min mit 1 x PBS unter leichtem Schwenken statt. Danach wurde für 1 h in 3 % BSA mit 5 % Kanninchenserum blockiert. Nach Entfernung der Blockierlösung wurden 150 μ l der unverdünnten Hybridoma-Kulturüberstandslösung mit monoklonalen Maus-Antikörpern (siehe mabs, Tabelle 2.5, S. 35) auf die 3D-Kollagengele gegeben und für 1,5 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurde erneut dreimalig für 5 Min mit 1 x PBS gewaschen. 150 μ l eines 1:100 in Blockierlösung verdünnten Fluorochrom-konjugierten Antikörpers gegen Maus-IgG wurden zusammen mit 1 μ g/ml DAPI (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

zur Färbungen der DNA auf die Kollagengele gegeben und 1 h im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurde durch dreimaliges Waschen von 5 Min mit 1 x PBS nicht-gebundener Antikörper und DAPI entfernt (Guggenberger *et al.*, 2012). Bei Färbungen mit anti-Emp wurde als Negativkontrolle eine $\Delta emp\Delta vWbp$ Doppelmutante von *S. aureus* Newman eingesetzt und im Konfokalmikroskop auf Immunfluoreszenz untersucht.

2.16.3 Vitalfärbung von Bakterien

Um den Vitalitätsgrad der Bakterien von im Kollagengel gewachsenen Mikrokolonien beurteilen zu können, wurde das LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieses enthält als Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumjodid und Syto 9, deren Anregungswellenlänge bei 490 bzw. 480 nm und deren Emission bei 635 bzw. 500 nm liegt. Beide Farbstoffe binden an Nukleinsäure. Syto 9 ist membranpermeabel und bindet sowohl Nukleinsäure von lebenden, als auch toten Bakterien. Der kationische Farbstoff Propidium Jodid ist nicht-membranpermeabel. Da die Membran von toten Bakterien geschädigt ist, kann Propidium Jodid in die Zelle eindringen und an die DNA binden. Dadurch wird das Signal von Syto 9 von dem des Propidium Jodids überlagert, wodurch Zelltod angezeigt wird. Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Vitalitätsgrades von Bakterien in einer Mikrokolonie im 3D-Kollagengel wurde der Mediumüberstand abgenommen, durch 150 μ l 1 x PBS mit Propidium Jodid (1:1000) und Syto 9 (1:1000) ersetzt und für 5 h bei RT inkubiert. Diese lange Inkubationszeit wurde gewählt, damit die Fluoreszenzfarbstoffe möglichst bis ins Innere der Mikrokolonien durchdringen können. Kürze Inkubationszeiten hatten selbst für kleinere Mikrokolonien lediglich eine Färbung der Bakterien im Randbereich der Mikrokolonien zur Folge. Zuletzt wurde durch dreimaliges Waschen von 5 Min mit 1 x PBS nicht-gebundener „*Life/Dead-stain*“ entfernt.

2.17 Zellbiologische Methoden

Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper wurden die antigenspezifischen klonalen murinen Hybridomzelllinien von Tobias Veit, 2013 (medizinische Doktorarbeit in Vorbereitung) verwendet.

2.17.1 Lagerung von monoklonalen Hybridoma-Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen für 4 Min bei 400 rpm sedimentiert, in gekühltem Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) resuspendiert und in speziellen Kryoröhrchen bei - 80°C eingefroren. DMSO diffundiert in das Zellinnere und verhindert dort die Kristallbildung von Wasser und damit die Zerstörung der Zellen. Durch Lagerung der Kryoröhrchen in speziell isolierten Einfrierboxen, die in Tiefkühlschränke mit -80°C gestellt wurden, konnte eine optimale Absenkung der Temperatur um 1 °C pro Stunde erreicht werden. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen nach wenigen Tagen in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

2.17.2 Auftauen von Zellen

Zur Kultivierung wurden Kryoröhrchen mit Schraubverschluss der Flüssigstickstoff-Lagerung entnommen und leicht geöffnet, um eingedrungenen Stickstoff entweichen zu lassen. Anschließend wurden die Zellen zügig im 37° C Wasserbad aufgetaut und möglichst schnell in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt dem 10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium tröpfchenweise hinzugefügt wurde. Um DMSO-Spuren zu beseitigen, wurden die Zellen für 3 Min bei 400 rpm abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt. Die so ausgesäten Zellen wurden bei 37° C und 5 % CO₂-gesättigter Atmosphäre inkubiert. Sobald die Zellen 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert.

2.17.3 Kultivierung von monoklonalen Hybridoma-Zellen

Die Hybridoma-Kulturen wurden im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigtem Wasserdampf als Suspensionskultur gehalten und mit FCS und Glutamin supplementiertem Opti-MEM® (Abschnitt 2.3.2, S. 34) in Zellkulturflaschen (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) kultiviert. Je nach Verdopplungszeit wurden die Zellen alle 3 - 4 Tage im Verhältnis 1:10 in frischem Medium verdünnt. Die in den Überstand sekretierten Antikörper wurden sobald ein konfluenter Zellrasen gewachsen war, durch Zentrifugation (4 Min, 400 rpm) von den Zellen getrennt und bis zur Verwendung bei 4 °C in sterilen 50 ml Falcons aufbewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der PBP2a-Produktion von MRSA-Referenzstämmen

MRSA sind aufgrund ihrer Resistenzen in Kliniken zu einem großen infektionsmedizinischen Problem geworden. Ein schnelles und preisgünstiges Verfahren zum Nachweis von MRSA ist notwendig, um frühzeitig präventive Maßnahmen einzuleiten. Im ersten Teil dieser Doktorarbeit wurde deshalb untersucht, ob ein schneller, sensitiver und spezifischer Nachweis des PBP2a-Proteins bei MRSA direkt aus Nasenabstrichen möglich ist. Es wurde ein Zweischrittverfahren entwickelt. Im ersten Schritt wurden *S. aureus* Bakterien mit Magnetbeads, die mit Streptavidin und einem biotinylierten *S. aureus* spezifischen Phagenprotein beschichtet sind (Sa-Beads), angereichert (vgl. Abbildung 3.1). Im zweiten Schritt wurde das MRSA-spezifische PBP2a-Protein induziert, um MRSA schnell und sensitiv nachweisen zu können.

3.1.1 Anreicherung von *S. aureus* mit magnetischen Sa-Beads

Zur Anreicherung von *S. aureus* aus Mischkulturen wurden nach der unter 2.13.9, S. 47 beschriebenen Methode Sa-Beads aus hyBeads® mit biotinyliertem Phagenprotein (Hyglos, Bernied) hergestellt (vgl. Abbildung 3.1). Tabelle 3.1 zeigt das Bindevverhalten der getesteten *S. aureus* Stämme an die Sa-Beads in Reinkultur. Alle untersuchten *S. aureus* Stämme binden zu einer hohen Prozentzahl an die Sa-Beads im Gegensatz zu *S. epidermidis*, der bei einer eingesetzten Zellzahl von 8×10^4 cfu/ml zu 0,13 % der Bakterienpopulation an die Sa-Beads bindet. Wie in Tabelle 3.1 gezeigt, binden zehn von zwölf Stämmen mit sehr hoher Rate ($\geq 99,37$ %) der Bakterien an die Sa-Beads, während zwei Stämme ein mittleres Bindevverhalten aufwiesen (84,56 % für MRSA-DM und 77,89 % MRSA-ND). Als Kontrolle wurden zudem Sa-Beads ohne Phagenprotein eingesetzt (Kontroll-Beads), an die *S. epidermidis* und die *S. aureus* Stämme nur mit geringer Rate binden. Um die Effektivität der Sa-Beads unter realistischen Bedingungen zu prüfen, wurden Mischkulturen aus MRSA-SP (4×10^1 cfu/ml) und *Enterobacter faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* bzw. *S. epidermidis* (je 4×10^3 cfu/ml) getestet und die MRSA-Bakterienanzahl ermittelt, die an die Sa-Beads bindet bzw. im Überstand verbleibt (Tabelle 3.2). In allen vier Mischkulturen konnten $\geq 99,99$ der eingesetzten MRSA-SP Bakterien mithilfe der Sa-Beads angereichert werden. Die charakteristisch in Nasenabstrichen vorkommenden Keime

ERGEBNISSE

E. faecalis, *E. coli*, *S. pyogenes* bzw. *S. epidermidis* banden zu 4,28 %, 27,96 %, 18,28 % bzw. 0,11 % an die Sa-Beads (Tabelle 3.2).

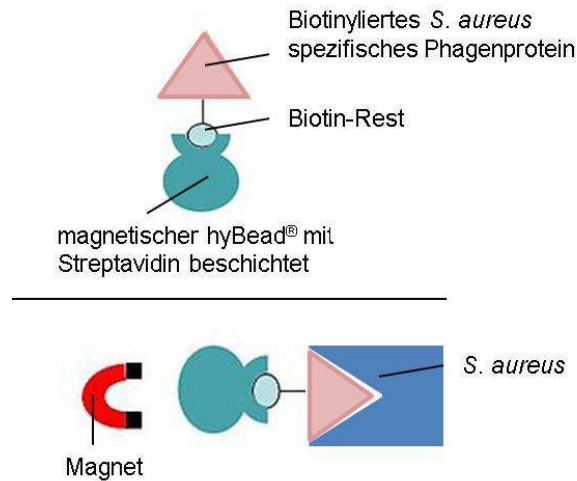


Abbildung 3.1: Aufbau eines magnetischen Sa-Beads mit gebundenem biotinylierten *S. aureus* spezifischen Phagenprotein und dessen Bindung an *S. aureus*

Das biotinylierte Phagenprotein bindet an die Wandteichonsäure von *S. aureus*. Durch Anlegen eines Magnetfelds können die hyBeads® Streptavidin-*S. aureus* vom Überstand getrennt werden. (Nach Hyglos).

ERGEBNISSE

Tabelle 3.1: Bindung von Staphylokokken Reinkulturen an Sa-Beads

Stamm	Anreicherungsgrad in % (Bindung an Sa-Beads)			
	Sa-Beads	Überstand	Kontroll-Beads	Überstand
<i>S. epidermidis</i> (Patientenisolat)	0,13	99,87	< 0,01	100
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	99,78	0,22	0,08	99,92
MRSA-RH	99,88	0,12	0,04	99,96
MRSA-SP	99,85	0,15	0,07	99,93
MRSA-WI	99,37	0,63	0,05	99,95
MRSA-BAR	99,92	0,08	0,02	99,98
MRSA-DM	84,56	15,44	0,04	99,96
MRSA-ND	77,89	22,11	0,08	99,92
MRSA-SD	99,87	0,13	2,21	97,79
MRSA-KG	99,96	0,04	0,17	99,83
MRSA-BER	99,88	0,12	0,04	99,96
MRSA-KLN	98,85	1,15	0,34	99,66
MRSA-GB	99,45	0,55	16,23	83,77

Prozentangaben der an Sa-Beads/Kontrollbeads gebundener oder im Überstand verbleibender Staphylokokken bei einer Zellzahl von 8×10^4 cfu/ml. Stämme: *S. aureus* ATCC 6538, *S. epidermidis*, MRSA-Stämme: RH, SP, WI, BAR, DM, ND, SD, KG, BER, KLN und GB.

Tabelle 3.2: Anreicherung von MRSA-SP aus verschiedenen Mischkulturen

Stammbezeichnung in Mischkultur	Anreicherungsgrad in % (Bindung an Beads)	
	Sa-Beads	Überstand
<i>E. faecalis</i> (Patientenisolat)	4,28	95,72
MRSA-SP	≥ 99,99	< 0,01
<i>E. coli</i> DH 5α	27,96	72,04
MRSA-SP	≥ 99,99	< 0,01
<i>S. pyogenes</i> (Patientenisolat)	18,28	81,72
MRSA-SP	≥ 99,99	< 0,01
<i>S. epidermidis</i> (Patientenisolat)	0,11	99,89
MRSA-SP	≥ 99,99	< 0,01

Prozentangaben der an Sa-Beads gebundener oder im Überstand verbleibender Bakterien bei einer Mischkultur mit einer eingesetzten Zellzahl von 4×10^1 cfu/ml (MRSA-SP) und 4×10^3 cfu/ml (*E. faecalis*, *E. coli*, *S. pyogenes*, bzw. *S. epidermidis*).

3.1.2 Untersuchungen zur Wachstumsrate von MRSA-Stämmen

Um aus Patientenproben möglichst schnell ausreichend PBP2a für den Nachweis zu erhalten, wurde nach optimalen Wachstumsbedingungen für MRSA gesucht. Im ersten Schritt wurde das Wachstum der MRSA-Stämme in LB-Medium (37 °C, aerob, unter Schütteln) bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^5 cfu/ml untersucht (Abbildung 3.2 und Tabelle 3.3). Alle Stämme wachsen in LB-Flüssigmedium in etwa gleich gut: Nach ca. 2 h treten die Bakterien von der lag- in die log-Phase über und erreichen nach ca. 7 h die stationäre Phase. Nach 6 h bzw. 24 h betrug die Zellzahl je nach Stamm zwischen $3,3 \times 10^7$ cfu/ml und $2,7 \times 10^8$ cfu/ml bzw. zwischen $4,3 \times 10^8$ cfu/ml und $9,5 \times 10^8$ cfu/ml (Tabelle 3.3).

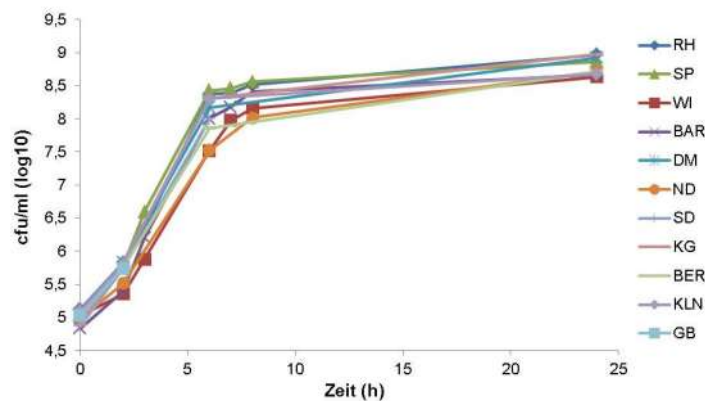


Abbildung 3.2: Wachstumskurven der MRSA-Referenzstämmen in LB-Flüssigmedium

Ausgangszellzahl: 1×10^5 cfu/ml. Wachstum in LB-Medium für 24 h bei 37 °C unter Schütteln. MRSA-Stämme: RH, SP, WI, BAR, DM, ND, SD, KG, BER, KLN und GB.

Tabelle 3.3: Zellzahlen von MRSA-Stämmen zu unterschiedlichen Wachstumszeitpunkten bei einer Ausgangszellzahl von ca. 1×10^5 cfu/ml

MRSA-Stamm	0 h	2 h	3 h	6 h	8 h	24 h	mVR
MRSA-RH	$1,3 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^6$	$2,4 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$9,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^2$
MRSA-SP	$1,1 \times 10^5$	$6,1 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$	$2,7 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$	$7,4 \times 10^8$	$2,4 \times 10^2$
MRSA-WI	$1,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^7$	$1,5 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^1$
MRSA-BAR	$6,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$4,6 \times 10^8$	$2,3 \times 10^2$
MRSA-DM	$1,1 \times 10^5$	$6,9 \times 10^5$	n.u.	$1,5 \times 10^8$	n.u.	$8,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^2$
MRSA-ND	$9,6 \times 10^4$	$3,3 \times 10^5$	n.u.	$3,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$	$5,2 \times 10^8$	$1,7 \times 10^1$
MRSA-SD	$7,4 \times 10^4$	$5,6 \times 10^5$	n.u.	$1,0 \times 10^8$	n.u.	$6,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^2$
MRSA-KG	$8,1 \times 10^4$	$6,7 \times 10^5$	n.u.	$2,1 \times 10^8$	n.u.	$9,5 \times 10^8$	$2,9 \times 10^2$
MRSA-BER	$1,2 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	n.u.	$7,2 \times 10^7$	n.u.	$5,2 \times 10^8$	$9,8 \times 10^1$
MRSA-KLN	$1,3 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	n.u.	$2,0 \times 10^8$	n.u.	$4,8 \times 10^8$	$2,5 \times 10^2$
MRSA-GB	$1,1 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	n.u.	$6,3 \times 10^7$	n.u.	$4,4 \times 10^8$	$1,8 \times 10^2$

Wachstum in LB-Medium bei 37 °C. Angaben in cfu/ml. n.u.: nicht untersucht. mVR: mittlere Vermehrungsrate (0 h- 4,5 h).

ERGEBNISSE

Bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu/ml zeigten sich deutliche Unterschiede während den ersten sieben Stunden Wachstum in LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln (Tabelle 3.4). Die MRSA-Stämme ließen sich in drei Gruppen einteilen: MRSA-WI und ND erreichten nach 7 h Inkubation nur Zellzahlen von $6,5 \times 10^5$ cfu/ml bzw. $4,5 \times 10^5$ cfu/ml (langsam wachsende MRSA-Stämme mit niedriger Vermehrungsrate). Fünf MRSA-Stämme (MRSA-SP, DM, SD, KG und GB) wuchsen nach 7 h auf Zellzahlen zwischen $1,5 \times 10^6$ cfu/ml und $7,8 \times 10^6$ cfu/ml an (moderates Zellwachstum). MRSA-RH, BAR, BER und KLN erreichten in derselben Zeit Zellzahlen von $1,1 \times 10^7$ cfu/ml bis $2,0 \times 10^7$ cfu/ml (schnell wachsende MRSA-Stämme).

Tabelle 3.4: Zellzahlen von MRSA-Stämmen zu unterschiedlichen Wachstumszeitpunkten bei einer Ausgangszellzahl von ca. 5×10^2 cfu/ml

MRSA-Stamm	0 h	5 h	6 h	7 h	mVR
MRSA-RH	$4,9 \times 10^2$	$6,7 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$8,1 \times 10^4$
MRSA-SP	$7,7 \times 10^2$	$5,1 \times 10^5$	$2,6 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$
MRSA-WI	$5,6 \times 10^2$	$9,7 \times 10^4$	$3,0 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$9,0 \times 10^2$
MRSA-BAR	$3,8 \times 10^2$	$7,2 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$7,6 \times 10^4$
MRSA-DM	$4,1 \times 10^2$	$1,9 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	$9,0 \times 10^3$
MRSA-ND	$2,0 \times 10^2$	$4,9 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^3$
MRSA-SD	$2,9 \times 10^2$	$1,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$8,6 \times 10^3$
MRSA-KG	$3,5 \times 10^2$	$1,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$8,6 \times 10^3$
MRSA-BER	$6,9 \times 10^2$	$4,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$4,2 \times 10^4$
MRSA-KLN	$6,9 \times 10^2$	$6,0 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$	$5,1 \times 10^4$
MRSA-GB	$4,7 \times 10^2$	$1,8 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$2,8 \times 10^6$	$8,5 \times 10^3$

Wachstum in LB-Medium bei 37 °C. Angaben in cfu/ml. Fettgedruckt: MRSA-Stämme mit niedriger Zellzahl. mVR: mittlere Vermehrungsrate (0 h – 7 h).

Um das Wachstum von MRSA in möglichst kurzer Zeit optimal zu fördern, wurde der Einfluss von Eisenverbindungen (Fe_2SO_4 , FeCl_3 und Hämoglobin) in jeweils vier verschiedenen Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten von MRSA getestet. Die Aufnahme von Eisen bzw. Häm kann über zwei Wege laufen: direkt über Bindeproteine auf der Zelloberfläche, die Eisen/Häm mithilfe von ABC-Permeasen ins Zellinnere transportieren (Koster, 2001) oder indirekt mithilfe von Siderophoren/Hämophoren, die ins extrazelluläre Medium sekretiert werden, wo sie Fe^{3+} -Ionen bzw. Häm binden. Über einen spezifischen Rezeptor gelangen die beladenen Siderophoren/Hämophoren anschließend zurück ins Zytoplasma. Fe^{3+} wird zu Fe^{2+} reduziert und Häm in Biliverdin und Eisen gespalten (Skaar *et al.*, 2004). Als Cofaktor spielt Eisen in vielen

enzymatischen Reaktionen eine entscheidende Rolle (Wandersman und Delepelaire, 2004). So stellt Eisen beispielsweise als Hauptbestandteil der Zytochrome bei der Zellatmung eine wichtige Komponente dar (Madigan *et al.*, 2003, Somerville und Proctor, 2009) und ist somit für das Wachstum von *S. aureus* essentiell. In einem Zeitraum von 8 h konnte jedoch für keine der drei Eisenverbindungen ein fördernder Effekt auf das Wachstum nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). Eine FeCl₃-Konzentration ab 5 mM wirkte inhibitorisch, was mit der durch Eisen katalysierten Fenton-Reaktion zusammenhängen könnte, bei der organische Substrate mit Wasserstoffperoxid zu hoch reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reagieren (Pignatello *et al.*, 2006).

Da LB-Medium nur sehr geringe Mengen Glukose enthält (< 100 µM) und Bakterien daher bereits in der frühen Wachstumsphase die weniger energiereichen Aminosäuren als Kohlenhydratquelle verwerten müssen (Sezonov *et al.*, 2007), wurde LB-Medium außerdem mit verschiedenen Zuckern supplementiert, um die Staphylokokken mit einer energiereichen C-Quelle zu versorgen. Zum Einsatz kam D-Glukose (Aldose) und D-Fruktose (Ketose) (jeweils 350 mM), die in ihrer phosphorylierten Form wichtige Bestandteile der zentralen Stoffwechselwege von *S. aureus* sind. Die Zugabe von D-Glukose oder D-Fruktose zu LB-Flüssigmedium führte jedoch zu keinem gesteigerten Bakterienwachstum (Daten nicht dargestellt).

Da die klonale Linie von MRSA-RH im gesamten Bundesgebiet vorkommt und besonders häufig (> 30% bis > 50%) an Bakteriämien/Septikämien, Pneumonien, Harnwegs- und Wundinfektionen beteiligt ist, wurde für Versuche, die nicht mit allen MRSA-Referenzstämmen durchgeführt wurden, dieser Stamm als Prototyp untersucht (Heeg und Schröppel, 2009). Da in einem Nasenabstrich von MRSA-Trägern nach „Auswaschen“ in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung üblicherweise 10² - 10³ cfu von MRSA erhalten werden, wurde der Einfluss von Oxacillin auf das Wachstumsverhalten von MRSA-RH bei einer niedrigen Ausgangszellzahl untersucht (Abbildung 3.3). Während bei einer Ausgangszellzahl von 8 x 10² cfu/ml das Wachstum durch 1 µg/ml Oxacillin in LB-Medium fast vollständig inhibiert wurde (Vermehrungsrate, 0 h - 7 h: 3 x 10¹), wurde das Wachstum durch 100 ng/ml Oxacillin deutlich weniger inhibiert (Vermehrungsrate, 0 h - 7 h: 4 x 10³) und mit 10 ng/ml oder geringer Oxacillinkonzentration gar nicht beeinflusst (Vermehrungsrate, 0 h - 7 h: 7 x 10⁴). Aus diesem Grund sollte bei einer Ausgangszellzahl von 8 x 10² cfu/ml nicht mehr als 10 ng/ml Oxacillin eingesetzt werden, wenn eine Inhibition des Zellwachstums vermieden werden soll.

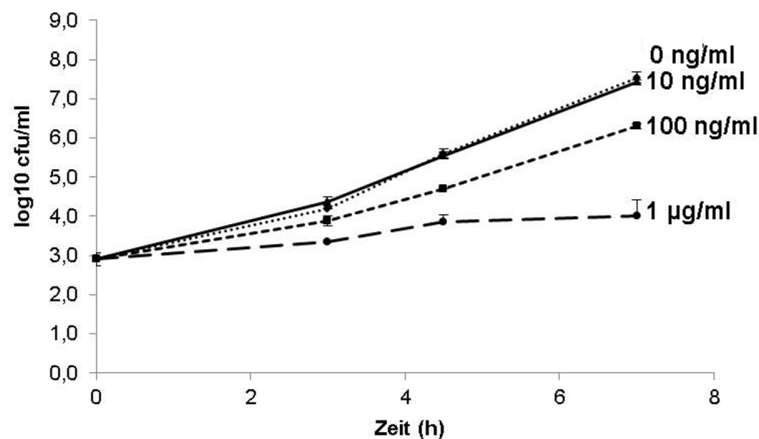


Abbildung 3.3: Wachstumsverhalten von MRSA-RH ohne und mit Oxacillin

Wachstumskurve über 7 h von MRSA-RH in verschiedenen Konzentrationen von Oxacillin in LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln. Ausgangszellzahl: 8×10^2 cfu/ml. 0 ng/ml: —, 10 ng/ml Oxacillin: ·····, 100 ng/ml Oxacillin: ---, 1 µg/ml Oxacillin: ———. Vermehrungsrate (0 h - 7 h) mit 1 µg/ml Oxacillin: 3×10^1 , 100 ng/ml Oxacillin: 4×10^3 , bzw. 0-10 ng/ml Oxacillin 7×10^4 .

3.1.3 Einfluss von NaCl auf die Induktion von PBP2a

Es wurde der Einfluss von NaCl auf die PBP2a-Produktion untersucht, da bereits 1987 gezeigt wurde, dass 5 % NaCl die PBP2a-Proteinbiosynthese induzieren kann (Chambers und Hackbarth, 1987; Madiraju *et al.*, 1987). Dazu wurde MRSA-RH zum einen mit einer Ausgangszellzahl von 1×10^6 cfu/ml für 4,5 h in LB-Medium (37 °C, aerob, unter Schütteln) inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass in 1 ml Kulturvolumen mit ca. 2×10^8 cfu die Menge an gebildetem PBP2a ohne oder mit 1 % NaCl gleichbleibend ist, hingegen mit 2 % und 4 % ein deutlicher Anstieg an gebildetem PBP2a im Immunoblot sichtbar ist (Abbildung 3.4). Ein Wachstum mit 6 % NaCl führte möglicherweise aufgrund von Wachstumshemmung zu einem Rückgang an nachzuweisendem PBP2a. Zum anderen wurde der Versuch mit einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu/ml für 7 h Wachstum in LB-Medium (37 °C, aerob, unter Schütteln) durchgeführt. Unter diesen Wachstumsbedingungen erreicht MRSA-RH Zellzahlen von ca. 4×10^7 cfu/ml. In 1 ml Kulturvolumen konnte kein Anstieg von PBP2a durch 2 % oder 4 % NaCl erreicht werden. Die Menge an produziertem PBP2a war in allen Ansätzen gleich und sank erst bei Wachstum in der Anwesenheit von 6 % NaCl ab.

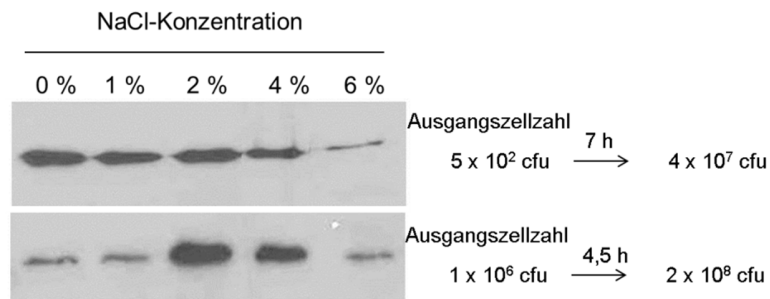


Abbildung 3.4: PBP2a-Immunoblot von MRSA-RH bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen

Darstellung der PBP2a-Produktion von MRSA-RH bei einer initialen Zellzahl von 5×10^2 cfu in 1 ml Kulturvolumen nach 7 h (aufgetragene Zellzahl ca. 4×10^7 cfu) bzw. von 1×10^6 cfu in 1 ml Kulturvolumen nach 4,5 h (aufgetragene Zellzahl ca. 2×10^8 cfu) Wachstum in LB-Medium (bei 37°C unter Schütteln) unter NaCl-Konzentrationen von 0 % - 6% (wie angezeigt).

3.1.4 Enzymatischer Zellaufschluss mit PRF-119

PRF-119 (Hyglos, Bernried) ist ein rekombinantes, chimäres *S. aureus*-spezifisches Phagenlysin mit zwei funktional unterschiedlichen Domänen. Die zellwandbindende Domäne stammt vom Bakteriozin Lysostaphin, die für die spezifische Bindung an die Zellwand von *S. aureus* verantwortlich ist. Die Cystein- und Histidin-abhängige Aminopeptidase/Hydrolase (CHAP) Domäne des Endolysins von Phage K stellt die enzymatische Domäne dar, die die Spaltung des Peptidoglykans verursacht (Fischetti, 2008, Idelevich *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde das Phagenlysin PRF-119 verwendet, um spezifisch das *S. aureus* Peptidoglykan zu spalten und das in die Zellwand eingebettete PBP2a für die Detektion durch Antikörper optimal freizulegen. Nach 4,5 h-Kultivierung erreicht MRSA-RH bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^6 cfu/ml ca. 2×10^8 cfu/ml (vgl. Tabelle 3.3). 1 ml Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in einer PRF-119-Lösung (mit unterschiedlicher Konzentration) resuspendiert. PRF-119 wurde in den Konzentrationen 2,3 $\mu\text{g/ml}$, 23 $\mu\text{g/ml}$ und 230 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, wobei die Inkubationszeit 5 Min oder 60 Min bei 37°C betrug (Abbildung 3.5). Die größte Menge an nachgewiesenem PBP2a wurde bei einer Inkubationszeit von 5 Min mit 230 $\mu\text{g/ml}$ PRF-119 erreicht. 2,3 $\mu\text{g/ml}$ und 23 $\mu\text{g/ml}$ PRF-119 führten zu einer deutlich schwächeren PBP2a-Bande im Immunoblot. Lag die Inkubationszeit bei 60 Min, reichten 2,3 $\mu\text{g/ml}$ PRF-119 aus, um eine ähnlich intensive Bande wie nach 5 Min mit 23 $\mu\text{g/ml}$ PRF-119 zu erreichen. Die detektierte Menge an PBP2a nach 60-minütigem Inkubation mit 23 $\mu\text{g/ml}$ oder 230 $\mu\text{g/ml}$ PRF-119 war ähnlich und vergleichbar mit der nachgewiesenen Menge PBP2a nach

5 Min Inkubation mit 230 µg/ml PRF-119. Da die Zeitspanne von der Untersuchung bis zum vorliegenden Testergebnis bei MRSA-Schnellnachweistests ein wichtiger Faktor ist, stellt die Inkubation der Bakterien für 5 Min in einer 230 µg/ml PRF-119-Lösung bei 37 °C eine Möglichkeit zum optimalen PBP2a-Nachweis dar.

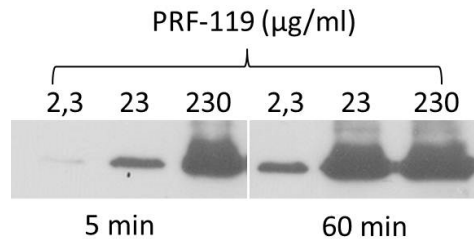


Abbildung 3.5: PBP2a-Immunoblot von MRSA-RH nach Inkubation mit PRF-119

Darstellung der PBP2a-Produktion von MRSA-RH bei einer initialen Zellzahl von 1×10^6 cfu/ml. Nach 4,5 h wurde 1 ml der Bakteriensuspension (enthält ca. 2×10^8 cfu) abzentrifugiert (5 Min, 6000 rpm) und das Bakteriensediment in einer PRF-119-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen (wie angezeigt) resuspendiert und für 5 Min bzw. 60 Min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

3.1.5 PBP2a-Nachweis von MRSA-Stämmen unter verschiedenen Wachstums- und Lysebedingungen

Die Detektionsgrenze für PBP2a mit dem in dieser Arbeit verwendeten PBP2a-Antikörper (Abschnitt 2.5, S. 35) liegt bei ca. 1 ng, was ca. 1×10^{10} PBP2a-Molekülen entspricht. Bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu liegt die Zellzahl nach 7 h Wachstum in LB-Medium für neun der elf MRSA-Referenzstämmen bei mindestens 1×10^6 cfu (vgl. Tabelle 3.4, S. 64). Für einen PBP2a-basierten MRSA-Schnellnachweistest müssten die MRSA-Stämme demnach ca. 1×10^4 PBP2a-Moleküle pro Zelle bilden, was als realistischer Wert eingeschätzt wird.

In dieser Arbeit wurde geprüft, ob eine siebenstündige Inkubation in LB-Medium bei 37 °C bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu in 1 ml Kulturvolumen ausreicht, um alle MRSA-Stämme anhand ihrer PBP2a-Produktion im Immunoblot nachzuweisen. Des Weiteren wurde geprüft, ob eine Induktion mit 10 ng/ml Oxacillin und/oder ein Zellaufschluss mit 230 µg/ml PRF-119 für 5 Min zu einem schnellen PBP2a-Nachweis beiträgt. Zur Übersicht des genauen Versuchsablaufs siehe Abbildung 3.6. Eine Oxacillin-Konzentration von 10 ng/ml Oxacillin wurde deshalb zur Induktion gewählt, da in Abbildung 3.3, (S. 66) gezeigt werden konnte, dass diese Oxacillin-Konzentration bei 8×10^2 cfu/ml nicht zur Inhibition des Zellwachstums führt. Die aufgetragene

Zellzahl betrug mit Ausnahme von MRSA-WI und ND zwischen 2×10^6 cfu und 2×10^7 cfu. MRSA-WI und MRSA-ND wuchsen langsamer und erreichten bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu/ml in 1 ml Kulturvolumen nach 7 h nur ca. 7×10^5 cfu bzw. 5×10^5 cfu (vgl. Tabelle 3.4, S.64). Mit Ausnahme von MRSA-KG produzierten alle MRSA-Stämme auch ohne Induktion durch Oxacillin oder Inkubation mit PRF-119 nach 7 h ausreichende PBP2a-Menge, um es im Immunoblot nachzuweisen (Abbildung 3.7, S. 70). Die Mindest-Zellzahl der MRSA-Stämme, um PBP2a auch ohne Oxacillin-Induktion im Immunoblot eindeutig nachweisen zu können, lag bei ca. $3 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cfu (MRSA-RH, SP, BAR, BER, KLN und GB) bzw. $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cfu (MRSA-WI, DM, ND, SD). Für MRSA-KG reichten 2×10^6 cfu nicht aus, um PBP2a unter nicht-induzierten Bedingungen nachzuweisen.

Eine Induktion der PBP2-Produktion durch 10 ng/ml Oxacillin war nur für die fünf MRSA-Stämme RH, SP, WI, BAR und KG möglich. Die PBP2a-Menge konnte dabei um ca. das doppelte bis um das 5-fache gesteigert werden, so dass geringere Zellzahlen für den PBP2a-Nachweis ausreichen, wodurch die Zeit bis zum Vorliegen des Testergebnis verkürzt werden kann. Für MRSA-KG konnte nach 7 h Inkubation in LB-Medium ohne Induktion durch Oxacillin kein PBP2a im Immunoblot nachgewiesen werden. Durch Induktion mit 10 ng/ml Oxacillin oder Inkubation des Bakteriensediments mit PRF-119 konnte hingegen auch für MRSA-KG nach 7 h PBP2a im Immunoblot eindeutig nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb von 7 h alle MRSA-Referenzstämme anhand der PBP2a-Produktion mittels Immunoblot eindeutig nachweisen lassen. Für zehn der elf Referenzstämme war dafür keine Induktion durch Oxacillin nötig. Um jedoch alle elf MRSA-Referenzstämme (mit MRSA-KG) bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu innerhalb von 7 h nachweisen zu können, war entweder eine Induktion mit 10 ng/ml Oxacillin oder eine fünfminütige Inkubation des Bakteriensediments mit 230 µg/ml PRF-119-Lösung bei 37 °C nötig. Zwei (18 %) der elf getesteten MRSA-Stämme (MRSA-WI und SD) könnten bereits nach ca. 5 h in einem PBP2a-Schnellnachweistest nachgewiesen werden. Nach 6 h würden sich fünf (45 %) der elf MRSA-Stämme (MRSA-WI, SD, RH, SP und BAR) anhand der PBP2a-Produktion detektieren lassen (vgl. Tabelle 3.5).

ERGEBNISSE

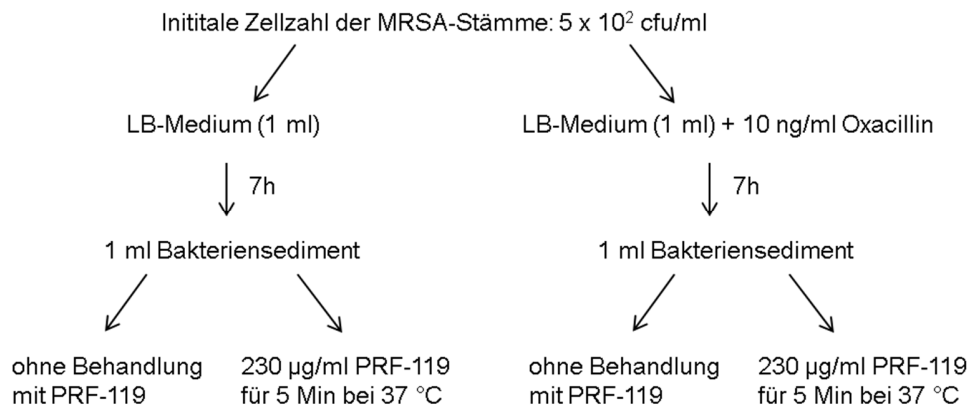


Abbildung 3.6: Übersicht des Versuchsablaufs zum Nachweis von PBP2a ohne und mit 10 ng/ml Oxacillin bzw. ohne und mit 230 µg/ml PRF-119

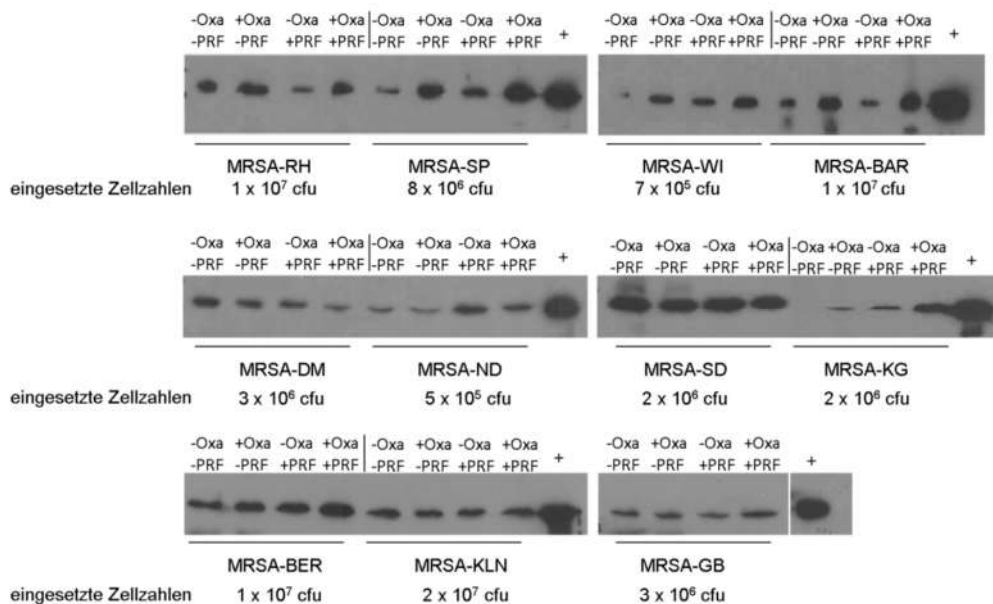


Abbildung 3.7: PBP2a-Immunoblot von MRSA-Stämmen unter verschiedenen Wachstums- und Lysebedingungen

Darstellung der PBP2a-Produktion von MRSA-Referenzstämmen nach 7 h Wachstum in 1 ml LB-Medium (bei 37 °C unter Schütteln) bei einer initialen Zellzahl von 5×10^2 cfu/ml. Die 1 ml-Bakteriensuspension wurde zentrifugiert und das Sediment in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 Min bei 100 °C aufgeköcht. Eingesetzte Zellzahlen: siehe auch Tab. 3.4 (7 h - Zeitpunkt), S. 60. +: 50 ng rekombinantes PBP2a. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und PBP2a durch Immunoblot nachgewiesen. - Oxa: ohne Oxacillin, + Oxa: mit 10 ng/ml Oxacillin, - PRF: ohne PRF-119-Lyse, + PRF: mit 230 µg/ml PRF-119-Lyse für 5 Min bei 37 °C.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.5: Übersicht zu Mindest-Zellzahlen zum PBP2a-Nachweis von MRSA-Stämmen

MRSA-Stamm/ PBP2a-Produktion	Mindest-Zellzahl zum PBP2a- Nachweis unter nicht-induzierten Bedingungen ¹	Mindest-Zellzahl zum PBP2a-Nachweis unter Oxacillin-induzierten Bedingungen ² oder Inkubation mit PRF-119 ³ und Inkubationsdauer
RH	$3 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ cfu	ca. 1×10^6 cfu (ca. 6 h)
SP		
BAR		ca. 5×10^6 cfu (ca. 7 h)
BER		
KLN		
GB		
WI	$2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cfu	ca. 1×10^5 cfu (ca. 5 h)
DM		ca. 1×10^6 cfu (ca. 7 h)
ND		ca. 5×10^5 cfu (ca. 7 h)
SD		ca. 2×10^5 cfu (ca. 5 h)
KG	Keine PBP2a-Bande mit 2×10^6 cfu	ca. 2×10^6 cfu (ca. 7 h)

Mindest-Zellzahlen von MRSA-Referenzstämmen zum PBP2a-Nachweis im Immunoblot (bei 37 °C unter Schütteln) bei einer initialen Zellzahl von 5×10^2 cfu/ml.

¹: Inkubation in LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln.

²: Inkubation in LB-Medium mit 10 ng/ml Oxacillin bei 37 °C unter Schütteln.

³: Inkubation in LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln. Anschließende Inkubation des Bakteriensediments in einer 230 µg/ml PRF-119-Lösung für 5 Min bei 37 °C unter Schütteln.

3.2 Molekularbiologischer Hintergrund von HA-MRSA-Referenzstämmen

Aufgrund der Feststellung von starken Schwankungen in der PBP2a-Produktion von deutschen MRSA-Referenzstämmen wurde im nächsten Schritt nach transkriptionalen/translationalen Ursachen gesucht. Dazu wurde die *mec*- und *bla*-Region sequenziert, die Transkription von *mecA* bzw. die Produktion von PBP2a, sowie der β -Laktamase analysiert und das Antibiotika-Resistenzverhalten der elf MRSA-Referenzstämme untersucht.

