

Die Rolle von mobilen genetischen Elementen auf die
Evolution von Antibiotikaresistenzen bei
Staphylococcus aureus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl. -Biol.

Michael Nagel

aus Linz/Rhein

Bonn Juli 2011

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) unter Leitung von Frau Prof. Dr. Bierbaum angefertigt.

Promotionskommission

Erstgutachterin:	Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Sahl
Fachnahes Mitglied:	Prof. Dr. rer. nat. Theo C. M. Bakker
Fachangrenzendes Mitglied:	Prof. Dr. rer. nat. Tom McCann

Tag der Promotion: 13.09.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2	Die klinische Relevanz von <i>S. aureus</i>	2
1.3	Evolution der Antibiotika-Resistenz bei <i>S. aureus</i>	4
1.4	Mobile genetische Elemente	6
1.5	Aufbau und Vielfalt von IS-Elementen	6
1.6	Mechanismen der Transposition von IS-Elementen	8
1.7	IS256	9
1.8	Ziel dieser Arbeit	11
2.	Material und Methoden	13
2.1	Chemikaliennachweis und sonstige Materialien	13
2.2	Gerätenachweis	14
2.3.	Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	15
2.3.1	Bakterienstämme	15
2.3.2	Plasmide	16
2.3.3	Oligonukleotide	17
2.4	Stammhaltung und Nährmedien	18
2.5	Sterilisationsverfahren	19
2.6	Molekularbiologische Arbeitstechniken	20
2.6.1	Isolierung von genomischer DNA	20
2.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA	20
2.6.3	Isolierung von RNA	20
2.6.4	Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren mittels Spectrophotometer	22
2.6.5	Gelelektrophorese	23
2.6.6	Gelelution von DNA-Fragmenten	23
2.6.7	Aufreinigung und Aufkonzentrierung von DNA	23
2.6.8	Polymerasekettenreaktion	24
2.6.9	Herstellung von cDNA	25
2.6.10	Real-Time PCR	26
2.6.11	DNA-Sequenzierungen	27

2.6.12 Restriktionsverdau und Ligation von DNA	28
2.6.13 Herstellung elektrokompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	28
2.6.14 Herstellung chemokompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	28
2.6.15 Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	30
2.6.16 Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach Morrison (1977)	30
2.6.17 Herstellung elektrokompetenter <i>S. aureus</i> -Zellen	31
2.6.18 Transformation von elektrokompetenten <i>S. aureus</i> -Zellen	31
2.7 Bestimmung von Resistenzen	32
2.7.1 Agardiffusionstest	32
2.7.2 Minimale Hemmkonzentration (MHK)	32
2.7.3 Epsilometertest (E-Test)	33
2.8 Klonierungsstrategie des Testsystems pA3	34
2.8.1 Klonierungsstrategie der Transposasemutante pA3 Δ tnptr	36
2.8.2 Klonierungsstrategie der pA3 σ^B -Mutanten	37
2.8.3 Klonierungsstrategie der pA3 σ^A -Mutanten	38
2.8.4 Klonierung der pA3 $\sigma^{A/B}$ -Mutanten	38
2.9 Bestimmung der Transpositionsfrequenz	39
2.10 Resistenzerrhöhung durch Passagierung mit stufenweise erhöhter Antibiotika-Konzentration	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Die Verbreitung von IS256 innerhalb von klinischen <i>S. aureus</i> -Isolaten	41
3.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	43
3.3 Das Testsystem pA3 zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz	43
3.4 Bestimmung der Transpositionsfrequenz	45
3.4.1 Transpositionsaktivität von pA3 in <i>S. aureus</i> RN4220	46
3.4.2 Transpositionsaktivität von pA3 in <i>S. aureus</i> HG001	46
3.4.2.1 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Vancomycin	48
3.4.2.2 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Ciprofloxacin	49
3.4.2.3 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Linezolid	51

3.4.2.4 Vergleich der Auswirkung von Vancomycin, Ciprofloxacin und Linezolid auf die Transpositionsfrequenz von IS256r aus pA3 in <i>S. aureus</i> HG001	52
3.4.3 Bestimmung der Transpositionsfrequenz der Mutante pA3 Δ tnptr	53
3.4.3.1 Transpositionsaktivität von pA3 Δ tnptr in <i>S. aureus</i> HG001	54
3.4.3.2 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Ciprofloxacin	56
3.4.4 Transpositionsaktivität von pA3 in <i>S. aureus</i> 8325	57
3.4.4.1 Transpositionsaktivität unter der Verwendung von Ciprofloxacin	59
3.4.4.2 Vergleich der Auswirkung von Ciprofloxacin auf das Transpositionsverhalten von IS256r aus pA3 in <i>S. aureus</i> 8325	61
3.5 Bestimmung der Transpositionsaktivität der Stämme mit verändertem Gegenstrangpromotor	61
3.5.1 Das Testsystem pA3 σ^B mut	62
3.5.2 Transpositionsaktivität von pA3 σ^B mut in <i>S. aureus</i> HG001	64
3.5.3 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Ciprofloxacin	65
3.5.4 Vergleich der Auswirkung von Ciprofloxacin auf das Transpositionsverhalten von IS256r σ^B mut aus pA3 in <i>S. aureus</i> HG001	66
3.5.5 Das Testsystem pA3 σ^A mut	67
3.5.6 Transpositionsaktivität von pA3 σ^A mut in <i>S. aureus</i> HG001	69
3.5.7 Das Testsystem pA3 $\sigma^{A/B}$ mut	70
3.5.8 Transpositionsfrequenz von pA3 $\sigma^{A/B}$ mut in <i>S. aureus</i> HG001	71
3.5.9 Vergleich der Auswirkungen der mutierten Sigma A und Sigma B-Gegenstrangpromotoren auf die Transpositionsfrequenz von IS256r aus pA3 σ^B mut, pA3 σ^A mut sowie pA3 $\sigma^{A/B}$ mut in <i>S. aureus</i> HG001	73
3.6 Nachweis von Antisense-RNA bei IS256r und IS256r σ^B mut	74
3.6.1 Nachweis von Antisense-RNA bei IS256r und IS256r σ^A mut	75
3.6.2 Verifizierung der Nachweise der Antisense-RNA	77
3.7 Passagierversuche zur Erhöhung der Antibiotika-Resistenz	78
4. Diskussion	83
4.1 Resistenzentwicklung aufgrund mobiler Elemente bei klinisch relevanten Bakterienarten (mit besonderer Berücksichtigung von Staphylokokken)	83