3.2.1 Genetische Diversität der *mec*- und *bla*-Region in MRSA-Stämmen

Die klonale Analyse von MRSA-Stämmen basiert auf der Methode der Multi-Lokus-Sequenz-Typisierung (MLST), die auf der Sequenz von sieben „Haushaltsgenen“ („*housekeeping genes*“) beruht. Je nach Sequenz des jeweiligen Gens ergibt sich für jeden Stamm ein bestimmtes Allelprofil, das einem bestimmten Sequenztyp (ST) zugeordnet werden kann. Für eine genauere Darstellung phylogenetischer Abstammung können Stämme zudem in klonale Komplexe („*clonal complex*“, CC) eingeteilt werden, deren Sequenzen in fünf der sieben Haushaltsgene identisch sein müssen, um demselben CC zu entsprechen (Enright *et al.*, 2000). Eine genaue Einteilung der deutschen MRSA-Referenzstämme nach ST und CC kann Tabelle 3.6 entnommen werden. Zur weiteren Charakterisierung der Stämme wurde außerdem eine SCCmec-Typisierung und *agr*-Gruppierung vorgenommen (Tabelle 3.6). Das *agr*-Regulationsoperon nimmt auf eine Vielzahl an Virulenzfaktoren (z. B. Exoproteine) Einfluss, so dass je nach *agr*-Gruppenzugehörigkeit die Expression von Virulenzgenen bei *S. aureus* Stämmen variieren kann (Geisinger *et al.*, 2012). Daher wurde für alle MRSA-Stämme dieser Arbeit die *agr*-Gruppe durch Genotypisierungen bestimmt. Die MRSA-Stämme konnten den *agr*-Gruppen I, II oder III zugeordnet werden. Die Sequenzierung des *mecA*-Gens, als auch der Promotorregion ergab eine 100 %-ige Homologie für alle Stämme. Sieben MRSA-Stämme hatten ein deletiertes *mecI*-Gen, während in den beiden MRSA-Stämmen WI und GB zwar das *mecI*-Gen vorlag, aber eine Punktmutation im Kodon Gln₆₈ (CAA → Stopkodon) bzw. Gln₁₁₅ (GAA → Stopkodon) enthalten ist, die nachgewiesenermaßen als Stopkodon zu einem verkürzten, nicht-funktionalem Repressorprotein führt (siehe Abbildung 3.8) (Oliveira und de Lencastre, 2011, Rosato *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte für die beiden genannten Stämme eine Punktmutation in der RBS („*ribosomal binding site*“) von *mecI* detektiert werden, die zu einem Basenaustausch von GGAA (Wildtyp) zu GGAG (klinische Stämme) führt, die auch für andere MRSA-Isolate beschrieben

ERGEBNISSE

wurde. Für die MRSA-Stämme WI und GB ist diese Punktmutation jedoch nicht von Bedeutung, da *MecI* in diesen beiden Stämmen nicht funktional ist. Die Punktmutation spiegelt jedoch die hohe Mutationsrate in MRSA-Stämmen wider. Für Stämme mit funktionalem *mecI*-Gen konnten Rosato *et al.* zeigen, dass die Punktmutation in der RBS von *mecI* im Vergleich zum Wildtyp zu einer verminderten Repression von *mecA* führt (Rosato *et al.*, 2003). Die Sequenz des *mecRI*-Gens der Stämme RH, KLN, WI und GB war identisch zu der des funktionalen *mecRI*-Gens des Vergleichsstamms MRSA252 (*mec*-Klasse A), während in allen anderen getesteten MRSA-Stämmen nur die N-terminale Zytoplasmadomäne (319 Kodons) von *MecR1* identifiziert werden konnte, die für die Spaltung von *MecI* verantwortlich ist (*mec*-Klasse B). Anstelle der stromabwärts gelegenen 261 Kodons des *mecRI*-Gens ist eine Insertionssequenz (IS1272) eingefügt (Kobayashi *et al.*, 1999) (vgl. Abbildung 3.8, S. 74).

Tabelle 3.6: Typisierung und Gruppierung der MRSA-Referenzstämme

MRSA-Stämme	MLST ^a	CC ^b	SCCmec-Typ	<i>mec</i> -Klasse	Bla-Kassette	<i>agr</i> -Gruppe
MRSA-RH	ST5	CC8	II	A	+	II
MRSA-BAR	ST22	CC22	IV	B	+	I
MRSA-ND	ST247	CC8	I	B	-	I
MRSA-SD	ST228	CC5	I	B	-	II
MRSA-KG	ST8	CC8	IV	B	+	I
MRSA-BER	ST45	CC45	IV	B	+	I
MRSA-KLN	ST225	CC5	II	A	-	II
MRSA-WI	ST239	CC8	III	A	+	I
MRSA-SP	ST8	CC8	IV	B	+	I
MRSA-DM	ST125	CC5	I	B	-	II
MRSA-GB	ST36	CC30	II	A	+	III

^aMultilokus-Sequenz-Typisierung (MLST); ^bKlonaler Komplex (CC)

+: *bla*-Kassette vorhanden; -: *bla*-Kassette negativ

ERGEBNISSE

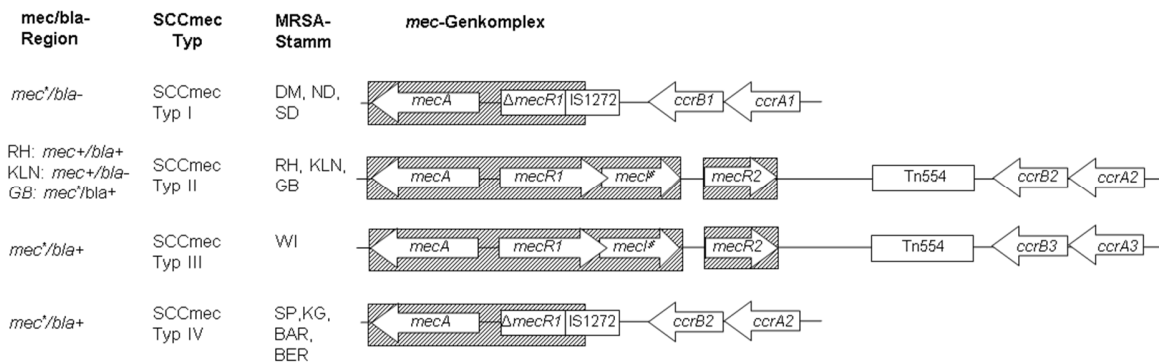


Abbildung 3.8: Übersicht der Genorganisation des *mec*- und *ccr*-Genkomplex der MRSA-Referenzstämme

#: MRSA-WI bzw. MRSA-GB: Punktmutation im *mecI*-Gen führt zum Stopkodon (Kodon 68 bzw. Kodon 115).

*mec**: *mecI* und *mecR1* defekt; *mec*+: vollständige *mec*-Region; *bla*-: genotypisch *bla*-negativ; *bla*+: vollständige *bla*-Region. *ccr*: cassette chromosome recombinase. IS: Insertionssequenz. Tn: Transposon. MRSA-Stämme: DM, ND, SD, RH, KLN, GB, WI, SP, KG, BAR und BER. Schraffierter Bereich entspricht der sequenzierten Genregion in dieser Arbeit. (Siehe auch www.staphylococcus.net).

Folglich hatten von den elf charakterisierten Stämmen nur MRSA-RH und KLN eine vollständige und funktionale *mecR1-mecI* Regulationsregion (Genotyp: *mec*+). Das kürzlich entdeckte MecR2 Protein, das als Anti-Repressor fungiert und für eine vollständige Induktion der *mecA*-Expression nötig ist, konnte für MRSA-Stämme des SCC*mec*-Typs II und III detektiert werden (Arede *et al.*, 2012). Es gibt zwei *mecR2*-Startkodons, die im Fall von MRSA-WI (SCC*mec*-Typ III) in einem 383 AS langen Protein resultieren und für MRSA-RH, KLN und GB (SCC*mec*-Typ II) zu einem 290 AS langen MecR2 führen.

Das *blaZ*-Gen und seine Regulatoren sind in sieben der elf untersuchten Stämme vorhanden (Genotyp: *bla*+), wobei Sequenzunterschiede in den *blaZ*-Genen der MRSA-Stämme bestehen (siehe Abbildung 7.1, S. 174 bis Abbildung 7.3, S. 176), die zu unterschiedlichen β -Laktamase-Typen führen. Mithilfe bereits sequenzierter *blaZ*-Sequenzen andere *S. aureus* Stämme für die eine Zuordnung zu den β -Laktamase Typen bereits beschrieben wurde, konnte den MRSA-Stämmen dieser Arbeit der jeweilige β -Laktamase Typ zugeordnet werden. Die Sequenz von BlaZ von MRSA-GB, MRSA-WI und MRSA-KG ist identisch zur Sequenz der Typ A β -Laktamase PC1 (Herzberg und Moulton, 1987). MRSA-RH (mit Ausnahme der letzten sieben Kodons) und MRSA-SP haben die identische *blaZ*-Sequenz zum *blaZ*-Gen von *S. aureus* 1071 (St Bartholomew's Hospital, London, 1963), dessen β -Laktamase auch zum Typ A gehört. Die *blaZ*-Sequenz von MRSA-BER ist wiederum identisch zur Sequenz des *blaZ*-Gens des *S. aureus* Stamms 3804

(Kings College Hospital, London, 1963), dessen β -Laktamase zum Typ C gehört. Die Sequenz des *blaZ*-Gens von MRSA-BAR ist identisch zur β -Laktamase AF086644 vom Typ B (East und Dyke, 1989). Somit tragen die MRSA-Stämme GB, WI, KG, RH und SP eine β -Laktamase Typ A, MRSA-BAR eine β -Laktamase Typ B und MRSA-BER eine β -Laktamase Typ C. β -Laktamasen des Typs A, C und D sind auf Plasmiden kodiert, während Typ B β -Laktamasen chromosomal kodiert sind (Voladri und Kernodle, 1998, Voladri *et al.*, 1996) (zur Übersicht siehe Tabelle 3.12, S. 117). In den vier MRSA-Stämmen DM, ND, SD und KLN konnten keine *bla*-Gene durch PCR detektiert werden.

Im Folgenden wird auf Mutationen in bedeutenden *bla*-Genregionen näher eingegangen. Eine Übersicht für welche MRSA-Stämme Mutationen in diesen Genregionen auftreten, ist Tabelle 3.7, S. 76 zu entnehmen. Das katalytische Zentrum von BlaZ (Ser₇₀) ist in allen untersuchten MRSA-Stämmen konserviert. Die Bindestelle für die RNA-Polymerase liegt 41-47 bp (TATTAT)/65-71 bp (TTGACA) bzw. die Shinge-Dalgarno Sequenz 7-12 bp (GGAGGG) stromaufwärts vom *blaZ*-Startkodon (McLaughlin *et al.*, 1981). In allen MRSA-Stämmen sind diese Genabschnitte stark konserviert. Einzige Ausnahme ist MRSA-BAR, der eine Punktmutation (A \rightarrow G) 66 bp stromaufwärts von *blaZ* trägt (RNA-Polymerase-Bindestelle). Die MecI/BlaI-Bindestelle (TACA/TGTA) 27 bp stromaufwärts von *blaZ* ist ebenfalls in fast allen Stämmen konserviert (Ender *et al.*, 2008). Eine Mutation im Bereich der MecI/BlaI-Bindestelle (C \rightarrow T) konnte jedoch für MRSA-RH und MRSA-SP nachgewiesen werden. Zudem wurde für MRSA-RH und MRSA-SP in BlaZ ein Aminosäureaustausch (Ser₂₂ \rightarrow Pro) festgestellt. Die Mutation liegt drei Kodons vor der Signalpeptidase-Spaltungsstelle zur Abspaltung von BlaZ. Aufgrund dieser Mutation wird laut East *et al.* der Export des Proteins verhindert (East *et al.*, 1990). Im Bereich des BlaR1-Proteins gibt es zwei wichtige mutierte Regionen: Die BlaR1-Region, die nach Antibiotikabindung acetyliert wird (Birck *et al.*, 2004) und die BlaR1-Spaltungsstelle zur Autoaktivierung der Zink-Protease nach Antibiotikabindung (Llarrull *et al.*, 2011). MRSA-BAR und BER enthalten eine Punktmutation im Kodon 391, das im Bereich der Acetylierungsstelle liegt, jedoch zu einer stillen Mutation führt. Darüber hinaus enthält MRSA-BER eine Mutation (Kodon 293: Arginin \rightarrow Asparagin) an der Spaltungsstelle von BlaR1, die zur Autoaktivierung der Zinkprotease nötig ist. Von großer Bedeutung für die Regulation von *blaZ* ist außerdem die BlaI-Spaltungsstelle (BlaI: Kodon 101 und 102) an der im Fall von Antibiotika-Bindung BlaI durch BlaR1 gespalten wird (Safó *et al.*, 2005). Diese Schnittstelle war für alle untersuchten MRSA-Stämme konserviert.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.7: Mutationen wichtiger Genabschnitte der *bla*-Region in MRSA-Stämmen

MRSA-Stamm	<i>bla</i> -Genabschnitt	Mutationsstelle
BAR	RNA-Polymerase-Bindestelle von <i>blaZ</i>	A → G (66 bp stromaufwärts vom <i>blaZ</i> -Gen)
RH, SP	Bindestelle für MecI/BlaI	C → T (22 bp stromaufwärts vom <i>blaZ</i> -Gen)
RH, SP	3 Kodons vor Signalpeptidase-Spaltungstelle zur Sekretion von BlaZ	Kodon 22: Serin → Prolin
BAR, BER	Acetylierungsstelle von BlaR1	Kodon 391: TAT → TAC (stille Mutation)
BER	Spaltungsstelle von BlaR1 zur Autoaktivierung der Zink-Protease nach Antibiotika-Bindung	Kodon 293: Arginin → Asparagin

3.2.2 Hydrolyse von Nitrocefin durch β -Laktamasen der MRSA-Referenzstämme

Für unterschiedliche β -Laktamase Typen konnten Unterschiede in der β -Laktamase-Aktivität festgestellt werden (Richmond, 1965). Daneben können Mutationen in den *blaR1*- und *blaI*-Genen die Antibiotika-induzierte Expression von *blaZ* beeinflussen (vgl. Abbildung 7.1, S. 174 bis Abbildung 7.3, S. 176). Um stammabhängige Unterschiede in der relativen Hydrolyserate (rHyr) des chromogenen Substrats Nitrocefin durch BlaZ zu überprüfen, wurden die unter 2.14.4, S. 49 beschriebenen Versuche ohne bzw. mit Oxacillin induzierten MRSA-Stämmen durchgeführt. Um sowohl die Zellwand-assoziierte, als auch die im Kulturmedium freigesetzte β -Laktamase zu erfassen (Gesamthydrolyserate von Nitrocefin durch β -Laktamasen), wurden zu 100 μ l einer auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellten ÜN-Kultur 50 μ l Nitrocefin (500 μ g/ml) gegeben und die OD₄₈₅ über einen Zeitraum von 40 Min registriert. (Die ursprüngliche OD₆₀₀ der ÜN-Kulturen der MRSA-Stämme lag zwischen 1,0 und 1,5). In Abwesenheit von Oxacillin war die rHyr von Nitrocefin aller *blaZ*-positiven Stämme äußerst gering (Abbildung 3.9, S. 78). Messungen mit MRSA-Stämmen, die über Nacht mit 10 ng/ml Oxacillin kultiviert wurden, ergaben eine deutliche Steigerung der Nitrocefin-rHyr aller *blaZ*-positiven MRSA-Stämme, wobei die rHyr von Nitrocefin durch BlaZ von MRSA-BAR und MRSA-BER deutlich geringer als die der anderen getesteten Stämme ausfiel. Die rHyr von MRSA-RH lag höher als die von MRSA-BAR und MRSA-BER, erreichte jedoch

nicht die von MRSA-SP, KG, WI und GB. Noch deutlicher zeigten sich die Unterschiede unter ÜN-Kultivierung mit 100 ng/ml Oxacillin. Durch vermehrte β -Laktamase-Bildung wurde die Nitrocefin-rHyr zum Teil erheblich beschleunigt. Die MRSA-Stämme ließen sich hinsichtlich ihrer relativen Gesamthydrolyserate von Nitrocefin in drei Gruppen einteilen. Gruppe 1: hohe Nitrocefin-rHyr durch MRSA-KG, WI, SP und GB (β -Laktamase Typ A), Gruppe 2: moderate Nitrocefin-rHyr durch MRSA-RH (β -Laktamase Typ A) und Gruppe 3: niedrige Nitrocefin-rHyr durch MRSA-BAR und MRSA-BER (β -Laktamase Typ B bzw. C). Die niedrige Nitrocefin-rHyr von MRSA-BAR kann dadurch erklärt werden, dass β -Laktamasen vom Typ B generell eine geringere „Effizienz“ (K_M/V_{max}) als β -Laktamasen vom Typ A haben (Richmond, 1965). Die geringe Effizienz kann laut Richmond *et al.* nicht durch eine erhöhte Enzymproduktion ausgeglichen werden (Richmond *et al.*, 1964), da Typ B β -Laktamasen chromosomal kodiert sind und *blaZ* daher nicht in hoher Kopienzahl vorkommt. Die in dieser Arbeit identifizierte Punktmutation der RNA-Polymerase-Bindestelle von *blaZ* (66 bp stromaufwärts vom *blaZ*-Gen) in MRSA-BAR resultiert möglicherweise in einer schwächeren *blaZ*-Expression/BlaZ-Produktion, wodurch die rHyr von Nitrocefin durch MRSA-BAR deutlich niedriger als in anderen MRSA-Stämmen ist.

MRSA-BER produziert eine Typ C β -Laktamase, bei der in anderen Forschungsarbeiten eine ähnlich hohe β -Laktamase Aktivität wie der von Typ A β -Laktamasen nachgewiesen werden konnte (Richmond *et al.*, 1964). In dieser Arbeit ist die Nitrocefin-rHyr von MRSA-BER jedoch sowohl ohne, als auch mit Induktion durch Oxacillin äußerst schwach. Die ausbleibende Induktion der β -Laktamase durch Oxacillin könnte mit der Mutation im *blaR1*-Gen (Kodon 293) von MRSA-BER zusammenhängen. Dadurch kommt es zu einem AS-Austausch in der Spaltungsstelle von BlaR1 zur Autoaktivierung der BlaR1 Zink-Protease. Diese Mutation könnte dazu führen, dass BlaI nicht von BlaR1 gespalten wird und so die Derepression von *blaZ* unterbleibt.

Die rHyr von Nitrocefin durch MRSA-Stämme mit β -Laktamase Typ A (MRSA-KG, WI, SP, GB) war hoch bzw. moderat (MRSA-RH), was zu den Ergebnissen von Richmond (1965) passt. Auch für MRSA-RH und MRSA-SP konnte die Nitrocefin-rHyr nachgewiesen werden. Bei beiden Stämmen liegt in Position 22 (drei Kodons vor der BlaZ-Signalpeptidasen-Spaltungsstelle) ein Kodonwechsel von Serin zu Prolin vor, der laut East *et al.* die Freisetzung von BlaZ in den Kulturüberstand verhindert (East *et al.*, 1990, East und Dyke, 1989). Die β -Laktamase von MRSA-RH und MRSA-SP wird deshalb nicht freigesetzt, sondern bleibt mit der Zellmembran über die Glycerid-Thioether-Verankerungsstelle (siehe Abbildung 7.1, S. 174) verankert. Dass die

ERGEBNISSE

Nitrocefin-Hydrolyse von MRSA-RH (moderate rHyr) und MRSA-SP (hohe rHyr) derart unterschiedlich verläuft, kann möglicherweise auf eine Mutation des fünftletzten Kodons des C-Terminus von BlaZ von MRSA-RH zurückzuführen sein, da hier ein Stopkodon entstanden ist.

BlaZ-negative Stämme (Δbla) zeigten auch nach Induktion mit Oxacillin keinerlei β -Laktamase Aktivität, was das Fehlen von BlaZ oder anderer β -Laktamasen bestätigt.

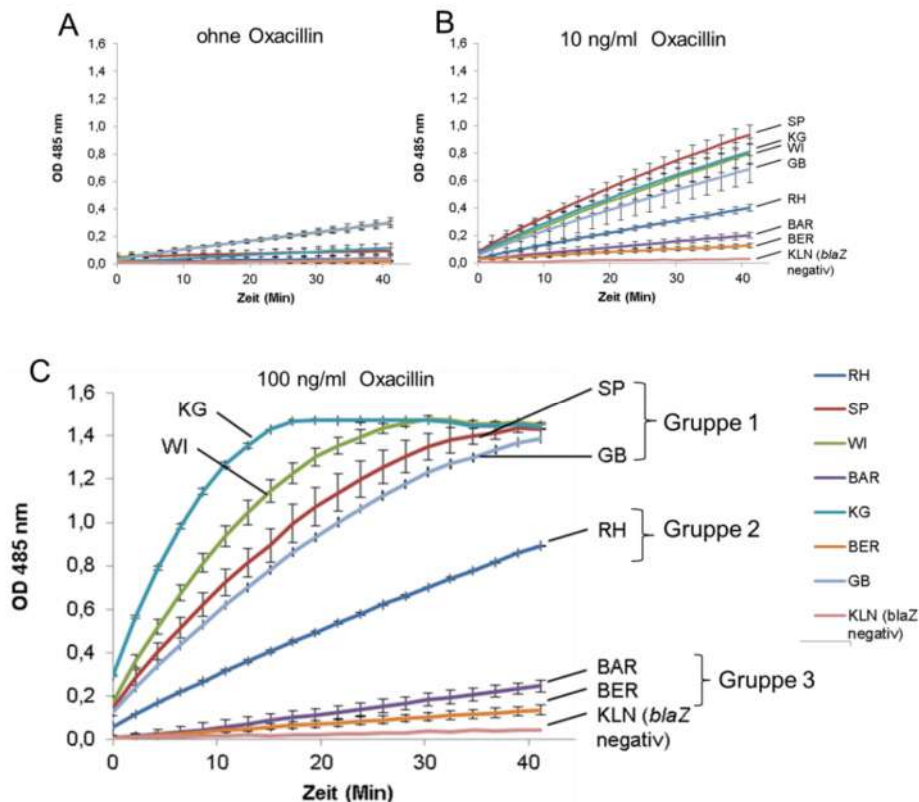


Abbildung 3.9: Darstellung der relativen Hydrolyserate (rHyr) von *blaZ*-positiven MRSA-Referenzstämmen mit Nitrocefin als Substrat

Durch Hydrolyse des β -Laktam-Rings von Nitrocefin durch β -Laktamasen ändert sich die Farbe von gelb zu rot. Die Nitrocefinhydrolyse durch BlaZ von MRSA-Referenzstämmen wurde daher durch Messung dieses Farbumschlags bei 486 nm quantitativ über die Zeit bestimmt (Hydrolyserate). 100 μ l einer nicht-induzierten (A) bzw. Oxacillin-induzierten (10 ng/ml (B) bzw. 100 ng/ml (C)) \ddot{U} N-Kultur (OD₆₀₀ auf 1,0 eingestellt) wurden mit 50 μ l Nitrocefin (500 μ g/ml) versetzt und die OD₄₈₆ über einen Zeitraum von 40 Min bei 37 °C gemessen. MRSA-Stämme ohne PCR-detectierbares *blaZ*-Gen verhielten sich wie MRSA-KLN, dessen Nitrocefin-rHyr exemplarisch für alle *blaZ*-negativen Stämme dargestellt ist. Gruppe 1: MRSA-Stämme mit hoher Nitrocefin-rHyr. Gruppe 2: MRSA-Stamm mit moderater Nitrocefin-rHyr. Gruppe 3: MRSA-Stämme mit niedriger Nitrocefin-rHyr. MRSA-Stämme: RH, SP, WI, BAR, KG, BER, GB und KLN.

3.2.3 Ausprägung der Oxacillinresistenz von MRSA-Referenzstämmen

Die Oxacillin-MHK der elf Referenzstämmen wurde anhand eines E-Test ermittelt (siehe Abschnitt 2.13.3, S. 45). Zu erwarten wäre, dass die Oxacillinresistenz mit der Menge an gebildetem PBP2a der MRSA-Stämme (vgl. Abschnitt 3.2.4, S. 82) korreliert. Jedoch zeigen mehrere Veröffentlichungen (und diese Arbeit), dass dies nicht der Fall sein muss (Chambers und Hackbarth, 1987, Parvez *et al.*, 2008, Shang *et al.*, 2010). Die MHK für Oxacillin lag für die MRSA-Stämme dieser Arbeit zwischen 16 und ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin (Tabelle 3.8). Die MRSA-Stämme SP und BAR konnten durch 16 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin bereits in ihrem Wachstum gehemmt werden, während für die Stämme WI, GB, DM, ND und SD 256 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin nicht zur Wachstumsinhibition ausreichten. MRSA-KG und BER bzw. MRSA-RH und KLN lagen mit einer MHK von 32 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 64 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin im mittleren Bereich.

Tabelle 3.8: MHK von MRSA-Referenzstämmen für Oxacillin (E-Test)

MRSA-Stamm	MHK
RH	64 $\mu\text{g/ml}$
KLN	64 $\mu\text{g/ml}$
SP	16 $\mu\text{g/ml}$
WI	> 256 $\mu\text{g/ml}$
BAR	16 $\mu\text{g/ml}$
KG	32 $\mu\text{g/ml}$
BER	32 $\mu\text{g/ml}$
GB	> 256 $\mu\text{g/ml}$
DM	> 256 $\mu\text{g/ml}$
ND	> 256 $\mu\text{g/ml}$
SD	> 256 $\mu\text{g/ml}$

Für eine genaue Charakterisierung der Stämme bzgl. ihres Resistenzverhaltens wurde ein Populationsanalyseprofil (PAP) für die einzelnen Stämme erstellt, aus dem heterogene und homogene Resistenzmuster ersichtlich werden (Abbildung 3.10). Dazu wurden 10 μl Proben der Verdünnungsstufen $10^0 - 10^{-6}$ einer ÜNK (ca. 1×10^9 cfu/ml in LB-Flüssigmedium) nach der nach Jett *et al.* beschriebenen Methode auf Agarplatten mit verschiedenen Oxacillin-Konzentrationen aufgetragen (Jett *et al.*, 1997) (Abschnitt 2.13.10, S.48).

Die elf untersuchten MRSA-Referenzstämmen können hinsichtlich ihrer PAP in drei Resistenz-Typen eingeteilt werden (Abbildung 3.10): Die vier MRSA-Stämme WI, GB, ND und SD wurden

als homoresistent bzw. „*homoresistance*“ (HoR-Typ) eingestuft, da eine Reduktion der Zellzahl um drei Log-Stufen erst mit 200 µg/ml (für MRSA WI und GB) bzw. 400 µg/ml Oxacillin (für MRSA ND und SD) erreicht werden konnte (hohe Resistenz). Eine weniger stark ausgeprägte Resistenz zeigten MRSA KG und DM, deren Zellzahl bei 12 µg/ml bzw. 50 µg/ml Oxacillin um drei Log-Stufen abnahm („*low-heteroresistance*“; l-HeR-Typ). Die übrigen fünf MRSA-Stämme RH, KLN, SP, BAR und BER werden in dieser Arbeit als „*high-heteroresistance*“ (h-HeR-Typ) MRSA-Stämme bezeichnet, da ihre Vermehrung bereits durch sehr niedrige Oxacillinkonzentrationen (zwischen 0,75 µg/ml und 6 µg/ml) um drei Log-Stufen gehemmt wurden. Je ein Vertreter der drei PAP-Gruppen (BAR, DM und WI) wurde nach Präselektion durch Oxacillin (BAR: 12 µg/ml Oxacillin; DM: 100 µg/ml Oxacillin; WI: 400 µg/ml Oxacillin) auf Steigerung der Resistenz bzw. „Homogenisierung“ der Oxacillin-Resistenz (Konversion zu HoR) untersucht. Dazu wurde ein PAP mit den präselektionierten MRSA-Stämmen durchgeführt. Wie aus Abbildung 3.11 ersichtlich führt Oxacillin-Präselektion bei allen drei Stämmen zu „Homogenisierung“ der Oxacillin-Resistenz. Während bei der ersten Kultivierung von MRSA-WI 100 µg/ml zum Absterben von etwas mehr als einer Log-Stufe der Bakterienpopulation führten, überlebten nach der Passage alle eingesetzten MRSA-WI eine Antibiotikakonzentration von bis zu 400 µg/ml (Homogenisierungseffekt für hohe MHKs).

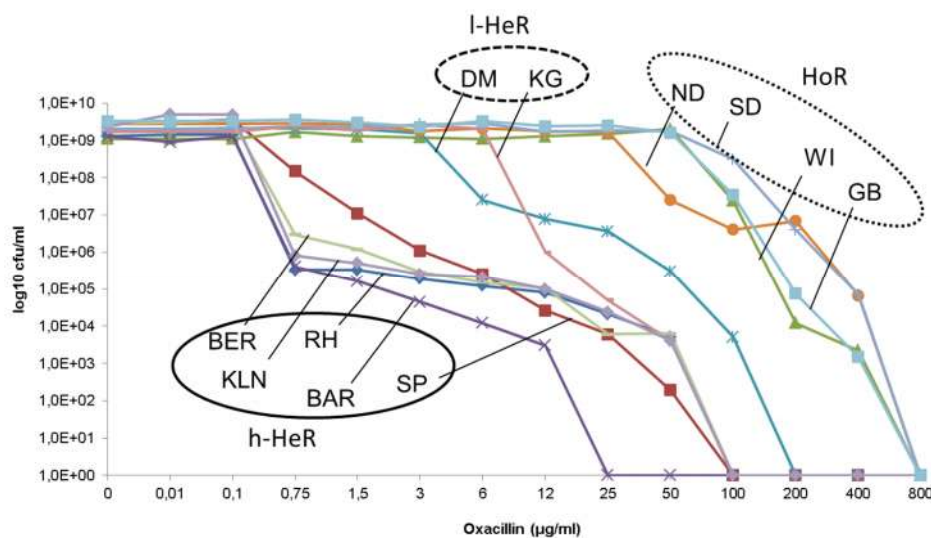


Abbildung 3.10: Populationsanalyseprofile (PAP) der deutschen MRSA-Referenzstämme für Oxacillin

„*Homoresistance*“ (HoR), „*low-heteroresistance*“ (l-HeR), „*high heteroresistance*“ (h-HeR). Bestimmung der cfu/ml durch Ausplattieren auf Oxacillin-haltigen LB-Agarplatten. MRSA-Stämme: RH, SP, WI, BAR, DM, ND, SD, KG, BER, KLN und GB.

ERGEBNISSE

Ähnlich verhalten sich auch die HeR-Stämme BAR und DM, deren Wachstum nach Präselektion mit Oxacillin erst bei 100 µg/ml bzw. 200 µg/ml Oxacillin um drei Log-Stufen gehemmt wird. Ohne Präselektion mussten hingegen nur 0,75 µg/ml bzw. 50 µg/ml Oxacillin für denselben bakteriziden Effekt eingesetzt werden. Dass diese bakterizide Wirkung mit der Produktionsmenge von PBP2a zusammenhängen könnte, zeigen die Ergebnisse in Abbildung 3.12, die belegen, dass die Menge an gebildetem PBP2a, sowohl bei MRSA-BAR als auch bei MRSA-WI höher ausfällt, wenn die Bakterien mit Oxacillin präselektiert wurden.

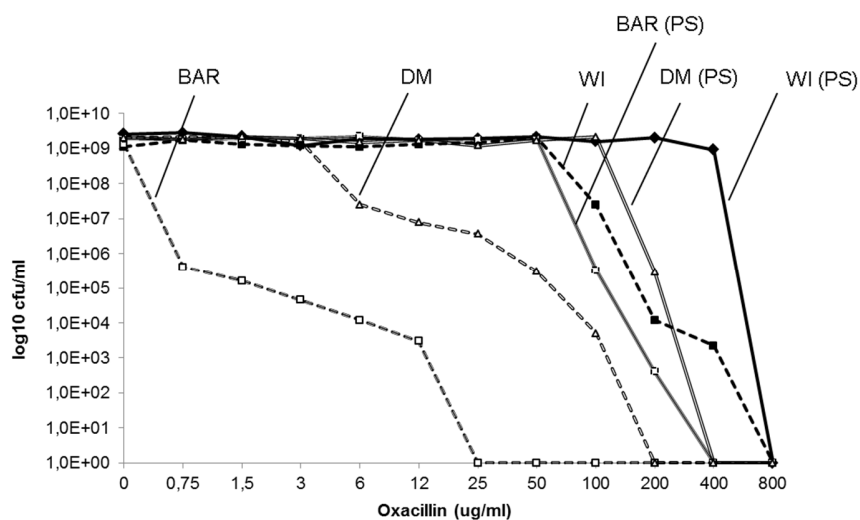


Abbildung 3.11: Populationsanalyseprofil (PAP) von MRSA-Stämmen ohne und mit Präselektion (PS) mit Oxacillin

Kolonien von Agarplatten ohne bzw. mit Oxacillin wurden in LB-Medium (37 °C, 16 h) kultiviert. Von den Kulturen wurden PAP Profile (siehe Abschnitt 2.13.10, S. 48) erstellt (Jett *et al.*, 1997). Gestrichelte Linien (---) repräsentieren PAP Profile von MRSA-Stämmen ohne Präselektion mit Oxacillin. Durchgezogene Linien (—) repräsentieren PAP Profile von MRSA-Stämmen nach Präselektion mit Oxacillin (Selektion durch 12 µg/ml für MRSA-BAR, 100 µg/ml für MRSA-DM und 400 µg/ml für MRSA-WI). MRSA-Stämme: WI, BAR und DM.

ERGEBNISSE

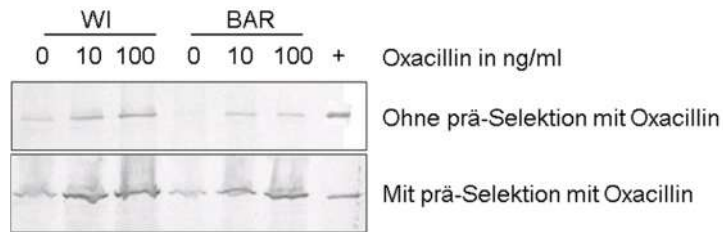


Abbildung 3.12: PBP2a-Immunoblot zum Nachweis der PBP2a-Produktion von MRSA-WI und MRSA-BAR

Nicht-präselektionierte bzw. präselektionierte Kolonien (Selektion durch 400 µg/ml für MRSA-WI und 12 µg/ml für MRSA-BAR) der Stämme WI und BAR wurden ohne Oxacillin bzw. mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml Oxacillin (wie angegeben) bis zu einer OD_{600} von 0,4 in LB-Medium bei 37 °C (aerob, unter Schütteln) inkubiert (1 ml aufgetragenes Kulturvolumen). Proteine wurden in SDS-PAGE aufgetrennt und PBP2a mittels Immunoblot nachgewiesen. +: 50 ng rekombinantes PBP2a-Protein.

3.2.4 Vergleichende quantitative Analyse der *mecA*-Transkription mit der PBP2a-Proteinproduktion

Um zu überprüfen, ob die PBP2a-Produktion (Translation) mit der *mecA*-Transkription korreliert, wurde für die elf MRSA-Stämme im Parallelansatz zum PBP2a-Immunoblot eine quantitative qRT-PCR vergleichend durchgeführt. Die MRSA-Stämme wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,4$) ohne Oxacillin oder mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml Oxacillin in LB-Medium kultiviert. Ein Teil der Kulturen wurde für die qRT-PCR zur Quantifizierung des *mecA*-Transkripts verwendet und auf das Referenztranskript des konstitutiv exprimierten *arcC*-Gens bezogen (Abbildung 3.13, S. 84). Der andere Teil der Kultur wurde für einen PBP2a-Immunoblot verwendet. In beiden Versuchsansätzen wurde der MSSA-Stamm ATCC 6538 als Negativkontrolle mitgeführt (nicht dargestellt). MRSA-RH ist der einzige der untersuchten Stämme mit funktionellen *mec*- und *bla*-Regulatorgenen (Genotyp: *mec*⁺/*bla*⁺). Eine Induktion mit Oxacillin zeigte für MRSA-RH einen stufenweisen Anstieg der *mecA*-mRNA, als auch des PBP2a-Proteins. Der einzige Stamm, der eine funktionelle *mec*-Region hat und *bla*-negativ ist, ist MRSA-KLN (Genotyp: *mec*⁺/*bla*⁻). Dieser zeigte keinen signifikanten Anstieg des *mecA*-Transkripts oder des PBP2a-Proteins in Anwesenheit von 10 ng/ml Oxacillin. Erst 100 ng/ml Oxacillin waren ausreichend, um eine verstärkte *mecA*-Transkription bzw. PBP2a-Produktion nachzuweisen. Sieben der elf MRSA-Referenzstämme haben defekte *mec*-Regulatoren, aber eine funktionale *bla*-Region (MRSA-RH, SP, WI, BAR, KG, BER und GB) (Genotyp: *mec*^{*}/*bla*⁺). Für diese Stämme konnte eine Zunahme der *mecA*-mRNA und PBP2a nachgewiesen werden, wenn die Bakterien mit

10 ng/ml bzw. 100 ng/ml Oxacillin in LB-Medium kultiviert wurden. Die absolute Zunahme des *mecA*-Transkripts bzw. PBP2a-Proteins variierte dabei von Stamm zu Stamm (insbesondere große Unterschiede zwischen MRSA-WI und MRSA-BAR). MRSA-WI produzierte bereits ohne Oxacillin relativ große Mengen *mecA*-Transkript und PBP2a, die durch Oxacillin im Wachstumsmedium noch gesteigert werden konnte. Eine hohe Menge *mecA*-Transkript korrelierte mit einer hohen PBP2a-Menge im Immunoblot. MRSA-BAR produzierte im Vergleich zu MRSA-WI ohne Oxacillin deutlich geringere Mengen an *mecA*-Transkript und PBP2a. Oxacillin Zugabe steigerte zwar die Transkript- bzw. Proteinmenge in MRSA-BAR, erreichte aber nicht vergleichbare Mengen wie bei MRSA-WI.

Die drei MRSA-Stämme DM, ND und SD haben defekte *mec*-Regulatorgene und sind *bla*-negativ (Genotyp: *mec*/bla-*) ausgestattet. Dieser genetischen Ausstattung entsprechend unterschied sich die produzierte Menge an *mecA*-mRNA und PBP2a für diese Stämme unter den getesteten Bedingungen nicht signifikant. Da keine funktionellen Regulatorgene vorlagen, war die Menge an *mecA*-Transkript und PBP2a-Protein wie erwartet Oxacillin unabhängig. Zur Übersicht sind in Tabelle 3.12 (S. 117) Eigenschaften zu den untersuchten MRSA-Stämmen im Hinblick auf *mec*-Kassette, β -Laktamase, Resistenzen, PBP2a-Produktion (Abschnitt 3.2, S. 72) und Charakteristika von MRSA-Mikrokolonien im 3D-CoG (Abschnitt 3.4, S. 88) zusammengefasst.

ERGEBNISSE

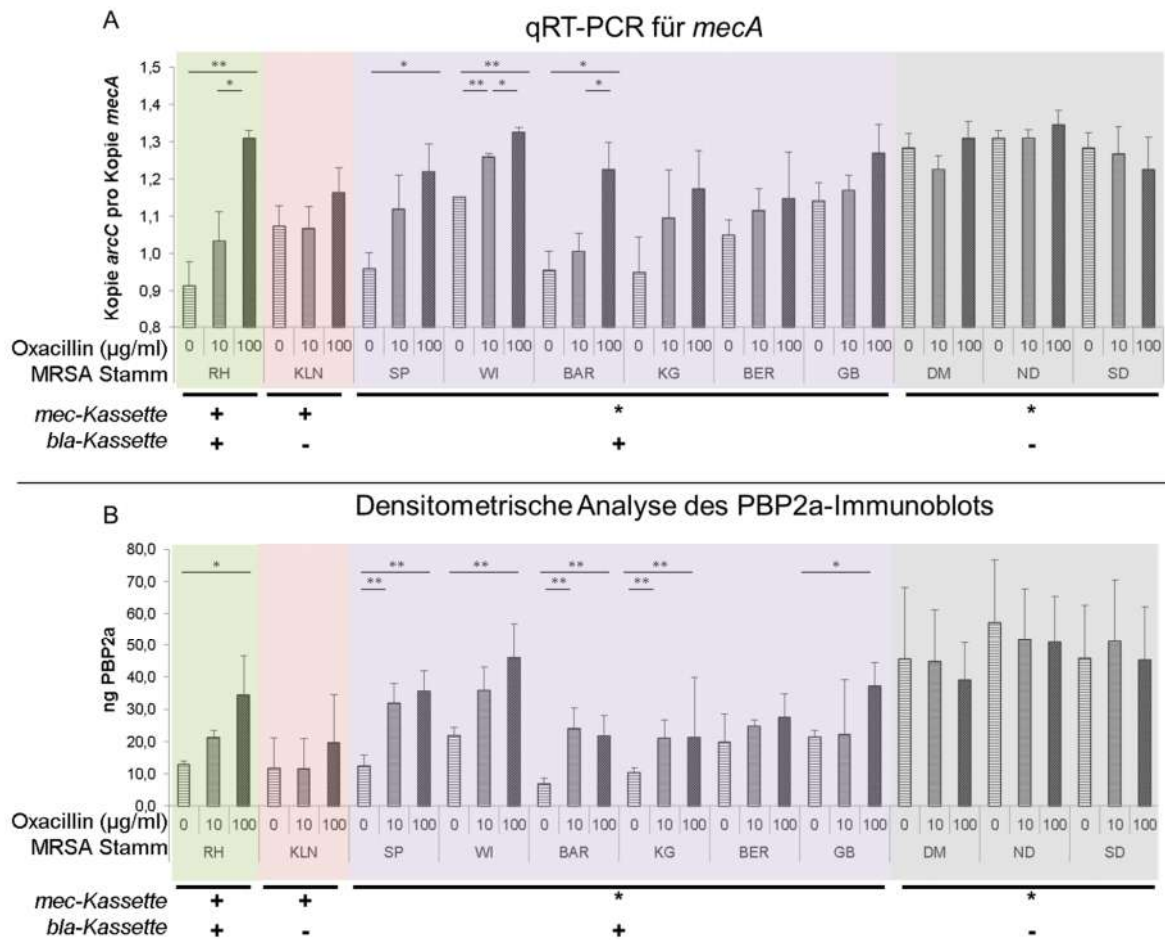


Abbildung 3.13: Analyse der *mecA*-Transkription und Produktion von PBP2a für elf deutsche MRSA-Referenzstämme in Abhängigkeit von Oxacillin in LB-Medium

qRT-PCR Analyse des *mecA*-Transkripts (A) und densitometrische Analyse des PBP2a-Immunoblots (B). MRSA-Referenzstämme (ohne Präselektion) wurden ohne Oxacillin (0) oder mit Oxacillin Konzentrationen von 10 ng/ml (10) oder 100 ng/ml (100) in LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 (entspricht ca. 1 x 10⁷ cfu/ml) kultiviert. (Initiale Zellzahl 10⁴ cfu/ml). 1 ml-Bakteriensuspension wurde zentrifugiert und das Sediment in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 5 Min bei 100 °C aufgekocht. *mec*⁺: vollständige *mec*-Region; *mec*^{*}: *mecI*- und *mecR1*-defekt; *bla*⁻: genotypisch *bla*-negativ; *bla*⁺: vollständige *bla*-Region. *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01.

3.3 Genetischer Hintergrund eines *mecA* PCR-positiven, Oxacillin-sensitiven *S. aureus* (OS-MRSA)

Als weiterer Stamm wurde ein OS-MRSA-Stamm miteinbezogen, der in der PCR *mecA*-positiv ist, aber phänotypisch keine Oxacillin-Resistenz aufweist (MHK für Oxacillin unter 4 µg/ml). Es wird angenommen, dass diese Isolate Oxacillin-heteroresistente Populationen bilden (Oxacillin-Resistenzrate $\leq 10^{-8}$) (Forbes *et al.*, 2008, Tomasz *et al.*, 1991). Eine Therapie mit β -Laktam-Antibiotika bei Patienten mit Oxacillin-empfindlichen, *mecA*-positiven *S. aureus* Stämmen ist deshalb häufig nicht erfolgreich (Selektionseffekt) (Sakoulas *et al.*, 2001). Es wurde bereits der *S. aureus* Stamm N315P beschrieben, bei dem eine sehr effektive Inhibierung der *mecA*-Transkription durch MecI eine ausgeprägte Methicillin Resistenz verhindert (Kuwahara-Arai *et al.*, 1996). Um festzustellen, worin die Ursache der Oxacillin-Sensitivität trotz vorhandenem *mecA*-Gen bei einem *S. aureus* Patientenisolat (GH-B13_35223) liegt, der von einer Patientin aus dem Universitätsklinikum in München 2013 isoliert wurde, wurde dieser hinsichtlich der *mec*- und *bla*-Gene sequenziert.

Der *mecA*-positive, Oxacillin-sensitive *S. aureus* Stamm GH-B13_35223 stammt von einem Wundabstrich nach einer Syme's Amputation einer älteren, weiblichen Patientin, die für zwei Monate stationär im Universitätsklinikum München war. Wie in Abbildung 3.14 A dargestellt, zeigt ein Routine-Test auf MRSA im Fall dieses Patientenstamms keine Oxacillin-Resistenz an, wonach der Patient mit β -Laktam-Antibiotika behandelt werden würde. Auch ein PBP2a-Test (Alere, Köln) war negativ. Die genaue Bestimmung der MHK von Oxacillin durch einen E-Test zeigt, dass in diesem Fall die MHK bei 0,094 µg/ml liegt und damit deutlich unter der MHK von 4 µg/ml für MRSA ist (siehe Abbildung 3.14 B). Mithilfe einer Multiplex-PCR zur Identifizierung von SCCmec-Typen konnte der Patientenstamm dem SCCmec-Typ III zugeordnet werden (Boye *et al.*, 2007). Sequenzierungen des *mecA-mecR1-mecI*-Abschnitts ergaben, dass das die ersten 33 bp vom *mecA*-Gen deletiert sind (vgl. Abbildung 3.15). Diese Deletion umfasst das Start-Kodon und partiell das Sec-abhängige Signalpeptid (11 von 24 Kodons) bzw. den Transmembrananker (11 von 23 Kodons) von PBP2a (Lim und Strynadka, 2002) (vgl. Abbildung 3.16). Allein aufgrund des fehlenden Start-Kodons kann die Expression von *mecA* nicht erfolgen (folglich keine PBP2a-Produktion). Die intergenische Region zwischen dem *mecA*- und dem *mecR1*-Gen ist bis auf die Deletion von 1 bp (1 bp vor Start-Kodon) zu der des Referenzstammes MRSA252 identisch. Die Sequenz des *mecR1*-Gens unterscheidet sich vom Wildtyp-Gen in lediglich einer stillen Mutation

(GAG → GAA), die 10 bp stromaufwärts vom 3'-Ende des *mecRI*-Gens liegt. Für das *mecI*-Gen des Oxacillin-empfindlichen MRSA-Stamms (GH-B13_35223) konnte eine Mutation des Stopkodons festgestellt werden (TAA → GAA). Die Folge ist ein um neun Aminosäuren verlängertes Protein, dessen Funktionalität noch nicht geklärt ist. Wie für MRSA-Stämme des SCCmec-Typ III typisch, trägt auch dieser Patientenstamm das von Arède *et al.* (2012) charakterisierte *mecR2*-Gen mit zwei aufeinanderfolgenden Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch (Valin → Alanin) an Position 139 des Proteins führen. Durch PCR konnte weder das β-Laktamase Gen *blaZ*, noch die Gene der Regulatoren *blaR1-blaI* detektiert werden. Auch ein Nitrocefin-Test (siehe Abschnitt 2.14.4, S. 49) zur Bestimmung der β-Laktamase-Aktivität fiel negativ aus, was drauf schließen lässt, dass die gesamte Bla-Region in diesem MRSA-Patientenstamm nicht vorhanden ist. Giannouli *et al.* beschrieben Mutationen in den *fem* (*factors essential for methicillin resistance*)-Genen von Oxacillin-empfindlichen, *mecA*-positiven MRSA-Stämmen, die mit einer atypischen Oxacillinresistenz zusammenhängen könnten (Giannouli *et al.*, 2010). Die drei Fem-Proteine FemX, FemA, und FemB sind Peptidyltransferasen, die essentiell für die Bildung der Pentaglycinbrücken zur Stabilisierung des Peptidoglykannetzes in *S. aureus* sind (Schneider *et al.*, 2004). Um auszuschließen, dass die Oxacillin-Sensitivität von *S. aureus* GH-B13_35223 mit der Akkumulation von Mutationen in den *fem*-Genen zusammenhängt, wurden diese ebenfalls sequenziert (Giannouli *et al.*, 2010). Es konnte jedoch keine Sequenzveränderung gegenüber den *fem*-Genen von Oxacillin-resistenten MRSA-Stämmen festgestellt werden. Der Grund für die Oxacillin-Sensitivität des Patientenisolats GH-B13_35223 hängt daher mit der Deletion von elf Kodons des *mecA*-Gens zusammen, die das Start-Kodon mit einschließt, weshalb keine *mecA*-Expression stattfindet.

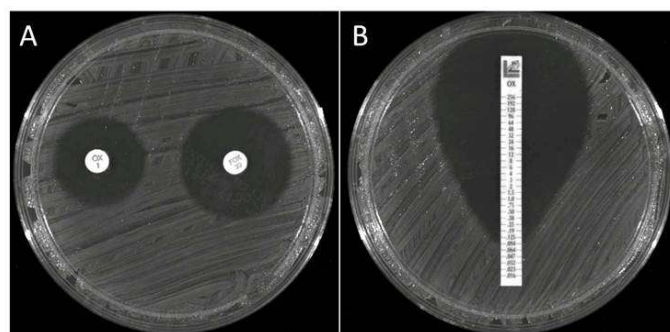


Abbildung 3.14: Antibiotika-Hemmhöfe von *S. aureus* Patientenisolat GH-B13_35223

A: Durch 1 µg/ml Oxacillin (OX 1) und 30 µg/ml Cefoxitin (FOX 30) verursachte Hemmhöfe auf MHA. B: Oxacillin E-Test zeigt eine MHK (Oxacillin) von 0,094 µg/ml an.

ERGEBNISSE

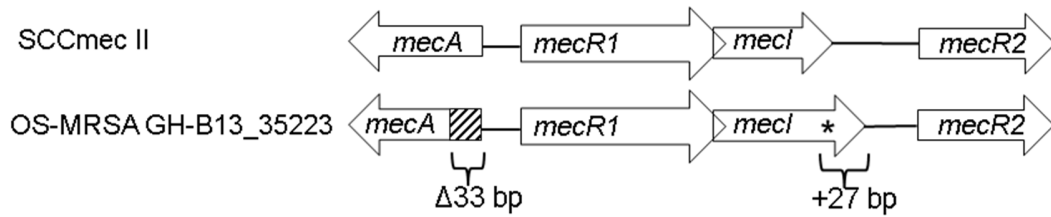


Abbildung 3.15: Schematische Übersicht der Genorganisation der *mec*-Region von OS-MRSA GH-B13_35223 im Vergleich zu einer SCCmec-Kassette II

Die ersten 33 bp vom *mecA*-Gen von GH-B13_35223 sind deletiert (schraffierter Bereich). Das *mecl*-Gen von OS-MRSA GH-B13_35223 enthält eine Mutation im Stopkodon (*). Nach acht weiteren Kodons folgt erneut ein Stopkodon, wodurch das *mecl*-Gen im OS-MRSA Stamm GH-B13_35223 im Vergleich zum *mecl*-Gen im SCCmecII-Element um 27 bp verlängert ist.

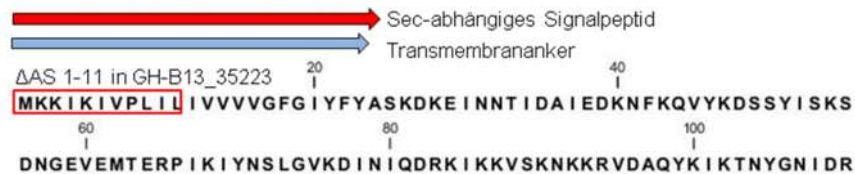


Abbildung 3.16: Aminosäure-Teilsequenz von PBP2a

Dargestellte Teilsequenz AS 1-110 (vollständige Aminosäuresequenz: 1-669). Rot umrandeter Bereich: Deletierte AS 1-11 im OS-MRSA Stamm GH-B13_35223. Blauer Pfeil: Transmembranbereich (AS 1-23). Roter Pfeil: Sec-abhängiges Signalpeptid (AS 1-24).

3.4 Exoprotein- und SERAM-Untersuchungen von MRSA-Referenzstämmen

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Referenzstämmen erstmalig in Bezug auf ihre Virulenz-assoziierten „*secretable expanded repertoire adhesive molecules*“ (SERAM-Proteine) (siehe Abschnitt 1.3.1, S. 3) mittels Immunfluoreszenz-Technik untersucht. Dafür wurden monoklonalen Antikörper (mab) gegen vier SERAM-Proteine eingesetzt: Koagulase (mab-Coa), extrazelluläre-Matrix-bindendes Protein (mab-Emp), Fibrinogen-bindendes Protein (mab-Efb) und Von-Willebrand-Faktor-bindendes Protein (mab-vWbp). Für *Yersinia enterocolitica* und *S. aureus* wurde kürzlich gezeigt, dass diese Erreger im dreidimensionalen Kollagengel (3D-CoG) unterschiedliche Morphotypen ausbilden (Mikrokolonien, planktonisches Wachstum), das bei *Yersinia* mit der Virulenz korreliert (Freund *et al.*, 2008). Entsprechend sollte die hier untersuchte Kollektion von MRSA-Referenzstämmen hinsichtlich Wachstum im 3D-CoG charakterisiert werden. Als Bezugsstamm für die 3D-CoG Wachstumsversuche wurde der gut untersuchte MSSA Newman Stamm verwendet (Guggenberger *et al.*, 2012).

3.4.1 Exoprotein-Analyse

Zunächst wurden die Exoprotein-Profile von *S. aureus* Newman und den MRSA-Referenzstämmen in Flüssigkultur charakterisiert. Die freien Kulturüberstands-Proteine von Staphylokokken der exponentiellen und stationären Phase wurden mithilfe von StrataClean Resin (Stratagene, Waldbronn) angereichert (siehe Abschnitt 2.15.4, S. 55) und mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blue angefärbt. Das Exoprotein-Muster von *S. aureus* Newman unterschied sich sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Phase deutlich von denen der untersuchten MRSA-Referenzstämmen (Abbildung 3.17). Dies lässt sich zum Teil auf Mutationen im Genom von *S. aureus* Newman zurückführen. Eine Punktmutation im *saeS*-Gen führt zu erhöhter Kinase-Aktivität von SaeS wodurch die Transkription der Zielgene (u.a. die Koagulase Coa) verstärkt wird (Mainiero *et al.*, 2010, Schäfer *et al.*, 2009, West und Stock, 2001). Eine weitere Besonderheit von *S. aureus* Newman ist das fehlende Sortase-Motiv LPXTG des Fibronectin-bindenden Proteins FnBPA. Folglich kann FnBPA nicht an die Zellwand gebunden werden, sondern wird in den Überstand freigesetzt (Grundmeier *et al.*, 2004).

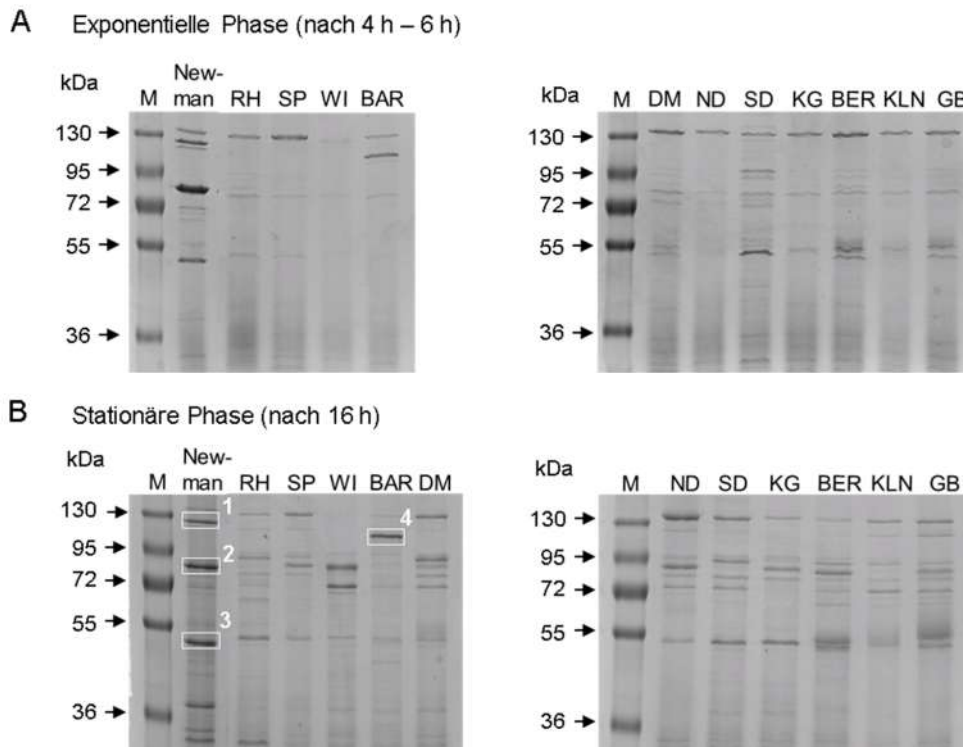


Abbildung 3.17: SDS-PAGE der Kulturüberstandsproteine von MSSA Newman und den MRSA-Referenzstämmen in der exponentiellen (A) und stationären (B) Wachstumsphase

Proteine des Kulturüberstands (5,8 ml) wurden mithilfe von StrataClean Resin angereichert (siehe 2.15.4, S. 55). Inkubationsdauer um $OD_{600} = 0,45$ zu erreichen (exponentielle Phase): MRSA-RH, BAR, KLN: 4 h, *S. aureus* Newman, MRSA-SP, DM, KG, BER, GB: 5 h, MRSA-WI, SD: 5 h 30 Min, MRSA-ND: 6 h. Inkubationsdauer stationäre Phase ($OD_{600} = 1,2$): 16 h. Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: RH, SP, WI, BAR, DM, ND, SD, KG, BER, KLN und GB.

Zur Identifizierung einzelner Proteinbanden der stationären Phase wurden diese durch Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) im Zentrallabor für Proteinanalytik (LMU, München) analysiert. Proteine werden dabei in Peptide gespalten und ionisiert. Abhängig von Masse und Ladung der Peptidionen können die Peptide charakterisiert und mit Werten aus der Datenbank verglichen werden. Die Auswertung ergab, dass Bande 1 (Abbildung 3.17 B) von *S. aureus* Newman FnBPA ist. FnBPA konnte für die getesteten MRSA-Referenzstämmen in der SDS-PAGE/Coomassie-Blue-Färbung nicht nachgewiesen werden. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit der bereits erwähnten deletierten Sortase-Erkennungssequenz von FnBPA in *S. aureus* Newman, die bei den MRSA-Stämmen nicht auftritt. Auch die durch LC-MS/MS identifizierte Koagulase (Coa) (Bande 2) und das Immunglobulinbindenden Protein Sbi („*second binding protein for immunoglobulins*“) (Bande 3) werden von

S. aureus Newman sekretiert (Abbildung 3.17 B). Beide Proteine wurden von den in dieser Arbeit untersuchten MRSA-Referenzstämmen nur in geringen Mengen oder nicht nachweisbar in der SDS-PAGE/Coomassie-Blue-Färbung sekretiert. Hintergrund ist vermutlich die für *S. aureus* Newman typische erhöhte SaeS Aktivität, die zur erhöhten Expression von Virulenzfaktor-Genen führt und in den MRSA-Stämmen nicht auftritt. Bande 4, die in der SDS-PAGE/Coomassie-Blue-Färbung nur für den Stamm BAR nachweisbar ist, stellt laut Massenspektrometrie-Analyse ein Zellwand-verankertes Protein (CAG44197.1) dar, das bisher nicht der SERAM-Familie zugeordnet werden konnte.

Zur weiteren Charakterisierung der Exoprotein-Bildung von Staphylokokken wurden die monoklonalen Antikörper mab-Coa, mab-Emp, mab-Efb und mab-vWbp für die Immunoblot-Analyse verwendet. Da Virulenz-assoziierte Exoproteine (z. B. SERAM Proteine), vorwiegend in der exponentiellen Phase sekretiert werden (Cheung *et al.*, 2004), wurden diese aus dem Überstand von exponentiell wachsenden Staphylokokken-Kulturen ($OD_{600} = 0,45$; entspricht ca. 1×10^7 cfu/ml) gewonnen. Zum Vergleich wurde überprüft, ob die vier SERAM-Proteine Coa (72 kDa), Emp (38 kDa), Efb (19 kDa) und vWbp (66 kDa) auch in der stationären Wachstumsphase ($OD_{600} = 1,2$; Wachstum für 16 h bei 37 °C in LB-Medium) nachweisbar sind. In Abbildung 3.17 sind die Coomassie-gefärbten Gele der SDS-PAGE von Exoproteinen der Kulturüberstände aus der exponentiellen (A) und stationären Wachstumsphase (B) dargestellt. Es zeigt sich, dass die untersuchten Stämme bei Einstellung auf eine OD_{600} von 1,2 nicht alle gleich viel Protein in den Kulturüberstand freisetzen. Insbesondere MRSA-WI setzt in der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,45$) weniger Exoprotein frei als die anderen Stämme. Darüber hinaus wird deutlich, dass *S. aureus* Newman wie bereits beschrieben (Herbert *et al.*, 2010) das prominenteste Exoprotein-Bandenmuster zeigt.

Das in Abbildung 3.17 gezeigten SDS-PAGE-Bandenmuster wurde mittels Immunoblot gezielt auf Coa, vWbp, Emp und Efb untersucht. Im Fall von MSSA Newman konnten sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase die vier SERAM-Proteine (Coa/vWbp und Emp/Efb) durch Immunoblot nachgewiesen werden (Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19). Für MSSA Newman konnte in der stationären Phase im Coa-Immunoblot eine Doppelbande bei ca. 30 kDa detektiert werden, die in Immunoblots mit anderen mabs nicht detektiert wurde. Da die Proteinbanden jedoch auch bei der *S. aureus* Newman *coa*-Mutante auftreten, scheint eine unspezifische Bindung des Erst-Antikörpers die Ursache zu sein. In der exponentiellen Phase konnte bei den MRSA-Referenzstämmen kein Coa und vWbp detektiert werden, was insbesondere

im Fall von MRSA-WI an der geringen Exoproteinmenge liegen könnte (Abbildung 3.17). In der stationären Phase konnte für einige Stämme (MRSA-WI, DM, ND, SD, KLN und GB) Coa-Freisetzung detektiert werden. Eine Detektion von vWbp war selbst in der stationären Phase in den Kulturüberständen der MRSA-Referenzstämmen mit mab-vWbp nicht möglich.

Emp konnte für die meisten MRSA-Stämme (alle außer MRSA-BER und GB) sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Phase detektiert werden (Abbildung 3.19 A). Auch im Hinblick auf die Efb-Detektion waren stammabhängige Unterschiede nachweisbar (Abbildung 3.19 B). Während Efb bei MRSA-Referenzstämmen in der exponentiellen Phase gar nicht oder nur sehr schwach nachzuweisen war, konnte für die MRSA-Stämme SP, WI, DM, SD, KG und KLN in der stationären Wachstumsphase Efb detektiert werden, während für die übrigen MRSA-Referenzstämmen keine Efb-Detektion möglich war. Eine Übersicht zum Nachweis der SERAM-Proteinen mittels Immunoblot ist in Tabelle 3.11, S. 116 dargestellt. Auffällig war außerdem eine Antikörper-reaktive Proteinbande bei ca. 50 kDa (gestrichelter Rahmen in Abbildung 3.18 und Abbildung 3.19). Diese scheinbar unspezifisch-reaktive Bande konnte nach Analyse durch Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) einem bisher nicht näher beschriebenen Protein (ADC36907.1) von *S. aureus* mit einem pI Wert von 9,04 zugeordnet werden. Durch die positive Ladung dieses Proteins könnte es bei neutralem pH negativ geladene Proteine oder z. B. bei 56 °C aggregierte IgG-Antikörper unspezifisch binden (Poston, 1984). Die unspezifische Bande könnte auch durch das *S. aureus* Protein A (42 kDa) verursacht sein, das über den Fc-Teil unspezifisch Antikörper bindet. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Protein A nicht nur als Zellwand-verankertes Protein, sondern auch im Überstand nachgewiesen werden kann (Becker *et al.*, 2014b). Zum Teil bleibt es mit Peptidoglykan-Fragmenten verbunden, was erklären könnte, warum die unspezifische Bande etwas größer als 42 kDa ist.

ERGEBNISSE

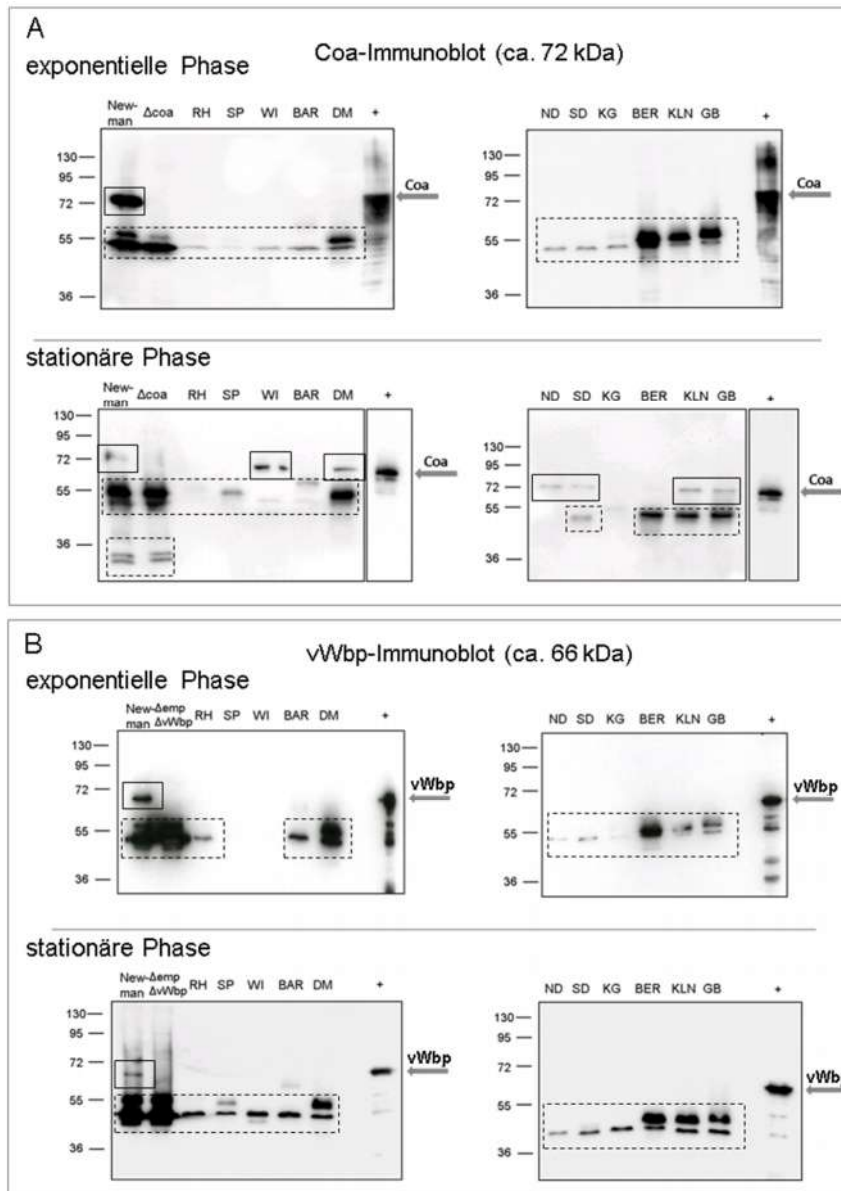


Abbildung 3.18: Nachweis der SERAM Proteine Coa (A) und vWbp (B) im Kulturüberstand der exponentiellen und stationären Wachstumsphase von MSSA Newman und den MRSA-Referenzstämmen mittels Immunoblot Proteine des Kulturüberstands (5,8 ml) wurden mithilfe von StrataClean Resin angereichert (siehe 2.15.4, S. 55) und Coa (A) bzw. vWbp (B) mit monoklonalen Mausantikörpern (mab-Coa bzw. mab-vWbp) detektiert. Inkubationsdauer um $OD_{600} = 0,45$ zu erreichen (exponentielle Phase): MRSA-RH, BAR, KLN: 4 h, *S. aureus* Newman, MRSA-SP, DM, KG, BER, GB: 5 h, MRSA-WI, SD: 5 h 30 Min, MRSA-ND: 6 h. Inkubationsdauer stationäre Phase ($OD_{600} = 1,2$): 16 h. Kästchen mit durchgezogener Linie repräsentieren spezifische Banden. Kästchen mit gestrichelter Linie repräsentieren unspezifische Proteinbanden. Nicht markierte Banden repräsentieren nicht bewertbare Proteinbanden. Stammbezeichnung: MSSA-Stämme: *S. aureus* Newman, *S. aureus* Newman Δ coa, *S. aureus* Newman Δ emp Δ vWbp. MRSA-Stämme: RH, SP, WI BAR, DM, ND, SD, KG, BER, KLN und GB. +: jeweils rekombinantes Protein als Positivkontrolle.

ERGEBNISSE

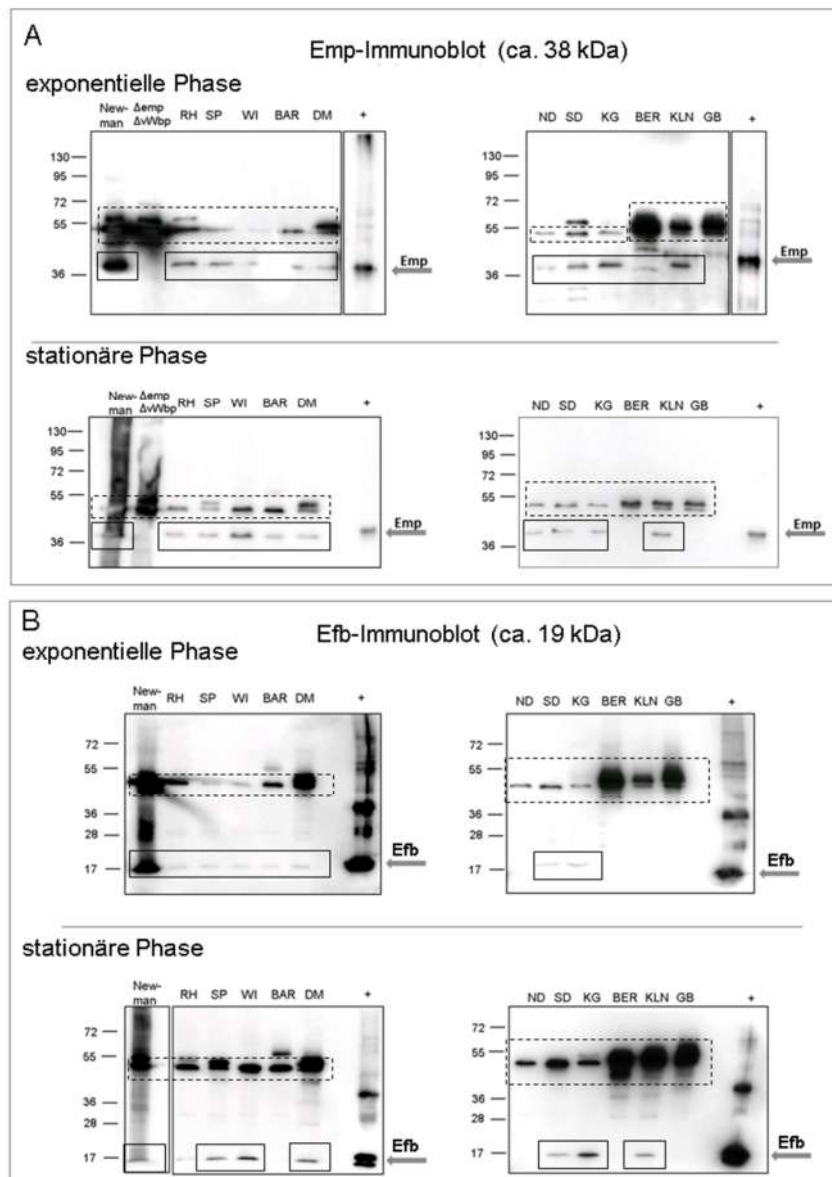


Abbildung 3.19: Nachweis der SERAM Proteine Emp (A) und Efb (B) im Kulturüberstand der exponentiellen und stationären Wachstumsphase von MSSA Newman und den MRSA-Referenzstämmen mittels Immunoblot Proteine des Kulturüberstands (5,8 ml) wurden mithilfe von StrataClean Resin angereichert (siehe 2.15.4, S. 55) und Emp (A) bzw. Efb (B) mit monoklonalen Mausantikörpern (mab-Emp bzw. mab-Efb) detektiert. Inkubationsdauer um $OD_{600} = 0,45$ zu erreichen (exponentielle Phase): MRSA-RH, BAR, KLN: 4 h, *S. aureus* Newman, MRSA-SP, DM, KG, BER, GB: 5 h, MRSA-WI, SD: 5 h 30 Min, MRSA-ND: 6 h. Inkubationsdauer stationäre Phase ($OD_{600} = 1,2$): 16 h. Kästchen mit durchgezogener Linie repräsentieren spezifische Banden. Kästchen mit gestrichelter Linie repräsentieren unspezifische Proteinbanden. Nicht markierte Banden repräsentieren nicht bewertbare Proteinbanden. Stammebezeichnung: MSSA-Stämme: *S. aureus* Newman, *S. aureus* Newman $\Delta emp \Delta wbp$. MRSA-Stämme: RH, SP, WI BAR, DM, ND, SD, KG, BER, KLN und GB. Verwendete monoklonale Mausantikörper: mab-Emp und mab-Efb. +: jeweils rekombinantes Protein als Positivkontrolle.

3.4.2 Wachstum im 3D-CoG System

In der geschüttelten Flüssigkultur wachsen Staphylokokken in der exponentiellen Phase planktonisch (Suspension von kleinen Kokken-Aggregaten). In der stationären Phase oder bei statischen Flüssigkulturen können Staphylokokken an der Gefäßwand Biofilme und große Aggregate (Mikrokolonien) bilden. Diese unterschiedlichen Morphotypen spielen auch in der Pathogenese der Staphylokokken-Infektionen mit ihren unterschiedlichen Krankheitsbildern eine Rolle (z.B. Endokarditis-Biofilme). In einer vorangegangenen Doktorarbeit (Guggenberger, 2012) wurde das 3D-CoG für die Wachstumsanalyse von Staphylokokken etabliert und die Interaktion von *S. aureus* mit Neutrophilen analysiert. Das 3D-CoG stellt ein Gewebe-Surrogate dar und ermöglicht dadurch *in vivo* ähnliche Wachstumsbedingungen, die auf Agarplatten oder in der Zellkultur so nicht erreicht werden können. Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens von MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG wurden monodisperse Staphylokokken mit einer neutralisierten Kollagen Typ I Lösung vermischt. Zur Gelbildung bzw. zur weiteren Inkubation wurde die Staphylokokken-Kollagen-Lösung (enthielt zwischen 25 und 50 cfu) auf eine Fläche von ca. 64 mm² in einem Napf einer 8-Well-Mikrotiterplatte (Ibidi, Martinsried) verteilt (Gesamt-Napffläche: 100 mm²). Nach der Gelbildung einer konvexen Kollagenmatrix (bei 37 °C ca. 45 Min) (s. Abschnitt 2.16.1, S. 56), wurde das Kollagengel mit RPMI-Medium (3D-CoG) überschichtet und für 4 h, 7 h bzw. 16 h bei 37 °C inkubiert. Durch konfokale *Laser-Scanning* Mikroskopie (CLSM) wurde die Koloniebildung von MRSA-Stämmen und die für *S. aureus* Newman typische Pseudokapsel- und MAM-Bildung im 3D-CoG untersucht (Guggenberger *et al.*, 2012). Die von Guggenberger *et al.* (2012) identifizierte Pseudokapsel ist Koagulase-, Fibrin- und Prothrombin-abhängig. Die Pseudokapsel umschließt dicht aneinander gewachsene Staphylokokken in der Mikrokolonie. Die Pseudokapsel der Mikrokolonie ist wiederum von einer ausstrahlenden netzartigen Kapsel, der MAM („*microcolony associated meshwork*“) umgeben, für deren Bildung vWbp, sowie Fibrin und Prothrombin essentiell sind. Beide Mikrokolonie-Kapselstrukturen bestehen wahrscheinlich durch die Aktivierung des Prothrombins und nachfolgender Umwandlung des Fibrinogens in Fibrinnetze aus Fibrin (Guggenberger *et al.*, 2012).

Die Mikrokolonie- und Fibrin-Kapselbildung der MRSA-Referenzstämme und *S. aureus* Newman wurde vergleichend untersucht. Da MRSA-RH nach 16 h im Kollagengel mikroskopisch kaum sichtbare Mikrokolonien bildete (sehr langsames Wachstum im RPMI/Kollagen), wurde dieser Stamm nicht weiter untersucht. Alle anderen MRSA-Referenzstämme bildeten nach 4 h im

3D-CoG unregelmäßig geformte Mikrokolonien (Abbildung 3.21). Mit Ausnahme von MRSA-BAR waren die Mikrokolonien aller MRSA-Stämme sehr klein mit einem Durchmesser von 2-10 µm. Der durchschnittliche Durchmesser von MRSA-BAR Mikrokolonien betrug nach 4 h Wachstum im 3D-CoG etwa 20 µm (siehe Abbildung 3.20). Nach 7 h waren die Mikrokolonien zu größeren, locker gepackten Mikrokolonien ohne Kapselstrukturen gewachsen. MRSA-BAR bildete mit einem Durchmesser von ca. 35 µm die größten Mikrokolonien (vgl. Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21). Auch MRSA-BER bildete mit einem Durchmesser von 30 µm vergleichsweise große Mikrokolonien. Alle anderen *S. aureus* Stämme bildeten kleinere Mikrokolonien mit einem Durchmesser von 5-20 µm. Nach 16 h Kultivierung im 3D-CoG waren große, dichter gepackte, unregelmäßig geformte (Newman) oder kugelförmige Mikrokolonien (MRSA-Stämme) mit peripheren locker gepackten Bakterienansammlungen im Hellfeldkanal (CLSM) mikroskopisch sichtbar. Der Durchmesser der Mikrokolonien der untersuchten Stämme reichte von 65-136 µm. Die durchschnittlich größten Mikrokolonien bildeten MRSA-GB (136 µm), MRSA-BAR (130 µm) und MRSA-BER (126 µm). Auch nach diesem Zeitpunkt war wie erwartet weder Pseudokapsel- noch MAM-Bildung sichtbar (Abbildung 3.21).

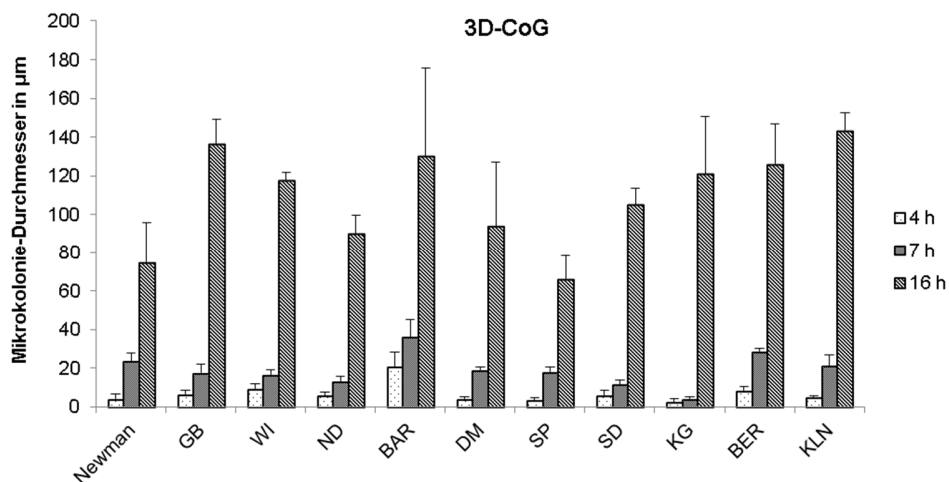


Abbildung 3.20: Mikrokolonie-Durchmesser von MSSA Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG Staphylokokken-Wachstum im 3D-CoG nach 4 h, 7 h und 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂. Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN. Mittelwerte und Standardabweichung der Mikrokolonie-Durchmesser wurden anhand von zehn Kolonien berechnet (siehe Abschnitt 2.16.1, S. 56). Die zum Teil hohe Standardabweichung ergibt sich aus der starken Streuung des Mikrokolonien-Durchmessers.

ERGEBNISSE

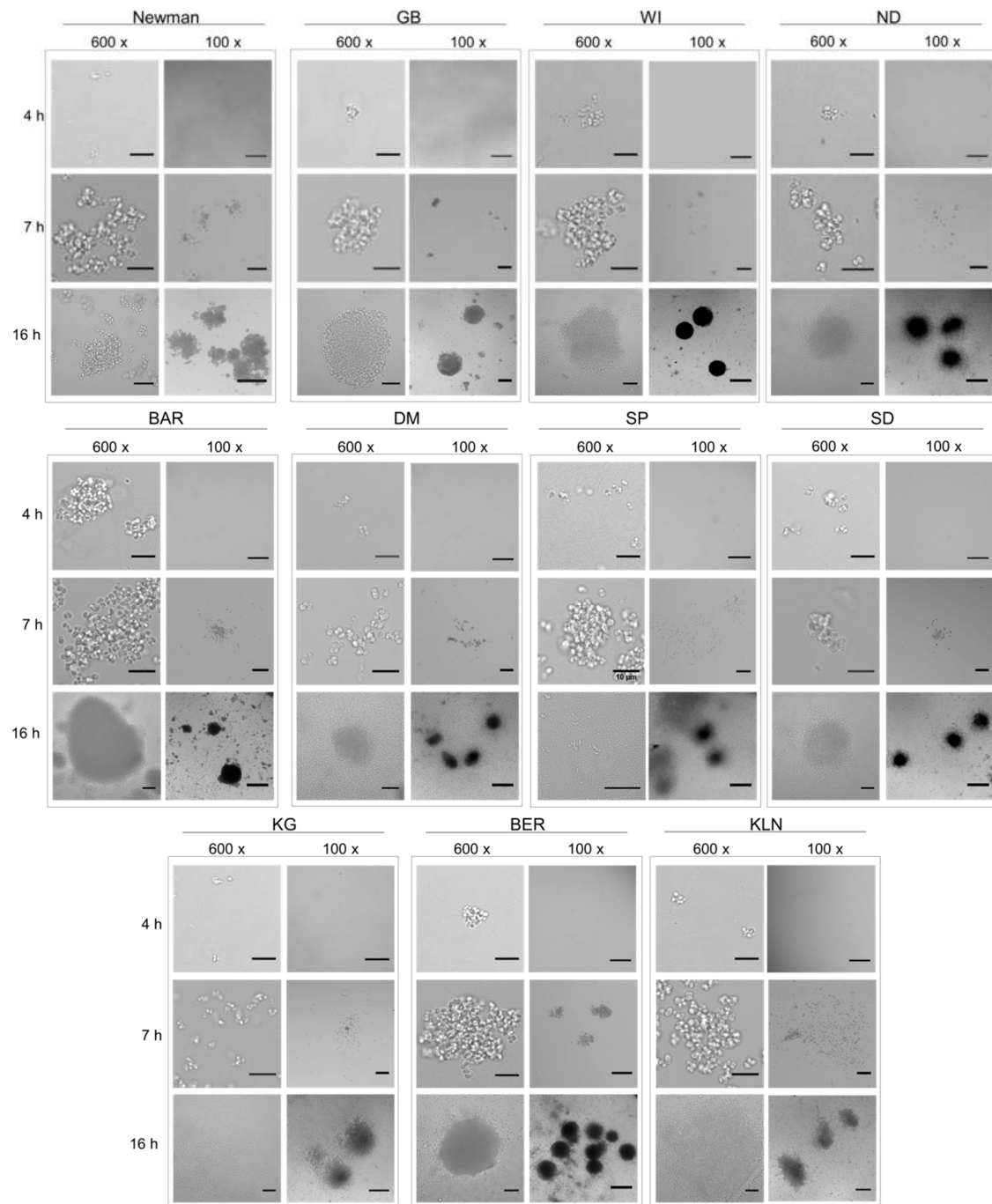


Abbildung 3.21: Mikrokolonie-Morphologie von MSSA Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG (Hellfeldkanal, CLSM)

Staphylokokken-Wachstum im 3D-CoG (25-50 cfu/Kollagengel) nach 4 h, 7 h und 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂. Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN. Balkengröße bei 630-facher Vergrößerung: 10 μm (4 h und 7 h) bzw. 30 μm durch elektronischen Zoom (16 h). Balkengröße bei 100-facher Vergrößerung: 50 μm (7 h) bzw. 150 μm (4 h, 16 h).

3.4.3 Wachstum im 3D-CoG/F System

Um die Wirkung von Coa und vWbp auf die Prothrombinaktivierung/Fibrinpolymerisierung (Pseudokapsel- und MAM-Bildung) zu zeigen, wurde das Wachstum von *S. aureus* Newman und den MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG/F (Supplementierung des Kollagen-RPMI-Mediums mit Fibrinogen (3 mg/ml)/Prothrombin (4 µg/ml)) untersucht. Für alle untersuchten Stämme zeigten sich nach vier Stunden Bakterienansammlungen von 7-12 µm Durchmesser (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.23). Alle MRSA-Referenzstämmen bildeten zum 4 h-Zeitpunkt weder sichtbare Pseudokapseln noch MAM aus, während die Bakterienaggregate von *S. aureus* Newman bereits von einer Pseudokapsel umgeben waren. Nach 7 h Wachstum im 3D-CoG/F bildete MRSA-BAR mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 32 µm die größten Mikrokolonien. MRSA-GB und ND bildeten mit Durchmessern von 11 µm bzw. 9 µm vergleichsweise kleine Mikrokolonien. Der Mikrokolonie-Durchmesser der übrigen MRSA-Stämme und *S. aureus* Newman betrug zwischen 14 und 21 µm. Die Stämme Newman, WI und BAR bildeten zu diesem Zeitpunkt bereits symmetrische, dicht gepackte Mikrokolonien, die von einer Pseudokapsel umgeben waren. *S. aureus* Newman und MRSA-WI bildeten im Gegensatz zu MRSA-BAR zudem eine MAM aus. Alle anderen Stämme bildeten unregelmäßige, locker gepackte Mikrokolonien. Nach 16 h zeigten alle Stämme außer MRSA-GB und ND sehr dicht gepackte, kugelförmige Mikrokolonien mit Durchmessern von über 60 µm bis 165 µm, die alle von einer Pseudokapsel umgeben waren. Die hohe Standardabweichung des Mikrokolonie-Durchmessers von MRSA-BAR (Abbildung 3.22) spiegelt die relativ starke Variation in der Mikrokolonie-Größe dieses Stamms wider. Die Mikrokolonien von MRSA-ND erschienen irregulär, weniger dicht gepackt, mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 60 µm und ohne Pseudokapsel. Auch die Mikrokolonien von MRSA-GB waren locker gepackt. Mit einer Mikrokoloniegröße von durchschnittlich 40 µm bildet MRSA-GB nach 16 h Wachstum die kleinsten Mikrokolonien. Strukturen wie Pseudokapsel und MAM waren jedoch bei MRSA-GB Mikrokolonien erkennbar. Die bereits nach 7 h ausgebildete MAM von *S. aureus* Newman konnte auch nach 16 h nachgewiesen werden, während die von MRSA-WI nach 16 h nicht mehr detektiert werden konnte. Eine Übersicht zur Mikrokolonien-Morphologie im 3D-CoG/F ist in Tabelle 3.9, S. 100 dargestellt. Tabelle 3.11, S. 116 gibt zudem eine Übersicht über Mikrokolonie-Morphologie und SERAM-Produktion (Immunfluoreszenz und Immunoblot) von MRSA-Stämmen im 3D-CoG/F.