4.2 Untersuchungen zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz in <i>S. aureus</i> HG001	85
4.3 Steuerung der Transposition	86
4.3.1 Der Einfluss von σ^B auf die Transpositionsfrequenz von IS256 und IS256r	89
4.3.2 Der Einfluss von σ^A auf die Transpositionsfrequenz von IS256 und IS256r	90
4.3.2.1 Die Auswirkungen der Inaktivierung beider Gegenstrangpromotoren auf die Transpositionsfrequenz des IS256r	92
4.3.3 Nachweise von Gegenstrang-RNA zur Steuerung der Transposition	92
4.3.4 Alternativen zur Beeinflussung der Transpositionsfrequenz	95
4.4 Resistenzsteigerung durch Vorhandensein des IS256	96
4.5 Etablierung von IS256 als Pathomarker	98
4.6 Das Problem der Resistenzentstehung aus historischer Sicht	99
4.7 Ausblick	100
5 Zusammenfassung	103
6. Literaturverzeichnis	105
7. Anhang	120
7.1 Sequenz IS256	120
7.2 Sequenz Plasmid pA3	121
7.2.1 Plasmidkarte pA3	122
7.3 Sequenz Plasmid pA3 Δ tnptr	123
7.3.1 Plasmidkarte pA3 Δ tnptr	124
7.4 Sequenz Plasmid pA3 σ^B mut	125
7.4.1 Plasmidkarte pA3 σ^B mut	126
7.5 Sequenz pA3 σ^A mut	127
7.5.1 Plasmidkarte pA3 σ^A mut	128
7.6 Sequenz pA3 $\sigma^{A/B}$ mut	129
7.6.1 Plasmidkarte pA3 $\sigma^{A/B}$ mut	130

7.7 Alignment der gefundenen IS256-Elemente mit dem detektierten Element aus klinischen Isolaten	131
7.8 Durchgeführte Verdünnungsreihen zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz	133
7.9 Lokalisierung der Primer innerhalb der Transposase des IS256r zur Bestimmung der Gegenstrang-RNA	134
8. Publikationen	135

Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden aufgeführt sind die häufig gebrauchten Abkürzungen in dieser Arbeit. Selten gebrauchte Abkürzungen werden an der jeweiligen Stelle im Text erklärt.

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
A	Ampere
A ₂₆₀	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf .../mit...
Amp	Ampicillin
aqua dest.	destilliertes Wasser (aqua destillata)
AS	Aminosäure(n)
BHI	Brain Heart Infusion, Hirn-Herz-Dextrose (Komplexmedium)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Cipro.	Ciprofloxacin
CM	Chloramphenicol
Da	Dalton
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig (double strand)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ery	Erythromycin
et al.	und andere (et alii)
F	Farad
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung
gr.	griechisch
h	Stunde(n)
kb	Kilobasen

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
lat.	Latein
LB _{Amp}	Luria-Bertani- Medium mit Ampicillin versetzt
LB- Medium	Luria-Bertani- Medium
LRSA	Linezolid-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
Lsg.	Lösung
mb	Megabase
MilliQ	Reinstwasser (Typ I)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol/l
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
ms	Millisekunde(n)
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
Ω	Ohm
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	potential hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time PCR
σ ^A	Sigmafaktor A
σ ^B	Sigmafaktor B
s	Sekunde
s.	siehe
SigA	Sigmafaktor A

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
SigB	Sigmafaktor B
ss	einzelsträngig (single strand)
subsp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T _M	Schmelztemperatur (temperature melting)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSB	Caseinpepton- Sojamehlpepton- Bouillon (tryptic soy broth)
U	Einheit(en), Unit(s)
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche mit
VISA	Vancomycin-intermediär-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
VK	Vorkultur
(v/v)	Volumenprozent
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
VSSA	Vancomycin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
(w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
z.B.	zum Beispiel

Physikalische Größen und Einheiten wurden nach dem SI-System abgekürzt, Nukleotide und Aminosäuren gemäß der IUPAC-Regeln.

1 Einleitung

1.1 *Staphylococcus aureus*

Die Erstbeschreibung des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* erfolgte durch den schottischen Chirurgen Alexander Ogston im Jahre 1881 (Newsom, 2008). Die sessilen, kokkoiden Zellen bilden traubenförmige Aggregate (griech. *staphyle* = Traube), da die Teilung der etwa 1 µm großen Bakterien in mehreren Ebenen erfolgt. Der Speziesname *aureus* (lat. *aureus* = golden) wurde 1881 durch Rosenbach aufgrund der gelben bis goldenen Pigmentierung eingeführt, daher klassifizierte er den Organismus als *Staphylococcus pyogenes aureus* (Köhler et al., 2001).

Derzeit sind 36 Staphylokokken- und einige Subspezies bekannt (Götz et al., 2006), wobei im Wesentlichen die drei Arten *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus saprophyticus* von humanmedizinischer Bedeutung sind (Köhler et al., 2001). Staphylokokken zeichnen sich durch einen niedrigen GC-Gehalt aus und wachsen in der Regel fakultativ aerob bei einem Temperaturoptimum von 30 - 37 °C. Wachstum ist aber auch in einem Toleranzbereich von 10 - 45 °C möglich. Bemerkenswert ist die Halotoleranz von Staphylokokken, eine Vermehrung erfolgt selbst noch bei einer Kochsalzkonzentration von 10 % und mehr und kann daher zur Anreicherung verwendet werden. Staphylokokken verfügen über eine natürliche Resistenz gegenüber UV-Strahlung, Hitze, Austrocknung und verschiedenen Desinfektionsmitteln, wobei die Resistenz gegenüber UV-Strahlung auf die carotinoidhaltige Pigmentierung zurückzuführen ist.

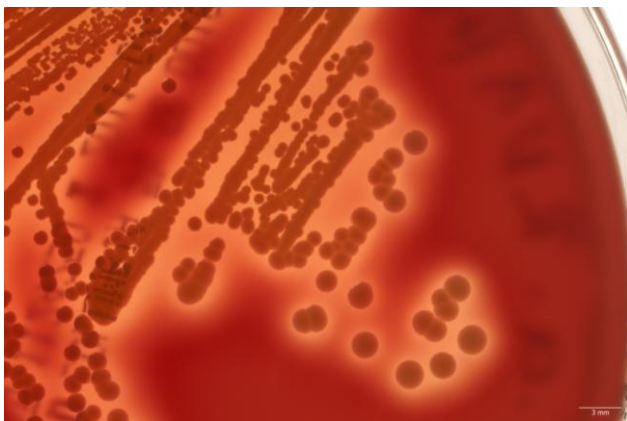


Abbildung 1.1: Makroskopische Aufnahme von *Staphylococcus aureus*-Zellen des in dieser Arbeit verwendeten Stammes *S. aureus* HG001 auf Columbia-Agar.

1.2 Die klinische Relevanz von *S. aureus*

Bedingt durch eine lange Co-Evolution mit dem Menschen hat *S. aureus* ein beträchtliches Arsenal an Pathogenitätsfaktoren entwickelt. Dieses umfasst ein Repertoire bestehend aus Zelloberflächenproteinen, extrazellulären Enzymen, Toxinen und Kapseln. Diese Faktoren verleihen dem Bakterium Eigenschaften, die es zu einem wichtigen Krankheitserreger machen. Die Trägerrate, also die Anzahl der Menschen, die von einem Antibiotika-sensiblen Stamm besiedelt sind, beläuft sich auf 15 bis 40 % (RKI Ratgeber für Ärzte, aktualisierte Fassung September 2009). Vor Etablierung der Antibiotikatherapie betrug die Letalitätsrate bei systemischen *Staphylococcus aureus*-Infektionen bis zu 80 % (Smith und Vickers, 1960). Laut Holzgrabe (2010) erkrankten in den USA jährlich 94.000 Menschen an einer Staphylokokken-Infektionen, wobei 19.000 davon fulminant verlaufen. Im Jahr 2005 verstarben in den USA mehr Menschen an durch Staphylokokken hervorgerufenen Krankheiten als durch HIV/AIDS (Camargo und Gilmore, 2008).