ERGEBNISSE

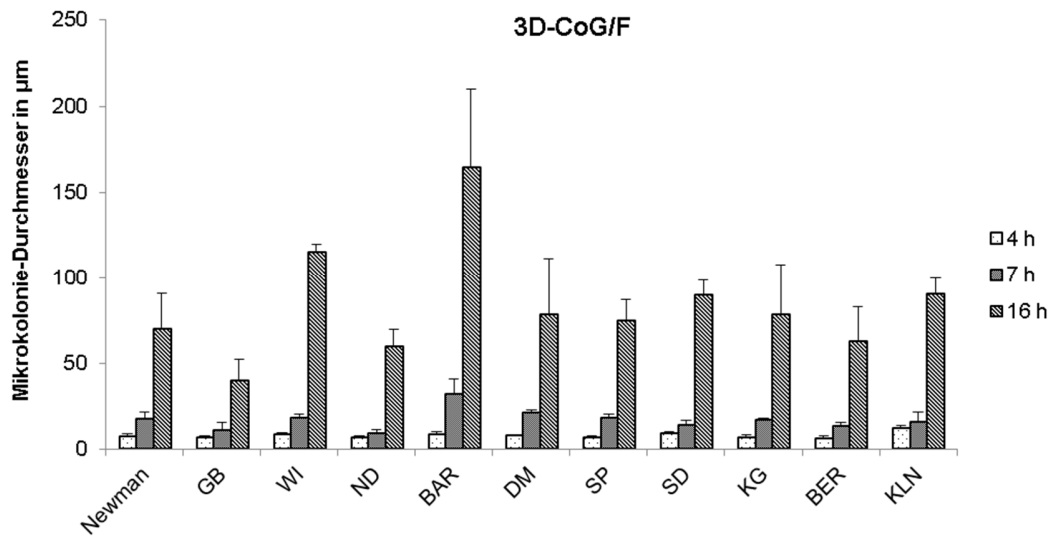


Abbildung 3.22: Mikrokolonie-Durchmesser von MSSA Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG/F Staphylokokken-Wachstum im 3D-CoG/F nach 4 h, 7 h und 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂. Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD, KG, BER und KLN. Mittelwerte und Standardabweichung der Mikrokolonie-Durchmesser wurden anhand von zehn Kolonien berechnet (siehe Abschnitt 2.16.1, S. 56).

ERGEBNISSE

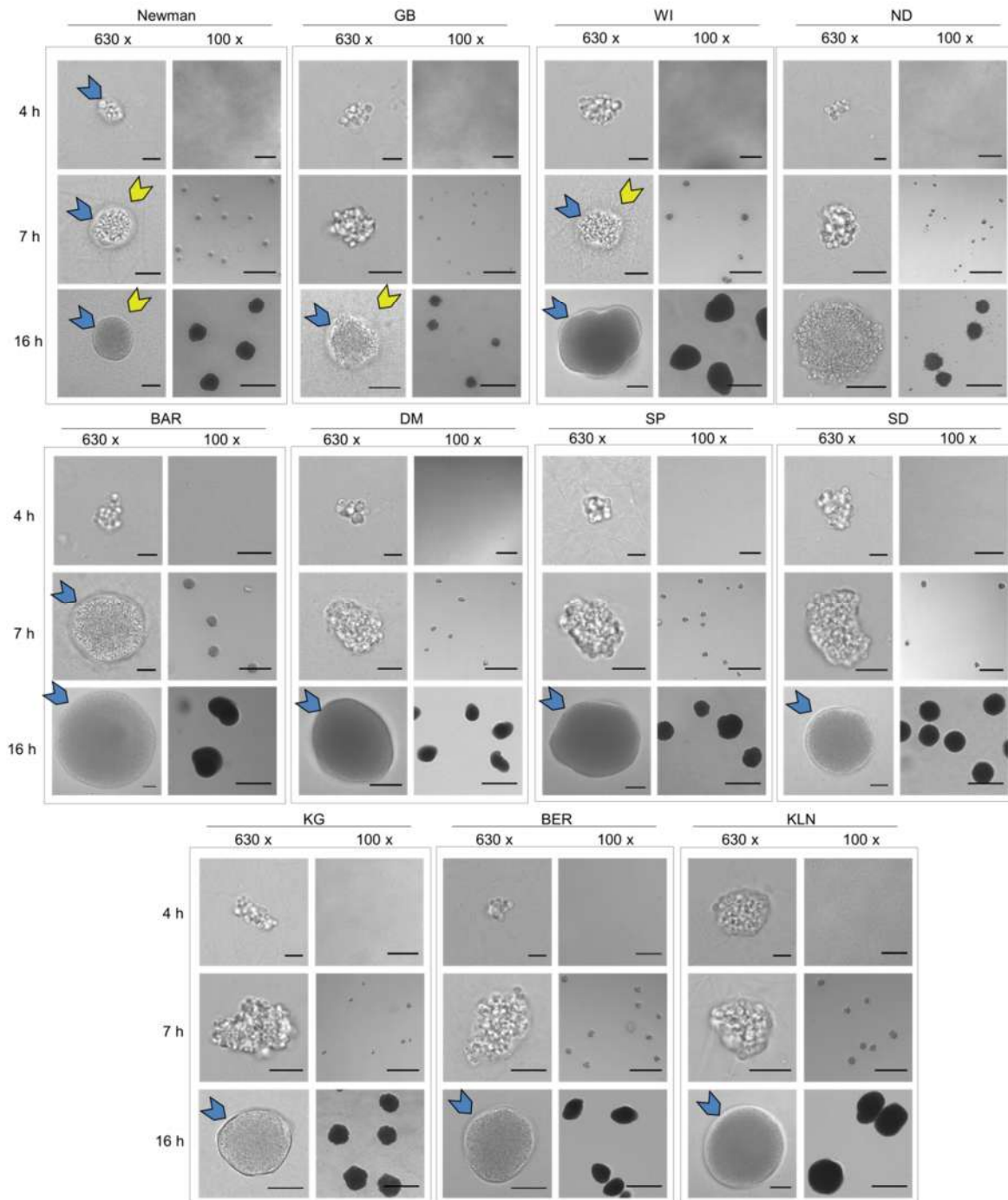


Abbildung 3.23: Mikrokolonie-Morphologie von MSSA Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG/F (Hellfeldkanal, CLSM)

Staphylokokken-Wachstum im 3D-CoG/F (25-50 cfu/Kollagengel) nach 4 h, 7 h und 16 h Wachstum bei 37 °C, 5 % CO₂ mit Darstellung von Pseudokapsel (blauer Pfeil) und MAM (gelber Pfeil). Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN. Balkengröße bei 630-facher Vergrößerung: 5 µm (4 h), 10 µm (7 h), 30 µm (16 h) durch elektronischen Zoom. Balkengröße bei 100-facher Vergrößerung: 150 µm.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.9: Übersicht zur Mikrokolonien-Morphologie von *S. aureus* Stämmen nach Wachstum im 3D-CoG/F nach verschiedenen Inkubationszeiten

Stamm	Newman	GB	WI	ND	BAR	DM	SP	SD	KG	BER	KLN
4 h	kleine Mikrokolonien, lp-ir										
	PC + MAM-	PC- MAM-									
7 h	kf-lp	ir-lp	kf-lp	ir-lp	kf-lp	ir-lp					
	PC+ MAM+	PC- MAM-	PC+ MAM+	PC- MAM-	PC+ MAM-	PC- MAM-					
16 h	kf-dp	kf-lp	kf-dp	kf-lp	kf-dp						
	PC+ MAM+	PC+ MAM-	PC- MAM-	PC+ MAM-							

Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD, KG, BER und KLN.

ir: irreguläre Mikrokolonien-Form. kf: kugelförmig. dp: dicht gepackt. lp: locker gepackt. PC: Pseudokapsel. MAM: „*microcolony associated meshwork*“.

3.4.4 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im 3D-CoG und 3D-CoG/F

In der Arbeit von Guggenberger *et al.* wurden Mikrokolonien von *S. aureus* Newman im 3D-CoG/F untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Mikrokolonien von *S. aureus* Newman im 3D-CoG/F nach 16 h Pseudokapsel und MAM bilden, die Coa- bzw. vWbp-abhängig gebildet werden. Coa und vWbp spielen bei der Umwandlung von löslichem Fibrinogen in unlösliches Fibrin eine entscheidende Rolle, indem sie Prothrombin in die aktive Form Thrombin umwandeln. Coa und Emp (bindet an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und Kollagen) ließen sich von Guggenberger *et al.* mit polyklonalem Kaninchen-Antikörper in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie am Rand der Mikrokolonie detektieren. DNA wurde durch DAPI-Färbung dargestellt, Peptidoglykan wurde durch FITC-Lektin angefärbt (Guggenberger *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit wurde *S. aureus* Newman als Positivkontrolle mitgeführt und Mikrokolonien von MRSA-Stämmen im 3D-CoG und 3D-CoG/F in Bezug auf Vitalitätsgrad („*Life/Dead-stain*“), Anfärbbarkeit (anti-Sau), und SERAM-Produktion (mit mabs) untersucht.

3.4.4.1 Differenzierung des Vitalitätsgrades und Anfärbarkeit von *S. aureus*-Mikrokolonien durch Immunfluoreszenz (anti-Sau) im 3D-CoG

In vielen Publikationen wurden bereits „*Life/Dead*“-Immunfluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, um den Vitalitätsgrad von Bakterien in Biofilmen zu überprüfen (Cerca *et al.*, 2012, Flemming *et al.*, 2009, Gomes *et al.*, 2009). Für den Vitalitätstest von Staphylokokken-Mikrokolonien im 3D-CoG wurde der „Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, dessen Farbstoffe an Nukleinsäure binden. Der Fluoreszenzfarbstoff Syto 9 ist ein grün fluoreszierender, membranpermeabler Farbstoff der alle Bakterien färbt, während der rote Fluoreszenzfarbstoff Propidium Jodid nicht membranpermeabel ist und deshalb in „intakte“ Bakterienzellen nicht eindringen kann. Propidium Jodid hat eine stärkere Affinität zu Nukleinsäure als Syto 9, weshalb eine Bakterienzelle rot fluoresziert, wenn beide Fluoreszenzfarbstoffe in einer Zelle vorhanden sind. Im 3D-CoG konnte für alle Stämme nachgewiesen werden, dass der Großteil der Bakterien ($\geq 50\%$) Propidium Jodid negativ (vital) ist (Abbildung 3.24). Die Beurteilung des Vitalitätsgrades durch „*Life/Dead-stains*“ muss jedoch in mehrerer Hinsicht kritisch betrachtet werden (Netuschil *et al.*, 2014). Durch negativ geladene Polysaccharide könnte das kationische Propidium Jodid abgefangen werden, wodurch eine Überlagerung des Syto 9 Fluoreszenzfarbstoff aufgrund der verringerten Propidium Jodid Konzentration nicht stattfindet. Tote Bakterien könnten auch dann nicht als solche detektiert werden, wenn die Nukleinsäure bereits abgebaut ist. Für *S. epidermidis* Biofilme konnte gezeigt werden, dass nicht alle Propidium Jodid positiven Bakterien zwangsläufig tot sind. *S. epidermidis* Biofilme enthalten nämlich Subpopulationen mit zum Teil beschädigter Zellmembran, die Propidium Jodid aufnehmen, obwohl die Bakterien vital sind (Cerca *et al.*, 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Propidium Jodid von der Wachstumsphase abhängt. Bakterien der exponentiellen Phase nehmen Propidium Jodid mit einer höheren Rate auf als solche der frühen stationären Phase (Shi *et al.*, 2007). Außerdem wurden die 3D-Kollagengele für die dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Vitalitätsfärbungen für 5 h mit den Fluoreszenzfarbstoffen überschichtet. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass während der langen Inkubationszeit ein Teil der Bakterien abstirbt.

Um die Anfärbarkeit von 16 h gewachsenen Mikrokolonien im 3D-CoG zu prüfen wurde der polyklonale FITC-konjugierte Kaninchen Antikörper gegen *S. aureus* Oberflächenproteine (anti-Sau) eingesetzt (direkte Immunfluoreszenzfärbung, s. Abschnitt 2.16.2, S. 57). Die Mikrokolonien aller Stämme konnten im 3D-CoG durch diesen Antikörper vollständig (auch im Zentrum)

ERGEBNISSE

angefärbt werden. Die Bakteriendichte der Mikrokolonien im 3D-CoG ist scheinbar locker genug, um das Eindringen von Antikörpern (anti-Sau) zu ermöglichen.

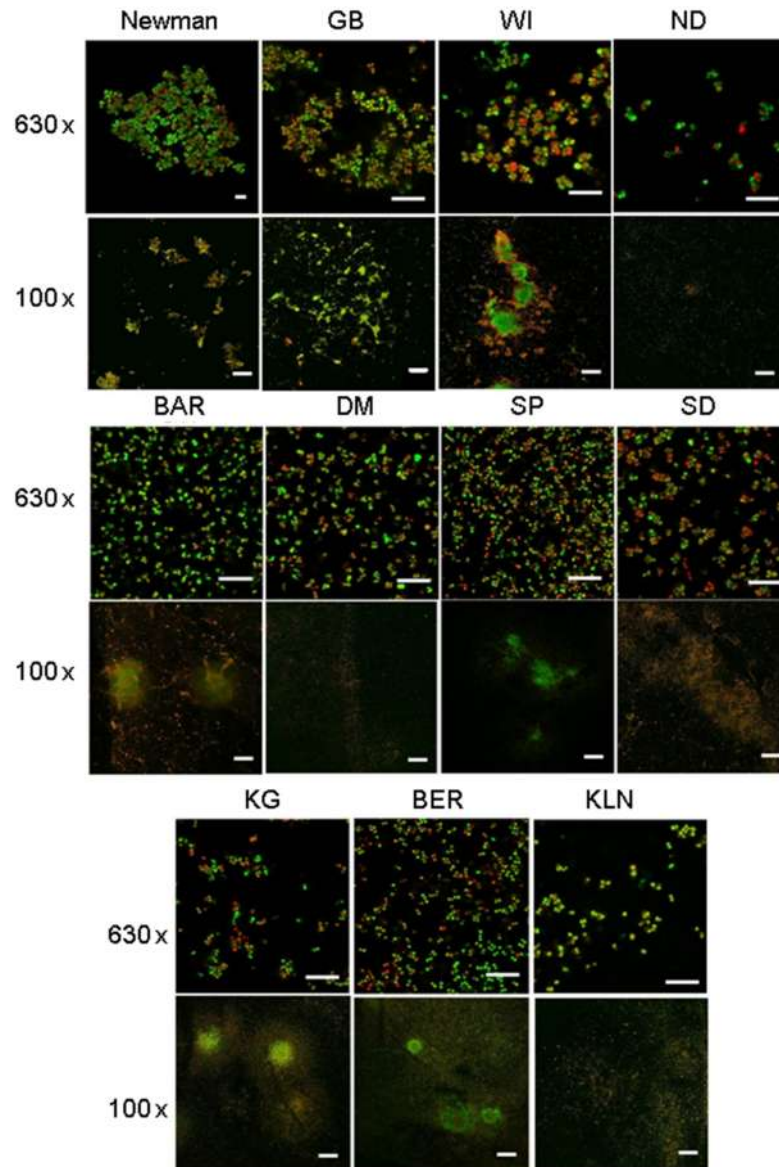


Abbildung 3.24: Fluoreszenzmikroskopie des Vitalitätsgrades von Mikrokolonien von *S. aureus* Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG nach 16 h mittels CLSM (Z-Ebene)

S. aureus Newman und die zehn MRSA-Stämme wurden für 16 h im 3D-CoG angezüchtet und anschließend mit Syto[®] 9 (Grünfluoreszenz: Syto[®] 9 positiv) und Propidium Jodid (Rotfluoreszenz: Propidium Jodid positiv) angefärbt („Life/Dead-stain“). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden in 630-facher Vergrößerung (Balkenlänge 10 µm durch elektronischen Zoom) und 100-facher Vergrößerung (Balkenlänge 150 µm) dargestellt. Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD, KG, BER und KLN.

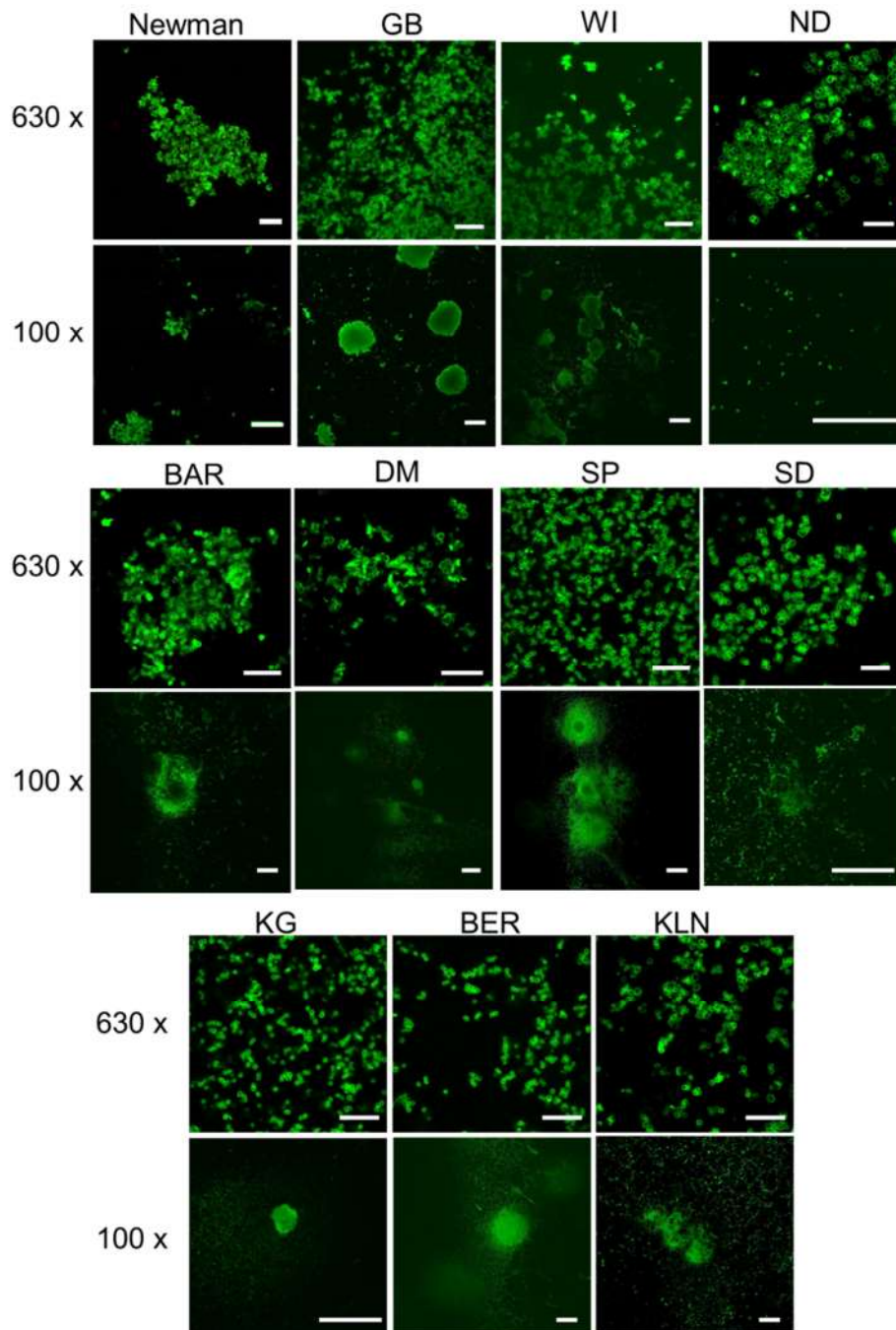


Abbildung 3.25: Direkter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von *S. aureus* Antigenen mit anti-Sau im 3D-CoG nach 16 h mittels CLSM (Z-Ebene)

Direkte Immunfluoreszenzfärbung mit FITC-konjugiertem IgG-Antikörper gegen *S. aureus* Oberflächenproteine (anti-Sau) (vgl. Tabelle 2.5, S. 35). Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN. Balkenlänge: 10 μm (630-fache Vergrößerung) durch elektronischen Zoom, 150 μm (100-fache Vergrößerung).

3.4.4.2 Charakterisierung der Bildung von SERAM-Proteinen im 3D-CoG

Guggenberger *et al.* konnten zeigen, dass *S. aureus* Newman im 3D-CoG/F Pseudokapsel (Coa-abhängig) und MAM (vWbp-abhängig) bildet und sich Coa durch einen polyklonalen Antikörper (anti-Coa) mittels Immunfluoreszenz detektieren lässt. Pseudokapsel- und MAM-Bildung von *S. aureus* Newman von Mikrokolonien im 3D-CoG/F konnte in dieser Arbeit reproduziert werden (Abbildung 3.23, S. 99). Um die Produktion und Lokalisierung von SERAM-Proteinen im 3D-Kollagengel von MRSA-Stämmen darzustellen, wurden vier verschiedene monoklonale Antikörper (mabs) getestet, die im Immunoblot spezifische Reaktivität zeigten: mab-Coa, mab-vWbp, mab-Emp und mab-Efb (siehe Abschnitt 3.4.1, S. 88). Mab-Coa und mab-vWbp zeigten trotz vorhandener Pseudokapsel und MAM für *S. aureus* Newman Mikrokolonien im 3D-CoG keine Reaktivität (Daten nicht dargestellt). Aufgrund dessen konnten mab-Coa und mab-vWbp nicht zu Versuchen im 3D-CoG mit Immunfluoreszenz eingesetzt werden. Die monoklonalen Antikörper mab-Emp und mab-Efb zeigten in der Immunfluoreszenz hingegen Reaktivität gegen Proteine von *S. aureus* Newman. Zur Detektion von mab-Emp und mab-Efb wurde der anti-Maus Cy3-Antikörper eingesetzt. In der Arbeit von T. Veit konnte gezeigt werden, dass der anti-Maus Cy3-Antikörper allein nur sehr schwache unspezifische Bindung an Staphylokokken im 3D-CoG zeigte (Veit, medizinische Doktorarbeit). Mikrokolonien werden in der Z-Ebene dargestellt, die der Ebene mit dem maximalen Durchmesser der Mikrokolonie entspricht, so dass sich Staphylokokken am Kolonierand in einer anderen Vermehrungsphase befinden könnten als Staphylokokken im Zentrum der Kolonien.

Für keinen der untersuchten *S. aureus* Stämme konnte nach 4 h im 3D-CoG Emp nachgewiesen werden. Nach 7 h und 16 h produzierte *S. aureus* Newman Emp, wobei der Emp-Nachweis unter den einzelnen Bakterien einer Mikrokolonie nicht gleichmäßig (heterogen) verteilt war. Für keinen der MRSA-Stämme konnte nach 7 h und 16 h Emp detektiert werden (Abbildung 3.26), obwohl sich für MRSA-Mikrokolonien Propidium Jodid negative Bakterien und Anfärbbarkeit durch anti-Sau nachweisen ließen (siehe Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25). Auch der Efb-Nachweis beschränkte sich auf den MSSA Newman Stamm (Abbildung 3.27). Einzige Ausnahme war der MRSA-Stamm KG, bei dem nach 4 h Wachstum im 3D-CoG in Mikrokolonien Efb nachgewiesen werden konnte. Innerhalb einer Mikrokolonie von *S. aureus* Newman konnte nach 4 h für alle Staphylokokken Efb (homogen) nachgewiesen werden. Nach 7 h und 16 h war die Efb ebenfalls nachweisbar, aber z. T. ungleichmäßig auf die Zellen der Mikrokolonie verteilt (ähnliches

ERGEBNISSE

Verteilungsmuster wie bei der Emp-Immunfärbung, Abbildung 3.26). Vorangegangene Versuche ergaben, dass *S. aureus* Newman Mikrokolonien im 3D-CoG zu ≥ 50 % aus Propidium Jodid negativen Bakterien bestehen und sich durch anti-Sau in der Immunfluoreszenz detektieren lassen. Die ungleichmäßige Emp/Efb-Produktion in Newman-Mikrokolonien kann daher nicht auf tote Bakterien oder schlechte Anfärbbarkeit durch Antikörper zurückgeführt werden.

ERGEBNISSE

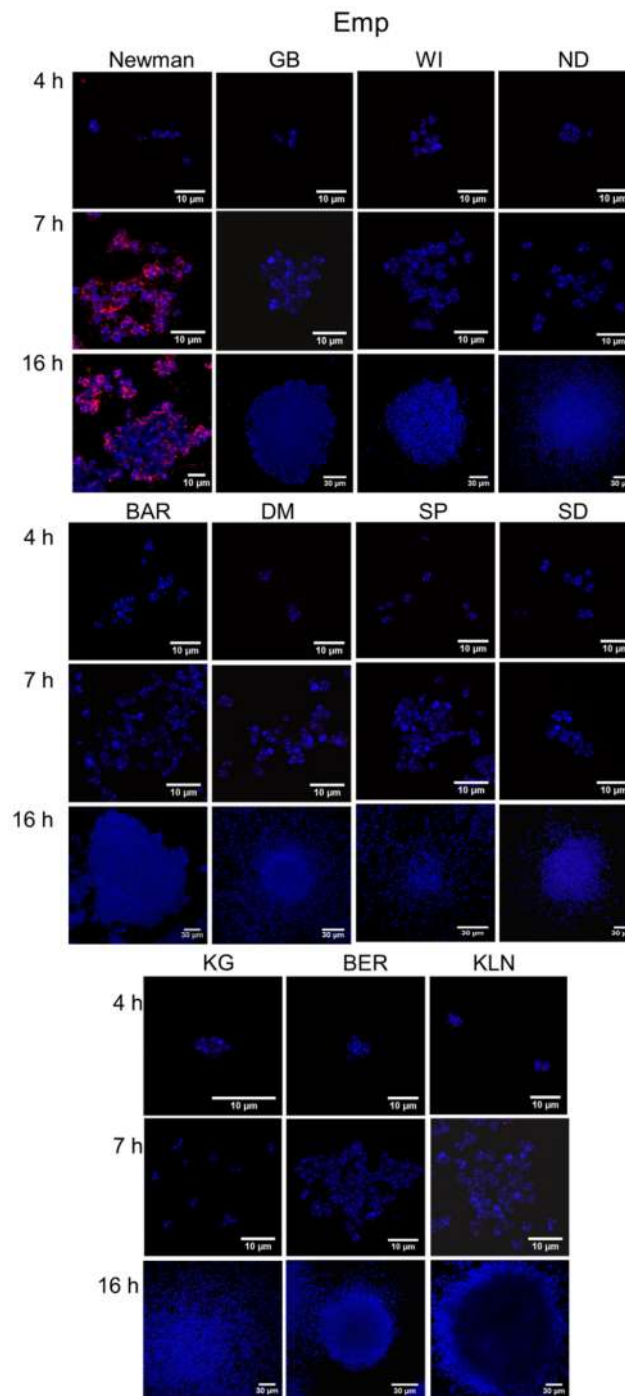


Abbildung 3.26: Indirekter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Emp in *S. aureus* Mikrokolonien im 3D-CoG

Staphylokokken-Wachstum im 3D-CoG nach 4 h, 7 h und 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂ (630-fache Vergrößerung). Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN. Emp wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit mab-Emp als Erst-Antikörper und Cy3 anti-Maus als Zweit-Antikörper nachgewiesen (rot). Nukleinsäure (Blau durch DAPI-Färbung). CLSM-Schnitte des maximalen Mikrokolonie-Durchmessers (Z-Ebene).

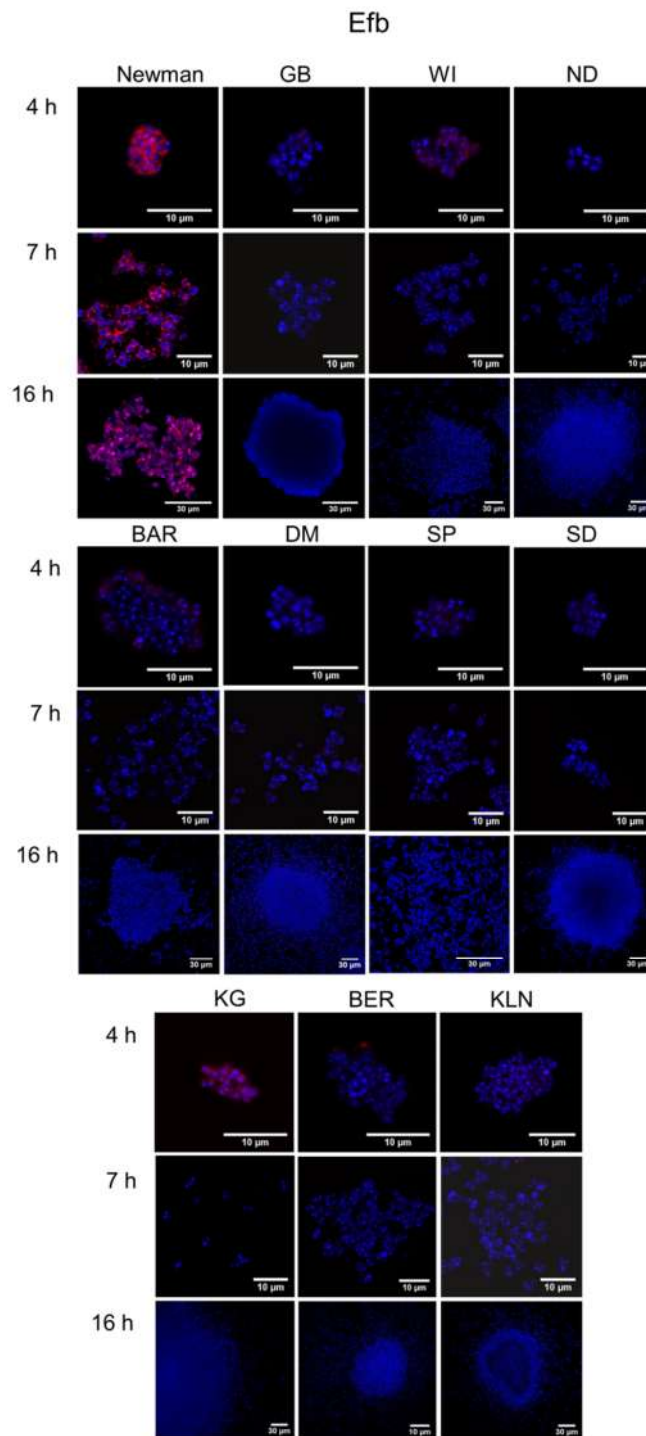


Abbildung 3.27: Indirekter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb in *S. aureus* Mikrokolonien im 3D-CoG

Staphylokokken-Wachstum im 3D-CoG nach 4 h, 7 h und 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂ (630-fache Vergrößerung). Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN. Efb wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit mab-Efb als Erst-Antikörper und Cy3 anti-Maus als Zweit-Antikörper nachgewiesen (rot). Nukleinsäure (Blau durch DAPI-Färbung). CLSM-Schnitte des maximalen Mikrokolonie-Durchmessers (Z-Ebene).

3.4.4.3 Differenzierung des Vitalitätsgrades und Anfärbbarkeit von *S. aureus*-Mikrokolonien durch Immunfluoreszenz (anti-Sau) im 3D-CoG/F

Im 3D-CoG/F sind die Mikrokolonien deutlich dichter gepackt als im 3D-CoG (vgl. Abbildung 3.21, S. 96 und Abbildung 3.23, S. 99). Es konnte nur für sechs (*S. aureus* Newman, GB, ND, DM, SP und KG) der elf untersuchten Stämme gezeigt werden, dass auch im Zentrum der Mikrokolonie Propidium Jodid negative (vitale) Bakterien nachweisbar sind (ca. 50 % bzw. ≥ 80 % Propidium Jodid negative Bakterien in Mikrokolonien von *S. aureus* Newman und MRSA-GB bzw. in Mikrokolonien von MRSA-ND, DM, SP und KG) (siehe Abbildung 3.28). Das Zentrum der Mikrokolonien von MRSA-WI, BAR, SD, BER und KLN konnte durch Syto 9/Propidium Jodid nur schlecht bzw. nicht angefärbt werden. Es konnte lediglich nachgewiesen werden, dass der Mikrokolonien-Randbereich von MRSA-WI und BAR nahezu vollständig aus Propidium Jodid negativen Bakterien besteht. Der Mikrokolonien-Randbereich von MRSA-SD, BER und KLN enthielt schätzungsweise 50-60 % Propidium Jodid negative Bakterien. Wie bereits in Abschnitt 3.4.4.1, S. 101 erwähnt, muss die Beurteilung des Vitalitätsgrades durch „*Life/Dead-stains*“ jedoch kritisch betrachtet werden (Netuschil *et al.*, 2014). Zum einen konnte gezeigt werden, dass Propidium Jodid von Bakterien der stationären Phase nur zu einem geringen Prozentsatz aufgenommen wird (Shi *et al.*, 2007), zum anderen könnten negativ geladene Polysaccharide Propidium Jodid abfangen, wodurch keine Überlagerung des Syto 9 Fluoreszenzfarbstoff in nicht-vitalen Bakterien stattfindet. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass während der langen Inkubationszeit (5 h) der 3D-Kollagengele mit den Fluoreszenzfarbstoffen ein Teil der Bakterien abstirbt.

Durch direkte Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Sau wurde die Anfärbbarkeit der Staphylokokken-Mikrokolonien im 3D-CoG/F überprüft. Das Anfärbemuster der Mikrokolonien von *S. aureus* Stämmen verhielt sich nicht homogen (siehe Abbildung 3.29). Mikrokolonien der MRSA-Stämme WI, BAR, SD und BER zeigten keine Anfärbung im Zentrum der Mikrokolonien. Diese MRSA-Stämme scheinen besonders kompakte Mikrokolonien zu bilden, da weder Fluoreszenzfarbstoff („*Life/Dead-stain*“), noch Antikörper (anti-Sau) Staphylokokken im Zentrum der Mikrokolonien durch Immunfluoreszenz anfärben können. Dass keine Immunfluoreszenz nachweisbar ist, könnte aber auch daran liegen, dass im Zentrum der Mikrokolonien keine Staphylokokken mehr vorhanden sind und die DNA bereits abgebaut ist. Oder die Staphylokokken „maskieren“ ihre Oberflächenproteine, so dass keine anti-Sau-Bindung erfolgen kann. Für alle

anderen MRSA-Stämme (GB, ND, DM, SP, KG und KLN) und *S. aureus* Newman konnte eine nahezu homogene Staphylokokken-Verteilung in den Mikrokolonien mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung 3.29). Die Bildung einer MAM scheint den immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis durch Antikörper nicht zu verhindern, da eine Immunfluoreszenzfärbung von Mikrokolonien von *S. aureus* Newman und MRSA-GB (beides MAM-Bildner) mit anti-Sau möglich war.

ERGEBNISSE

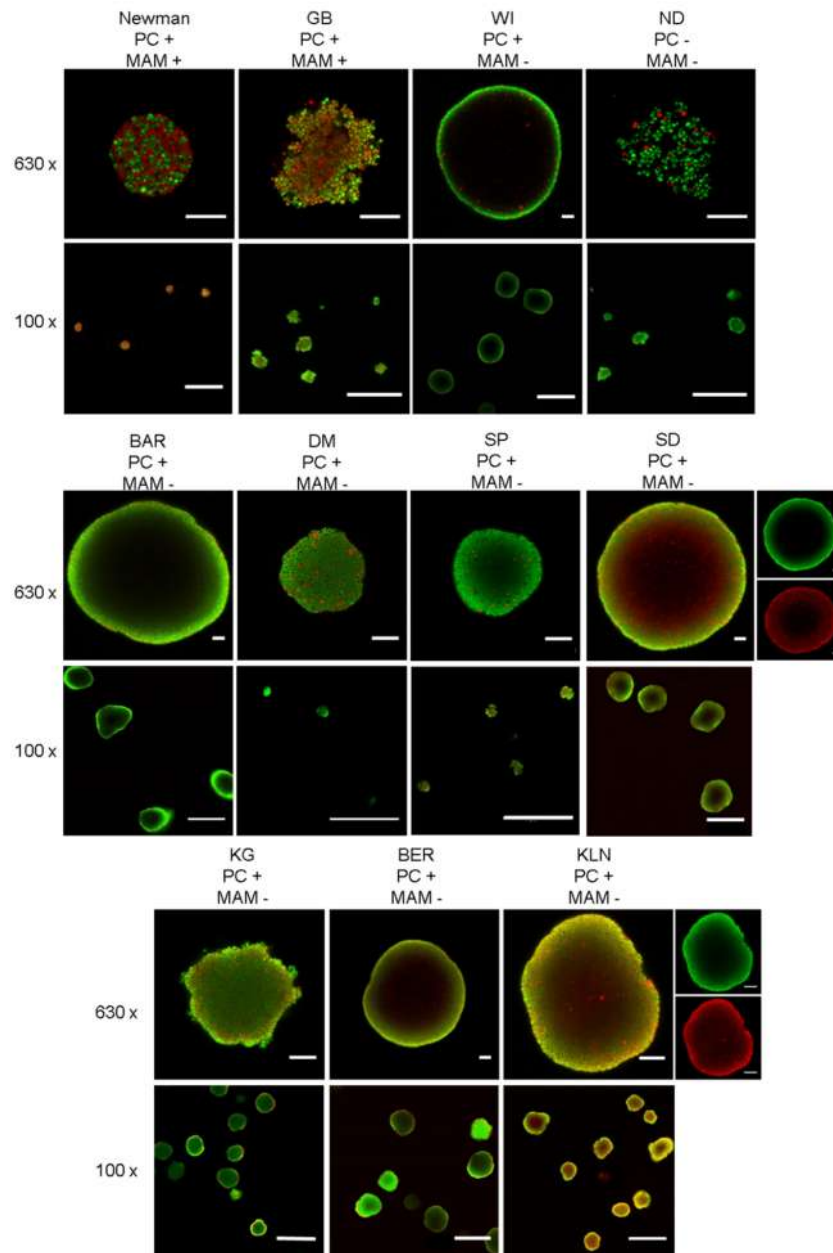


Abbildung 3.28: Fluoreszenzmikroskopie des Vitalitätsgrades von Mikrokolonien von *S. aureus* Newman und MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG/F nach 16 h mittels CLSM (Z-Ebene)

S. aureus Newman und die zehn MRSA-Stämme wurden für 16 h im 3D-CoG angezüchtet und anschließend mit Syto[®] 9 (Grünfluoreszenz: Syto[®] 9 positiv) und Propidium Jodid (Rotfluoreszenz: Propidium Jodid positiv) angefärbt („Life/Dead-stain“). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden in 630-facher Vergrößerung (Balkenlänge 15 µm durch elektronischen Zoom) und 100-facher Vergrößerung (Balkenlänge 150 µm) dargestellt. Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD, KG, BER und KLN. PC: Pseudokapsel. MAM: „microcolony associated meshwork“.

ERGEBNISSE

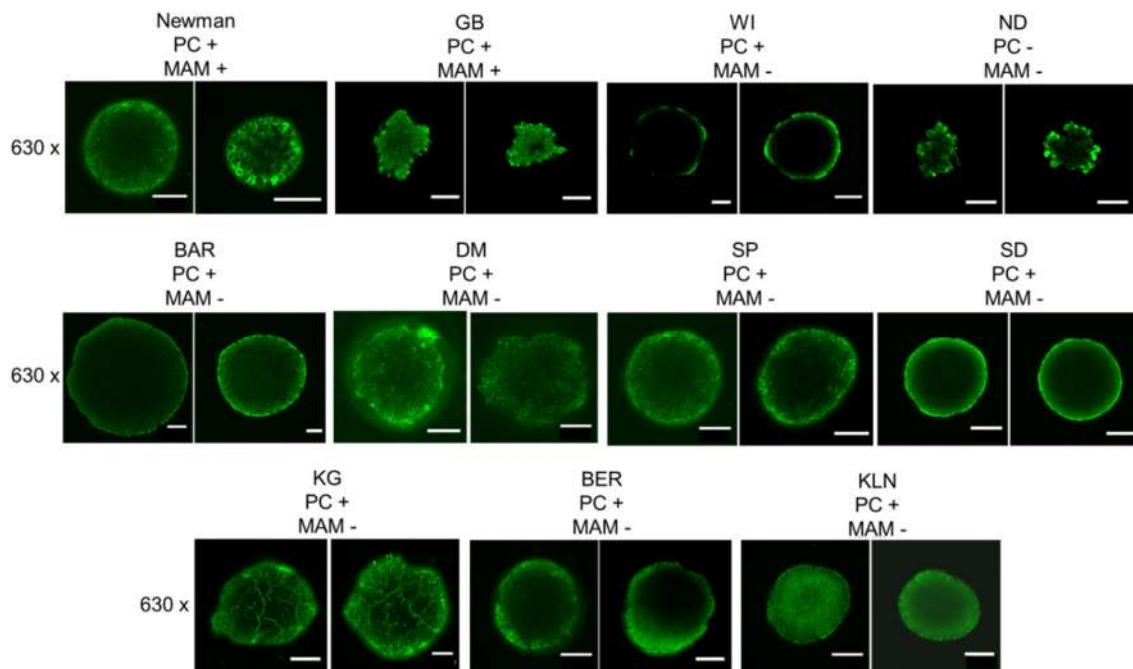


Abbildung 3.29: Direkter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von *S. aureus* Antigenen mit anti-Sau im 3D-CoG/F nach 16 h mittels CLSM (Z-Ebene)

Direkte Immunfluoreszenzfärbung mit FITC-konjugiertem IgG-Antikörper gegen *S. aureus* Oberflächenproteine (anti-Sau) (vgl. Tabelle 2.5, S. 35). Es sind je zwei repräsentative Mikrokolonien pro Stamm dargestellt. Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN. 630-fache Vergrößerung. Balkenlänge: 30 µm durch elektronischen Zoom. PC: Pseudokapsel. MAM: „microcolony associated meshwork“.

3.4.4.4 Charakterisierung der Bildung von Adhäsionsproteinen im 3D-CoG/F

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mikrokolonien von *S. aureus* Newman im 3D-CoG/F Coa-abhängige Pseudokapsel- bzw. vWbp-abhängige MAM-Bildung zeigen. Darüber hinaus konnte randständige Coa- und Emp-Anfärbung mit polyklonalem anti-Coa bzw. anti-Emp durch indirekte Immunfluoreszenz für Mikrokolonien von *S. aureus* Newman nachgewiesen werden (Guggenberger *et al.*, 2012).

Für *S. aureus* Newman konnte Pseudokapsel- (Coa-abhängig) bzw. MAM-Bildung (vWbp-abhängig) reproduziert werden. Jedoch war keine Immunfluoreszenzfärbung von *S. aureus* Newman Mikrokolonien mit den monoklonalen Antikörpern mab-Coa und mab-vWbp im 3D-CoG/F möglich (Daten nicht dargestellt). Daher eignen sich mab-Coa und mab-vWbp nicht für Immunfluoreszenzfärbungen im 3D-CoG/F. Für mab-Emp und mab-Efb konnte hingegen Reaktivität in der Immunfluoreszenz für *S. aureus* Newman Mikrokolonien nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.30 und Abbildung 3.31). Da Fibrinogen/Fibrin die Produktion von SERAM-

Proteinen (z. B. Emp und Efb) induzieren könnte, wurde die Immunfluoreszenzfärbung von Mikrokolonien im 3D-CoG/F mit mab-Emp und mab-Efb untersucht.

Für die MRSA-Stämme WI, BAR, DM, SP, SD, KG, BER und KLN konnte zu keinem der drei Wachstumszeitpunkte eine Immunfärbung mit mab-Emp nachgewiesen werden (Abbildung 3.30). Für MRSA-ND und GB war nach 16 h Emp-Nachweis möglich. Die Anfärbbarkeit von Emp bezog sich dabei auf jede Bakterienzelle innerhalb der Mikrokolonie, so dass solche Kolonien in dieser Arbeit als Kolonien mit homogenem Emp-Immunfluoreszenzmuster (hom) bezeichnet werden (Tabelle 3.10, S. 115). Im Fall von *S. aureus* Newman ließen sich bereits nach 4 h Mikrokolonien mit homogenem Emp-Immunfluoreszenzmuster nachweisen, während nach 7 h und 16 h Emp-Anfärbung nur bei am Mikrokolonie-Rand gelegenen Bakterien (ran) möglich war. Im Zentrum der Mikrokolonien von *S. aureus* Newman konnte kein Emp nachgewiesen werden, obwohl Antikörper (anti-Sau) das Zentrum der Mikrokolonie anfärben können und dort vereinzelt Propidium Jodid negative (vitale) Bakterien vorzufinden sind (siehe Abbildung 3.29, S. 111 und Abbildung 3.28, S. 110).

Das Efb-Anfärbemuster von *S. aureus* Newman Mikrokolonien unterschied sich vom Emp-Anfärbemuster nicht. Bereits nach 4 h konnten Mikrokolonien mit homogener Efb-Immunfluoreszenzmuster nachgewiesen werden, wohingegen sich die Efb-Anfärbbarkeit nach 7 h und 16 h auf den Kolonierand beschränkte (Abbildung 3.31). Während für MRSA-WI, SP und KG zu keinem der drei Zeitpunkte Emp nachgewiesen werden konnte, ließen sich Mikrokolonien von MRSA WI nach 4 h und 7 h, MRSA-KG nach 4 h und MRSA-SP nach 7 h heterogen (MRSA-WI und SP) bzw. homogen (MRSA-KG) mit mab-Efb anfärben. Zu anderen Zeitpunkten kann bei diesen Stämmen keine Efb-Anfärbung erzielt werden. Für fünf MRSA-Stämme (MRSA-BAR, DM, SD, BER und KLN) konnte in den Versuchen zu keinem der getesteten Zeitpunkte Emp- oder Efb-Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Eine Übersicht zum Nachweis von Emp und Efb in Mikrokolonien im 3D-CoG/F ist in Tabelle 3.10, S. 115 zusammengefasst. Tabelle 3.11, S. 116 gibt zudem eine Übersicht über untersuchte Charakteristika von im 3D-CoG/F gewachsenen Mikrokolonien bzgl. „Life/Dead-stain“-Differenzierung, Immunfärbung mit anti-Sau, Mikrokolonie-Morphologie und Emp- bzw. Efb-Anfärbung durch Immunfluoreszenz, sowie Emp- und Efb-Nachweis durch Immunoblot. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2 und 3.4 ist zudem in Tabelle 3.12, S. 117 gegeben.

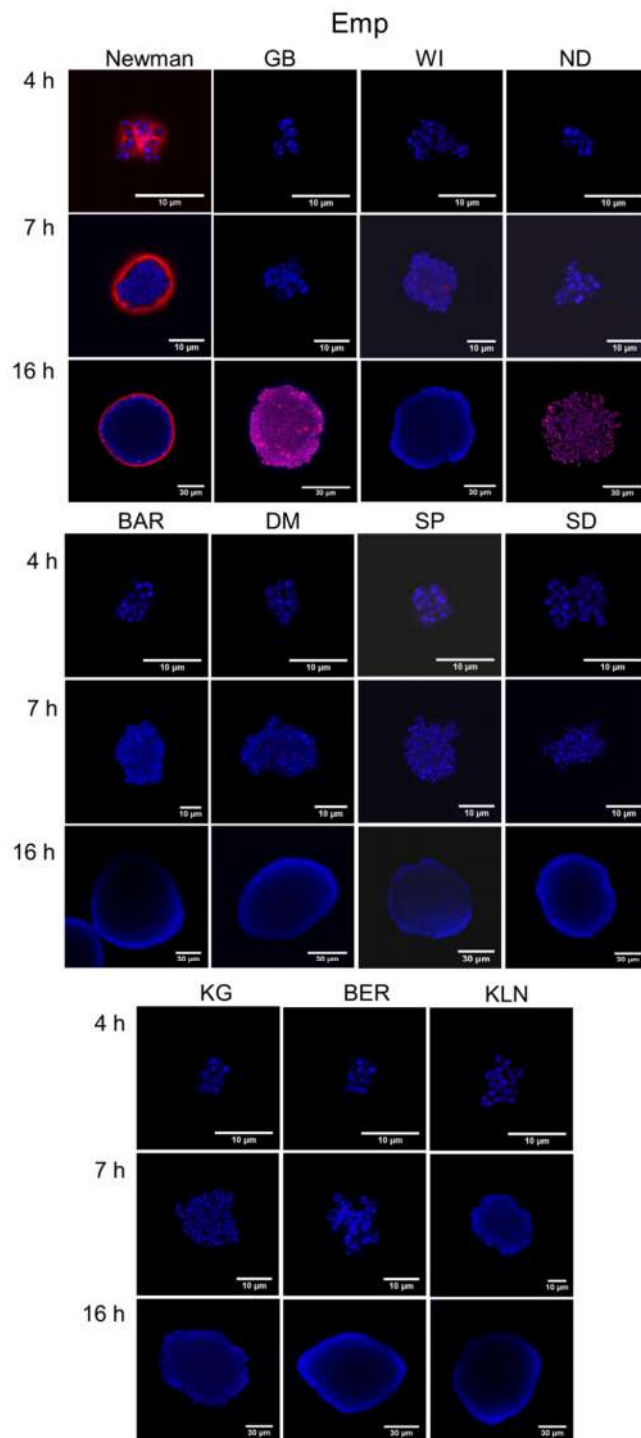


Abbildung 3.30: Indirekter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Emp in *S. aureus* Mikrokolonien im 3D-CoG/F

Staphylokokken-Wachstum im 3D-CoG/F nach 4 h, 7 h und 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂ (630-fache Vergrößerung). Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN. Emp wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit mab-Emp als Erst-Antikörper und Cy3 anti-Maus als Zweit-Antikörper nachgewiesen (rot). Nukleinsäure (Blau durch DAPI-Färbung). CLSM-Schnitte des maximalen Mikrokolonie-Durchmessers (Z-Ebene).

ERGEBNISSE

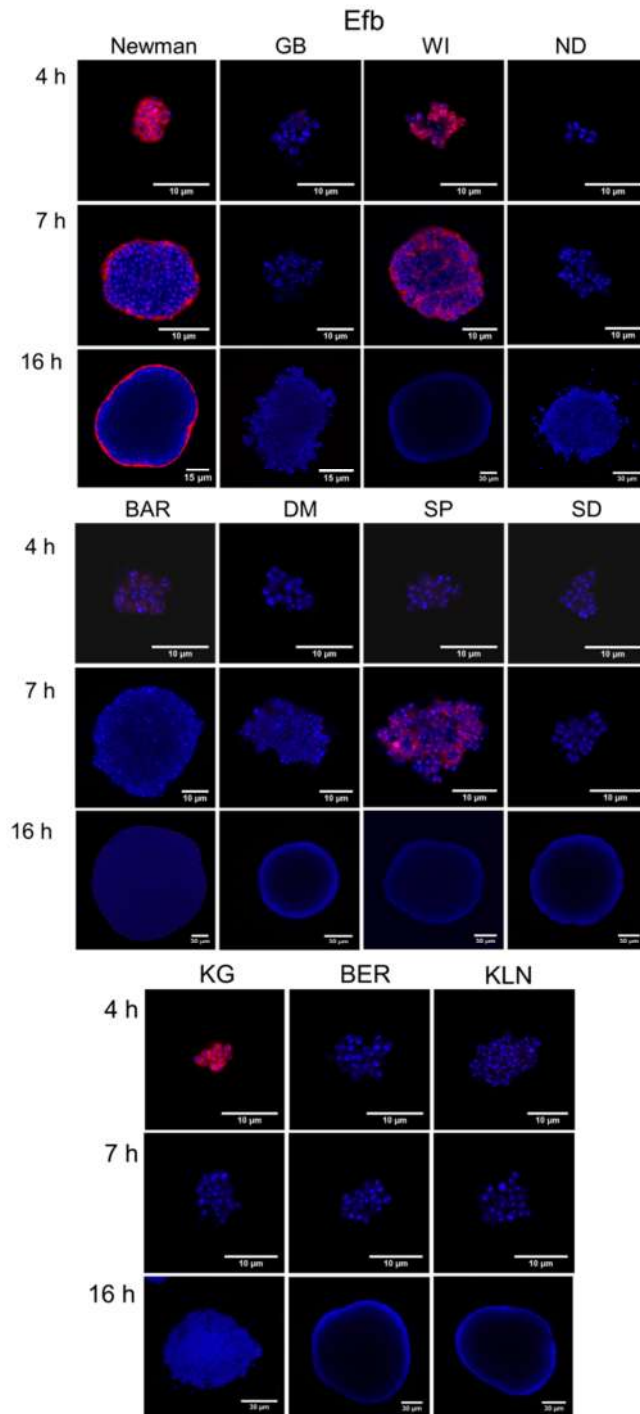


Abbildung 3.31: Indirekter immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Efb in *S. aureus* Mikrokolonien im 3D-CoG/F

Staphylokokken-Wachstum im 3D-CoG/F nach 4 h, 7 h und 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂ (630-fache Vergrößerung). Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN. Efb wurde durch indirekte Immunfluoreszenz mit mab-Efb als Erst-Antikörper und Cy3 anti-Maus als Zweit-Antikörper nachgewiesen (rot). Nukleinsäure (Blau durch DAPI-Färbung). CLSM-Schnitte des maximalen Mikrokolonie-Durchmessers (Z-Ebene).

ERGEBNISSE

Tabelle 3.10: Emp- und Efb-Mikrokolonie-Färbung von Staphylokokken Stämmen zu drei verschiedenen Zeitpunkten

Stamm	Emp-Nachweis zu drei verschiedenen Zeitpunkten			Efb-Nachweis zu drei verschiedenen Zeitpunkten		
	4 h	7 h	16 h	4 h	7 h	16 h
Newman	hom	ran	ran	hom	ran	ran
GB	-	-	hom	-	-	-
WI	-	-	-	het	het	-
ND	-	-	hom	-	-	-
BAR	-	-	-	-	-	-
DM	-	-	-	-	-	-
SP	-	-	-	-	het	-
SD	-	-	-	-	-	-
KG	-	-	-	hom	-	-
BER	-	-	-	-	-	-
KLN	-	-	-	-	-	-

Detektion nach Wachstum im 3D-CoG/F nach 4 h, 7 h und 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂.

Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: SP, WI, BAR, DM, ND, SD, KG, BER, KLN und GB.

Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit mab-Emp und mab-Efb:

positiv: heterogenes (het), homogenes (hom) und randständiges (ran) Immunfluoreszenzmuster

negativ: - (keine Immunfluoreszenz)

ERGEBNISSE

Tabelle 3.11: Übersicht zu Charakteristika von *S. aureus* Stämmen

MRSA-Stamm	LD-Differenzierung* und Anteil lebender Bakterien pro MK (16 h)	Anti-Sau Färbung* (16 h)	PC* (4h, 7h, 16h)	MAM* (4h, 7h, 16h)	Emp-IF* (4h, 7h, 16h)	Emp-IB (exp./stat.)	Efb-IF* (4h, 7h, 16h)	Efb-IB (exp./stat.)	Coa-IB (exp./stat.)	vWbp-IB (exp./stat.)
Newman	h+	hom	+/+/+	-/+/+	het/ran/ran	+/+	hom/ran/ran	+/+	+/+	+/+
BAR	r++	ran	-/+/+	-/-/-	-/-/-	+/+	-/-/-	+/-	-/-	-/-
ND	h++	hom	-/-/-	-/-/-	-/-/hom	+/+	-/-/-	-/-	-/+	-/-
SD	r+	ran	-/-/+	-/-/-	-/-/-	+/+	-/-/-	+/+	-/+	-/-
KG	h++	hom	-/-/+	-/-/-	-/-/-	+/+	hom/-/-	+/+	-/-	-/-
BER	r+	ran	-/-/+	-/-/-	-/-/-	-/-	-/-/-	-/-	-/-	-/-
KLN	r+	hom	-/-/+	-/-/-	-/-/-	+/+	-/-/-	-/+	-/+	-/-
WI	r++	ran	-/+/+	-/+/-	-/-/-	+/+	het/het/-	+/+	-/+	-/-
SP	h++	hom	-/-/+	-/-/-	-/-/-	+/+	-/het/-	+/+	-/-	-/-
DM	h++	hom	-/-/+	-/-/-	-/-/-	+/+	-/-/-	+/+	-/+	-/-
GB	h+	hom	-/-/+	-/-/+	-/-/hom	-/-	-/-/-	-/-	-/+	-/-

*Wachstum im 3D-CoG/F bei 5 % CO₂.

LD: Lebend/tot; MK: Mikrokolonie; IF: Immunfluoreszenz; IB: Immunoblot; PC: Pseudokapsel; MAM: „microcolony-associated meshwork“;

exp: exponentielle Phase; stat: stationäre Phase.

h+: homogene LD-Färbung, ca. 50 % Propidium Jodid negativ; h++: homogene LD-Färbung, ca. 80-90 % Propidium Jodid negativ;

r+: randständige LD-Färbung, ca. 50 % Propidium Jodid negativ; r++: randständige LD-Färbung, ca. 80-90 % Propidium Jodid negativ;

hom: homogene IF-Färbung; ran: randständige IF-Färbung;

+: vorhanden. -: nicht vorhanden bzw. keine Färbung (IF) oder Bande (IB).

Stämme: *S. aureus* Newman, MRSA-Stämme: GB, WI, ND, BAR, DM, SP, SD KG, BER und KLN.

ERGEBNISSE

Tabelle 3.12: Gesamt-Übersicht zu den Charakteristika der untersuchten MRSA-Referenzstämme

MRSA-Stamm	MLST	SCCmec-Typ	mec-Klasse	BlaZ-Typ, Nitrocefin-Umsetzung	agr-Gruppe	MHK (µg/ml Oxacillin)	PAP	PBP2a-Produktion	PC/MAM ^c	Efb-Produktion IB/IF	Emp-Produktion IB/IF
RH	ST5	II	A	Typ A, +	II	64	1	+	n.u.	+/ n.u.	+/ n.u.
BAR	ST22	IV	B	Typ B, (+)	I	16	1	(+)	+/-	+/-	+/-
ND	ST247	I	B	nn, -	I	≥ 256	3	++	-/-	-/-	+/+
SD	ST228	I	B	nn, -	II	≥ 256	3	++	+/-	+/-	+/-
KG	ST8	IV	B	Typ A, ++	I	32	2	+	+/-	+/+	+/-
BER	ST45	IV	B	Typ C, (+)	I	32	1	+	+/-	-/-	-/-
KLN	ST225	II	A	nn, -	II	64	1	+	+/-	-/-	+/-
WI	ST239	III	A ^a	Typ A, ++	I	≥ 256	3	++	+/-	+/+	+/-
SP	ST8	IV	B	Typ A, ++	I	16	1	+	+/-	+/+	+/-
DM	ST125	I	B	nn, -	II	≥ 256	2	++	+/-	+/-	+/-
GB	ST36	II	A ^b	Typ A, ++	III	≥ 256	3	+	+/+	-/-	-/+

mec-Klasse A: *mecA*, *mecR1*, *mecI*, *mecR2*; mec-Klasse A^a: *mecA*, *mecR1*, *mecI*: Gln₆₈ → Stopkodon; mec-Klasse A^b: Gln₁₁₅ → Stopkodon;

mec-Klasse B: *mecA*, verkürztes *mecR1*, Δ *mecI*. Nitrocefin-Umsetzungsrate: (+) sehr schwach, + mittel, ++ stark, - keine.

PAP Stufen: Reduktion der Zellzahl mit 1: ≥ 0,75 µg/ml, 2: ≥ 6 µg/ml bzw. 3: ≥ 50 µg/ml Oxacillin. PBP2a-Produktion: gering: (+), mittel: +, stark: ++.

PC^c/MAM^c: Pseudokapsel^c "microcolony associated meshwork" im 3D-CoG/F nach 16 h: +: vorhanden -: nicht vorhanden.

IB: Immunoblot. IF: Immunfluoreszenz im 3D-CoG/F, +: Efb/Emp-Produktion nachweisbar; -: Efb/Emp-Produktion nicht nachweisbar.

nn: nicht nachweisbar. n.u.: nicht untersucht.

3.4.4.5 Charakterisierung der Mikrokolonie-Morphologie und Emp/Efb-Produktion von *S. aureus* Patientenisolaten im 3D-CoG/F

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich nicht nur bei MRSA-Referenzstämmen, sondern dass sich auch bei frisch isolierten klinischen *S. aureus*-Isolaten Unterschiede in der Mikrokolonie-Morphologie nach Wachstum im 3D-CoG/F zeigen (Abbildung 3.32). Stamm MP-5 bildete nach 16 h Wachstum kugelige, dicht gepackte Mikrokolonien mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 120 µm, die von einer Pseudokapsel umgeben waren. Eine MAM konnte nicht detektiert werden. Die Stämme MP-6 und MP-3 bildeten nach 16 h kugelige Mikrokolonien (durchschnittlicher Durchmesser 15–20 µm), die sowohl von einer Pseudokapsel, als auch einer MAM umgeben waren. Stamm MP-9 bildete 50-60 µm große, dicht gepackte Mikrokolonien. Es konnte weder Pseudokapsel noch MAM nachgewiesen werden. Emp-Anfärbung konnte für keinen der vier *S. aureus* Patientenisolate mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Bei den beiden MAM-positiven Stämmen MP-6 und MP-9 konnte hingegen Efb randständig angefärbt werden. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Patientenisolate MP-5 und MP-6, die beide aus dem Respirationstrakt isoliert wurden sich in Kolonief orm und im Efb-Anfärbemuster unterscheiden. Drei der vier untersuchten Patientenisolate (MP-6, MP-3 und MP-9) wurden bezüglich ihrer Mikrokolonie-Morphologie bereits in einer Veröffentlichung von Guggenberger *et al.* untersucht (Guggenberger *et al.*, 2012). Überraschenderweise stimmt die Mikrokolonie-Morphologie in dieser Arbeit nicht mit der von Guggenberger *et al.* überein. Die Versuchsbedingungen sind bis auf die Zugabe von 4 µg/ml Prothrombin zur Supplementierung des Kollagen-RPMI-Mediums in dieser Arbeit mit denen der Publikation identisch und wurden derselben Stammsammlung entnommen. Trotzdem konnte in dieser Arbeit für MP-6 und MP-3 eine MAM detektiert werden, die in der Arbeit von Guggenberger *et al.* nicht nachgewiesen wurde (Guggenberger *et al.*, 2012). Für MP-9 konnten Guggenberger *et al.* hingegen eine Pseudokapsel nachweisen, die in dieser Arbeit nicht vorhanden war. Diese Ergebnisse legen eine starke Heterogenität zwischen klinischen *S. aureus* Stämmen, als auch innerhalb einer Population dar.

ERGEBNISSE

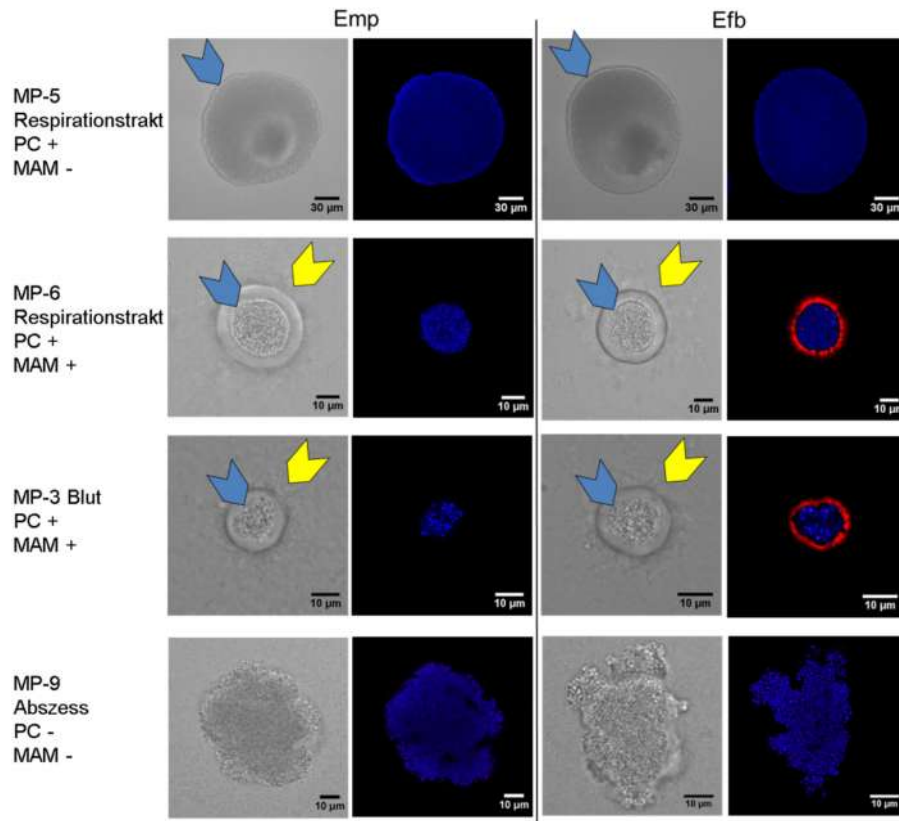


Abbildung 3.32: Phasenkontrast- und immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung Pseudokapsel und MAM bzw. Emp/Efb-Produktion von *S. aureus* Patientenisolaten im 3D-CoG/F mittels CLSM

Staphylokokken-Wachstum im 3D-CoG/F nach 16 h bei 37 °C, 5 % CO₂ (630-fache Vergrößerung). Stämme: *S. aureus* Patientenisolat MP-5 und MP-6 (Respirationstrakt-Abstrich), MP-3 (Blut-Abstrich) und MP-9 (Abszess-Abstrich). Emp bzw. Efb wurde durch Immunfluoreszenz mit mab-Emp bzw. mab-Efb detektiert. Bindung von mab-Emp bzw. mab-Efb wurde durch Cy3 anti-Maus nachgewiesen (rot). Nukleinsäure (Blau durch DAPI-Färbung). PC: Pseudokapsel (blauer Pfeil), MAM: „microcolony associated meshwork“ (gelber Pfeil).

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von repräsentativen MRSA-Referenzstämmen und Optimierung des Nachweis von PBP2a

In Zusammenarbeit mit der Firma Hyglos wurden im ersten Teil dieser Arbeit die Voraussetzungen zum Nachweis von PBP2a mittels Antikörper-basierendem Immunotest etabliert und für die Anwendung eines spezifischen, günstigen, schnellen und praktischen Schnelltest evaluiert. Für die Evaluation standen elf deutsche MRSA-Referenzstämmen des NRZ für Staphylokokken (RKI, Wernigerode) zur Verfügung, die zunächst hinsichtlich ihrer Resistenz auf Gen- bzw. Proteinebene (Regulation und Expression/Produktion) untersucht wurden. Diese MRSA-Stämme umfassen zehn verschiedene Multi-Lokus-Sequenztypen (MLST), fünf klonale Komplexe (CC) und vier SCCmec-Typen (vgl. Tabelle 3.12, S. 117).

4.1.1 Genetische Charakterisierung der MRSA-Referenzstämmen

Für eine genetische Charakterisierung der MRSA-Referenzstämmen wurde zunächst eine Einteilung in *agr*-Gruppen vorgenommen. Der *agr*-Lokus reguliert durch *Quorum sensing* eine Vielzahl an Virulenzfaktoren in *S. aureus* und setzt sich aus den vier Genen *agrABCD* zusammen. Die weite Verbreitung der *agr*-Gruppe I in klinischen Isolaten spiegelt sich auch in den MRSA-Referenzstämmen wieder, von denen sechs (MRSA-BAR, ND, KG, BER, WI und SP) der elf untersuchten Stämme der *agr*-Gruppe I zugeordnet wurden (Moore und Lindsay, 2001, van Leeuwen *et al.*, 2000). Zur *agr*-Gruppe II gehören MRSA-RH, SD, KLN und DM. MRSA-GB gehört als einziger der elf Stämme zur *agr*-Gruppe III. Diese *agr*-Gruppen korrelieren zum Teil mit bestimmten Biotypen (Novick und Geisinger, 2008). Im Fall der MRSA-Referenzstämmen konnte in dieser Arbeit jedoch kein Zusammenhang zwischen *agr*-Gruppe und MHK, PBP2a-Produktionsmenge oder anderen untersuchten Kriterien nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3.12, S. 117).

Eine Klassifizierung der MRSA-Referenzstämmen in SCCmec-Typen ergab, dass MRSA-ND, SD und DM SCCmec-Typ I tragen, wie auch der in der Literatur beschriebene NCTC10442 Stamm

(AB033763) MRSA-RH, KLN und GB enthalten SCCmec-Typ II (vgl. Stamm N315, D86934). MRSA-WI trägt als einziger SCCmec-Typ III. Der SCCmec-Typ III wurde auch für den Stamm 85/2082 (AB037671) beschrieben (siehe NCBI). Der oft für Methicillin-resistente *S. epidermidis* und andere Koagulase-negative Staphylokokken beschriebene SCCmec-Typ IV wurde für den MRSA-Stamm CA05 (AB063172) und ZH47 (AM292304) durch Sequenzierung nachgewiesen. Von den MRSA-Referenzstämmen dieser Arbeit tragen auch die vier Stämme MRSA-BAR, KG, BER und SP den SCCmec-Typ IV (siehe auch Tabelle 3.12, S. 117). SCCmec-Typ I und IV sind kleinere genomische Inseln als SCCmec-Typ II und III (IWG-SCC, 2009). Der evolutionäre Erfolg des SCCmec-Typ IV-Elements kann daher möglicherweise auf effizientere Übertragungsmöglichkeiten und/oder geringere Energieaufwendungen zurückgeführt werden (Ender *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2007, Monecke *et al.*, 2011). Die genetische Ausstattung im Hinblick auf *mecA*, *mecR1*, *mecI* und *bla*-Kassette, SCCmec-Typ, bzw. Zugehörigkeit zur *agr*-Gruppe des jeweiligen MRSA-Stamms kann Abbildung 4.1 bzw. Tabelle 4.1 entnommen werden. Eine Sequenzierung des *mecA*-Gens und deren RBS („*ribosomal binding site*“) von allen vier SCCmec-Typen ergab eine 100 %-ige Sequenz-Übereinstimmung für alle MRSA-Stämme. Für Unterschiede im Resistenzverhalten sollten deshalb *mecA*-Regulatoren oder andere Faktoren verantwortlich sein. Diese hohe Konservierung der *mecA*-Sequenz ist sowohl für *S. aureus*, als auch für andere Staphylokokkenarten, wie *S. haemolyticus*, *S. simulans* und *S. epidermidis* bekannt (Ryffel *et al.*, 1990, Ubukata *et al.*, 1990). Eine aktuelle Studie belegt, dass es aber auch verschiedene *mecA*-Allele unter den verschiedenen Staphylokokken-Arten gibt (Monecke *et al.*, 2012). Wie für MRSA-Stämme mit dem SCCmec-Typ I und IV generell charakteristisch ist das *mecR1*-Gen partiell und das *mecI*-Gen vollständig deletiert (vgl. Abbildung 4.1, S. 123). Diese Deletionen sind mit dem Vorliegen der Insertionssequenz (IS) 1272 assoziiert. Die weite Verbreitung von IS1272 in klinisch relevanten Staphylokokken-Arten ist bereits seit über zwei Dekaden bekannt (Kobayashi *et al.*, 1999). Wahrscheinlich stammt IS1272 ursprünglich von *S. haemolyticus*, der sehr viele IS1272-Kopien trägt, die sekundär auf *S. epidermidis* und *S. aureus* übertragen wurden (Archer *et al.*, 1996). Von den vier Stämmen mit SCCmec-Typ II und III (MRSA-RH, KLN, GB und WI) bei denen *mecR1* und *mecI* vorhanden sind, hatten die Stämme MRSA-WI und GB eine Mutation im *mecI*-Gen, die zu einem „verfrühten“ Stopkodon führt. Diese Mutation wurde auch für andere Stämme (SA41, SA35, SA7, SA57) beschrieben und führt zur Produktion eines nicht-funktionalen Repressorproteins (Oliveira und de Lencastre, 2011, Rosato *et al.*, 2003). Mutationen

DISKUSSION

im Bereich der *mec*-Regulatorgene könnten damit zusammenhängen, dass für die Ausbreitung im Krankenhaus eine stark ausgeprägte Methicillin-Resistenz Voraussetzung ist. Durch Punktmutationen oder großen Gensequenz-Deletionen (bis zum Fehlen eines intakten MecI-Proteins), kann es zur konstitutiven bzw. dereprimierten Expression des *mecA*-Gens kommen. Für MRSA-Stämme des SCCmec-Typs II und III konnte außerdem kürzlich ein MecR2 Protein identifiziert werden, das die ineffiziente Induktion von *mecA* durch MecR1 kompensiert (Arede *et al.*, 2012). Das *mecR2*-Gen wurde auch in den MRSA-Stämmen mit SCCmec-Typ II und III (MRSA RH, WI, KLN und GB) identifiziert und sequenziert.

Tabelle 4.1: Übersicht zur genetischen Ausstattung der MRSA-Referenzstämme

MRSA-Stamm	SCCmec-Typ	funktionelle <i>mec</i> -Regulatorregion	<i>bla</i> -Region	<i>agr</i> -Gruppe
RH	II	+	+	II
KLN	II	+	Δ	II
SP	IV	*	+	I
WI	III ^a	*	+	I
BAR	IV	*	+	I
KG	IV	*	+	I
BER	IV	*	+	I
GB	II ^a	*	+	III
DM	I	*	Δ	II
ND	I	*	Δ	I
SD	I	*	Δ	II

^a nicht funktionelle *mec*-Region aufgrund einer Punktmutation im *mecI*-Gen

(*) nicht funktionelle *mec*-Region (*mecA*-Gen vorhanden); (+) Gen-Region vorhanden; (Δ) *bla*-Region deletiert.

DISKUSSION

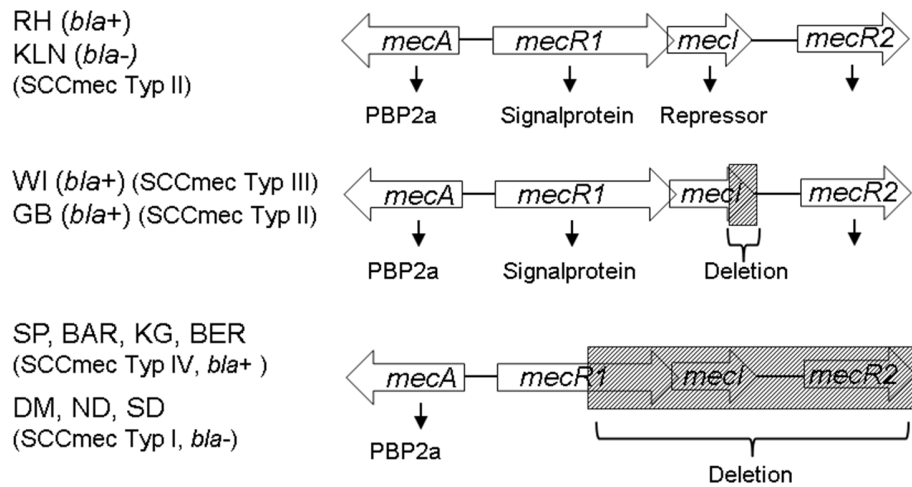


Abbildung 4.1: Übersicht zur Genorganisation der *mec*-Region der MRSA-Referenzstämmen

Genotyp *bla*⁺: vollständige *bla*-Region, *bla*⁻: genotypisch *bla*-negativ. Schraffierter Bereich: deletierter Sequenzabschnitt. MRSA-WI bzw. MRSA-GB: Punktmutation im *mecI*-Gen führt zum Stopkodon (Kodon 68 bzw. Kodon 115). MRSA-Stämme: DM, ND, SD, RH, KLN, GB, WI, SP, KG, BAR und BER.

Aufgrund der hohen Homologie zwischen den Bla- und Mec-Regulatoren können die Bla-Regulatoren ebenfalls die Transkription von *mecA* steuern, weshalb der genetische Hintergrund der Bla-Kassette bei den MRSA-Referenzstämmen ebenfalls berücksichtigt werden muss (Hackbarth und Chambers, 1993, Safo *et al.*, 2005). Für die hier untersuchten MRSA-Stämme des SCCmec-Typs I-IV zeigte sich, dass entweder die aus den Genen *blaZ*, *blaR1* und *blaI* bestehende komplette Bla-Region vorhanden ist (Genotyp: *bla*⁺) oder aber vollständig fehlt (Genotyp: Δ *bla*) (vgl. Tabelle 4.1, S. 122). Ein Selektionsdruck für die Erhaltung der *bla*⁻, nicht aber für die Erhaltung der *mec*-Regulatoren ist plausibel (Milheiriço *et al.*, 2011). Basierend auf dem Vorhandensein der *mec*- und *bla*-Region können die Referenzstämmen in vier Gruppen eingeteilt werden (siehe auch Tab. 4.1): (i) MRSA-RH mit vollständiger *mec*- und *bla*-Region (Genotyp: *mec*⁺/*bla*⁺), (ii) MRSA-KLN mit vollständiger *mec*-Region, aber genotypisch negativer *bla*-Region (Genotyp: *mec*⁺/*bla*⁻), (iii) MRSA-SP, WI, BAR, KG, BER und GB mit defektem *mecI* und *mecR1* und vollständiger *bla*-Region (Genotyp: *mec*^{*}/*bla*⁺) und (iv) MRSA-Stämme DM, ND und SD mit defektem *mecI* und *mecR1*, sowie genotypisch negativer *bla*-Region (Genotyp: *mec*^{*}/*bla*⁻). Die Stämme RH, WI, KLN und GB enthalten außerdem das *mecR2*-Gen (vgl. Abbildung 4.1). Die PBP2a-Produktion wird je nach genetischer Ausstattung durch *mec*- und/oder *bla*-Regulatoren gesteuert oder ist konstitutiv

bzw. dereprimiert. Für einen PBP2a-basierten MRSA-Test mit hoher Sensitivität müssen auch Stämme mit geringer PBP2a-Produktion erfasst werden können. In dieser Arbeit wurde deshalb auch untersucht, ob sich die unterschiedliche Genausstattung der *mec*- und *bla*-Region in der PBP2a-Produktion widerspiegelt und unter welchen Bedingungen für die MRSA-Referenzstämme dieser Arbeit ein PBP2a-basierter MRSA-Immunoschnelltest möglich wäre.

4.1.2 Wachstum von MRSA-Stämmen unter Anwesenheit von Oxacillin

Der Nachweis von PBP2a hängt davon ab, ob die untersuchten Stämme zu den Heteroresistenz-Typen (HeR-Typen) oder Homoresistenz-Typen (HoR-Typen) gehören. Eine Populationsanalyse (PAP) zur Einteilung der untersuchten MRSA-Referenzstämme in HeR-Typen und HoR-Typen ergab, dass fünf Stämme vom „*high-heteroresistance*“-Typ (h-HeR-Typ), zwei Stämme vom „*low-heteroresistance*“-Typ (l-HeR-Typ) und vier Stämme vom homoresistenten („*homoresistance*“) Typ (HoR) sind (siehe Abbildung 3.10, S. 80). Eine HeR-Population enthält ≥ 99 % Zellen mit niedrigem/moderatem Resistenzgrad und < 1 % Zellen mit extrem hoher Resistenz (mehrere 100 $\mu\text{g/ml}$ Antibiotikum) (Dordel *et al.*, 2014). HoR besagt, dass mehr als 1 % der Zellpopulation phänotypische Resistenz gegenüber ≥ 50 $\mu\text{g/ml}$ Methicillin ausbildet (Hartman und Tomasz, 1986). Die Ursache für die Ausbildung von unterschiedlichen Populationstypen (z.B. HeR oder HoR) ist bisher nicht bekannt. Eine Deletion des *mecRI*- und *mecI*-Gens korrelierte nicht mit der Ausprägung einer HoR. Zum Beispiel sind MRSA-BAR und SP auch ohne funktionelles *mecRI*- und/oder *mecI*-Gen phänotypisch h-HeR sind. Auch die Anwesenheit von *MecR2* scheint kein Kriterium für HoR zu sein, da beispielsweise MRSA-RH eine funktionelle *mec*-Region besitzt, aber dennoch phänotypisch h-HeR ist.

Für drei Stämme (MRSA-WI (HoR-Typ), DM (l-HeR-Typ) und BAR (l-HeR-Typ)) konnte die Konversion zur homoresistenten Population durch Selektion mit subinhibitorischen Oxacillin-Konzentrationen erzielt werden (Abb. Abbildung 3.11, S. 81). Für alle drei Stämme konnte im PAP nach Präselektion eine Selektion zu Subpopulationen mit höherer Resistenz nachgewiesen werden (z.B. cfu-Reduktion der Population von MRSA-BAR um drei Log-Stufen durch 0,75 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin ohne Präselektion bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$ Oxacillin nach Präselektion der Population). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Konversion in eine HoR-Population mit einer erhöhten PBP2a-Produktion assoziiert ist, was plausibel ist und zu Berichten anderer Arbeitsgruppen passt (Cuirolo

et al., 2009, Dordel *et al.*, 2014, Finan *et al.*, 2002). Der genaue Mechanismus, der zu erhöhter PBP2a-Produktion führt, ist bisher nicht bekannt. PBP2a ist zwar für eine hohe Antibiotika-Resistenz notwendig, aber nicht hinreichend. Die hier vorgelegten Ergebnisse bestätigen, dass die PBP2a-Produktion nicht mit der MHK korreliert (Chambers und Hackbarth, 1987, Parvez *et al.*, 2008, Shang *et al.*, 2010). Für eine hohe Methicillin-Resistenz spielen zusätzlich die Fem- („*factors essential for methicillin resistance*“ und aux („*auxiliary*“)-Faktoren, die Produktion einer β -Laktamase und die Stressantwort bei der Bildung einer HoR- aus einer HeR-Population eine Rolle (Kim *et al.*, 2013).

Es werden verschiedene plausible Mechanismen der Stressantwort diskutiert, die die Methicillin-Resistenz begünstigen: β -Laktam-Antibiotika induzieren die Produktion der DNA-Polymerase PolIV. PolIV führt vermehrt zu Basenaustauschen in Genen („*error-prone*“-Polymerase) und damit zu Mutationen mit resistenzvermittelnder Funktion. Gleichzeitig wird die Produktion von MutS (*Mismatch*-Detektions- und Reparaturprotein) durch die kleine RNA SdsR reprimiert. Dadurch werden weniger Punktmutationen durch MutS repariert (Gutierrez *et al.*, 2013). Cuirolo *et al.* konnten zeigen, dass durch Oxacillin die SOS-Antwort verstärkt wird. Dabei wird LexA aktiviert, wodurch die Expression von *umuC* induziert wird. UmuC ist wie die PolIV auch eine „*error-prone*“ Polymerase, deren Aktivität zu erhöhter Mutationsrate führt, wodurch die Selektion einer hoch-resistenten Population verstärkt wird (Cuirolo *et al.*, 2009). Insgesamt wurden Mutationen in 27 Genen beschrieben, die zur HoR beitragen (Dordel *et al.*, 2014). Da in den meisten Fällen bereits eine Mutation in den 27 Genen ausreicht, um eine HeR-Population in eine HoR-Population zu konvertieren, wird die Wahrscheinlichkeit zur Bildung einer HoR-Population erhöht. Durch den erhöhten Antibiotika-induzierten Stress treten außerdem metabolische Veränderungen ein, die zu erhöhter Aktivität des Zitratzyklus und zur Verminderung fermentativer Prozesse führen. Die Energieproduktion wird dabei auf die Zellwandsynthese/Metabolismus ausgerichtet, wodurch die Überlebenschance unter β -Laktam-Antibiotika erhöht wird (Keaton *et al.*, 2013). Untersuchungen einzelner Bakterienzellen ergaben außerdem, dass sich eine Bakterien-Kolonie, die auf Agarplatten mit Ceftriaxon (Cephalosporin) wächst, aus schnell und langsam wachsenden Bakterien zusammensetzt. Die langsam wachsenden Bakterien hydrolysieren Antibiotika, wodurch sich verbesserte Wachstumsbedingungen für die schnell wachsenden Bakterien ergeben (Wang *et al.*, 2014). Die hier genannten Aspekte tragen dazu bei, dass Bakterienpopulationen auch bei höheren Antibiotika-Konzentrationen überleben können.