Im Folgenden werden einige Pathogenitätsfaktoren im Einzelnen vorgestellt:

Zum Schutz vor der Phagozytierung durch den Wirt besitzen fast alle *S. aureus*-Stämme das zellwandständige Protein A. Es verhindert eine Opsonierung durch Phagozyten, indem es Antikörper über deren Fc-Stücke bindet. Die gleiche Funktion erfüllt eine Polysaccharid-Kapsel, auch sie bietet den Bakterien einen wirksamen Schutz vor Phagozytose durch das Immunsystem des Wirtes. Zu den weiteren Zellwand-assoziierten Pathogenitätsfaktoren, die nahezu immer bei *S. aureus*-Stämmen anzutreffen sind, gehören der Clumpingfaktor und die Fibronectin-Bindeproteine, die beide eine bessere Adhäsion ermöglichen.

Des Weiteren geben *S. aureus*-Zellen extrazelluläre Produkte an ihre Umgebung ab, diese umfassen Proteasen, Plasmakoagulase, Leukozidin, verschiedene Hämolytine, Hyaluronidase, Exfoliativtoxine und diverse Enterotoxine (Köhler et al., 2001).

Durch die Exkretion von extrazellulären Proteasen sind *S. aureus*-Stämme in der Lage eine Vielzahl von Proteinen des Wirts zu deaktivieren und zu zerstören, hierzu gehören die großen Ketten aller Immunglobuline, Plasma-Protease-Inhibitoren sowie Elastin. Besonders beteiligt sind Proteasen an der Entwicklung von Haut- und Weichteilinfektionen bis hin zu invasiven Erkrankungen, indem sie Zelloberflächenproteine wie Fibronectin-Bindeproteine und das Protein A inhibieren (Karlsson et al., 2001).

Das Enzym Plasmakoagulase bewirkt eine Verklumpung des Blutplasmas. Hierbei verbindet sich die Koagulase mit dem Prothrombin, welches die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin

bewirkt. Das entstandene Fibrinpolymer hat die Funktion eines Schutzwalls vor der Immunabwehr des Wirts. Das entstandene Fibrinpolymer kann durch die Staphylokinase wieder aufgelöst werden, so dass sich die Bakterien in erhöhter Zellzahl in die Umgebung ausbreiten können (Köhler et al., 2001).

Das porenbildende Toxin Leukozidin schützt das Bakterium vor Phagozytose durch Granulozyten und Makrophagen der menschlichen Immunabwehr (Kayser et al., 2005).

Durch gebildete Hämolsine sind die Bakterien in der Lage Erythrocyten aufzulösen. Bisher bekannt sind die Hämolsine α , β , γ und δ . Das α -Hämolsin wirkt letal cytotoxisch auf Thrombocyten, Endothelzellen und einige Epithelzellen durch Porenbildung und ist pathogenetisch von großer Bedeutung. Sowohl das β - als auch das γ -Hämolsin wirken cytotoxisch und hämolysierend, die Funktion des δ -Hämolsins ist bisher nicht eindeutig geklärt (Köhler et al., 2001).

Die hohe Gewebsinvasivität von *S. aureus*-Stämmen ist auf das Vorhandensein einer Hyaluronidase zurückzuführen (Kayser et al., 2005).

Bei den Exfoliativtoxinen A und B handelt es sich um epidermolytische Enzyme, die zur intraepidermalen Spaltbildung zwischen Stratum spinosum und Stratum granulosum der Epidermis führen. Das klinische Erscheinungsbild wird als SSSS beschrieben (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome).

Von großer humanmedizinischer Relevanz sind die gebildeten Enterotoxine A und B. Sie sind enorm hitzeresistent und lassen sich auch durch 30-minütiges Erhitzen auf 100 °C nicht völlig inaktivieren (Köhler et al., 2001).

Die Virulenz von *S. aureus*-Stämmen beruht immer auf der Gesamtheit bzw. einer Vielzahl dieser Faktoren. Bedingt durch das große Arsenal an Virulenzfaktoren ist *S. aureus* für eine Vielzahl von invasiven und toxinvermittelten Erkrankungen verantwortlich. Zu den invasiven Erkrankungen gehören Furunkel und Karbunkel, Osteomyelitis, Abszesse sowie die *S. aureus*-Pneumonie. Problematisch ist, dass basierend auf oberflächlichen oder tiefen Prozessen eine Keimeinschwemmung in die Blutbahn möglich ist, worauf sowohl eine Sepsis als auch eine Endokarditis folgen können. Besonders gefährlich sind die Infektionen durch Fremdkörper, beispielsweise hervorgerufen über Hämodialysehunt- oder Gefäßprothesen durch mit *S. aureus* kontaminierte Polymeroberflächen.

Die toxinvermittelten Erkrankungen werden im Wesentlichen durch das oben beschriebene SSSS (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome), das Toxic Shock Syndrom und die akute Gastroenteritis vertreten (Köhler et al., 2001).

1.3 Evolution der Antibiotika-Resistenz bei *S. aureus*

Verschiedene *S. aureus*-Stämme haben im Laufe von sechs Dekaden eine bemerkenswerte Evolution hinsichtlich ihrer Resistenz vollzogen. Die Tatsache, dass Staphylokokken eine ernste Bedrohung für den menschlichen Organismus darstellen, wurde bereits sehr früh von Ogston (1881) und Rosenbach (1884) erkannt.

Nachvollziehbar ist die Resistenzentwicklung von Staphylokokken seit der Einführung des Penicillins um 1940 zur Behandlung von durch grampositive Erreger hervorgerufenen Infektionen. Nur zwei Jahre später wurden die ersten Penicillin-resistenten *S. aureus*-Isolate identifiziert (Lowy, 2003) und schon Anfang der 1960er Jahre waren mehr als 80 % der isolierten *S. aureus*-Stämme gegenüber Penicillin resistent. Durch die Entwicklung des Penicillinderivats Methicillin schien die Resistenzproblematik gelöst, da dieses nicht durch das Enzym Penicillinase inaktiviert werden konnte. Durch die Acquisition des *mecA*-Gens, welches für ein alternatives Penicillinbindeprotein codiert, war allerdings auch dieses Antibiotikum bereits 2 Jahre nach Einführung, zumindest in England, nicht mehr uneingeschränkt einsetzbar (Stewart und Holt, 1963; Chambers, 1997). Diese Isolate wurden als Methicillin-resistente-*Staphylococcus aureus* (MRSA) –Varianten beschrieben und traten vorwiegend bei hospitalisierten Patienten auf.