4.1.3 Einfluss von Mec- und Bla-Regulatoren auf *blaZ*- und *mecA*-Expression

Die relative Hydrolyserate (rHyr) von Nitrocefin durch β -Laktamasen der MRSA-Referenzstämme wurde überprüft. Wie erwartet, konnte bei den vier *bla*-PCR negativen MRSA-Stämmen DM, SD, ND und KLN keine β -Laktamase-Aktivität nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung der *bla*-Region der MRSA-Stämme dieser Arbeit ergab, dass MRSA-RH, KG, WI, SP und GB eine β -Laktamase Typ A (plasmidal) besitzen. MRSA-BAR trägt eine β -Laktamase Typ B, die chromosomal lokalisiert ist. Das *blaZ*-Gen von MRSA-BER kodiert für eine β -Laktamase vom Typ C (plasmidal) (vgl. Tabelle 3.12, S. 117) (Rosdahl, 1985). *S. aureus* β -Laktamasen sind zum Teil über einen Lipidanker membrangebunden oder werden in die Umgebung freigesetzt. Da in dieser Arbeit die β -Laktamase-Aktivität von Flüssigkulturen gemessen wurde, wurde die GesamtrHyr für Nitrocefin durch die β -Laktamase für jeden MRSA-Stamm untersucht. Wie groß der Anteil an freier bzw. gebundener β -Laktamase ist, ist stammabhängig (Bruns und Keppeler, 1987). Für alle *blaZ*-positiven MRSA-Stämme konnte eine Hydrolyserate von Nitrocefin nachgewiesen werden, die in allen Stämmen durch Induktion mit Oxacillin (zum Teil nur schwach) gesteigert werden konnte. Bei Wachstum mit 100 ng/ml Oxacillin zeigten sich die deutlichsten Unterschiede zwischen den MRSA-Stämmen hinsichtlich der Nitrocefin-rHyr durch BlaZ. Die hier untersuchten MRSA-Stämme mit β -Laktamase vom Typ A zeigten die höchste Nitrocefin-rHyr. Diese Ergebnisse passen zu den Ergebnissen von Richmond *et al.*, der für β -Laktamasen vom Typ A im Vergleich zu β -Laktamasen vom Typ B und C die höchste Enzymaktivität gemessen hat (Richmond *et al.*, 1964). Die rHyr für Nitrocefin durch MRSA-BAR (β -Laktamase Typ B) und MRSA-BER (β -Laktamase Typ C) war deutlich niedrig. Im Fall des MRSA-BAR Stamms könnte die Ursache der niedrigen rHyr für Nitrocefin durch die chromosomale Lokalisation von *blaZ* und das Vorhandensein einer Genkopie bedingt sein. Von Plasmid-kodiertem *blaZ* liegen mehrere Plasmid-Kopien vor, was zu Erhöhung der β -Laktamase-Produktion führt. Darüber hinaus könnte die Mutation in der RNA-Polymerase-Bindestelle von *blaZ* der Typ B β -Laktamase von MRSA-BAR zusätzlich die Expression von *blaZ* herabsetzen (vgl. Tabelle 3.7, S. 76).

MRSA-RH und MRSA-SP (β -Laktamase Typ A) sind bis auf die letzten acht Aminosäuren des C-Terminus von BlaZ in ihrer *bla*-Region identisch. Aufgrund eines AS-Austauschs (Ser₂₂ → Pro) in unmittelbarer Nähe zur BlaZ-Signalpeptidase-Spaltungstelle (vgl. Abbildung 7.1, S. 174) kann die β -Laktamase von MRSA-RH und MRSA-SP laut einer Studie von East *et al.* nicht freigesetzt

werden, sondern bleibt zellgebunden (East *et al.*, 1990). Da in dieser Arbeit die Gesamt-rHyr von Nitrocefin gemessen wurde, ist trotz des AS-Austausches kein großer Unterschied in der Nitrocefin-rHyr von MRSA-SP im Vergleich zur rHyr von anderen Typ A β -Laktamasen zu erwarten. Die Nitrocefin-rHyr von MRSA-RH ist jedoch trotz hoher Sequenzhomologie des *blaZ*-Gens von MRSA-RH und MRSA-SP (insbesondere unter 100 ng/ml Oxacillin) deutlich schwächer als die von MRSA-SP. Da in MRSA-RH für das *blaZ*-Gen ein durch Punktmutation entstandenes Stopkodon fünf Kodons vor dem Stop-Kodon des Wildtyp *blaZ*-Gens nachgewiesen wurde, könnte diese Mutation die Ursache für die herabgesetzte die BlaZ-Aktivität sein. Plausibel wäre, dass durch die verkürzte Aminosäuresequenz von BlaZ die Teritätstruktur verändert ist, was die Enzymeffizienz herabsetzt. Die Vielzahl an unterschiedlichen Allotypen der *bla*-Region, die sich für die MRSA-Referenzstämme dieser Arbeit zeigt, ist auch für andere MRSA-Stämme beschrieben und lässt sich nicht auf eine bestimmte genetische Linie, SCCmec-Typ und/oder β -Laktam Resistenzphänotyp zurückführen (Milheiriço *et al.*, 2011) und spiegelt wahrscheinlich auch die hohe Mutationsrate in MRSA wider.

In bisherigen Studien wurde die Oxacillin-abhängige Transkription des *mecA*-Gens separat von der PBP2a-Produktion verschiedener Stämme untersucht (Rosato *et al.*, 2003; Niemeyer *et al.*, 1996; Parvez *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Stämme mit hoher *mecA*-Transkript-Konzentration auch große Mengen an PBP2a (Immunoblot) produzieren (siehe Abbildung 3.13, S. 84). Stämme mit geringerer Menge an *mecA*-mRNA zeigten eine schwache PBP2a-Bande. Daher kann angenommen werden, dass die Menge an PBP2a in direktem Zusammenhang mit der *mecA*-Transkriptionsrate steht und post-transkriptionelle Effekte keine Rolle spielen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Zusammenspiel aus *mec*- und/oder *bla*-Regulation die Produktion von *mecA*-Transkript bzw. PBP2a kontrolliert. Die in dieser Arbeit untersuchten MRSA-Stämme mit dem Genotyp *mec*^{*}/*bla*- (MRSA-DM, ND und SD) exprimierten konstitutiv viel *mecA*-mRNA bzw. produzierten relativ hohe Mengen PBP2a. Bei allen anderen Stämmen mit den Genotypen *mec*⁺/*bla*⁺, *mec*⁺/*bla*⁻ oder *mec*^{*}/*bla*⁺ (MRSA-RH, KLN, SP, WI, BAR, KG, BER und GB) fällt die Menge an *mecA*-Transkript und PBP2a niedrig aus, wenn keine antibiotikainduzierte Derepression vorliegt (Übersicht zur Genorganisation siehe Abbildung 3.8, S. 74). Dass nachweisbare Mengen an *mecA*-Transkript auch bei konstitutiver MecI/BlaI-Hemmung (ohne Oxacillin) in detektierbaren Mengen vorliegt, steht im Einklang mit publizierten Ergebnissen und hängt vermutlich damit zusammen, dass eine Repression durch MecI oder BlaI

DISKUSSION

unvollständig ist (Finan *et al.*, 2002, Noto *et al.*, 2008a). MRSA-RH, KLN, WI und GB enthalten neben den *mec*-Genen *mecA*, *mecI* und *mecR1* zusätzlich ein *mecR2*-Gen, dessen Genprodukt MecR2 die unvollständige Induktion der *mecA*-Expression durch MecR1 kompensiert (Arede *et al.*, 2012). Da keine Stämme mit funktionaler *mec*-Kassette ohne *mecR2*-Gen vorliegen, ist ein Vergleich des direkten Einfluss von MecR2 nicht möglich. Bei MRSA-WI und GB liegt das *mecR2*-Gen ebenfalls vor. Durch eine Mutation im *mecI*-Gen, ist das *mecA*-Gen aber ohnehin dereprimiert, so dass MecR2 keinen direkten Einfluss nehmen kann. Bei HeR-Stämmen besteht die plausible Möglichkeit, dass nur ein Bruchteil der Staphylokokken PBP2a produziert und damit entsprechend nur geringe Mengen *mecA*-Transkript bzw. PBP2a nachweisbar sind. Jedoch ist die nachgewiesene Menge von *mecA*-Transkript bzw. PBP2a bei HeR- (z.B. MRSA-SP) nicht signifikant unterschiedlich zu der von HoR-Stämmen (z.B. MRSA-WI). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass für die Oxacillin-MHK neben PBP2a noch andere Faktoren eine Rolle spielen.

Wie kürzlich beschrieben, besteht bei MRSA-Stämmen vom Genotyp *mec+/bla+* die Möglichkeit, dass sich MecI::BlaI-Heterodimere bilden, die ineffizienter als ihre jeweiligen Homodimere die Transkription von *mecA* hemmen (Arede *et al.*, 2013). Dies würde bedeuten, dass Stämme mit dem Genotyp *mec+/bla+* die *mecA*-Expression insgesamt weniger effizient reprimieren, als wenn lediglich Mec- oder Bla-Regulatoren vorliegen, da sich zu einem bestimmtem Prozentsatz immer Heterodimer bilden würden. Zieht man außerdem in Betracht, dass MecI die Expression des *mecA*-Gens effizienter hemmt als BlaI und dass die Aufhebung dieser Hemmung durch MecR1 wesentlich länger dauert als durch BlaR1 (McKinney *et al.*, 2001), würde dies bedeuten, dass eine Regulation durch Bla-Regulatoren für die Bakterien der bestmögliche Regulationsmechanismus für die Expression von *mecA* ist. Zu dieser Hypothese passen die Ergebnisse des MRSA-Stamms KLN, dem einzigen Stamm mit dem Genotyp *mec+/ Δ bla*. Aufgrund der Repression durch MecI reichen 10 ng/ml Oxacillin noch nicht aus, um eine Expression von *mecA*/PBP2a-Produktion zu induzieren. Erst durch 100 ng/ml Oxacillin kann die MecI-vermittelte Repression von *mecA* aufgehoben werden. Bisher ist nicht bekannt, ob der Verlust von *mec*- und *bla*-Regulatoren in untersuchten Stämmen mit SCCmec-Typ I von Vor- oder Nachteil für das Überleben bzw. Vermehrung unter Oxacillin ist. Die weite Verbreitung der Deletion des *mecI*-Gens kann für MRSA-Stämme unter Krankenhausbedingungen als vorteilhaft angesehen werden, um eine hohe *mecA*-Expression (Derepression) gewährleisten zu können, bzw. um sofort auf Antibiotika reagieren zu können (Kobayashi *et al.*, 1999, Sharma *et al.*, 1998, Weller,

1999). Unter antibiotikafreien Bedingungen könnte die konstitutive PBP2a-Produktion als Nachteil gewertet werden, die sich laut Lee *et al.* im verlangsamten Wachstum der Stämme mit SCCmec-Typ I im Vergleich zu Stämmen mit anderen SCCmec-Typen zeigt, auf denen Mec-Regulatoren kodiert sind (Lee *et al.*, 2007).

4.1.4 Anreicherung von MRSA für den MRSA-Schnellnachweis

Das grundsätzliche Konzept für einen PBP2a-basierten MRSA-Schnellnachweis ist eine schnelle Identifizierung von MRSA-Trägern mit hoher Sensitivität und hoher Spezifität. Für eine hohe Sensitivität wurden die optimalen Bedingungen zur *mecA*-Expression für MRSA-Referenzstämme untersucht. Um mit hoher Spezifität MRSA anzureichern, wurden Sa-Beads (Streptavidin-Kügelchen, an die ein *S. aureus* spezifisches Phagenprotein gekoppelt wurde, das spezifisch an Wandteichonsäuren von *S. aureus* bindet) verwendet. Da die Sa-Beads magnetisch sind, können diese nach Bindung von *S. aureus* durch Anlegen eines Magnetfelds von der Abstrichprobensuspension getrennt werden (vgl. Abbildung 3.1, S. 61). Um PBP2a aus Patientenabstrichen nachweisen zu können, ist insbesondere die Abtrennung von *S. epidermidis* von großer Bedeutung, da Methicillin-resistente *S. epidermidis* auch PBP2a bilden können (Chambers, 1987). Wie die Ergebnisse in Abschnitt 3.1.1, S. 60 zeigen, eignen sich Sa-Beads für eine spezifische und effektive Anreicherung aller MRSA-Referenzstämme. Die Untersuchungen zeigten, dass *S. epidermidis* in vernachlässigbaren Mengen an die Sa-Beads bindet. Auch in Mischkulturen, die neben *S. aureus* Bakterienarten verschiedener Gattungen (*Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*) enthielten, die typischerweise in Nasenabstrichen gefunden werden (4×10^3 cfu/ml), war eine Anreicherung von *S. aureus* sehr gut möglich. Die Verwendung der Sa-Beads ermöglichte eine ausreichende Trennung von *S. aureus* von *S. epidermidis*. Untersuchungen von Idelevich *et al.* belegten zeitgleich, dass das an Streptavidin-Beads gekoppelte Bakteriophagenprotein phiSLT (*S. aureus* Wandteichonsäuren-Erkennungsprotein) zur Selektion von *S. aureus* aus Mischkulturen mit Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) genutzt werden kann (Idelevich *et al.*, 2014).

4.1.5 Optimierung der Wachstumsbedingungen

Für MRSA-Schnellnachweistests ist neben der Spezifität auch eine hohe Sensitivität wichtig. Deshalb wurden Bedingungen geschaffen, unter denen alle MRSA-Referenzstämme bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu/ml (typische MRSA-Zellzahl pro Nasenabstrich) optimal kultiviert werden können (schnelle Vermehrung, hohe PBP2a-Produktion). Um dies zu erreichen, wurde Bakterienwachstum in LB-Medium (nach Miller) und BHI untersucht. Da die MRSA-Stämme in LB-Medium schnelleres Wachstum als in BHI zeigten, wurde die Kultivierung der MRSA-Stämme in LB-Medium gewählt. Eine Supplementierung des Mediums mit verschiedenen Eisen- und Zuckerquellen konnte die Wachstumsrate in LB-Medium nicht weiter steigern (Generationszeit von ca. 30-40 Min). Möglicherweise wird der Ertrag des Metabolismus durch Sauerstoff limitiert, so dass die Zugabe von Eisen- bzw. Zuckerquellen keinen ausschlaggebenden Effekt auf die Aktivität des Zitronensäurezyklus nehmen kann (Ledala *et al.*, 2014).

4.1.6 Induktion von PBP2a durch erhöhte Osmolarität des Wachstumsmediums

Bereits 1987 wurde berichtet, dass NaCl-Konzentrationen des Mediums zwischen 344 mM (*w/v*) (entspricht 2 %) und 862 mM (*w/v*) (entspricht 5 %) die Resistenz von MRSA-Stämmen zwar fördert, jedoch nicht die PBP2a-Produktion steigert (Chambers und Hackbarth, 1987). Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen, die besagen, dass NaCl die PBP2a-Produktion stimuliert (Madiraju *et al.*, 1987). Aufgrund dieser widersprüchlichen Aussagen und zusammen mit der Erfahrung, dass sich heteroresistente MRSA besser mit erhöhter Osmolarität detektieren lassen (Cunha, 2005), wurde der Effekt der erhöhten NaCl-Konzentration im Wachstumsmedium auf die PBP2a-Produktion untersucht. In den beiden erwähnten Veröffentlichungen wurde mit Inokula von 1×10^5 - 1×10^7 cfu/ml gearbeitet (Chambers und Hackbarth, 1987, Madiraju *et al.*, 1987). Da für Nasenabstriche Zellzahlen um 5×10^2 cfu/ml üblich sind, wurde die mögliche PBP2a-Induktion durch NaCl mit diesem Inokulum und mit einem Inokulum, der beiden oben genannten Studien (Chambers und Hackbarth, 1987, Madiraju *et al.*, 1987) entsprechend von 1×10^6 cfu/ml untersucht. Es zeigte sich, dass sich bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu/ml durch NaCl-Konzentrationen bis zu 688 mM NaCl (*w/v*) (entspricht 4 %) keine Steigerung der PBP2a Menge im Immunoblot nachweisen lässt. Bei einer Konzentration von 1,03 M (*w/v*) (entspricht 6 %) nahm die Menge an insgesamt gebildetem PBP2a sogar wieder ab. Die Ursache könnte auf ein

vermindertes Zellwachstum von MRSA-RH zurückführen sein. Im Gegensatz dazu steht eine Studie von 1996, die belegt, dass NaCl-Konzentrationen bis zu 6 % keine inhibierende Wirkung auf die Vermehrung von *S. aureus* haben (Thomas und Wimpenny, 1996). Anscheinend spielen stammabhängige Unterschiede beim Wachstum unter hoher Osmolarität eine Rolle. Bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^6 cfu/ml konnten durch 344 mM (w/v) (entspricht 2 %) und 688 mM NaCl (w/v) (entspricht 4 %) höhere PBP2a Mengen als ohne, bzw. durch 172 mM (w/v) (entspricht 1 %) oder 1,03 M (w/v) NaCl (entspricht 6 %) nachgewiesen werden. Die Unterschiede in der PBP2a-Produktion bei unterschiedlich hoher Osmolarität des Wachstumsmediums für verschiedene Ausgangszellzahlen (5×10^2 cfu/ml und 1×10^6 cfu/ml) könnten in der Heterogenität einer MRSA-Population liegen. Möglicherweise enthält eine Bakterienpopulation mit 5×10^2 Bakterien nur wenige oder keine Bakterien, deren PBP2a-Produktion durch Osmolarität induziert wird. In einer Bakterienpopulation von 1×10^6 cfu sollten statistisch betrachtet mehr Bakterien mit der Fähigkeit vorhanden sein, deren PBP2a-Produktion durch hohe Osmolarität ansteigt. Eine heterogene Merkmalsausprägung innerhalb einer Population ist auch in der Literatur beschrieben (Cuirolo *et al.*, 2009).

4.1.7 Verbesserung der Sensitivität von PBP2a-Immunoblots

Im nächsten Schritt wurde versucht die Sensitivität des Immunotests für PBP2a zu erhöhen. Dazu wurde PRF-119 (Hyglos, Bernried) eingesetzt, ein rekombinantes, chimäres Endolysin, das Peptidoglykan-Verknüpfungen spaltet (Idelevich *et al.*, 2011). Durch Spaltung des Peptidoglykans im Bereich des in die Zellwand eingebetteten PBP2a, konnte PBP2a soweit freigelegt werden, dass es für den Antikörper zur Detektion besser zugänglich war. Am meisten PBP2a konnte nach 60 Min Inkubation mit 23 µg/ml bzw. 230 µg/ml PRF-119 oder 5 Min mit 230 µg/ml PRF-119 nachgewiesen werden.

Wie im Immunoblot (durch Chemilumineszenz) gezeigt wurde, liegt die Nachweisgrenze mit dem PBP2a-Antikörper bei 1 ng PBP2a (78 kDa) pro Bande (Abbildung 3.7, S. 70), was einer PBP2a-Molekülanzahl von ca. 1×10^{10} entspricht. Bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu lag die Zellzahl der MRSA-Referenzstämme nach 7 h Inkubation in 1 ml LB-Kulturvolumen Medium zwischen 5×10^5 cfu/ml auf 2×10^7 cfu. Demnach müssten die Staphylokokken für einen PBP2a-basierten Nachweis nach 7 h zwischen 1×10^3 und 5×10^4 PBP2a-Moleküle pro Zelle produzieren.

DISKUSSION

Um PBP2a ausgehend von einer MRSA-Zellzahl von 5×10^2 cfu/ml durch Immunoblot nachweisen zu können, war eine Inkubation von 7 h in LB-Medium bei 37 °C für zehn der elf getesteten MRSA-Stämme ausreichend. Selbst der langsam wachsende MRSA-Stamm ND, der nach 7 h nur eine Zellzahl von ca. 5×10^5 cfu/ml erreicht, bildet ausreichend PBP2a, um es im Immunoblot nachweisen zu können. Die hohe PBP2a-Produktion basiert wahrscheinlich darauf, dass MRSA-ND vom Genotyp *mec*/bla-* ist, d. h. dass das *mecI*- und das *mecRI*-Gen defekt sind. PBP2a wird deshalb konstitutiv produziert (vgl. Abbildung 3.13, S. 84). Im Fall von MRSA-KG (moderates Zellwachstum; Genotyp: *mec*/bla+*) konnte unter nicht-induzierten Bedingungen kein PBP2a nachgewiesen werden. Für den MRSA-Schnellnachweistest dieses Stamms war zusätzlich zur Kultivierung in LB-Medium für 7 h eine Induktion mit 10 ng/ml Oxacillin oder eine zusätzliche Inkubation (37 °C, 5 Min) des Bakteriensediments in einer 230 µg/ml PRF-119-Lösung notwendig. Die Ergebnisse zeigten, dass die PBP2a-Produktion pro Bakterienzelle unter den MRSA-Stämmen stark variiert. Für einen PBP2a-basierten Nachweis aller MRSA-Stämme mittels Immunoblot waren $2 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ cfu nötig. Bei einer Ausgangszellzahl von 5×10^2 cfu könnten nach ca. 5 h Inkubation in LB-Medium bei 37 °C zwei (18 %) der elf getesteten MRSA-Stämme im PBP2a-Schnellnachweistest nachgewiesen werden. Nach ca. 6 h Inkubation würden sich fünf (45 %) der elf MRSA-Stämme anhand der PBP2a-Produktion detektieren lassen. Erst nach 7 h Inkubation wird von allen elf MRSA-Stämmen genügend PBP2a produziert, um es mittels Immunoblot nachzuweisen.

Bisher wird MRSA entweder durch *mecA*-spezifische PCR oder in kulturellen Nachweisverfahren nachgewiesen. Der Vorteil von PCR-basierten Nachweisverfahren ist die hohe Sensitivität (Nachweisgrenze 100 bis 200 Zielorganismen pro Untersuchungsmaterial, RKI) und ein schnelles Testergebnis. Nachteil ist der hohe Kostenfaktor. *mecA*-positive PCR-Nachweise können jedoch auch falsch-positiv sein (*mecA*-positive Antibiotika-sensitive Staphylokokken, die kein PBP2a produzieren (siehe auch Abschnitt 4.2)) und bedürfen daher weiterhin der kulturellen Bestätigung (Sturenburg, 2009). Bei PBP2a-basierten Nachweistests (z.B. PBP2a-Latex-Agglutinationstest) wären falsch-positive Testergebnisse wesentlich unwahrscheinlicher. Beim PBP2a-Latex-Agglutinationstest (Beschichtung mit PBP2a-Antikörpern) werden *S. aureus* Kolonien mit einer Latex-Partikel-Suspension resuspendiert. Verklumpung steht für ein MRSA-positives Testergebnis (Weist *et al.*, 2006). Der Test setzt jedoch eine vorausgegangene Kultivierung von MRSA aus dem Patientenabstrich voraus, wodurch bis zum definitiven

DISKUSSION

Testergebnis meist ein bis zwei Tage vergehen. Bei dem in dieser Arbeit beschriebenen PBP2a-Nachweis mittels Immunotest ist die geringe Sensitivität ein großer Nachteil (Mindestanzahl 500 Bakterien). Der Vorteil ist hingegen das vergleichsweise schnelle Testergebnis nach 7 h, die hohe Spezifität und die kostengünstige Durchführung. Zudem könnten aufgrund der Anzucht der MRSA im Anschluss an den MRSA-Schnellnachweis weitere mikrobiologische Diagnostikverfahren (z. B. Antibiogramme) durchgeführt werden. Durch verbesserte Technologie des Immunotests ließe sich die Sensitivität erhöhen und damit die Anwendbarkeit in der Routineuntersuchung verbessern.

4.2 Genetischer Ursache von *mecA* PCR-positiven, Oxacillin-sensitiven Staphylokokken

Über das Auftreten von konstitutiv Oxacillin-sensitiven, *mecA* positiven *S. aureus* (OS-MRSA) wird schon seit mehreren Jahren berichtet. In einer Studie zwischen 1995 und 1996 wurde festgestellt, dass sieben von 447 Personen (1,5 %), die in der medizinischen Versorgung in drei deutschen Krankenhäusern arbeiteten, OS-MRSA Träger sind und als Reservoir für „ruhende MRSA“ in Frage kommen (Kampf *et al.*, 2003). Auch in Griechenland, Japan, Taiwan, Indien und den USA konnten OS-MRSA aus Krankenhäusern isoliert werden (Chen *et al.*, 2009, Forbes *et al.*, 2008, Hososaka *et al.*, 2007, Kumar *et al.*, 2013, Petinaki *et al.*, 2002). Ein Problem ist die Detektion von OS-MRSA, die entscheidend für die Behandlung der Patienten ist (Kumar *et al.*, 2013). Im Hinblick auf die Präsenz von *mecA* trotz Sensitivität gegenüber Oxacillin stellt sich die Frage inwieweit *mecA* bzw. PBP2a an der Antibiotika-Resistenz beteiligt sind (Pournaras *et al.*, 2013). Es gibt eine Vielzahl an Faktoren die einen Einfluss auf die Antibiotika-Resistenz haben, jedoch gilt bisher *mecA* als notwendiger, aber nicht hinreichender Faktor für Oxacillin-Resistenz (Berger-Bächi und Rohrer, 2002).

Die meisten Studien berichten lediglich vom Auftreten und der Häufigkeit von OS-MRSA ohne Ergebnisse der Sequenzierung der relevanten Gene *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaI* und *blaR1*. Da die Sequenzierung jedoch Aufschluss über den Hintergrund der Oxacillin-Sensitivität trotz vorhandenem *mecA*-Gen geben könnte, wurde in dieser Arbeit die *mec*- und *bla*-Region eines OS-MRSA, der von einer älteren Patientin aus dem Universitätsklinikum München 2013 isoliert wurde, untersucht. Für diesen OS-MRSA-Stamm (GH-B13_35223) konnte keine β -Laktamase detektiert werden. Die SCCmec-Kassette konnte Typ III zugeordnet werden. Wie für den SCCmec-Typ III bekannt, sind neben *mecA* auch Gene für *mecR1*, *mecI* und *mecR2* vorhanden. Das *mecA*-Gen, das unter MRSA-Stämmen für gewöhnlich stark konserviert ist (Archer *et al.*, 1994, Reynolds und Fuller, 1986), ist beim untersuchten OS-MRSA-Stamm am 5'-Ende um 11 Kodons deletiert, was die Deletion des Start-Kodons und die partielle Deletion des Sec-abhängigen Signalpeptids und des Transmembranankers miteinschließt (vgl. Abbildung 3.16, S. 87). Folglich kann kein *mecA* transkribiert werden. Aufgrund dessen fiel der PBP2a-Test wie erwartet negativ aus. Da nur 11 von 669 Kodons deletiert sind, fielen jede PCR mit Primern, die nicht genau in dem deletierten Bereich

liegen, positiv aus. Eine PCR mit einem Primerpaar, die das Start-Kodon miteinschließt, könnten (in diesem Fall) ein falsch-positives Testergebnis verhindern.

Auch im *mecI*-Gen des OS-MRSA-Stamms liegt eine Mutation im Stop-Kodon (TAA → GAA) vor, wodurch die Transkription fortgeführt wird, bis die Polymerase 27 bp später auf ein weiteres Stop-Kodon trifft. Da keine Expression des *mecA*-Gens aufgrund der beschriebenen Mutation möglich ist, spielt die Mutation im *mecI*-Gen nur eine untergeordnete Rolle. Die Mutation des *mecA*- und *mecI*-Gens kann jedoch als Zeichen für eine hohe Mutationsrate unter Krankenhaus-Stämmen gesehen werden. Die Ursache für eine erhöhte Mutationsrate unter Antibiotikadruck ist zum einen die erhöhte Produktion der Polymerase IV, die für häufige DNA-Basenaustausche verantwortlich ist. Zudem wird die Produktion von MutS verringert, wodurch weniger DNA-Reparatur stattfindet (Gutierrez *et al.*, 2013).

Die Entwicklung von Stämmen ohne phänotypische Antibiotikaresistenz trotz *mecA*-Gen könnten Übergangsformen auf dem Weg zu vollständigen Verlust der Resistenzgene sein. Dies wäre plausibel, da Studien zeigen konnten, dass eine SCCmec-Kassette bzw. das *mecA*-Gen die "Fitness" der Bakterien reduziert (Ender *et al.*, 2004, Katayama *et al.*, 2003). Entsprechend sind PBP2a-exprimierende Bakterien bei fehlendem Oxacillin-Selektionsdruck benachteiligt, weshalb Mutationen, die die Expression von *mecA* und damit die PBP2a-Produktion verhindern, in manchen Stämmen, erhalten bleiben (Noto *et al.*, 2008b). Denkbar wäre demnach, dass OS-MRSA ursprünglich von MRSA-Stämmen aus dem Krankenhaus abstammen, die sich später in einer Umgebung ohne Antibiotikadruck verbreitet haben.

4.3 Exoprotein-Untersuchungen von MRSA-Referenzstämmen

SERAM-Proteine tragen einen erheblichen Teil zur Virulenz von *S. aureus* bei. Um die Produktion der verschiedenen MRSA-Stämme und *S. aureus* Newman (als Referenzstamm) genauer zu charakterisieren, wurden Versuche sowohl in Flüssigkultur, als auch in dem Gewebe-Surrogat-Modell des 3D-Kollagengels (auch für MSSA-klinische Isolate) durchgeführt. Zum spezifischen Nachweis der SERAM-Proteine vWbp, Coa, Emp und Efb wurden die murinen monoklonalen Antikörper (mab) mab-vWbp, mab-Coa, mab-Emp und mab-Efb verwendet (Veit, medizinische Doktorarbeit). Diese wurden zunächst zum Nachweis der vier SERAM-Proteine aus dem Überstand von Flüssigkulturen verwendet. Dazu wurden Zellüberstands-Proteine der MRSA-Referenzstämmen aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase gewonnen und in denaturierter Form (SDS-PAGE) mittels Immunoblot detektiert. Dadurch können sowohl vollständige, als auch degradierte/verkürzte Proteine nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie die Verteilung der Proteine im fixierten Zustand in Mikrokolonien im 3D-CoG untersucht. Zusätzlich wurde die Anfärbbarkeit durch Antikörper (anti-Sau) und der Vitalitätsgrad von Mikrokolonien im 3D-CoG geprüft.

4.3.1 SDS-PAGE und Immunoblot-Exoprotein-Muster von MRSA-Stämmen

Durch Genomsequenzierungen von *S. aureus* Stämmen konnte eine hohe genetische Variabilität für *S. aureus* Stämme nachgewiesen werden. Der Vergleich von Genomsequenzen von 13 *S. aureus* Stämmen unterschiedlichen Ursprungs zeigte, dass eine Diversität von bis zu 20 % vorliegen kann (Baba *et al.*, 2008, Lindsay und Holden, 2006). Diese Variabilität bezieht sich größtenteils auf Gene, die für Oberflächen-assoziierte- (SERAMS) und Zellwand-verankerte Adhäsionsproteine (MSCRAMMs) kodieren (Holtfreter *et al.*, 2007, Lindsay und Holden, 2006). Die Expression der Gene von SERAM- und MSCRAMM-Proteinen wird durch mehrere Regulatorsysteme (u.a. *agr*, *sigB*, *saeRS*) kontrolliert. Das Zwei-Komponenten-System *saeRS* nimmt dabei eine zentrale Rolle ein (vgl. Abschnitt 1.3.3, S. 6). SaeR ist ein Regulatorprotein und SaeS eine Histidinkinase. SaeR wird durch Übertragung einer Phosphatgruppe durch SaeS aktiviert. Im aktiven Zustand steuert SaeR die Expression der Zielgene wie *hla* (α -Hämolyisin), die Gene der SERAM-Proteine *efb* (extrazelluläres Fibrinogen bindendes Protein), *coa* (Koagulase) und *eap* (extrazelluläres Adhärenzprotein), sowie des MSCRAMMs *fnbA* (Fibronectin-bindendes Protein) (Abbildung 1.1,

S. 7). Da das *saeRS*-System hauptsächlich am Anfang der exponentiellen Phase aktiv ist, werden SERAM- und MSCRAMM-Proteinen insbesondere in der exponentiellen Phase gebildet (Mainiero *et al.*, 2010, Rogasch *et al.*, 2006). Eine Reduktion von SERAM-Protein-Produktion in den stationären Phase hängt damit zusammen, dass bei steigender Bakterienzahl das *agr-Quorum sensing* System aktiviert wird, dass durch RNAIII zur Inhibierung der Transkription von Oberflächenproteinen und zur Aktivierung der Sekretion und Freisetzung von Exotoxinen führt (Cheung *et al.*, 2011, George und Muir, 2007) (vgl. Abbildung 1.2, S. 8).

Die in den Kulturüberstand freigesetzten SERAM-Proteine von Stamm Newman und der elf MRSA-Referenzstämme wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblot charakterisiert. Das Exoprotein-Muster der MRSA-Stämme im Vergleich zum Exoprotein-Muster von MSSA Newman weniger stark ausgeprägt. Eine Ursache könnte eine Punktmutation im *saeS*-Gen sein, die 2009 für *S. aureus* Newman beschrieben wurde (Schäfer *et al.*, 2009). Diese Punktmutation führt zum Aminosäureaustausch an Position 18 von Leucin zu Prolin im SaeS, wodurch die Kinase-Aktivität erhöht wird, was wiederum eine vermehrte Phosphorylierung des Regulatorproteins SaeR zur Folge hat, wodurch die Transkription der Zielgene vermehrt gefördert wird (Mainiero *et al.*, 2010, West und Stock, 2001). Da bei allen hier untersuchten MRSA-Referenzstämmen die Wildtyp-Gensequenz von *saeS* identifiziert werden konnte, können die vergleichsweise großen Mengen an sekretierter Koagulase und Sbi bei *S. aureus* Newman sehr wahrscheinlich auf diese Punktmutation zurückgeführt werden (Mainiero *et al.*, 2010). Die auffallend intensive Proteinbande bei einer Größe von 120 kDa in der SDS-PAGE für Kulturüberstands-Proteine (Abbildung 3.17, S. 89), die nur bei *S. aureus* Newman auftritt, konnte durch Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) als Fibronectin-bindendes Protein (FnBPA) identifiziert werden. FnBPA ist als MSCRAMM normalerweise am Peptidoglykan gebunden, vermittelt Adhäsion an Fibronectin und spielt vermutlich bei der Interaktion mit Wirtszellen durch Bindung an den Integrinrezeptor $\alpha 5\beta 1$ eine Rolle. Aufgrund einer Punktmutation im *fnbpA*_{Newman}-Gen, die zum vorzeitigen Stop-Kodon führt, besteht FnBP_{Newman} nur noch aus 742 Aminosäuren anstatt 966 Aminosäuren. Die Folge ist das Fehlen des Sortase Motivs LPXTG, weshalb FnBPA in den Überstand freigesetzt wird und nicht an der Zellwand stabil gebunden bleibt (Grundmeier *et al.*, 2004). Im Exoprotein-Profil der MRSA-Stämme ist keine FnBPA-Bande erkennbar, was dafür spricht, dass die Stämme das Wildtyp FnBPA produzieren, dass aufgrund der Zellwandverankerung nicht im Überstand zu finden ist. Signalpeptide dienen nicht nur zur

Sekretion von Proteinen, sondern bestimmen auch die Endlokalisation von Proteinen. Proteine mit einem YSIRK/GS-Motiv (z.B. ClfA, Protein A und FnBPA) im Signalpeptid werden beispielsweise ringförmig an der Zellteilungsgrenzschicht sekretiert. Proteine ohne ein solches Motiv (*S. aureus* surface protein (Sas) A, SasD, SasF und SasK) werden an den Zellpolen (am Ort der Entstehung einer Tochterzelle) sekretiert (Carlsson *et al.*, 2006, DeDent *et al.*, 2008, Schneewind und Missiakas, 2012). Insgesamt erscheint das Exoprotein-Profil der MRSA-Stämme einheitlich, lediglich MRSA-BAR sekretiert ein Protein, das weder einem bekannten Exoprotein der MRSA-Stämme, noch einem von *S. aureus* Newman zugewiesen werden konnte. LC-MS/MS-Analyse ergab, dass es sich vermutlich um ein Zellwand-verankertes Vorläuferprotein (CAG44197.1) handelt, das bisher nicht näher charakterisiert wurde. Als Zellwand-verankertes Protein ist ein Nachweis im Überstand nicht zu erwarten. Ein Sec-abhängiges Signalpeptid (PREDTAT) konnte für dieses Protein identifiziert werden. Im Fall von MRSA-BAR könnte es sein, dass die Signalsequenz zur Verankerung (z.B. das Lipobox- oder das LPXTG-Motiv) mutiert ist und das Protein deshalb nicht durch einen Lipid-Anker in der Plasmamembran bzw. Sortase-vermittelt in der Zellwand verankert ist (Hutchings *et al.*, 2009), sondern in den Kulturüberstand freigesetzt wird. Eine funktionelle Analyse würde helfen die Bedeutung dieses Proteins bzgl. seiner Virulenz zu klären.

Für die detaillierte Analyse der SERAM-Proteine standen monoklonale Antikörper gegen Coa (72 kDa), vWbp (66 kDa), Emp (38 kDa) und Efb (19 kDa) (mab-Coa, mab-vWbp, mab-Emp und mab-Efb) zur Verfügung. Wie bereits die Exoprotein-SDS-Auftrennung vermuten ließ, lässt sich auch im Immunoblot Coa deutlich für *S. aureus* Newman nachweisen. Für die MRSA-Stämme lag die Menge an exprimierter Koagulase in der exponentiellen Phase wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze, ließ sich jedoch für einige Stämme in der stationären Phase nachweisen (Übersicht siehe Tabelle 3.11, S. 116). Auch die drei weiteren SERAM-Proteine, Emp, vWbp und Efb konnten im *S. aureus* Newman Stamm bereits in der exponentiellen Phase deutlich detektiert werden, während für die MRSA-Stämme, sowohl in der exponentiellen, als auch in der stationären Phase kein vWbp detektierbar war. Wahrscheinlich bleibt der Großteil von Coa, vWbp, Emp und Efb bei den MRSA-Stämmen über nicht-kovalente Bindungen an der Zellwand der Staphylokokken gebunden, so dass nicht genug Protein im Überstand vorliegt, um es im Immunoblot nachzuweisen. Für Emp und Efb konnten im Vergleich zu *S. aureus* Newman zumindest geringe Proteinmengen in beiden Wachstumsphasen für die meisten Stämme

nachgewiesen werden. Eine Bande bei ca. 50 kDa, wird bei Immunoblots mit allen vier Antikörpern (mab-Coa, mab-vWbp, mab-Emp und mab-Efb) detektiert. Die Analyse der Bande mittels LC-MS/MS ergab, dass es sich um ein kationisches Protein handeln könnte, das wahrscheinlich vom Gen ADC36907.1 von *S. aureus* kodiert wird. Allerdings ist dieses Protein mit ca. 71 kDa deutlich größer als die detektierte Proteinbande bei ca. 50 kDa, so dass eventuell nur ein Bruchstück des degradierten Proteins vorliegt. Zudem liegt Protein A mit 42 kDa etwa im Bereich der unspezifischen Proteinbande. Allerdings ist Protein A über ein LPXTG-Motiv im Peptidoglykan der Zellwand verankert und demnach nicht im Überstand zu erwarten. Kürzlich konnte hingegen gezeigt werden, dass Protein A durch eine endogene Murein-Hydrolase (LytN) freigesetzt werden kann. Dabei bleibt es mit Peptidoglykan-Fragmenten (L-Ala-D-Gln-(Gly₃)L-Lys-D-Ala-Gly₄ bzw. L-Ala-D-Gln-(Gly₅)L-Lys-D-Ala-Ala) verbunden (Becker *et al.*, 2014b). Dies könnte auch erklären, warum die unspezifische Proteinbande auf einer Höhe von ca. 50 kDa liegt und nicht wie zu erwarten bei 42 kDa.

4.3.2 Wachstumsverhalten von MRSA-Stämmen im 3D-CoG und 3D-CoG/F

Im 3D-CoG wachsen die MRSA-Referenzstämme und *S. aureus* Newman ähnlich: Nach 4 h liegen die Staphylokokken noch als kleine (2-20 µm), unregelmäßige Bakterienaggregate vor, die nach 7 h zu größeren (5-35 µm), unregelmäßigen Bakterienaggregaten anwachsen. Nach 16 h bilden alle Stämme große (65-136 µm), z. T. symmetrische, relativ dicht gepackte Mikrokolonien, die von kleineren Satellitenkolonien umgeben sind. Unabhängig von Zeitpunkt, Größe und Dichte der Bakterianhäufungen wird keine Pseudokapsel oder MAM gebildet, da diese Strukturen fibrinogenabhängig sind (Guggenberger *et al.*, 2012). Diese Satellitenkoloniebildung im 3D-CoG ist wahrscheinlich auf die Auflösung (Dispersion) einiger Mikrokolonien mit nachfolgender Satellitenbildung zurückzuführen, was auch von Biofilmen bekannt ist. Sobald sich ein ausgereifter Biofilm entwickelt hat, lösen sich die Bakterien aus dem Biofilm, um weitere Oberflächen zu besiedeln (de la Fuente-Nunez *et al.*, 2013).

Eine charakteristische Eigenschaft von *S. aureus* ist die Fähigkeit Prothrombin in aktives Thrombin durch Coa oder vWbp umzuwandeln. Das aktive Thrombin (Serin-Protease) wandelt Fibrinogen in Fibrin bzw. Fibrinnetze um (Friedrich *et al.*, 2003, Kroh *et al.*, 2009).

Die Übersichtung der 3D-CoG mit Fibrinogen und Prothrombin (3D-CoG/F) hatte erhebliche Auswirkungen auf die Mikrokolonie-Morphologie der untersuchten Stämme. Der Durchmesser der

Mikrokolonien von MRSA-Stämmen im 3D-CoG im Vergleich zu solchen im 3D-CoG/F war vergleichbar. Im 3D-CoG/F lag der Mikrokolonie-Durchmesser nach 4 h bei ca. 10 µm, nach 7 h bei 9-32 µm und nach 16 h bei 45-165 µm. Die Struktur der Mikrokolonien war deutlich kompakter als im 3D-CoG. Für Wachstum im 3D-CoG/F wurde für *S. aureus* Newman nach 16 h kürzlich gezeigt, dass dieser symmetrisch kugelig geformte Mikrokolonien bildet, die von zwei konzentrischen Strukturen, der Pseudokapsel und der MAM (koronaartiges Fibrinnetz) umgeben sind (Guggenberger *et al.*, 2012). Interessanterweise wird die Pseudokapsel von *S. aureus* Newman bereits nach 4 h gebildet, während es bis zur Ausbildung der MAM bis zu 7 h dauert. Diese Pseudokapsel- bzw. MAM-Bildung ist Prothrombin- und Coa- bzw. Prothrombin- und vWbp-abhängig (Guggenberger *et al.*, 2012). Bei den in dieser Arbeit getesteten zehn MRSA-Stämmen konnte nur bei zwei Stämmen (MRSA-WI und GB) MAM-Bildung nachgewiesen werden. Auch im Kulturüberstand konnte für diese MRSA-Stämme kein vWbp nachgewiesen werden. Im Fall von MRSA-WI und GB wird vWbp in Flüssigkultur entweder nicht vollständig freigesetzt, so dass es sich im Kulturüberstand nicht nachweisen lässt oder die Wachstumsbedingungen führen im 3D-CoG/F zur vWbp-Bildung, nicht aber in Flüssigkultur. MRSA-WI und GB unterscheiden sich hinsichtlich der MAM-Bildung vom *S. aureus* Newman: Im Fall von MRSA-GB ist erst nach 16 h eine MAM nachweisbar und im Fall von MRSA-WI ist die MAM-Bildung zwar bereits nach 7 h vorhanden, ist aber nach 16 h nicht mehr nachweisbar. Die MAM könnte entweder abgebaut worden sein oder die MAM ist auch nach 16 h noch vorhanden, kann aber nicht mehr detektiert werden, da diese von Staphylokokken überwachsen wurde, die keine MAM bilden. Allel-abhängige Unterschiede in den *agr*-Genen können zu verfrühter Aktivierung von RNAIII führen, wodurch ein zeitlicher Spielraum in der Repression der Produktion von Oberflächenproteinen für die verschiedenen *S. aureus* Stämme besteht (Geisinger *et al.*, 2012). Da *S. aureus* Newman das Typ I *agr*-Allel trägt, genauso wie die MRSA-Stämme BAR, ND, KG, WI und SP ist diese Annahme wenig begründet. Es könnte aber sein, dass andere Regulationssysteme wie das SaeRS oder DNA Bindungsproteine wie SigB oder SarA ebenfalls stammabhängig auf die SERAM-Produktion wirken (Cheung *et al.*, 2004).