Als Ersatztherapeutikum kam unter anderem das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin zum Einsatz, aber bereits im Jahr 1997 wurden in Japan die ersten Stämme mit geringerer Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin isoliert (Hiramatsu et al., 1997). Diese Stämme wurden als Vancomycin-intermediär resistent (VISA) klassifiziert. Die intermediäre Resistenz wird durch eine Ansammlung von Mutationen hervorgerufen, beispielsweise durch eine verdickte Zellwand (Cui et al., 2000), verringerte Quervernetzung der Zellwand (Reipert et al., 2003) oder das Anbieten zusätzlicher Bindestellen auf der Zellwand, so dass das Vancomycin nicht mehr zum eigentlichen Zielort vordringen kann (Cui et al., 2000).

Seit dem Jahr 2002 werden nun vermehrt gegen Vancomycin resistente *S. aureus*-Stämme isoliert, vorwiegend aus den USA, aber auch aus Indien und aus dem Iran. Der Mechanismus, der eine völlige Resistenz gegenüber Vancomycin vermittelt, beruht auf der Akquisition des 11 kb großen Transposons *Tn1546* aus Vancomycin-resistenten Enterokokken-Stämmen (Perichon und Courvalin, 2009). Das Transposon enthält das *vanA*-Operon und bewirkt, dass die Zielstruktur von Vancomycin, der D-Alanyl-D-Alanin-Rest, der ebenfalls die Zielstruktur der Transpeptidasen bei der Quervernetzung des Peptidoglykans ist, auf D-Alanyl-D-Laktat

endet (Perichon und Courvalin, 2009; Mezian-Cherif, 2010). Auf diese Weise wird die Bindungsaffinität für Vancomycin bis zu 1000fach reduziert (Bugg et al., 1991).

Eine weitere aktuelle Problematik stellt das Auftreten so genannter community associated-MRSA-Stämme (CA-MRSA) dar, die seit ihrer Erstbeschreibung in den 1990er Jahren in Westaustralien (Udo et al., 1993) nun eine weltweite Verbreitung erfahren (Chua et al., 2011). Die Zielgruppe dieser Stämme stellen vor allem gesunde Jugendliche und junge Erwachsene dar (Otto, 2009), ganz im Gegensatz zu den hospitalisierten Patienten, die normalerweise von MRSA betroffen sind. Daher werden die Stämme, die im hospitalisierten Bereich auftreten, auch als hospital-associated MRSA beschrieben (HA-MRSA). Bedingt dadurch, dass CA-MRSA-Stämme ebenfalls in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen persistieren, ist eine exakte Differenzierung zwischen den beiden Typen schwierig.

Weiterhin weisen CA-MRSA-Stämme in der Regel das durch die Gene *lukF* und *lukS* gebildete Panton-Valentine Leukocidin (PVL-Toxin) auf, welches unter anderem schwere Gewebnekrosen verursacht, und besitzen SCCmec-Kassetten der Klassen IV und V (Chua et al., 2011). Bedingt durch die hohe Invasivität der CA-MRSA durch das PVL-Toxin ermöglichte dies vermutlich die rasche Verbreitung von CA-MRSA (Deurenberg et al., 2008; Löffler et al., 2010).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die schnelle Evolution von *S. aureus* ein großes Problem für die Gesundheitssysteme darstellt. In Deutschland ist die Anzahl der MRSA-Isolate seit Jahren ansteigend, für das Jahr 2010 betrug deren Anteil etwa 24,6 % (Robert Koch-Institut: ARS, <https://ars.rki.de>, Datenstand: Januar 2011). Auf EU-Ebene kommt es jährlich zu geschätzten 150.000 MRSA-Infektionen, die Behandlungskosten dieser Infektionen belaufen sich auf ca. 380 Millionen Euro, was wiederum Mehrkosten von etwa 2500 Euro pro Patient verursacht (Köck et al., 2010). Die ermittelten Mehrkosten für die Therapie eines MRSA-Patienten in der europäischen Union werden jedoch in der Literatur unterschiedlich hoch angegeben, so kommt Monecke auf einen Betrag von 5700 – 10.000 Euro pro Patient (Monecke et al., 2011).

1.4 Mobile genetische Elemente

Insertionssequenzen und mobile genetische Elemente sind in der Natur weit verbreitet, sie finden sich sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten. Erste Hinweise auf das Vorhandensein von mobilen genetischen Elementen ergaben sich bereits 1950 durch Arbeiten von Barbara McClintock an Mais (McClintock, 1950). Sie beschrieb diese als kontrollierende Elemente. Heute ist bekannt, dass insbesondere Mais eine Vielzahl mobiler genetischer Elemente beherbergt, das Genom dieser Pflanzenart besteht bis zu 85 % aus mobilen Elementen (Vicient, 2010). Auch in tierischen Eukaryoten, wie in dem Modellorganismus *Drosophila*, werden seit den 1980er Jahren mehr und mehr mobile Elemente detektiert (Georgiev et al., 1989). Auch das humane Genom besteht, wie auch das Primaten-Genom, nach aktuellen Angaben rund zur Hälfte aus mobilen Elementen (Xing et al., 2009).

Die Erstbeschreibung über das Vorhandensein mobiler Elemente in Bakterien erfolgte im Jahr 1968 durch die Arbeitsgruppe um P. Starlinger in *E. coli* (Jordan et al., 1968). Diese Autoren führten den Begriff „Insertionssequenzen“ bzw. „IS-Element“ ein und stellten den Zusammenhang zwischen den von McClintock beschriebenen „kontrollierenden Elementen“ und IS-Elementen her (Starlinger und Saedler, 1972). Erst später stellte sich heraus, dass es sich bei den beobachteten mobilen Elementen im Genom von Mais um Transposons handelte. Transposons sind zwar prinzipiell aufgebaut wie IS-Elemente, unterscheiden sich aber in ihrer Größe und beinhalten weitere Resistenzgene, beispielsweise gegen Antibiotika oder Schwermetalle (Bennett, 2008; Malachowa und DeLeo, 2010).

1.5 Aufbau und Vielfalt von IS-Elementen

IS-Elemente sind die einfachsten transponierbaren Elemente und beherbergen lediglich ein Transposase-Gen (in der Literatur auch als T_pase bezeichnet). Die meisten Transposasen beinhalten das so genannte DDE-Motiv (Glutamat, Glutamat, Aspartat), diese Triade aus Aminosäuren ist hoch konserviert und scheint einen wichtigen Einfluss auf die von der Transposase katalysierte Reaktion zu haben (Mahillon und Chandler, 1998). Alle IS-Elemente werden an ihren Seiten von kurzen 10 bis 40 bp langen, zueinander komplementären Sequenzwiederholungen (indirect Repeats) flankiert. Die Anzahl der Basenpaare dieser Sequenzwiederholungen ist spezifisch für das jeweilige IS-Element. Ebenfalls spezifisch für

das jeweilige IS-Element ist die Anzahl der Basenpaare der, die indirect Repeats umschließenden, direct Repeats. Ihre Länge variiert zwischen 2 – 14 bp (Siguier et al., 2006). Die direct Repeats gehören nicht im eigentlichen Sinn zu dem jeweiligen IS-Element, sondern resultieren aus der Ziel-DNA, die bei der Insertion des IS-Elements mit überhängenden Enden aufgeschnitten wird; die Lücken des jeweiligen Gegenstranges werden durch die Reparatursysteme des Wirts mit Nukleotiden aufgefüllt (Mahillon und Chandler, 1998). Die Länge von IS-Elementen liegt zwischen 700 und 2500 bp und bis zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 1500 verschiedene IS-Elemente beschrieben (Siguier et al., 2006).

Wie bereits oben erwähnt, enthalten IS-Elemente keinerlei genetische Informationen, außer der einer Transposase, um an einer neuen Stelle im Genom zu inserieren. Der Vorgang der Transposition wird auch als unspezifische oder illegitime Rekombination bezeichnet und wird im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

Durch die Transposition von IS-Elementen können Mutationen hervorgerufen oder die Gen-Expression beeinflusst werden (Old und Russell, 2008). Die beschriebenen Veränderungen können sowohl über eine direkte Insertion des IS-Elements erfolgen als auch über ein verändertes Expressionsverhalten, ausgelöst durch polare Effekte oder Ausbildung von Hybridpromotoren durch die Insertion in Regulatorregionen (Maki und Murakami, 1997; Jansen et al., 2007; Malachowa und DeLeo, 2010).

Die Nomenklatur von IS-Elementen ist weiterhin strittig. Anfänglich bestand die Systematik der Nomenklatur in der chronologischen Benennung der IS-Elemente (Lederberg, 1981; Mahillon und Chandler, 1998). Aufgrund der Vielfalt der bislang entdeckten IS-Elemente ist dieses System allerdings fragwürdig. Ein weiteres System, welches sich allmählich durchzusetzen scheint, besteht darin, dass zunächst die Buchstaben IS für insertion sequence, dann der erste Buchstabe des Gattungsnamens und die beiden Anfangsbuchstaben des Epithetons und anschließend die konventionelle Nummer des Elements zu nennen sind. Für das IS256 würde dies ISSau256 bedeuten (Siguier et al., 2006). Diese Nomenklatur bietet den Vorteil, dass eine direkte Information über den Ursprung des IS-Elements bereits im Namen enthalten ist.

1.6 Mechanismen der Transposition von IS-Elementen

Der Vorgang der Transposition (von lat. *transponere* = versetzen) beschreibt die Lageveränderung von mobilen Elementen und ist von zentraler Bedeutung. Prinzipiell gibt es drei verschiedene, bisher beschriebene Transpositionsmechanismen für IS-Elemente. Die erste Variante ist ein konservativer „cut and paste“-Mechanismus, bei dem das Element von einer Stelle im Genom an einer anderen Stelle inseriert und sich nicht repliziert. Dieses Verfahren resultiert somit in einer Spaltung in beiden DNA-Strängen zu jeder Seite des IS-Elements, wie auch in der Ziel-DNA bei der erneuten Insertion. Diesen Mechanismus nutzen beispielsweise die IS-Elemente *10* und *50* (Mahillon und Chandler, 1998; Haren et al., 1999).

Die semikonservative Strategie ist eine weitere Möglichkeit für verschiedene IS-Elemente zu translozieren, hierbei wird ein Cointegrat ausgebildet, welches an eine andere Stelle im Genom integriert, das ursprüngliche IS-Element verbleibt an Ort und Stelle. Daher wird dieser Mechanismus auch als „copy and paste“ bezeichnet. Bei dieser Variante löst sich lediglich der Bereich am 3' Ende der DNA, während der 5' Bereich fest verbunden bleibt. Sowohl bei der konservativen als auch bei der hier beschriebenen halbkonservativen Variante entstehen am 3'-Ende der Elemente freie Hydroxylgruppen, die an eine beliebige Phosphodiesterbindung an der neuen Insertionsstelle binden können. Unter anderem wurde dieser Transpositionsweg für die Mitglieder der IS6-Familie beschrieben, zu der unter anderem auch das IS257 zählt, aber auch für das IS256 (Mahillon und Chandler, 1998; Haren et al., 1999).

Als dritte Möglichkeit für die Translokation ist die Ausbildung zirkulärer Intermediate zu nennen, wobei ein Ende des IS-Elements mit dem anderen Ende des Elements eine Ringstruktur ausbildet. In diesem Fall entsteht ein Einzelstrangbruch an nur einer Seite des IS-Elements und die resultierende OH-Gruppe verbindet dieses Ende mit dem anderen Ende des IS-Elements. Diesen Weg nutzen beispielsweise IS21, IS911 und, wie von Loessner et al. beschrieben wurde, ebenfalls das IS256 (Mahillon und Chandler, 1998; Haren et al., 1999; Loessner et al., 2002).

1.7 IS256

Das IS-Element 256 wurde erstmals 1987 im Zusammenhang mit dem Transposon Tn4001 durch Lyon et al. beschrieben. Ziel der damaligen Untersuchung war die Charakterisierung australischer *S. aureus*-Stämme, die eine Resistenz gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika aufwiesen (Lyon et al., 1987). Die beobachtete Antibiotika-Resistenz wurde durch das Plasmid pSK1 vermittelt (Lyon et al., 1984). Dieses Plasmid wiederum enthält das 4,5 kb große Transposon Tn4001, welches aus zwei in gegensätzlicher Richtung angeordneten IS256-Elementen besteht und die Gene *aacA-aphD* beinhaltet, die für eine Resistenz gegenüber Gentamicin, Kanamycin und Tobramycin kodieren (Mahairas et al., 1989).

Das mobile Element IS256 bildet, gemeinsam mit 32 weiteren Elementen, die IS256 Familie, wobei sich die einzelnen Mitglieder der Familie über viele Genera erstrecken, beispielsweise *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium*, *Yersinia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Wolbachia* usw. (Siguier et al., 2006). Eine Besonderheit stellt die Eingruppierung des MurA-Elements in diese Gruppe dar. Es ist das Genprodukt des Mutatorelements MuDR von Mais (*Zea mays*) und weist eine Ähnlichkeit in der Sequenz der Transposase zu den übrigen IS-Elementen dieser Familie auf (Eisen et al., 1994; Mahillon und Chandler, 1998). Die Mitglieder der IS256-Familie verfügen über inverted Repeats mit einer Länge zwischen 24 und 41 bp.