Im Kulturüberstand einiger MRSA-Stämme (MRSA-BAR, KG, SP, BER) konnte keine Coa-Produktion mittels Immunoblot nachgewiesen werden. Mikrokolonien von neun der zehn der untersuchten MRSA-Stämme waren hingegen im 3D-CoG/F von einer Pseudokapsel (Coa-abhängig) umgeben (zur Übersicht siehe Tabelle 3.11, S. 116). Ein Agglutinationstest ergab für

alle MRSA-Stämme ein positives Testergebnis. Allerdings kann dieses auf eine freie Koagulase (Coa) oder eine gebundene Koagulase (Clumping Faktor A, ClfA) zurückzuführen sein. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die Agglutination lediglich durch ClfA hervorgerufen wird. Der negative Befund einer Coa-Proteinbande im Immunoblot im Fall der erwähnten MRSA-Stämme könnte auch damit zusammenhängen, dass Coa von den MRSA-Stämmen nicht wie von *S. aureus* Newman in den Kulturüberstand freigesetzt wird, sondern mit der Zellwand assoziiert bleibt (wahrscheinlich auch für vWbp).

4.3.3 Nachweis von Emp und Efb bei *S. aureus* im 3D-CoG

Es ist nicht ungewöhnlich, dass monoklonale Antikörper zwar im Immunoblot (SDS-PAGE, überwiegend denaturierte Proteine) reaktiv sind, nicht aber wie hier im 3D-CoG nach Formalin-Fixierung mit Staphylokokken assoziieren. Von den vier monoklonalen Antikörpern (mabs) erwiesen sich für Mikrokolonien des Stamms Newman mab-Emp und mab-Efb in der indirekten Immunfluoreszenz-Mikroskopie als reaktiv. Eine Detektion von Emp und Efb war für Mikrokolonien der MRSA-Stämme im 3D-CoG hingegen nicht möglich. Geht man davon aus, dass MRSA-Stämme, die im Immunoblot Emp- bzw. Efb-positiv waren auch im 3D-CoG eine Produktion von Emp und Efb stattgefunden hat, könnte das Fehlen eines Fluoreszenzsignals verschiedene Ursachen haben: Erstens könnte es an einer Maskierung der beiden Adhäsionsproteine liegen. Dieses Phänomen wurde bereits für das ClfA-Protein beschrieben, das durch ein kapsuläres Polysaccharid maskiert werden kann (Risley *et al.*, 2007). Allerdings können 20 – 25 % aller *S. aureus* Isolate keine Polysaccharid-Kapsel ausbilden, da dies durch Mutationen innerhalb der für die Kapsel notwendigen Gene *cap5* oder *cap8* oder in deren Regulatorgenen verhindert wird (Cocchiario *et al.*, 2006). Zweitens kommen *S. aureus* Proteasen in Frage, die Emp und Efb abbauen könnten. Ein Abbau von *S. aureus* Oberflächenproteinen wie FnBPs, Protein A und ClfB durch verschiedene Proteasen (Aureolysin (Metallo-Protease), Ssp A (Staphylokokken-Serine-Protease), SspB (Cystein-Protease) und Scp (Staphopain)) wurde bereits in früheren Publikationen beschrieben (Karlsson *et al.*, 2001, McAleese *et al.*, 2001, McGavin *et al.*, 1997). Drittens könnte eine Überproduktion von anderen Exoproteinen dazu führen, dass die Sekretionswege (Sec-Sekretionsweg) überlastet sind, wodurch Emp und Efb nicht aus der Zelle ausgeschleust werden können. Dass einzelne Proteine mit hohem Sekretionslevel einen Rückgang der Sekretion anderer Proteine verursachen können, konnte bereits 1990 im Rahmen einer

Doktorarbeit gezeigt werden (Vehmaanperä, 1990). Der negative Nachweis von Emp und Efb in Mikrokolonien im 3D-CoG könnte auch damit zusammenhängen, dass Stämme in die ein *mec*-Element eingefügt wurde, die Fähigkeit der Adhäsion an Fibrinogen und Fibronektin verlieren bzw. kein Emp und Efb produzieren (Vaudoax *et al.*, 1998). Unterstützt wird diese These dadurch, dass für *S. aureus* Newman (enthält kein *mec*-Element) im 3D-CoG Emp und Efb detektiert werden konnte. Die Produktion von Emp und Efb von *S. aureus* Newman konnte bereits nach 4 h (Efb) bzw. nach 7 h (Emp) in fast allen Staphylokokken im 3D-CoG nachgewiesen werden (homogene Produktion). Emp-Produktion konnte jedoch auch für vier MSSA-Patientenisolaten im 3D-CoG/F nicht nachgewiesen werden und auch die Efb-Produktion war nachweislich nur bei zwei MSSA-Stämmen vorhanden (vgl. Abbildung 3.32, S. 119).

4.3.4 Nachweis von Emp und Efb bei *S. aureus* im 3D-CoG/F mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Im nächsten Schritt wurde die Emp- und Efb-Produktion in Mikrokolonien der MRSA-Stämme und *S. aureus* Newman im 3D-CoG/F untersucht. Zur Detektion wurden die Antikörper mab-Emp und mab-Efb eingesetzt. Mikrokolonien von *S. aureus* Newman zeigten nach 4 h heterogene (Emp) bzw. homogene (Efb), nach 7 h und 16 h randständige Emp- bzw. Efb-Produktion. Von den MRSA-Stämmen war Emp-Bildung im 3D-CoG/F nur für die MRSA-GB und ND nach 16 h nachweisbar. *S. aureus* Newman und MRSA-ND zeigten, im Gegensatz zu MRSA-GB auch im Immunoblot eine Emp-positive Bande. Efb-Bildung konnte neben *S. aureus* Newman nur für MRSA-WI (4 h, 7 h), SP (7 h) und KG (4 h) nachgewiesen werden. Für diese *S. aureus*-Stämme konnte auch im Immunoblot eine Efb-positive Bande detektiert werden. Für die MRSA-Stämme BAR, DM, SD, BER und KLN gelang weder der indirekte Immunfluoreszenz-Nachweis für Emp noch Efb. Mit Ausnahme von MRSA-BER war für diese MRSA-Stämme hingegen eine Detektion von Emp bzw. Efb im Immunoblot möglich (zur Übersicht siehe Tabelle 3.10, S. 115).

Für *S. aureus* Newman und alle MRSA-Stämme (mit Ausnahme von MRSA-WI) mit positivem Emp- bzw. Efb-Nachweis (MRSA-GB, ND, SP und KG) waren Propidium Jodid negative Bakterien nachweisbar und die Mikrokolonien konnten durch direkte Immunfluoreszenz mit anti-Sau dargestellt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesene randständige Emp- oder Efb-Produktion (wie für *S. aureus* Newman gezeigt) kein Artefakt ist, der mit einer Penetrationsbarriere der Mikrokolonien für Antikörper zusammenhängt.

Wahrscheinlich wird Emp bzw. Efb beim *S. aureus* Newman nur am Rand der Kolonie detektiert, weil sich dort die Staphylokokken in der exponentiellen Phase befinden und Zugang zu Nährstoffen haben. Wie es für Biofilme bekannt ist, wäre es auch plausibel, dass manche Staphylokokken im Zentrum der Mikrokolonie ihren Metabolismus reduzieren. Da im Zentrum eines Biofilms die Sauerstoffzufuhr begrenzt ist, wird das Zellwachstum verlangsamt, wodurch auch die Proteinproduktion (Emp/Efb) vermindert wird (de la Fuente-Nunez *et al.*, 2013) oder sezernierte Proteine proteolytisch abgebaut werden. Mithilfe des „Life/Dead-stain“ konnte nachgewiesen werden, dass ca. die Hälfte der Newman-Staphylokokken im Zentrum der Mikrokolonie Propidium Jodid positiv sind (Abb. Abbildung 3.28, S. 110). Das Absterben von Bakterien kann durch Nährstoffmangel induziert sein (programmierter Zelltod) oder die Staphylokokken lysieren, um den umliegenden Bakterien den Zellinhalt als Nährstoffquelle zur Verfügung zu stellen (Sadykov und Bayles, 2012). Die Regulation des Zelltods verläuft in *S. aureus* unter anderem indirekt über CidC (Pyruvat-Oxidase) und AlsSD (α -Acetolaktat-Synthase/Decarboxylase). Durch Glukose-Fermentation entsteht Acetat und Laktat, die das Medium ansäuern (sinkender pH). In saurem Milieu wird die CidC-Aktivität erhöht, wodurch vermehrt Acetat aus Pyruvat gebildet wird. Der pH sinkt weiter und führt schließlich zum Zelltod. Durch AlsSD-Aktivität kann Pyruvat aber auch (unter Protonenverbrauch) zu Acetoin umgewandelt werden (der pH steigt) (Thomas *et al.*, 2014). Auf diese Weise kann der Zelltod von Bakterien im Biofilm/in Mikrokolonien gesteuert werden. Nach dem Zelltod trägt freiwerdende DNA zur Stabilisierung von Biofilmen bei, erhöht die Antibiotikaresistenz und unterstützt den horizontalen Gentransfer. Der Kontakt zu Fibrinogen kann ist wahrscheinlich nicht die Ursache für Emp- bzw. Efb-Produktion, da Emp und Efb von Stamm Newman auch im 3D-CoG gebildet wurde. Andererseits ist die Regulation zur Produktion von SERAM-Proteinen in *S. aureus* Newman durch die konstitutive Aktivität der Histidin-Kinase SaeS dereguliert (vgl. Abschnitt 1.3.3, S. 6), so dass ein Einfluss von Fibrinogen auf die SERAM-Produktion von Staphylokokken-Stämmen mit reguliertem SaeRS-Zwei-Komponenten System bestehen könnte. Abbildung 4.2A, S. 146 gibt einen schematischen Überblick über die Morphologie der Mikrokolonien im 3D-CoG und 3D-CoG/F, sowie der Emp- und Efb-Bildung von MRSA-Stämmen und *S. aureus* Newman nach 16 h Wachstum.

Im Fall von MRSA-WI konnte weder der Vitalitätsgrad im Zentrum der Mikrokolonien, noch die Anfärbbarkeit durch anti-Sau erreicht werden, so dass keine Aussage über die Emp- und Efb-Produktion im Inneren der Mikrokolonien getroffen werden kann. Für *Streptococcus mutans*

konnte gezeigt werden, dass sich während der Biofilm-Bildung Exopolysaccharide zwischen die Kokken lagern, um Hohlräume zu füllen, als auch um die Mikrokolonien herum (Xiao und Koo, 2010). Im Fall von Mikrokolonien könnte durch Exopolysaccharid-Produktion die Zugänglichkeit für Farbstoffe und/oder Antikörper in das Koloniezentrum stark reduziert sein. Dieses Phänomen ist für die schlechte Penetration von Antibiotika in Biofilmen bekannt.

Dass Emp im Fall der MRSA-Stämme GB und ND erst in der stationären Phase detektierbar war, widerspricht dem Konzept, dass Adhäsionsproteine durch *Quorum sensing*-Systeme nach der exponentiellen Phase nicht mehr exprimiert werden. Die Wachstumsbedingungen im 3D-CoG/F unterscheiden sich jedoch stark von denen in Flüssigkultur. Durch die monodisperse Verteilung der Mikrokolonien im 3D-CoG/F ist der Verdünnungseffekt von *Quorum sensing*-Signalmolekülen möglicherweise zu groß, um Änderungen in der Genexpression hervorzurufen. Plausibel wäre auch, dass die Transkription zwar nur in der exponentiellen Phase stattfindet, die Translation aber erst in der stationären Phase abgeschlossen ist. Die Detektion von Emp in der stationären Phase passt außerdem zu Ergebnissen bzgl. ClfA (MSCRAMM), dessen Transkript auch in der stationären Phase am höchsten ist (Wolz *et al.*, 2002).

Im Fall von *S. aureus* Newman unterschied sich im 3D-CoG/F der Phänotyp bzgl. Emp- und Efb-Produktion nicht. Dies könnte auf den gleichen Regulationsmechanismus rückführbar sein, widerspricht jedoch den Ergebnissen der Emp- und Efb-Bildung der MRSA-Stämme, die, abgesehen von Stämmen ohne jegliche Emp- und Efb-Produktion, nicht einheitlich Emp bzw. Efb produzieren. Der Stand des Wissens ist, dass die Produktion von SERAM Proteinen über mehrere Zwei-Komponenten Systeme und DNA-Bindeproteine gesteuert wird. Da sich die Regulationssysteme z. T. gegenseitig beeinflussen, entsteht ein äußerst komplexes Netzwerk, von dem nicht bekannt ist, ob die Regulation aller SERAMs auf einem gemeinsamen Mechanismus oder Faktor beruht (Cheung *et al.*, 2004). Das unterschiedliche Expressionsmuster von *emp* und *efb* in MRSA-Stämmen könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass *emp* und *efb* jeweils eigene Operator- bzw. Promotorsequenzen haben, wie dies auch für *emp* und *vWbp* gezeigt wurde (Harraghy *et al.*, 2008). Dass Emp- bzw. Efb-Produktion nicht mittels indirekter Immunfluoreszenz-Mikroskopie bei den MRSA-Stämmen BAR, DM, SD, BER und KLN im 3D-CoG/F nachgewiesen werden konnte, könnte folgende Ursachen haben: (i) Maskierung von Emp/Efb durch Kapselbildung, (ii) Abbau durch Proteasen oder ausbleibende Sekretion der Proteine (Verbleib im Cytosol) oder (iii) es werden keine oder andere Fibrinogen-/Kollagen-

bindende Proteine sekretiert. Dass Efb (MRSA-GB und ND) bzw. Emp (MRSA-WI, SP und KG) von manchen MRSA-Referenzstämmen nur im 3D-CoG/F und nicht im 3D-CoG produziert wird, könnte im Zusammenhang mit der Bildung eines Fibrin-Netztes stehen, wodurch eine kompaktere Koloniebildung entsteht. Dadurch wird die Zelldichte gesteigert, was Einfluss auf die Expression von Genen nehmen kann (Kontakt-Induktion). Stammabhängige Unterschiede in der Produktion von SERAM-Proteinen könnte mit dem Auftreten von *agr*-defekten *S. aureus* Stämmen zusammenhängen, die insbesondere bei Patienten detektiert wurden, die zuvor stationär in Krankenhäusern untergebracht waren (Shopsin *et al.*, 2008). Eine Aktivierung des *agr*-Systems in der exponentiellen Phase führt zur Repression von Genen, die für Oberflächenproteine kodieren (Bronner *et al.*, 2004). Die Efb bzw. Emp-Produktion von *S. aureus* Stämmen mit defektem *agr*-System könnten sich daher von solchen mit einem Wildtyp *agr*-System unterscheiden. Darüber hinaus könnte die unterschiedlich ausgeprägte SERAM-Proteinproduktion mit der generellen genomischen Diversität von MRSA-Stämmen zusammenhängen (Ziebandt *et al.*, 2010).

Dass sich die Variabilität hinsichtlich Form und Größe der Mikrokoloniebildung bzw. Produktion von Emp und Efb nicht nur auf MRSA-Referenzstämme bezieht, zeigen Wachstumsversuche im 3D-CoG/F mit MSSA-Patientenisolaten, die aus dem Universitätsklinikum München stammen (schematische Übersicht, siehe Abbildung 4.2B, S. 146). Isolate, aus lokal unterschiedlichen Abstrichen, unterschieden sich in Koloniform, als auch in der Produktion von Emp und Efb. Selbst zwei MSSA-Isolate, die beide dem Respirationstrakt entnommen wurden, unterschieden sich in diesen Parametern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die deutlichen Unterschiede im Wachstumsverhalten im 3D-CoG/F zwischen MSSA Newman und MRSA-Stämmen dar. Dies ist insofern hoch relevant, als zahlreiche Studien über *S. aureus* mit dem Newman-Stamm durchgeführt wurden. Dass dieser Stamm eine Mutation im *saeS*-Gen aufweist, womit eine konstitutive Aktivität des Zwei-Komponenten Systems verbunden ist, sollte in jedem Fall berücksichtigt werden. Rückschlüsse von Forschungsergebnissen mit *S. aureus* Newman können daher nicht zwangsläufig auf MRSA-Stämme übertragen werden.

DISKUSSION

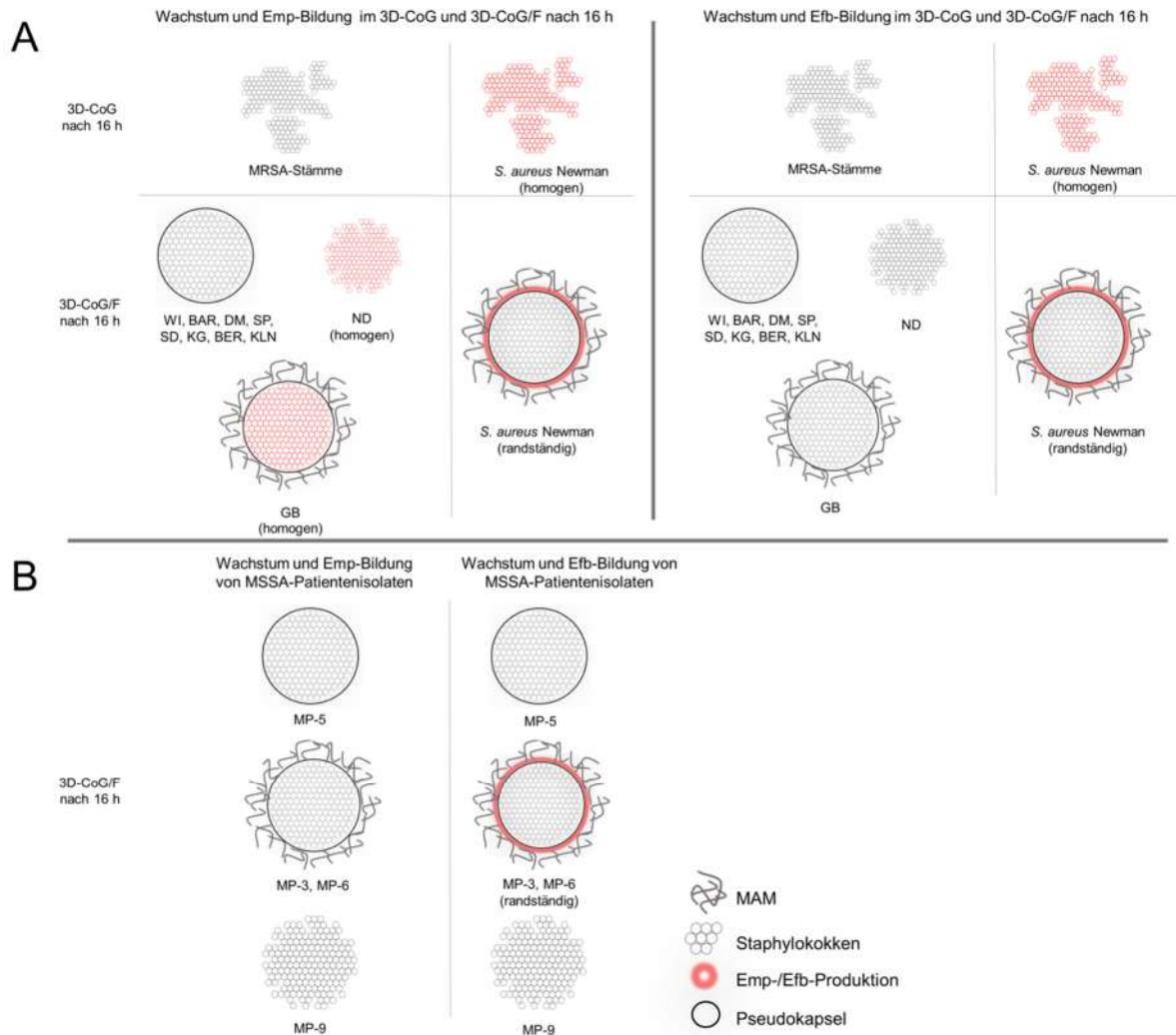


Abbildung 4.2: Schematische Übersicht zur Mikrokolonie-Morphologie und Emp-/Efb-Produktion von *S. aureus* im 3D-CoG und 3D-CoG/F nach 16 h Wachstum

A: *S. aureus* Newman und MRSA-Stämme (MRSA-SP, WI, BAR, DM, ND, SD, KG, BER, KLN und GB).

B: MSSA-Patientenisolate: MP-3, MP-5, MP-6 und MP-9.

Besonders hervorzuheben sind Pseudokapsel, MAM und Emp- bzw. Efb-Nachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz.

5 Zusammenfassung/Summary

5.1 Zusammenfassung

MRSA (Methicillin-resistenter *S. aureus*) ist ein fakultativ humanpathogenes Bakterium, das seit Anfang der 1960er Jahren auftritt und aufgrund des Erwerbs des *mecA*-Gens zur PBP2a-Bildung fähig ist. PBP2a vermittelt Resistenz gegen die meisten β -Laktam-Antibiotika, wie z. B. Methicillin und Oxacillin. Eine schnelle und kostengünstige Detektion von MRSA-Trägern und – Infizierten in Krankenhäusern könnte zur Reduktion der Verbreitung von MRSA wesentlich beitragen. Die Voraussetzungen zur Durchführung eines MRSA-Schnelltests aus Patientennasenabstrichen mit niedriger Zellzahl wurden mittels PBP2a-Immunoblot in dieser Arbeit geprüft. Für die Untersuchungen standen elf verschiedene MRSA-Referenzstämme aus der Stammsammlung des NRZ (RKI, Wernigerode) zur Verfügung.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Resistenz-relevanten Gene *mecA*, *mecR1*, *mecI*, *blaZ*, *blaR1* und *blaI* sequenziert. Aufgrund dessen lassen sich die untersuchten MRSA-Stämme in vier Gruppen einordnen: Ein Stamm mit funktionalen *mec*- und *bla*-Regulatoren (MRSA-RH), ein Stamm nur mit funktionalen *mec*-Regulatoren (MRSA-KLN), sechs Stämme nur mit funktionalen *bla*-Regulatoren (MRSA-SP, WI, BAR, KG, BER und GB) und vier Stämme mit nicht-funktionalen *mec*- und *bla*-Regulatoren (MRSA-DM, ND und SD). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass MRSA-Stämme mit hoher *mecA*-Transkriptionsrate (RT-qPCR) auch große PBP2a-Mengen (Immunoblot) produzieren. Stämme mit geringer *mecA*-Transkript-Menge zeigten eine schwache PBP2a-Bande. Daher kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Menge an PBP2a in direktem Zusammenhang mit der *mecA*-Transkriptionsrate steht und post-transkriptionelle Effekte kaum eine Rolle spielen. Die unterschiedliche *mecA*-Transkription/PBP2a-Produktion bei verschiedenen MRSA-Stämmen lässt sich aufgrund der Mec/Bla-Regulationsproteine erklären. Eine Korrelation zwischen *mecA*-Transkript/PBP2a-Menge und MHK (minimale Hemmkonzentration) für Oxacillin bestand jedoch nicht, was im Einklang mit publizierten Ergebnissen steht. Eine Populationsanalyse zur Einteilung der Stämme in Hetero- bzw. Homoresistenz ergab, dass vier Stämme homoresistent (mit hohen

MHKs im E-Test) und die übrigen sieben Stämme heteroresistent gegenüber Oxacillin sind. Immunoblot-Versuche zum Nachweis von PBP2a bei MRSA-Stämmen zeigten, dass bei allen elf MRSA-Referenzstämmen bei einer initialen Ausgangszellzahl von 500 cfu/ml nach 7 h Wachstum in LB-Medium (37 °C unter Schütteln) PBP2a mittels Immunoblot nachgewiesen werden kann. Dazu war eine Induktion der PBP2a-Produktion mit 10 ng/ml Oxacillin notwendig. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass anstelle von Oxacillin-induzierter PBP2-Produktion ein Nachweis von PBP2a verbessert werden kann, wenn die MRSA-Referenzstämmen durch Resuspension der Staphylokokken in 230 µg/ml PRF-119 (*S. aureus* spezifisches Phagolysin) für 5 Min bei 37 °C lysiert wurden. Untersuchungen mit Magnetbeads, die mit *S. aureus*-spezifischem Phagenprotein beschichtet waren (Sa-Beads), zeigten, dass sich diese zur Anreicherung und Selektion von *S. aureus* aus Rein- und Mischkulturen eignen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zur weiteren Charakterisierung der hier untersuchten Kollektion von MRSA-Referenzstämmen die MRSA-Stämme erstmalig in Bezug auf vier SERAM-Proteine (Coa, Emp, Efb und vWbp) mittels spezifischer monoklonaler Antikörper (mab-Coa, mab-vWbp, mab-Emp und mab-Efb) im Immunoblot und Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Während die vier SERAM-Proteine im Immunoblot nachgewiesen werden konnten, erwiesen sich mab-Emp und mab-Efb auch für Immunfluoreszenz-Mikroskopie als geeignet. Die MRSA-Stämme und klinische MSSA-Isolate wurden deshalb auch hinsichtlich ihrer Emp- und Efb-Produktion im 3D-Kollagengel (3D-CoG) und im mit Fibrinogen supplementierten 3D-CoG (3D-CoG/F) charakterisiert und mit dem *S. aureus* Stamm Newman verglichen. Das 3D-CoG stellt ein Gewebe-Surrogate dar und ermöglicht dadurch *in vivo* ähnliche Wachstumsbedingungen, die auf Agarplatten oder in der Zellkultur so nicht erreicht werden können. Darüber hinaus wurden die Referenzstämmen auch erstmalig in Bezug auf ihre Mikrokolonie-Morphologie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die MRSA-Referenzstämmen im 3D-CoG unregelmäßig geformte Mikrokolonien bilden, die nach 16 h Inkubation von peripheren locker gepackten Bakterienansammlungen umgeben waren, die Biofilmstrukturen ähneln. Im 3D-CoG/F bildeten die Mikrokolonien von sieben Stämmen nach 16 h Mikrokolonien, die von einer Pseudokapsel umgeben waren. Für drei Stämme konnte zumindest für einen Zeitpunkt während der 16 h Kultivierung MAM („*microcolony associated meshwork*“) und Pseudokapsel mikroskopisch nachgewiesen werden. MRSA-ND bildete sehr kleine Mikrokolonien ohne Pseudokapsel und MAM. Auch im Hinblick auf die Produktion von Emp und Efb im 3D-CoG und 3D-CoG/F

unterschieden sich die einzelnen Stämme. Es wurden sowohl Stämme mit Mikrokolonien identifiziert, die randständige Emp- bzw. Efb-Produktion zeigten, als auch solche mit homogener oder heterogener Emp- bzw. Efb-Produktion.

Diese Arbeit zeigt, dass nicht nur hinsichtlich Oxacillin-Resistenz, sondern auch im Hinblick auf Emp- und Efb-Produktion mit Heterogenität unter MRSA-Stämmen gerechnet werden muss. Diese Unterschiede haben zur Folge, dass Forschungsergebnisse zu einem Stamm nur eingeschränkt auf andere MRSA-Stämme übertragen werden können. Diese Heterogenität von MRSA-Stämmen stellt sowohl bei der Detektion wichtiger Phänotypen (Resistenz, Virulenz) von MRSA-Stämmen, als auch in der Entwicklung von Medikamenten bzw. Impfstoffen gegen *S. aureus* ein Problem dar.

5.2 Summary

MRSA (Methicillin-resistant *S*taphylococcus *a*ureus) is a facultative pathogenic bacterium which acquired the *mecA*-gene in the early 1960s, that mediates resistance to most β -lactam-antibiotics (e.g. methicillin and oxacillin) by PBP2a production. Fast and cost efficient screening of hospitalized patients with MRSA colonization is very important to limit the spread of this organism. In this thesis, the requirements for the detection of MRSA from patient nasal swabs with low bacterial number were evaluated using PBP2a-immunoblot. Eleven MRSA reference strains were used for analysis, which were obtained from the NRZ (RKI, Wernigerode) and genes involved in resistance (*mecA*, *mecR1*, *mecI*, *blaZ*, *blaR1* and *blaI*) were sequenced.

In the first part the eleven MRSA reference strains could be divided into four groups based on sequencing results: One strain with functional *mec*- and *bla*-regulators (MRSA-RH), one strain with only functional *mec*-regulators (MRSA-KLN), six strains containing only functional *bla*-regulators (MRSA-SP, WI, BAR, KG, BER and GB) and four strains without functional *mec*- and *bla*-regulators, respectively (MRSA-DM, ND and SD). Furthermore, it was shown for the first time that strains with high *mecA*-transcription rate (RT-qPCR) also produced high amounts of PBP2a (immunoblot). Strains with low amount of *mecA*-transcript showed a weak PBP2a band. These results suggest that the amount of PBP2a is directly linked to the *mecA*-transcription rate, indicating negligible post-transcriptional effects. The different results of *mecA*-transcription/PBP2a-production of MRSA strains can be assigned to different combinations of functional or non-functional Mec- and Bla-regulators. Correlation between *mecA*-transcript/PBP2a production and MIC (minimum inhibitory concentration) for oxacillin could not be determined, confirming already published data. A population analysis profile (PAP) to differentiate between hetero- and homoresistant strains showed that four strains are homoresistant (high MIC in E-tests) and seven strains are heteroresistant for oxacillin. PBP2a-based detection of MRSA strains revealed that starting with an initial cell number of 500 cfu/ml, detection of all eleven MRSA reference strains was possible within 7 h (shaking in LB-medium at 37 °C), when incubated in LB-medium supplemented with 10 ng/ml Oxacillin. Additionally, it could be shown that detection of MRSA reference strains was improved if the bacteria pellet was lysed in 230 μ g/ml PRF-119 (*S. aureus* specific phagolysin) for 5 Min at 37 °C after growth in LB-medium for 7 h. Magnetic beads covered

with *S. aureus* specific phage protein (Sa-Beads) proved to be able for enrichment and selection of *S. aureus* from pure and mixed cultures.

In the second part the MRSA reference strain collection was further characterized by SERAM-protein (Coa, Emp, Efb and vWbp) production detected by immunoblotting. Four mouse monoclonal antibodies (mab-Coa, mab-vWbp, mab-Emp und mab-Efb) were available. It could be shown that mab-Emp and mab-Efb can also be used for immunofluorescence microscopy. Emp- and Efb-production of MRSA strains and clinical MSSA-isolates were therefore further tested in a 3D-collagen gel (3D-CoG) and 3D-CoG/F (3D-CoG supplemented with fibrinogen) and were compared with Emp- and Efb-production of *S. aureus* Newman. The 3D-CoG is a tissue-surrogate that enables growth under *in vivo* similar growth conditions that cannot be achieved by conventional cultivation on solid or in liquid medium. Furthermore, for the first time the MRSA reference strains were characterized based on their microcolony morphology. It was shown that in a 3D-CoG MRSA reference strains form irregular shaped microcolonies that are surrounded by loosely packed accumulations of bacteria that resemble structures of biofilms. After 16 h of growth in 3D-CoG/F seven strains formed microcolonies that were surrounded by a pseudocapsule. Three strains showed at least at one investigated point in time MAM- (microcolony associated meshwork) or pseudocapsule formation. MRSA-ND formed very small microcolonies with neither pseudocapsule nor MAM. Production of Emp and Efb in 3D-CoG and 3D-CoG/F was highly diverse between MRSA strains. Microcolonies of different strains showed either marginal, homogenous or heterogenous Emp- and Efb-production, respectively.

This thesis shows that MRSA strains are not only very heterogenous with regard to oxacillin resistance but also with regard to Emp- and Efb-production. Therefore, predictions that can be made for a specific MRSA strain are not necessarily true for other MRSA strains. This heterogeneity of MRSA strains is a challenge for detection of important phenotypes (resistance, virulence), but also for the development of drugs and vaccines against *S. aureus*.

6 Literatur

Adams RL and Bird RJ (2009): Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. Nephrology (Carlton). **14**: 462-470

Aires de Sousa M and de Lencastre H (2004): Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol Med Microbiol. **40**: 101-111

Ambler R (1980): The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **289**: 321-331

Antignac A, Sieradzki K and Tomasz A (2007): Perturbation of cell wall synthesis suppresses autolysis in *Staphylococcus aureus*: evidence for coregulation of cell wall synthetic and hydrolytic enzymes. J Bacteriol. **189**: 7573-7580

Appelbaum PC and Jacobs MR (2005): Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria. Curr Opin Microbiol. **8**: 510-517

Archer GL, Niemeyer DM, Thanassi JA and Pucci MJ (1994): Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. Antimicrob Agents Chemother. **38**: 447-454

Archer GL, Thanassi JA, Niemeyer DM and Pucci MJ (1996): Characterization of IS1272, an insertion sequence-like element from *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrob Agents Chemother. **40**: 924-929

Arede P, Milheirico C, de Lencastre H and Oliveira DC (2012): The anti-repressor MecR2 promotes the proteolysis of the *mecA* repressor and enables optimal expression of beta-lactam resistance in MRSA. PLoS Pathog. **8**: e1002816

Arede P, Ministro J and Oliveira DC (2013): Redefining the Role of the beta-Lactamase Locus in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: beta-Lactamase Regulators Disrupt the MecI-Mediated Strong Repression on *mecA* and Optimize the Phenotypic Expression of Resistance in Strains with Constitutive *mecA* Expression. Antimicrob Agents Chemother. **57**: 3037-3045

Argudin MA, Tenhagen BA, Fetsch A, Sachsenroder J, Kasbohrer A, Schroeter A, . . . Guerra B (2011): Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. Appl Environ Microbiol. **77**: 3052-3060

Ariens RA (2013): Fibrin(ogen) and thrombotic disease. J Thromb Haemost. **11 Suppl 1**: 294-305

Armand-Lefevre L, Ruimy R and Andremont A (2005): Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls, and pigs. Emerg Infect Dis. **11**: 711-714

Baba T, Bae T, Schneewind O, Takeuchi F and Hiramatsu K (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

LITERATUR

- Bannerman TL (2003): Staphylococci, Micrococcus and other catalasepositive cocci that grow aerobically. Manual of Clinical Microbiology. **8**: 384-404
- Barg N, Chambers H and Kernodle D (1991): Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. **35**: 1975-1979
- Barna JC and Williams DH (1984): The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. Annu Rev Microbiol. **38**: 339-357
- Bartlett AH and Hulten KG (2010): Staphylococcus aureus pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. Pediatr Infect Dis J. **29**: 860-861
- Becker K, Heilmann C and Peters G (2014a): Coagulase-Negative Staphylococci. Clin Microbiol Rev. **27**: 870-926
- Becker S, Frankel MB, Schneewind O and Missiakas D (2014b): Release of protein A from the cell wall of Staphylococcus aureus. Proc Natl Acad Sci U S A. **111**: 1574-1579
- Berger-Bächi B and Rohrer S (2002): Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Archives of Microbiology. **178**: 165-171
- Birck C, Cha JY, Cross J, Schulze-Briese C, Meroueh SO, Schlegel HB, . . . Samama JP (2004): X-ray crystal structure of the acylated beta-lactam sensor domain of BlaR1 from Staphylococcus aureus and the mechanism of receptor activation for signal transduction. J Am Chem Soc. **126**: 13945-13947
- Bjerketorp J, Jacobsson K and Frykberg L (2004): The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of Staphylococcus aureus is a coagulase. FEMS Microbiol Lett. **234**: 309-314
- Bjerketorp J, Nilsson M, Ljungh A, Flock JI, Jacobsson K and Frykberg L (2002): A novel von Willebrand factor binding protein expressed by Staphylococcus aureus. Microbiology. **148**: 2037-2044
- Boden MK and Flock JI (1994): Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from Staphylococcus aureus. Mol Microbiol. **12**: 599-606
- Boehnke W and Zollner T (1999): Die Rolle bakterieller Superantigene in der Pathophysiologie der Haut. Hautarzt. **50**: 91-97
- Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Moller JA and Westh H (2007): A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant Staphylococcus aureus SCCmec types I-V. Clin Microbiol Infect. **13**: 725-727
- Bronner S, Monteil H and Prevost G (2004): Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus: complexity and applications. FEMS Microbiol Rev. **28**: 183-200
- Bruns W and Keppeler H (1987): Extracellular and membrane-bound beta lactamase of Staphylococcus aureus: their importance for the expression of penicillin resistance. J Med Microbiol. **23**: 133-139

LITERATUR

- Bugg TD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P and Walsh CT (1991): Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine:D-alanine ligase of altered substrate specificity. Biochemistry. **30**: 2017-2021
- Burlak C, Hammer CH, Robinson MA, Whitney AR, McGavin MJ, Kreiswirth BN and Deleo FR (2007): Global analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exoproteins reveals molecules produced in vitro and during infection. Cell Microbiol. **9**: 1172-1190
- Carlsson F, Stalhammar-Carlemalm M, Flardh K, Sandin C, Carlemalm E and Lindahl G (2006): Signal sequence directs localized secretion of bacterial surface proteins. Nature. **442**: 943-946
- Cedergren L, Andersson R, Jansson B, Uhlen M and Nilsson B (1993): Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. Protein Eng. **6**: 441-448
- Cerca F, Franca A, Guimaraes R, Hinzmann M, Cerca N, Lobo da Cunha A, . . . Vilanova M (2011): Modulation of poly-N-acetylglucosamine accumulation within mature *Staphylococcus epidermidis* biofilms grown in excess glucose. Microbiol Immunol. **55**: 673-682
- Cerca N, Gomes F, Pereira S, Teixeira P and Oliveira R (2012): Confocal laser scanning microscopy analysis of *S. epidermidis* biofilms exposed to farnesol, vancomycin and rifampicin. BMC Res Notes. **5**: 244
- Chambers HF (1987): Coagulase-negative staphylococci resistant to beta-lactam antibiotics in vivo produce penicillin-binding protein 2a. Antimicrob Agents Chemother. **31**: 1919-1924
- Chambers HF (1997): Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. **10**: 781-791
- Chambers HF and Deleo FR (2009): Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. **7**: 629-641
- Chambers HF and Hackbarth CJ (1987): Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **31**: 1982-1988
- Chavakis T, Wiechmann K, Preissner KT and Herrmann M (2005): *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. Thromb Haemost. **94**: 278-285
- Chen FJ, Hiramatsu K, Huang IW, Wang CH and Lauderdale TL (2009): Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: identification of oxacillin-susceptible mecA-positive methicillin-resistant *S. aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis. **65**: 351-357
- Cheung AL, Bayer AS, Zhang G, Gresham H and Xiong YQ (2004): Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol. **40**: 1-9

LITERATUR

- Cheung GY, Wang R, Khan BA, Sturdevant DE and Otto M (2011): Role of the accessory gene regulator agr in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus pathogenesis. Infect Immun. **79**: 1927-1935
- Clarke SR and Dyke KG (2001): Studies of the operator region of the Staphylococcus aureus beta-lactamase operon. J Antimicrob Chemother. **47**: 377-389
- Cocchiari JL, Gomez MI, Risley A, Solinga R, Sordelli DO and Lee JC (2006): Molecular characterization of the capsule locus from non-typeable Staphylococcus aureus. Mol Microbiol. **59**: 948-960
- Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, . . . Enright MC (2007): Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains: the HARMONY collection. J Clin Microbiol. **45**: 1830-1837
- Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL and Fowler Jr VG (2009): Micrococci in Human Disease. Oxford, Wiley-Blackwell. **Second Edition**
- Cuirolo A, Plata K and Rosato AE (2009): Development of homogeneous expression of resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strains is functionally associated with a beta-lactam-mediated SOS response. J Antimicrob Chemother. **64**: 37-45
- Cunha BA (2005): Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: clinical manifestations and antimicrobial therapy. Clin Microbiol Infect. **11 Suppl 4**: 33-42
- Curtis NAC, Hayes MV, Wyke AW and Ward JB (1980): A mutant of Staphylococcus aureus H lacking penicillin-binding protein 4 and Transpeptidase activity in vitro. . FEMS Microbiol. Lett. **9**: 263-266
- de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Fernandez L and Hancock RE (2013): Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. Curr Opin Microbiol. **16**: 580-589
- DeDent A, Bae T, Missiakas DM and Schneewind O (2008): Signal peptides direct surface proteins to two distinct envelope locations of Staphylococcus aureus. EMBO J. **27**: 2656-2668
- Deisenhofer J (1981): Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-A resolution. Biochemistry. **20**: 2361-2370
- Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA and Stobberingh EE (2007): The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect. **13**: 222-235
- Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, . . . Perdreau-Remington F (2006): Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet. **367**: 731-739
- Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, . . . Chambers HF (2008): The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of

LITERATUR

virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. **197**: 1523-1530

Dordel J, Kim C, Chung M, Pardos de la Gandara M, Holden MT, Parkhill J, . . . Tomasz A (2014): Novel determinants of antibiotic resistance: identification of mutated loci in highly methicillin-resistant subpopulations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. MBio. **5**: e01000

Duthie ES and Lorenz LL (1952): Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. J Gen Microbiol. **6**: 95-107

East AK, Curnock SP and Dyke KG (1990): Change of a single amino acid in the leader peptide of a staphylococcal beta-lactamase prevents the appearance of the enzyme in the medium. FEMS Microbiol Lett. **69**: 249-254

East AK and Dyke KG (1989): Cloning and sequence determination of six *Staphylococcus aureus* beta-lactamases and their expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J Gen Microbiol. **135**: 1001-1015

Ender M, McCallum N, Adhikari R and Berger-Bächli B (2004): Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **48**: 2295-2297

Ender M, McCallum N and Berger-Bächli B (2008): Impact of mecA promoter mutations on mecA expression and β -lactam resistance levels. International Journal of Medical Microbiology. **298**: 607-617

Enright M (2002): The evolution of a resistant pathogen – the case of MRSA. Current Opinion in Pharmacology. **3**: 474-479

Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ and Spratt BG (2000): Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. **38**: 1008-1015

Falugi F, Kim HK, Missiakas DM and Schneewind O (2013): Role of protein A in the evasion of host adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus*. MBio. **4**: e00575-00513

Fessler A, Scott C, Kadlec K, Ehrlich R, Monecke S and Schwarz S (2010): Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. J Antimicrob Chemother. **65**: 619-625

Finan JE, Rosato AE, Dickinson TM, Ko D and Archer GL (2002): Conversion of oxacillin-resistant staphylococci from heterotypic to homotypic resistance expression. Antimicrob Agents Chemother. **46**: 24-30

Fischetti VA (2008): Bacteriophage lysins as effective antibacterials. Curr Opin Microbiol. **11**: 393-400

Fleming A (1929): On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Bull World Health Organ, 2001. **79**: 780-790