Das IS-Element 256 hat eine Länge von 1324 bp und wird von 8 - 9 bp langen direct Repeats bzw. target site duplications (TSDs) eingerahmt. In der folgenden Abbildung ist das IS256 schematisch dargestellt:

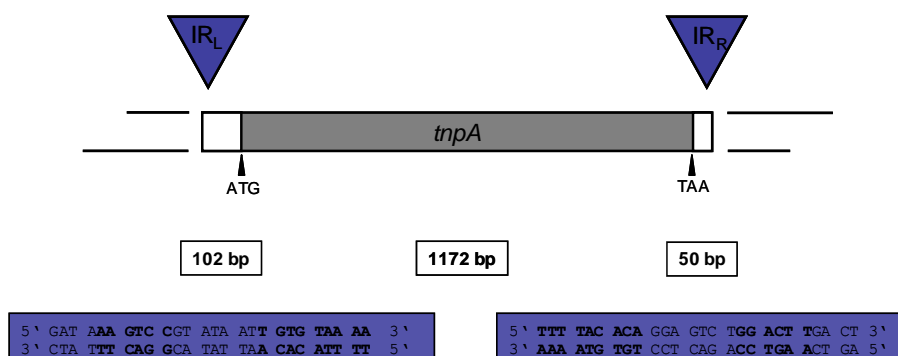


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht über IS256. IR_L: inverted Repeat left; IR_R: inverted Repeat right; *tnpA*: Transposase. Die Sequenzen der inverted Repeats sind in den farbig hinterlegten Kästen aufgeführt, wobei die zueinander exakten inverted Repeats fettgedruckt sind.

Wie aus der Abbildung 2 hervorgeht, macht die Transposase des IS256 mit 1172 bp den größten Teil des IS-Elements aus. Die Transposase wird umgeben von zwei inverted Repeats zu jeder Seite, dem inverted Repeat left (IR_L) und dem inverted Repeat right (IR_R) mit einer Länge von jeweils 26 bp. Die inverted Repeats sind ähnlich zueinander, aber nicht identisch.

Wie bereits von Loessner et al. (2002) und Hennig und Ziebuhr (2010) beschrieben, verursacht das IS256 reversible Gen-(In)aktivierungen und dadurch bedingt eine Veränderung in der Expression von Resistenz- und Virulenzgenen bei *S. aureus* und *S. epidermidis*.

In vorausgegangenen Arbeiten wurde insbesondere das IS256 in dem Elternstamm *S. aureus* 137/93A sowie in dem Tochterstamm *S. aureus* 137/93G untersucht. Der aus einem Trachealsekret isolierte Methicillin-resistente Stamm *S. aureus* 137/93A wies eine intermediäre Resistenz gegenüber Vancomycin auf. Durch die Anwesenheit von Vancomycin in einer Glycerinkultur ging aus dem Stamm *S. aureus* 137/93A der Stamm *S. aureus* 137/93G hervor, der eine höhere Vancomycin-Resistenz aufwies als der Elternstamm (ermittelte MHK gegenüber Vancomycin von 8 µg/ml im Vergleich 12 µg/ml). Die höhere Resistenz gegenüber Vancomycin wurde teilweise durch eine Insertion von IS256 in das *tcaA*-Gen verursacht (Maki et al., 2004; Jansen et al., 2007). Der Stamm *S. aureus* 137/93G ist weiterhin charakterisiert durch eine teilweise deletierte SCCmec-Kassette, eine 65,4 kb große Deletion innerhalb der chromosomalen DNA und keine β-Lactamase-Produktion, bedingt durch den Verlust eines Plasmids.

Der Stamm *S. aureus* 137/93A verfügt über eine Insertion des IS256 innerhalb der Promotorregion des Zweikomponenten-Regulationssystems YycFG, wodurch ein Hybridpromotor ausgebildet wird und *yycFGHI* überexprimiert wird. Das YycFG ist essentiell für viele Bakterien, unter anderem auch für *S. aureus*, es übt beispielsweise einen Einfluss auf die Membranzusammensetzung und die Regulation der Zellwandbiosynthese aus (Reipert et al., 2003; Jansen et al., 2007).

Weiterhin kann IS256 die Ausbildung von Biofilmen bei *Staphylococcus epidermidis* (Ziebuhr et al., 1999) und *Staphylococcus aureus* (Knobloch et al., 2002) durch Insertion in das *ica*-Gencluster regulieren. Innerhalb des Genoms scheint es bevorzugte Insertionsstellen für IS-Elemente zu geben, für *S. epidermidis* innerhalb der Gene *icaC* (Ziebuhr et al., 1999), *rsbU* und *sarA* (Conlon et al., 2004). Für *S. aureus* wurden Insertionen von IS256 ebenfalls häufig in den Genen *icaC*, *rsbU* und *sarA* beschrieben (Valle et al., 2007).

Die Transposition von IS256 verläuft, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, über die Ausbildung zirkulärer Intermediate. Besonders bemerkenswert ist dieser Mechanismus hinsichtlich der Phasenvariabilität der Biofilmproduktion bei *S. epidermidis* (Ziebuhr et al., 1999). Denn das An- und Ausschalten der Biofilmproduktion durch Inserieren des IS256 in das *icaADBC*-Operon erfordert die Entfernung der bei der Insertion entstandenen direct Repeats. Dieses Phänomen des „exakten Ausschneidens“ wurde erstmals von Ziebuhr et al. (1999) für *S. epidermidis* beschrieben. Von Hennig und Ziebuhr (2008) konnte gezeigt werden, dass für diesen Vorgang keine intakte Transposase benötigt wird, sondern lediglich intakte direct Repeats. Demzufolge wäre der Vorgang der Restaurierung der Ursprungssequenz ein vom Wirt gesteuerter Prozess (Hennig und Ziebuhr, 2008; Hennig und Ziebuhr, 2010).

1.8 Ziel dieser Arbeit

Der stete Anstieg von Antibiotikaresistenzen bei *Staphylococcus aureus* stellt eine große Herausforderung an die Ökonomie der Gesundheitswesen dar. Das Verständnis von molekularen Resistenzentwicklungen ist in dieser Hinsicht von zentraler Bedeutung um Lösungsansätze für dieses Problem zu finden. Insbesondere mobile genetische Elemente sollten bei möglichen Lösungsansätzen beachtet werden, da sie einen Anteil von 15 % des Genoms von *S. aureus* ausmachen (Lindsay und Holden, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern mobile genetische Elemente befähigt sind eine Erhöhung der Resistenz gegenüber Antibiotika zu vermitteln. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, sind die exakten Auslöser für eine Transposition von IS256 bislang nicht umfassend erforscht.

Dass Stress, beispielsweise durch Bestrahlung mit UV-Licht, einen Einfluss auf das Transpositionsverhalten ausübt, wurde für das IS10-Element in *Escherichia coli* beschrieben (Eichenbaum und Livneh, 1998). Aufgrund dieser Beobachtung konnte der erste Rückschluss gezogen werden, dass eine Verbindung zwischen der bakteriellen SOS-Antwort und der Transposition eines mobilen, genetischen Elements besteht.

Verschiedene Antibiotika, wie Ciprofloxacin oder zellwandaktive Antibiotika, sind in der Lage die SOS-Antwort auszulösen (Drlica und Zhao, 1997; Miller, 2004). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob das

Transpositionsniveau durch die Zugabe von Antibiotika gesteigert werden kann, wofür die klinisch relevanten Antibiotika Ciprofloxacin, Vancomycin und Linezolid eingesetzt wurden. Ciprofloxacin wurde verwendet, da es, wie bereits oben erwähnt, bei *S. aureus* als Auslöser der SOS-Antwort identifiziert wurde (Cirz et al., 2007) und für eine kurze Zeit als adäquates Antibiotikum für die Behandlung von MRSA-Infektionen verwendet wurde (Raviglione et al., 1990). Die Antibiotika Vancomycin und Linezolid wurden getestet, da sie momentan zu den empfohlenen Therapeutika zur Behandlung von durch MRSA-verursachte Pneumonien oder Empyemen gezählt werden (Skriptum „Empfehlung zur Antibiotika- und Antimykotika-Therapie“ von Christian Rabe et al., 2008).

Für die Bestimmung der Transpositionshäufigkeit wurde ein Testsystem entwickelt und etabliert. Der Einfluss der klinisch relevanten Antibiotika Ciprofloxacin, Vancomycin und Linezolid auf die Insertionssequenz IS256 konnte auf diese Weise beobachtet und quantitativ, über die Berechnung der Transpositionsfrequenz, bestimmt werden. Ebenfalls wurden Sequenzvergleiche mit der Transposase des IS256 durchgeführt um potentielle Promotoren oder andere Steuerungselemente zu identifizieren und deren Einfluss auf das Transpositionsverhalten zu untersuchen. Bislang wurde lediglich ein möglicher Einfluss von SigmaB auf das Transpositionsverhalten von IS256 beschrieben (Valle et al., 2007).

Dass es zwischen dem Vorhandensein von IS256 und der Entstehung von Resistenzen einen Zusammenhang gibt, wurde erstmalig für *S. aureus* von Lyon et al. (1987) und für *Enterococcus faecalis* von Rice et al. beschrieben (Rice et al., 1994; Rice et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls untersucht, ob viele klinisch relevante MRSA- wie auch CA-MRSA-Stämme über ein natürlich vorkommendes IS256 verfügen, welches diesen Stämmen möglicherweise einen Selektionsvorteil ermöglicht. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht, ob das Vorhandensein des IS256 den hier untersuchten Stämmen einen Selektionsvorteil gegenüber den Stämmen ohne IS256 verlieh.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikaliennachweis und sonstige Materialien

Verwendete Chemikalien

Agarose, Top Vision™, LE GQ
Ampicillin
Ampuwa®, PCR-Wasser
Bacto-Agar
Blutagar, Columbia mit 5 % Schafblut
Chloramphenicol
Ciprofloxacin
DNase I
Elektroporationsküvetten, 25 x 2mm
Erythromycin
Ethidiumbromid
GeneRuler™ DNA-Längenstandards
Hefeextrakt
Kongorot
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)
Linezolid
Lysostaphin
Lysozym
MinElute™ PCR Purification Kit
Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen
(Polypropylen)
Nukleotide (dNTPs)
Phusion™-Polymerase
Presto Spin D Bug
Presto Spin R Bug
Primer, DNA-Oligonukleotide
Proteinase K
Qiagen Genomic-tip 20/G Kit

Hersteller

Fermentas, St. Leon-Rot
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fresenius Kabi, Bad Homburg
Difco (Becton & Dickinson), Heidelberg
Becton & Dickinson, Heidelberg
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fermentas, St. Leon-Rot
Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fermentas, St. Leon-Rot
Oxoid, Basingstoke (England)
Merck, Darmstadt
Sarstedt, Nümbrecht
Pfizer, Berlin
Genmedics, Reutlingen
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Qiagen, Hilden
Nunc Brand, Wiesbaden
Fermentas, St. Leon-Rot
NEB, Frankfurt/ Main
Molzym, Bremen
Molzym, Bremen
Metabion, Martinsried
Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Qiagen, Hilden

QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme und Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase	Molzym, Bremen
RNaseZap® Wipes	Applied Biosystems, Darmstadt
RNAprotect® Bacteria Reagent	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase + 10x Ligationspuffer	Roche, Mannheim
Vancomycin	Ratiopharm, Ulm
Trypton	Difco (Becton & Dickinson), Heidelberg
Pepton	Difco (Becton & Dickinson), Heidelberg

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden über die Fa. Merck (Darmstadt) bzw. die Fa. Applichem (Darmstadt) im Reinheitsgrad per analysis bezogen. Sämtliche Antibiotika wurden als Stammlösungen (100 mg/ml) bei -20 °C gelagert, mit Ausnahme von Linezolid und Ciprofloxacin, welche bei RT gelagert wurden.

2.2 Gerätenachweis

In dieser Arbeit verwendete Geräte

Brutschrank 37 °C, B 20
 Brutschrank 45 °C, B 6
 Gelkammer
 Dampfsterilisator, Varioklav 75S
 Eismaschine, UBE 30-10
 Nanodrop®, ND-1000
 Netzgerät für Gelkammer, Desatron 2000/300
 Gefrierschrank, HFU 86 (-70 °C)
 Gene Pulser™ (Elektroporation)
 Lightcycler® 480 Analysesystem
 Magnetrührer, RCT-B
 Photometer, UV-160
 Pulse Controller (Elektroporation)
 Reinstwasseranlage, MilliQ Biocel System A10
 Schüttelwasserbad SW 20

Hersteller

Heraeus, Langenseebold
 Heraeus, Langenseebold
 Peqlab Biotechnologie, Erlangen
 H + P Labortechnik AG, Oberschleißheim
 Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
 Peqlab Biotechnologie, Erlangen
 Desaga, Heidelberg
 Heraeus (Kendro Lab.), Langenseebold
 BioRad, München
 Roche, Penzberg
 Janke und Kunkel, Staufen
 Shimadzu, Duisburg
 BioRad, München
 Millipore, Schwalbach
 Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach

Schüttler, Certomat U	B. Braun, Melsungen
Sterilbank, Axosafe 120	Kojair Tech Oy, Vilppula Finnland
Thermocycler, Labcycler	Sensoquest, Göttingen
Thermocycler, PCR-Express	Hybaid, ThermoLifeScience, Engelsbach
UV-Imager, Image Master VDS	Amersham Bioscience, Freiburg
UV-Tisch, Chroma 43	Vetter GmbH, Wiesloch
Vortexer VF2	Jahnke & Kunkel, Staufen
Zentrifuge 2K15	Sigma, Osterode
Zentrifuge Sorvall Evolution	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.3.1 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme befinden sich in Tabelle 2.1.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>S. aureus</i> NCTC 8325	Laborstamm, natürliche Mutation in <i>rsbU</i> (<i>rsbU</i> -)	Nationales Referenzzentrum für Staphylokokken, Wernigerode
<i>S. aureus</i> HG001	<i>S. aureus</i> 8325 mit aktivem <i>rsbU</i>	Herbert et al., 2010
<i>S. aureus</i> RN4220	abgeleitet von <i>S. aureus</i> 8325-4, restriktionsnegativ	Kreiswirth et al., 1983
<i>S. aureus</i> 15981	Patientenisolat, Biofilm-positiv	Valle et al., 2003
<i>S. aureus</i> USA300	Patientenisolat, prominenter CA-MRSA, PVL positiv	Voyich et al., 2006
<i>S. aureus</i> 137/93G	Laborstamm, spontane Mutante von <i>S. aureus</i> 137/93A, Δ SCCmec, Met ^s , Δ tcaA, VISA	Reipert et al., 2003