LITERATUR

- Flemming K, Klingenberg C, Cavanagh JP, Sletteng M, Stensen W, Svendsen JS and Flaegstad T (2009): High in vitro antimicrobial activity of synthetic antimicrobial peptidomimetics against staphylococcal biofilms. J Antimicrob Chemother. **63**: 136-145
- Forbes BA, Bombicino K, Plata K, Cuirolo A, Webber D, Bender CL and Rosato AE (2008): Unusual form of oxacillin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains. Diagn Microbiol Infect Dis. **61**: 387-395
- Foster TJ (2004): The *Staphylococcus aureus* "superbug". J Clin Invest. **114**: 1693-1696
- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK and Hook M (2014): Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Nat Rev Microbiol. **12**: 49-62
- Frere JM, Joris B, Dideberg O, Charlier P and Ghuysen JM (1988): Penicillin-recognizing enzymes. Biochem Soc Trans. **16**: 934-938
- Freund S, Czech B, Trülzsch K, Ackermann N and Heesemann J (2008): Unusual, Virulence Plasmid-Dependent Growth Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Three-Dimensional Collagen Gels. Journal of Bacteriology. **190**: 4111-4120
- Frick IM, Bjorck L and Herwald H (2007): The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. Thromb Haemost. **98**: 497-502
- Friedrich R, Panizzi P, Fuentes-Prior P, Richter K, Verhamme I, Anderson PJ, . . . Bock PE (2003): Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. Nature. **425**: 535-539
- Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB and Mobashery S (2004): The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. **279**: 40802-40806
- Geisinger E, Chen J and Novick RP (2012): Allele-dependent differences in quorum-sensing dynamics result in variant expression of virulence genes in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **194**: 2854-2864
- George EA and Muir TW (2007): Molecular mechanisms of agr quorum sensing in virulent staphylococci. ChemBiochem. **8**: 847-855
- Ghebremedhin B, König W, Witte W, Hardy KJ, Hawkey PM and König B (2007): Subtyping of ST22-MRSA-IV (Barnim epidemic MRSA strain) at a university clinic in Germany from 2002 to 2005. J Med Microbiol. **56**: 365-375
- Ghuysen JM (1990): Membrane topology, structure, and functions of the penicillin-interactive proteins. Biotechnol. Appl. Biochem. **12**: 468-472
- Ghuysen JM (1997): Penicillin-binding proteins. Wall peptidoglycan assembly and resistance to penicillin: facts, doubts and hopes. Int J Antimicrob Agents. **8**: 45-60

LITERATUR

Giannouli S, Labrou M, Kyritsis A, Ikonomidis A, Pournaras S, Stathopoulos C and Tsakris A (2010): Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. **65**: 626-633

Gilbert B, P. R and L. L (2011): Use of Antibacterial Agents in Renal Failure. Med Clin N Am. **95** 677-702

Giraud AT, Calzolari A, Cataldi AA, Bogni C and Nagel R (1999): The sae locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. FEMS Microbiol Lett. **177**: 15-22

Golemi-Kotra D (2003): Resistance to beta -Lactam Antibiotics and Its Mediation by the Sensor Domain of the Transmembrane BlaR Signaling Pathway in *Staphylococcus aureus*. Journal of Biological Chemistry. **278**: 18419-18425

Gomes FI, Teixeira P, Azeredo J and Oliveira R (2009): Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. Curr Microbiol. **59**: 118-122

Gorwitz RJ, Kruszon-Moran D, McAllister SK, McQuillan G, McDougal LK, Fosheim GE, . . . Kuehnert MJ (2008): Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004. J Infect Dis. **197**: 1226-1234

Gravet A, Colin DA, Keller D, Girardot R, Monteil H and Prevost G (1998): Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. FEBS Lett. **436**: 202-208

Gregory PD, Lewis RA, Curnock SP and Dyke KG (1997): Studies of the repressor (Blal) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. **24**: 1025-1037

Grundmeier M, Hussain M, Becker P, Heilmann C, Peters G and Sinha B (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

Guggenberger C (2012): Analysis of host-pathogen interactions in novel three dimensional surrogate infection models. Fakultät für Biologie. München, Ludwig-Maximilians-Universität

Guggenberger C, Wolz C, Morrissey JA and Heesemann J (2012): Two Distinct Coagulase-Dependent Barriers Protect *Staphylococcus aureus* from Neutrophils in a Three Dimensional in vitro Infection Model. PLoS Pathogens. **8**: e1002434

Gutierrez A, Laureti L, Crussard S, Abida H, Rodriguez-Rojas A, Blazquez J, . . . Matic I (2013): beta-Lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. Nat Commun. **4**: 1610

Hackbarth CJ and Chambers HF (1993): blal and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **37**: 1144-1149

LITERATUR

- Hackbarth CJ, Kocagoz T, Kocagoz S and Chambers HF (1995): Point mutations in Staphylococcus aureus PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. Antimicrob Agents Chemother. **39**: 103-106
- Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H and Hiramatsu K (1998): Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strains Mu3 and Mu50. J Antimicrob Chemother. **42**: 199-209
- Harraghy N, Homerova D, Herrmann M and Kormanec J (2008): Mapping the transcription start points of the Staphylococcus aureus eap, emp, and vwb promoters reveals a conserved octanucleotide sequence that is essential for expression of these genes. J Bacteriol. **190**: 447-451
- Harraghy N, Kormanec J, Wolz C, Homerova D, Goerke C, Ohlsen K, . . . Herrmann M (2005): sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. Microbiology. **151**: 1789-1800
- Hartleib J, Kohler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, . . . Herrmann M (2000): Protein A is the von Willebrand factor binding protein on Staphylococcus aureus. Blood. **96**: 2149-2156
- Hartman BJ and Tomasz A (1986): Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. **29**: 85-92
- Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schafer T, Hecker M, Albrecht D, . . . Gotz F (2010): Repair of global regulators in Staphylococcus aureus 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. Infect Immun. **78**: 2877-2889
- Herzberg O and Moulton J (1987): Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: crystal structure of beta-lactamase from Staphylococcus aureus PC1 at 2.5 Å resolution. Science. **236**: 694-701
- Hiramatsu K, Asada K, Suzuki E, Okonogi K and Yokota T (1992): Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of mecA gene in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). FEBS Lett. **298**: 133-136
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M and Ito T (2001): The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends Microbiol. **9**: 486-493
- Holtfreter S, Grumann D, Schumde M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B, . . . Broker BM (2007): Clonal distribution of superantigen genes in clinical Staphylococcus aureus isolates. J Clin Microbiol. **45**: 2669-2680
- Hososaka Y, Hanaki H, Endo H, Suzuki Y, Nagasawa Z, Otsuka Y, . . . Sunakawa K (2007): Characterization of oxacillin-susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus: a new type of MRSA. Journal of Infection and Chemotherapy. **13**: 79-86
- Hua Z, Zhao W, Harab Y and Shimamura T (2001): Epigallocatechin gallate synergy with ampicillin/sulbactam against 28 clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J. Antimicrob. Chemother. **48**: 361-364

LITERATUR

- Hussain M, Becker K, von Eiff C, Schrenzel J, Peters G and Herrmann M (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
- Hussain M, von Eiff C, Sinha B, Joost I, Herrmann M, Peters G and Becker K (2008): eap Gene as novel target for specific identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. **46**: 470-476
- Hutchings MI, Palmer T, Harrington DJ and Sutcliffe IC (2009): Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. Trends Microbiol. **17**: 13-21
- Idelevich EA, von Eiff C, Friedrich AW, Iannelli D, Xia G, Peters G, . . . Becker K (2011): In Vitro Activity against *Staphylococcus aureus* of a Novel Antimicrobial Agent, PRF-119, a Recombinant Chimeric Bacteriophage Endolysin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. **55**: 4416-4419
- Idelevich EA, Walther T, Molinaro S, Li X, Xia G, Wieser A, . . . Becker K (2014): Bacteriophage-Based Latex Agglutination Test for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. **52**: 3394-3398
- Ito T, Kuwahara K and Hiramatsu K (2007): Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Analysis of MRSA. Methods in Molecular Biology. **391**: 87-102
- IWG-SCC (2009): Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother. **53**: 4961-4967
- Izaki K, Matsushashi M and Strominger JL (1968): Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. 8. Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reaction in strains of *Escherichia coli*. J Biol Chem. **243**: 3180-3192
- Jayasinghe L and Bayley H (2005): The leukocidin pore: evidence for an octamer with four LukF subunits and four LukS subunits alternating around a central axis. Protein Sci. **14**: 2550-2561
- Jeong DW, Cho H, Lee H, Li C, Garza J, Fried M and Bae T (2011): Identification of the P3 promoter and distinct roles of the two promoters of the SaeRS two-component system in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **193**: 4672-4684
- Jett B, Hatter K, Huycke M and Gilmore M (1997): Simplified Agar Plate Method for Quantifying Viable Bacteria. BioTechniques. **23**: 648-650
- Jevons MP, Coe AW and Parker MT (1963): Methicillin resistance in staphylococci. Lancet. **27**: 904-907
- Johnson M, Cockayne A and Morrissey JA (2008): Iron-regulated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* Newman requires ica and the secreted protein Emp. Infect Immun. **76**: 1756-1765
- Joris B, Ghuysen JM, Dive G, Renard A, Dideberg O, Charlier P, . . . et al. (1988): The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. Biochem J. **250**: 313-324

LITERATUR

Joshi GS, Spontak JS, Klapper DG and Richardson AR (2011): Arginine catabolic mobile element encoded speG abrogates the unique hypersensitivity of Staphylococcus aureus to exogenous polyamines. Mol Microbiol. **82**: 9-20

Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J and Schwarz S (2009): Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398 from diseased swine. J Antimicrob Chemother. **64**: 1156-1164

Kampf G, Adena S, Ruden H and Weist K (2003): Inducibility and potential role of MecA-gene-positive oxacillin-susceptible Staphylococcus aureus from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. J Hosp Infect. **54**: 124-129

Kaneko J and Kamio Y (2004): Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. Biosci Biotechnol Biochem. **68**: 981-1003

Karlsson A, Saravia-Otten P, Tegmark K, Morfeldt E and Arvidson S (2001): Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in Staphylococcus aureus sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases. Infect Immun. **69**: 4742-4748

Katayama Y, Ito T and Hiramatsu K (2000): A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. **44**: 1549-1555

Katayama Y, Zhang HZ, Hong D and Chambers HF (2003): Jumping the barrier to beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus. J Bacteriol. **185**: 5465-5472

Keaton MA, Rosato RR, Plata KB, Singh CR and Rosato AE (2013): Exposure of clinical MRSA heterogeneous strains to beta-lactams redirects metabolism to optimize energy production through the TCA cycle. PLoS One. **8**: e71025

Kelly JA, Kuzin AP, Charlier P and Fonze E (1998): X-ray studies of enzymes that interact with penicillins. Cell Mol Life Sci. **54**: 353-358

Kim C, Mwangi M, Chung M, Milheirico C, de Lencastre H and Tomasz A (2013): The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. PLoS One. **8**: e82814

Kluytmans J, van Belkum A and Verbrugh H (1997): Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. **10**: 505-520

Kobayashi N, Urasawa S, Uehara N and Watanabe N (1999): Distribution of insertion sequence-like element IS1272 and its position relative to methicillin resistance genes in clinically important Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. **43**: 2780-2782

Kobayashi SD and DeLeo FR (2013): Staphylococcus aureus protein A promotes immune suppression. MBio. **4**: e00764-00713

LITERATUR

- Kondo N, Ito T and Hiramatsu K (1997): [Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA]. Nihon Saikingaku Zasshi. **52**: 417-434
- Koster W (2001): ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. Res Microbiol. **152**: 291-301
- Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, . . . Novick RP (1993): Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science. **259**: 227-230
- Kroh HK, Panizzi P and Bock PE (2009): Von Willebrand factor-binding protein is a hysteretic conformational activator of prothrombin. Proc Natl Acad Sci U S A. **106**: 7786-7791
- Kumar VA, Steffy K, Chatterjee M, Sugumar M, Dinesh KR, Manoharan A, . . . Biswas R (2013): Detection of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* isolates by use of chromogenic medium MRSA ID. J Clin Microbiol. **51**: 318-319
- Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, Takeuchi F, Mori H and Hiramatsu K (2004): Two-component system *VraSR* positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology. **49**: 807-821
- Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-Suzuki E and Hiramatsu K (1996): Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecl*-mediated repression of PBP 2' production. Antimicrob Agents Chemother. **40**: 2680-2685
- Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, . . . Bowden MG (2007): *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science. **315**: 1130-1133
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680-685
- Lamers RP, Muthukrishnan G, Castoe TA, Tafur S, Cole AM and Parkinson CL (2012): Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. BMC Evol Biol. **12**: 171
- Layer C, Strommenger, Werner, Witte (2012): Aktuelle Daten und Trends zu Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Bundesgesundheitsblatt. **55**: 1377-1386
- Ledala N, Zhang B, Seravalli J, Powers R and Somerville GA (2014): Influence of Iron and Aeration on *Staphylococcus aureus* Growth, Metabolism, and Transcription. J Bacteriol. **196**: 2178-2189
- Lee LY, Liang X, Hook M and Brown EL (2004): Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). J Biol Chem. **279**: 50710-50716

LITERATUR

- Lee SM, Ender M, Adhikari R, Smith JM, Berger-Bachi B and Cook GM (2007): Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 1497-1499
- Lewis RA, Curnock SP and Dyke KG (1999): Proteolytic cleavage of the repressor (Blal) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* **178**: 271-275
- Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR, . . . Otto M (2009): Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**: 5883-5888
- Li Y, Cao B, Zhang Y, Zhou J, Yang B and Wang L (2011): Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* T0131, an ST239-MRSA-SCCmec type III clone isolated in China. *J Bacteriol.* **193**: 3411-3412
- Lim D and Strynadka NCJ (2002): Structural basis for the β lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology.* **9**: 870-876
- Lindsay JA and Holden MT (2006): Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Funct Integr Genomics.* **6**: 186-201
- Livermore DM (2000): Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents.* **16 Suppl 1**: S3-10
- Llarrull LI, Toth M, Champion MM and Mobashery S (2011): Activation of BlaR1 Protein of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Its Proteolytic Processing, and Recovery from Induction of Resistance. *Journal of Biological Chemistry.* **286**: 38148-38158
- Lowy FD (1998): *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* **339**: 520-532
- Lowy FD (2003): Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* **111**: 1265-1273
- Lozano C, Aspiroz C, Ara M, Gomez-Sanz E, Zarazaga M and Torres C (2011): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu(A)* gene. *Clin Microbiol Infect.* **17**: 923-927
- Lu WP, Sun Y, Bauer MD, Paule S, Koenigs PM and Kraft WG (1999): Penicillin-binding protein 2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: kinetic characterization of its interactions with beta-lactams using electrospray mass spectrometry. *Biochemistry.* **38**: 6537-6546
- Madigan M, Martinko J and Parker J (2003): Brock: Mikrobiologie. Goebel W. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Madiraju MV, Brunner DP and Wilkinson BJ (1987): Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **31**: 1727-1733

LITERATUR

- Mainiero M, Goerke C, Geiger T, Gonser C, Herbert S and Wolz C (2010): Differential target gene activation by the *Staphylococcus aureus* two-component system saeRS. J Bacteriol. **192**: 613-623
- Mallorqui-Fernandez G, Marrero A, Garcia-Pique S, Garcia-Castellanos R and Gomis-Ruth FX (2004): Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions. FEMS Microbiol Lett. **235**: 1-8
- Marrero A, Mallorquí-Fernández G, Guevara T, García-Castellanos R and Gomis-Rüth FX (2006): Unbound and Acylated Structures of the MecR1 Extracellular Antibiotic-sensor Domain Provide Insights into the Signal-transduction System that Triggers Methicillin Resistance. Journal of Molecular Biology. **361**: 506-521
- Massidda O, Montanari MP, Mingoia M and Varaldo PE (1994): Cloning and expression of the penicillinase from a borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strain in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. **119**: 263-269
- Massidda O, Montanari MP, Mingoia M and Varaldo PE (1996): Borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains have more in common than reduced susceptibility to penicillinase-resistant penicillins. Antimicrob Agents Chemother. **40**: 2769-2774
- McAleese FM, Walsh EJ, Sieprawska M, Potempa J and Foster TJ (2001): Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. J Biol Chem. **276**: 29969-29978
- McDevitt D, Francois P, Vaudaux P and Foster TJ (1994): Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. **11**: 237-248
- McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K, Bell E, Turner N, McIntire L, . . . Hook M (1997): Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. Eur J Biochem. **247**: 416-424
- McDevitt D, Vaudaux P and Foster TJ (1992): Genetic evidence that bound coagulase of *Staphylococcus aureus* is not clumping factor. Infect Immun. **60**: 1514-1523
- McDougal LK and Thornsberry C (1986): The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol. **23**: 832-839
- McGavin MJ, Zahradka C, Rice K and Scott JE (1997): Modification of the *Staphylococcus aureus* fibronectin binding phenotype by V8 protease. Infect Immun. **65**: 2621-2628
- McKinney TK, Sharma VK, Craig WA and Archer GL (2001): Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators. J Bacteriol. **183**: 6862-6868
- McLaughlin JR, Murray CL and Rabinowitz JC (1981): Unique features in the ribosome binding site sequence of the gram-positive *Staphylococcus aureus* beta-lactamase gene. J Biol Chem. **256**: 11283-11291

LITERATUR

Medeiros AA (1997): Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clin Infect Dis. **24 Suppl 1:** S19-45

Milheiro C, Portelinha A, Krippahl L, de Lencastre H and Oliveira DC (2011): Evidence for a purifying selection acting on the β -lactamase locus in epidemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiology. **11:** 76

Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, . . . Ehricht R (2011): A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. **6:** e17936

Monecke S, Muller E, Schwarz S, Hotzel H and Ehricht R (2012): Rapid microarray-based identification of different *mecA* alleles in *Staphylococci*. Antimicrob Agents Chemother. **56:** 5547-5554

Moore PC and Lindsay JA (2001): Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. J Clin Microbiol. **39:** 2760-2767

Netuschil L, Auschill TM, Sculean A and Arweiler NB (2014): Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms--which stain is suitable? BMC Oral Health. **14:** 2

Nielsen JBK and Lampen JO (1982): Membrane-bound Penicillinases in Gram-positive Bacteria. The Journal of Biological Chemistry. **257:** 4490-4495

Noble WC, Virani Z and Cree RG (1992): Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. **72:** 195-198

Noto MJ, Fox PM and Archer GL (2008a): Spontaneous deletion of the methicillin resistance determinant, *mecA*, partially compensates for the fitness cost associated with high-level vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **52:** 1221-1229

Noto MJ, Kreiswirth BN, Monk AB and Archer GL (2008b): Gene acquisition at the insertion site for SCC*mec*, the genomic island conferring methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **190:** 1276-1283

Novick RP and Geisinger E (2008): Quorum sensing in staphylococci. Annu Rev Genet. **42:** 541-564

Novick RP and Jiang D (2003): The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with agr quorum sensing. Microbiology. **149:** 2709-2717

Nübel U, Nitsche A, Layer F, Strommenger B and Witte W (2012): Single-nucleotide polymorphism genotyping identifies a locally endemic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS One. **7:** e32698

Okamoto R, Okubo T and Inoue M (1996): Detection of genes regulating beta-lactamase production in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **40:** 2550-2554

Oliveira DC and de Lencastre H (2011): Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* is not affected by the overexpression in trans of the *mecA* gene repressor: a surprising observation. PLoS One. **6:** e23287

LITERATUR

- Ortega E, Abriouel H, Lucas R and Galvez A (2010): Multiple roles of Staphylococcus aureus enterotoxins: pathogenicity, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. Toxins (Basel). **2**: 2117-2131
- Oshida T, Sugai M, Komatsuzawa H, Hong YM, Suginaka H and Tomasz A (1995): A Staphylococcus aureus autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. Proc Natl Acad Sci U S A. **92**: 285-289
- Otto M (2009): Staphylococcus epidermidis--the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol. **7**: 555-567
- Otto M (2013): Community-associated MRSA: what makes them special? Int J Med Microbiol. **303**: 324-330
- Palma M, Wade D, Flock M and Flock JI (1998): Multiple binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from Staphylococcus aureus and fibrinogen. J Biol Chem. **273**: 13177-13181
- Panton PN, Came MB, Valentine F and Lond M (1932): Staphylococcal toxin. The Lancet. **1**: 506-508
- Parvez MA, Shibata H, Nakano T, Niimi S, Fujii N, Arakaki N and Higuti T (2008): No relationship exists between PBP 2a amounts expressed in different MRSA strains obtained clinically and their beta-lactam MIC values. J Med Invest. **55**: 246-253
- Patti JM, Jonsson H, Guss B, Switalski LM, Wiberg K, Lindberg M and Hook M (1992): Molecular characterization and expression of a gene encoding a Staphylococcus aureus collagen adhesin. J Biol Chem. **267**: 4766-4772
- Peacock SJ, de Silva I and Lowy FD (2001): What determines nasal carriage of Staphylococcus aureus? Trends Microbiol. **9**: 605-610
- Peacock SJ, Moore CE, Justice A, Kantzanou M, Story L, Mackie K, . . . Day NP (2002): Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of Staphylococcus aureus. Infect Immun. **70**: 4987-4996
- Pereira SF, Henriques AO, Pinho MG, de Lencastre H and Tomasz A (2009): Evidence for a dual role of PBP1 in the cell division and cell separation of Staphylococcus aureus. Mol Microbiol. **72**: 895-904
- Petinaki E, Kontos F and Maniatis AN (2002): Emergence of two oxacillin-susceptible mecA-positive Staphylococcus aureus clones in a Greek hospital. J Antimicrob Chemother. **50**: 1090-1091
- Pignatello J, Oliveros E and MacKay A (2006): Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. **36**: 1-84
- Pinchuk IV, Beswick EJ and Reyes VE (2010): Staphylococcal enterotoxins. Toxins (Basel). **2**: 2177-2197

LITERATUR

- Pinho MG, de Lencastre H and Tomasz A (2000): Cloning, characterization, and inactivation of the gene *pbpC*, encoding penicillin-binding protein 3 of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **182**: 1074-1079
- Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H and Tomasz A (2001): Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **183**: 6525-6531
- Poston RN (1984): Basic proteins bind immunoglobulin G: a mechanism for demyelinating disease? Lancet. **1**: 1268-1271
- Pournaras S, Stathopoulos C and Tsakris A (2013): Oxacillin-susceptible MRSA: could it become a successful MRSA type? Future Microbiol. **8**: 1365-1367
- Prevost G, Cribier B, Couppie P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbancon V, . . . Piemont Y (1995): Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. Infect Immun. **63**: 4121-4129
- Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS, . . . Aarestrup FM (2012): *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. MBio. **3**
- Queck SY, Khan BA, Wang R, Bach TH, Kretschmer D, Chen L, . . . Otto M (2009): Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA. PLoS Pathog. **5**: e1000533
- Reynolds P (1988): The essential nature of staphylococcal penicillinbinding proteins. In Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function. P. Actor LD-M, M. L. Higgins, M. R. Salton, and G. D. Shockman (ed.). Washington, D.C., American Society for Microbiology: 343-351
- Reynolds P and Fuller C (1986): Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*: presence of identical additional penicillin-binding protein in all strains examined. FEMS Microbiol Lett **33**: 251-254
- Richmond MH (1965): Wild-Type Variants of Exopenicillinase from *Staphylococcus Aureus*. Biochem J. **94**: 584-593
- Richmond MH, Parker M, Jevons MP and John M (1964): High Penicillinase Production Correlated With Multiple Antibiotic Resistance In *Staphylococcus aureus*. Lancet. **8**: 293-296
- Risley AL, Loughman A, Cywes-Bentley C, Foster TJ and Lee JC (2007): Capsular polysaccharide masks clumping factor A-mediated adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrinogen and platelets. J Infect Dis. **196**: 919-927
- RKI (2013): Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland – Update 2011/2012. Epidemiologisches Bulletin. **21**
- Roche FM, Downer R, Keane F, Speziale P, Park PW and Foster TJ (2004): The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. J Biol Chem. **279**: 38433-38440

LITERATUR

- Rogasch K, Ruhmling V, Pane-Farre J, Hoper D, Weinberg C, Fuchs S, . . . Engelmann S (2006): Influence of the two-component system SaeRS on global gene expression in two different *Staphylococcus aureus* strains. J Bacteriol. **188**: 7742-7758
- Rosato AE, Craig WA and Archer GL (2003): Quantitation of *mecA* transcription in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. J Bacteriol. **185**: 3446-3452
- Rosdahl VT (1985): Localisation of the penicillinase gene in naturally occurring *Staphylococcus aureus* strains. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B. **93**: 383-388
- Ryffel C, Kayser FH and Berger-Bachi B (1992): Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. **36**: 25-31
- Ryffel C, Tesch W, Birch-Machin I, Reynolds PE, Barberis-Maino L, Kayser FH and Berger-Bachi B (1990): Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Gene. **94**: 137-138
- Sadykov MR and Bayles KW (2012): The control of death and lysis in staphylococcal biofilms: a coordination of physiological signals. Curr Opin Microbiol. **15**: 211-215
- Safo MK, Ko T-P, Musayev FN, Zhao Q, Wang AHJ and Archer GL (2006): Structure of the *MecI* repressor from *Staphylococcus aureus* in complex with the cognate DNA operator of *mecA*. Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystallization Communications. **62**: 320-324
- Safo MK, Zhao Q, Ko TP, Musayev FN, Robinson H, Scarsdale N, . . . Archer GL (2005): Crystal Structures of the *BlaI* Repressor from *Staphylococcus aureus* and Its Complex with DNA: Insights into Transcriptional Regulation of the *bla* and *mec* Operons. Journal of Bacteriology. **187**: 1833-1844
- Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM and Qian Q (2001): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J Clin Microbiol. **39**: 3946-3951
- Sanger F, Nicklen S and Coulson A (1997): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. **74**: 5463-5467
- Schäfer D, Lam TT, Geiger T, Mainiero M, Engelmann S, Hussain M, . . . Sinha B (2009): A point mutation in the sensor histidine kinase *SaeS* of *Staphylococcus aureus* strain Newman alters the response to biocide exposure. J Bacteriol. **191**: 7306-7314
- Schlievert PM, Strandberg KL, Lin YC, Peterson ML and Leung DY (2010): Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. **125**: 39-49
- Schneewind O and Missiakas DM (2012): Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **367**: 1123-1139

LITERATUR

Schneider T, Senn MM, Berger-Bachi B, Tossi A, Sahl HG and Wiedemann I (2004): In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. **53**: 675-685

Scriba TJ, Sierro S, Brown EL, Phillips RE, Sewell AK and Massey RC (2008): The *Staphylococcus aureus* Eap protein activates expression of proinflammatory cytokines. Infect Immun. **76**: 2164-2168

Sezonov G, Joseleau-Petit D and D'Ari R (2007): *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. J Bacteriol. **189**: 8746-8749

Shang W, Davies TA, Flamm RK and Bush K (2010): Effects of ceftobiprole and oxacillin on *mecA* expression in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. **54**: 956-959

Sharma VK, Hackbarth CJ, Dickinson TM and Archer GL (1998): Interaction of native and mutant *MecI* repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci. J Bacteriol. **180**: 2160-2166

Shi L, Gunther S, Hubschmann T, Wick LY, Harms H and Muller S (2007): Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. Cytometry A. **71**: 592-598

Shopsin B, Drlica-Wagner A, Mathema B, Adhikari RP, Kreiswirth BN and Novick RP (2008): Prevalence of *agr* dysfunction among colonizing *Staphylococcus aureus* strains. J Infect Dis. **198**: 1171-1174

Shore AC and Coleman DC (2013): Staphylococcal cassette chromosome *mec*: recent advances and new insights. Int J Med Microbiol. **303**: 350-359

Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O'Connell B, Monecke S, . . . Coleman DC (2011): Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *bla_Z*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **55**: 3765-3773

Skaar EP, Gaspar AH and Schneewind O (2004): *IsdG* and *IsdI*, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. **279**: 436-443

Skinner D and Keefer C (1941): Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. Arch. Intern. Med. **68**: 851-875

Somerville GA and Proctor RA (2009): At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. Microbiol Mol Biol Rev. **73**: 233-248

Spratt BG and Jobanputra V (1977): Mutants of *Escherichia coli* which lack a component of penicillin-binding protein 1 are viable. FEBS Lett. **79**: 374-378

Stille W, Brodt HR, Groll AH and Just-Nübling G (2006): *Antibiotika-Therapie: Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung*. Stuttgart, Schattauer

LITERATUR

- Strominger JL, Izaki K, Matsuhashi M and Tipper DJ (1967): Peptidoglycan transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase: penicillin-sensitive enzymatic reactions. Fed Proc. **26**: 9-22
- Sturenburg E (2009): Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. Ger Med Sci. **7**: Doc06
- Symersky J, Patti JM, Carson M, House-Pompeo K, Teale M, Moore D, . . . Narayana SV (1997): Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. Nat Struct Biol. **4**: 833-838
- Thomas LV and Wimpenny JW (1996): Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol. **62**: 2006-2012
- Thomas VC, Sadykov MR, Chaudhari SS, Jones J, Endres JL, Widhelm TJ, . . . Bayles KW (2014): A central role for carbon-overflow pathways in the modulation of bacterial cell death. PLoS Pathog. **10**: e1004205
- Tipper DJ and Strominger JL (1965): Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proc Natl Acad Sci U S A. **54**: 1133-1141
- Tomasz A (1979): The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. Annu Rev Microbiol. **33**: 113-137
- Tomasz A, Nachman S and Leaf H (1991): Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. **35**: 124-129
- Trülzsch K, Rinder H, Trcek J, Bader L, Wilhelm U and Heesemann J (2002): "Staphylococcus pettenkoferi," a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. **43**: 175-182
- Ubukata K, Nonoguchi R, Matsuhashi M and Konno M (1989): Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. J Bacteriol. **171**: 2882-2885
- Ubukata K, Nonoguchi R, Song MD, Matsuhashi M and Konno M (1990): Homology of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus simulans* to that of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **34**: 170-172
- Udo EE, Pearman JW and Grubb WB (1993): Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. J Hosp Infect. **25**: 97-108
- Uhlen M, Guss B, Nilsson B, Gatenbeck S, Philipson L and Lindberg M (1984): Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. J Biol Chem. **259**: 1695-1702
- van Cleef BA, Graveland H, Haenen AP, van de Giessen AW, Heederik D, Wagenaar JA and Kluytmans JA (2011): Persistence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in field workers after short-term occupational exposure to pigs and veal calves. J Clin Microbiol. **49**: 1030-1033

LITERATUR

van Leeuwen W, van Nieuwenhuizen W, Gijzen C, Verbrugh H and van Belkum A (2000): Population studies of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains reveal a lack of variability in the *agrD* gene, encoding a staphylococcal autoinducer peptide. J Bacteriol. **182**: 5721-5729

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, . . . Etienne J (2003): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis. **9**: 978-984

Varaldo PE, Montanari MP, Biavasco F, Manso E, Ripa S and Santacrose F (1993): Survey of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* for borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **12**: 677-682

Vaudaux PE, Monzillo V, Francois P, Lew DP, Foster TJ and Berger-Bachi B (1998): Introduction of the *mec* element (methicillin resistance) into *Staphylococcus aureus* alters in vitro functional activities of fibrinogen and fibronectin adhesins. Antimicrob Agents Chemother. **42**: 564-570

Vehmaanperä J (1990): Ph.D. thesis. Helsinki, Finland, University of Helsinki

Voladri RK and Kernodle DS (1998): Characterization of a chromosomal gene encoding type B beta-lactamase in phage group II isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. **42**: 3163-3168

Voladri RK, Tummuru MK and Kernodle DS (1996): Structure-function relationships among wild-type variants of *Staphylococcus aureus* beta-lactamase: importance of amino acids 128 and 216. J Bacteriol. **178**: 7248-7253

Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C and Wulf M (2005): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerg Infect Dis. **11**: 1965-1966

Wandersman C and Delepelaire P (2004): Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annu Rev Microbiol. **58**: 611-647

Wang PZ, Projan SJ and Novick RP (1991): Nucleotide sequence of beta-lactamase regulatory genes from staphylococcal plasmid pI258. Nucleic Acids Res. **19**: 4000

Wang X, Kang Y, Luo C, Zhao T, Liu L, Jiang X, . . . Yu J (2014): Heteroresistance at the single-cell level: adapting to antibiotic stress through a population-based strategy and growth-controlled interphenotypic coordination. MBio. **5**: e00942-00913

Wann ER, Gurusiddappa S and Hook M (2000): The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. J Biol Chem. **275**: 13863-13871

Watanabe S, Ito T, Sasaki T, Li S, Uchiyama I, Kishii K, . . . Hiramatsu K (2009): Genetic diversity of staphylocoagulase genes (*coa*): insight into the evolution of variable chromosomal virulence factors in *Staphylococcus aureus*. PLoS One. **4**: e5714

LITERATUR

- Watanabe S, Ito T, Takeuchi F, Endo M, Okuno E and Hiramatsu K (2005): Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **187**: 3698-3707
- Waxman DJ and Strominger JL (1983): Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. Annu Rev Biochem. **52**: 825-869
- Weber K and Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem. **244**: 4406-4412
- Weidenmaier C, Goerke C and Wolz C (2012): *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. Trends Microbiol. **20**: 243-250
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, . . . Tenover FC (2003): Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science. **302**: 1569-1571
- Weist K, Cimbal AK, Lecke C, Kampf G, Ruden H and Vonberg RP (2006): Evaluation of six agglutination tests for *Staphylococcus aureus* identification depending upon local prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). J Med Microbiol. **55**: 283-290
- Weller TM (1999): The distribution of *mecA*, *mecR1* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. J Antimicrob Chemother. **43**: 15-22
- Wendlandt S, Schwarz S and Silley P (2013): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a food-borne pathogen? Annu Rev Food Sci Technol. **4**: 117-139
- Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA and Nouwen JL (2005): The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet Infect Dis. **5**: 751-762
- Wertheim HF, Walsh E, Choudhury R, Melles DC, Boelens HA, Miajlovic H, . . . van Belkum A (2008): Key role for clumping factor B in *Staphylococcus aureus* nasal colonization of humans. PLoS Med. **5**: e17
- West AH and Stock AM (2001): Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. Trends Biochem Sci. **26**: 369-376
- Wise EM, Jr. and Park JT (1965): Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. **54**: 75-81
- Witte W (1999): Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. J Antimicrob Chemother. **44 Suppl A**: 1-9
- Witte W (2007): Zur MRSA-Situation in Deutschland 2005 und 2006. Epidemiologisches Bulletin. **6**: 41-46
- Witte W, Kresken M, Bräulke C and Cuny C (1997): Increasing incidence and widespread dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in hospitals in central Europe, with special reference to German hospitals. Clin Microbiol Infect. **3**: 414-422

LITERATUR

Witte W, Miehke M and Ammon A (2005): Fachtagung der AG Nosokomiale Infektionen am RKI zur Intensivierung der Umsetzung von Präventionsstrategien bei MRSA. Epidemiologisches Bulletin. **5**: 31-38

Wolz C, Goerke C, Landmann R, Zimmerli W and Fluckiger U (2002): Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. Infect Immun. **70**: 2758-2762

Wu SW, de Lencastre H and Tomasz A (2001): Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **183**: 2417-2424

Wyke AW, Ward JB, Hayes MV and Curtis NA (1981): A role in vivo for penicillin-binding protein-4 of *Staphylococcus aureus*. Eur J Biochem. **119**: 389-393

Xiao J and Koo H (2010): Structural organization and dynamics of exopolysaccharide matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. J Appl Microbiol. **108**: 2103-2113

Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM and Chambers HF (2001): A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. Science. **291**: 1962-1965

Ziebandt AK, Kusch H, Degner M, Jaglitz S, Sibbald MJ, Arends JP, . . . Engelmann S (2010): Proteomics uncovers extreme heterogeneity in the *Staphylococcus aureus* exoproteome due to genomic plasticity and variant gene regulation. Proteomics. **10**: 1634-1644

Zimmerli W (2005): Infektiologie: Der ambulant erworbene methicillinresistente *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Schweiz Med Forum **5**: 1285-1287

Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Hook A, Gurusiddappa S, . . . Narayana SV (2005): A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. EMBO J. **24**: 4224-4236

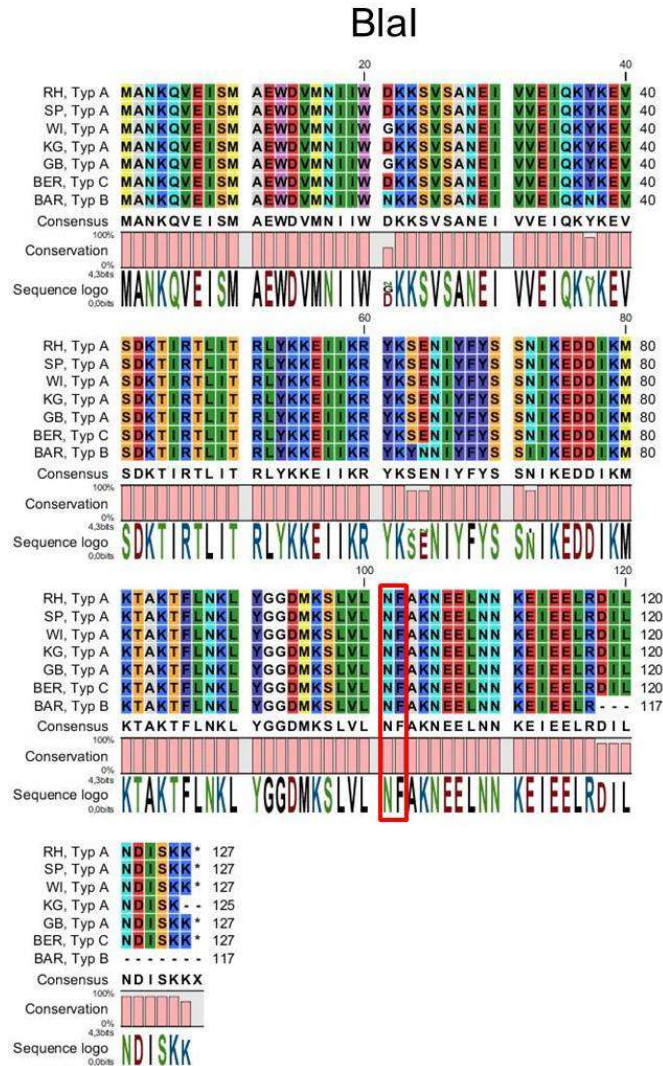


Abbildung 7.2: Aminosäuresequenz-Vergleich von BlaI verschiedener MRSA-Stämme

MRSA-Stämme: RH, SP, WI, BAR, KG, BER und GB. β -Laktamasen-Typ A, B bzw. C.

*: Stop-Kodon. -: MRSA-BAR: Nicht-sequenzierte Aminosäuren. Rot umrandete Aminosäure: Spaltungsstelle durch BlaI.

BlaR1

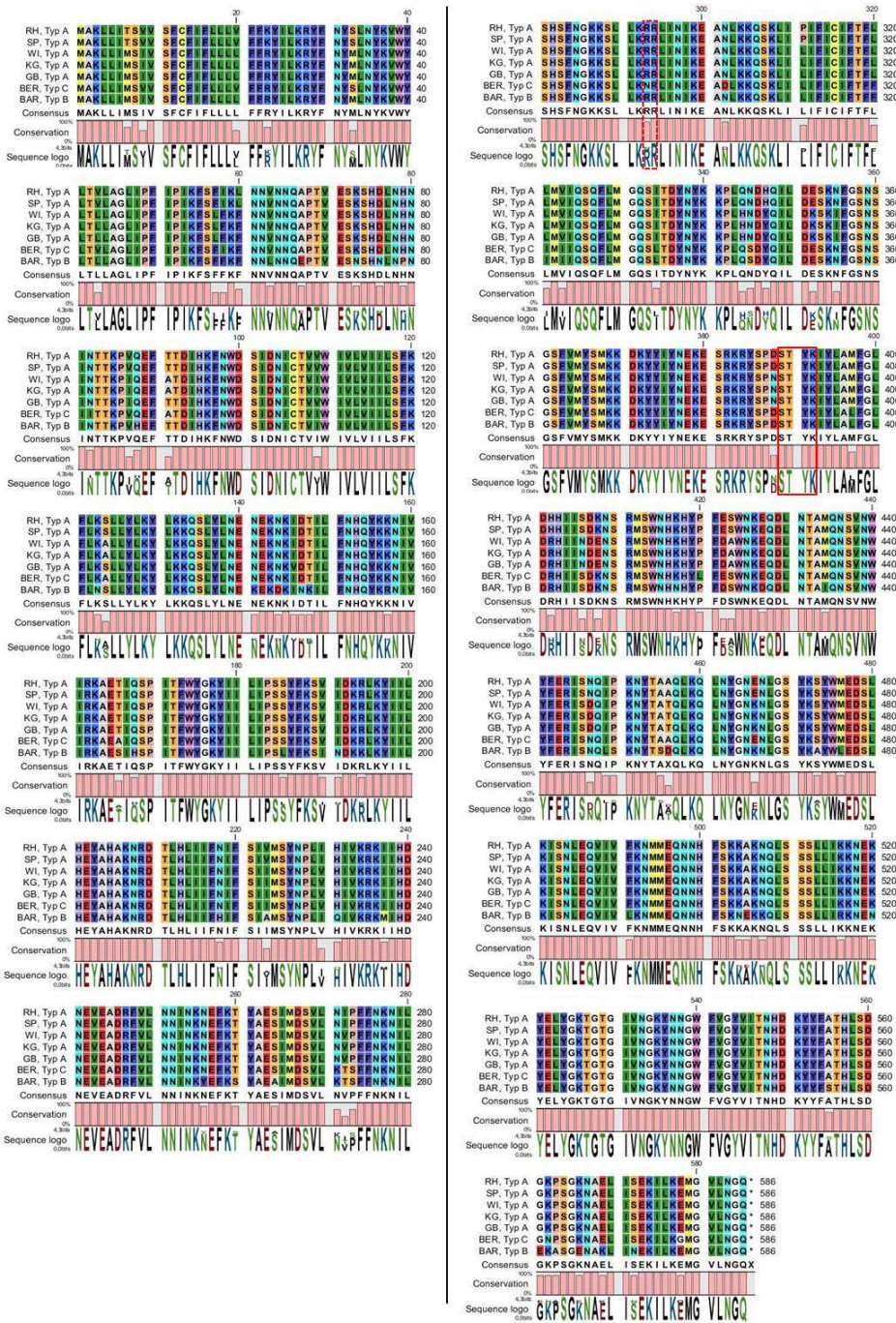


Abbildung 7.3: Aminosäuresequenz-Vergleich von BlaR1 verschiedener MRSA-Stämme

MRSA-Stämme: RH, SP, WI, BAR, KG, BER und GB. β -Laktamasen-Typ A, B bzw. C. *: Stop-Kodon. Rot umrandete Aminosäuren: Spaltungsstelle zur Aktivierung der Zink-Protease (AS 293/294; gestrichelte Linie), Acetylierungsstelle nach Antibiotikabindung (AS 389-392; durchgezogene Linie).

Danksagung

Großer Dank gilt Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Max-von-Pettenkofer Institut durchzuführen, für die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und für die vielen Ideen und Anregungen.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Rudi F. Vogel für die Möglichkeit eine medizinisch-mikrobiologische Doktorarbeit unter seiner Obhut durchführen zu können, für die externe Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit.

Dr. med. Nikolaus Ackermann danke ich für die Betreuung und Unterstützung in den ersten beiden Jahren der Doktorarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Nicolas Jäger, Gisela Anding und Eva Schriefer für ihre Hilfsbereitschaft und vielen Tipps im Laboralltag bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Mittagsrunde bestehend aus Bea, Lea, Caro, Verena, Krissi, Max, Nico und Eva für die herzliche Stimmung, aufbauende Worte und Unterstützung bei Laborfragen.

Nicht zuletzt möchte ich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann bedanken, die mich immer bestärkt und mit voller Überzeugung unterstützt haben. Aus dieser Runde habe ich meinen Mann besonders strapaziert. Deshalb danke ich ihm ganz besonders fürs Zuhören, die bestmögliche moralische Unterstützung und die Geduld in den letzten Jahren.