<i>E. coli</i> JM109	Interimswirt zum Klonieren, <i>subE</i> ⁺ Δ (lac-proAB) hsdR17 dam (Fa. Boehringer)	Yanisch-Perron et al., 1985
<i>E. coli</i> JM83	Interimswirt zum Klonieren, rpsL ara Δ (lac-proAB) Φ 80dlacZ Δ M15	Messing und Vieira, 1982

2.3.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt. Die Klonkarten sowie die Sequenzen befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBT2	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> shuttle Vektor mit temperatursens. ori für grampos. Bakterien, <i>cat</i>	Brückner et al., 1997
pA3	pBT2 mit IS256r-Element, beinhaltet <i>ermB</i> -Kassette	diese Arbeit; Nagel et al., 2010
pA3 Δ tnptr	pA3 mit inaktivierter Transposase im IS256r	diese Arbeit; Nagel et al., 2010
pA3 σ^A mut	pA3 mit verändertem SigmaA Gegenstrang- Promotor im IS256r	diese Arbeit
pA3 σ^B mut	pA3 mit verändertem SigmaB Gegenstrang- Promotor im IS256r	diese Arbeit; Nagel et al., 2010
pA3 $\sigma^{A/B}$ mut	pA3 mit verändertem SigmaA und SigmaB Gegenstrangpromotor im IS256r	diese Arbeit

2.3.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Primer	Primersequenz (5' - 3')
ermB for	GCC AAG CTT AGT CAA GTC CAG ACT CCT GTG TAA AGA AAA ACG AAA TGA TAC ACC
ermB rev	CTC TCT AGA TTA TTT CCT CCC GTT AAA TAA TAG A
IS IRL for	GTA GAATTC GGA TAA AGT CCG TAT AAT TGT GT
IS IRR rev	TGT TCTAGA TGC TAT ACA ATG TTT TTA CCA TTT C
Linker	TAC CCG GGT A
cat pA3/884 for	CAT TAG GCC TAT CTG ACA ATT CC
cat pA3/1511 rev	AAT AAA ATT GAT TTA GAC AAT TGG AAG
SigB mut for Ph	AAT CAA ACA TCA GCA AAT AGA TTA ATT GGA GCC
SigB mut rev Ph	GGG GAA GAT GCG AAT AAT CTT TTC TCT TCT
SigA -10 mut for	TTG ATT CAT GAC TAC ATC GAT CAA CCA AAA
SigA -10 mut rev	TCG ATT TTT AGC CTC ACG CGC TAA GTT
RNA 100 for	AAA GCT TGC GCA TCA TTG GAT G
RNA 0 rev	C TCT TCT GCG TAC TTC TTG ATT C
SigA 89 for	GTT GGC AAA GAT GCC AAG TTC
SigA 0 rev	AGC CTC ACG CGC TAA GTT AAT
SigA mut checkfor	TCC GTC TCT AAG TCC TTC GT
SigA mut checkrev	AAT ATT TTG GTT GAT CGA TGT AG

2.4 Stammhaltung und Nährmedien

Von allen in Tabelle 2.1 genannten Bakterienstämmen wurden Dauerkulturen angelegt und in Glycerin (50 % (v/v)) bei -70 °C gelagert. Vor Versuchsbeginn wurden die Bakterien auf Columbia-Agarplatten (Fa. Becton & Dickinson) oder andere Selektionsplatten überimpft und, falls nicht anders beschrieben, bei 37 °C inkubiert. Ausgehend von den Agarplatten wurden Flüssigkulturen beimpft und bei 37 °C sowie 150 rpm (Certomat U, B. Braun, Melsungen) bebrütet.

Die verwendeten Nährmedien für die in Tabelle 2.1 aufgeführten Stämme werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Fest- und Flüssigmedien

Stamm	Festmedien	Flüssigmedien
<i>S. aureus</i> RN4220, <i>S. aureus</i> NCTC 8325, <i>S. aureus</i> HG001, <i>S. aureus</i> USA300 incl. pBT2, pA3 und dessen Derivate	TSA + Erythromycin [25 µg/ml]; TSA + Chloramphenicol [20 µg/ml]	TSB+ Erythromycin [25 µg/ml]; TSB+ Chloramphenicol [20 µg/ml]
<i>S. aureus</i> RN4220, <i>S. aureus</i> NCTC 8325, <i>S. aureus</i> HG001, <i>S. aureus</i> USA300. <i>S. aureus</i> 137/93G und alle weiteren Patientenisolate	Columbia-Agar	TSB, BHI
<i>E. coli</i> JM83, <i>E. coli</i> JM109	LB-Agar	LB
<i>E. coli</i> JM83, <i>E. coli</i> JM109 incl. pBT2, pA3 und dessen Derivate	LB + Ampicillin [40 µg/ml]	LB + Ampicillin [40 µg/ml]

Die Zusammensetzungen der verwendeten Nährmedien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 2.5: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien

Nährmedium	Komponenten
Brain-Heart-Infusion-Bouillon (BHI; Fa. Oxoid)	12,5 g/l Kalbshirnkomponenten, 5,0 g/l Rinderherzkomponenten, 10,0 g/l Pepton, 2,0 g/l Glucose, 5,0 g/l NaCl, 2,5 g/l Di-Natrium-Phosphat, pH 7,4 +/- 0,2
Blutagar / Columbia-Agar (Fa. Oxoid)	10,0 g/l Lab-Lemco Pulver, 10,0 g/l Pepton, 5,0 g/l NaCl, 9 % frisches, defibriniertes Hammelblut, pH 7,0
Luria-Bertani (LB)	10,0 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5
Müller-Hinton-Bouillon (MHB; Fa. Oxoid)	2,0 g/l Rindfleischreduktion aus 300 g, 17,5 g/l Caseinhydrolysat, 1,5 g/l Stärke,
Trypton-Soja-Bouillon (TSB; Fa. Oxoid)	17,0 g/l Casein, 5,0 g/l Soja-Pepton, 5,0 g/l NaCl, 2,5 g/l KH ₂ PO ₄ , 2,5 g/l Dextrose

Für die Erzeugung von festen Nährmedien wurden den jeweiligen Komponenten 14 g/l Agar (Fa. Becton & Dickinson) vor dem Autoklavieren zugesetzt und anschließend in sterile Petrischalen gegossen. Für die Herstellung von Selektivnährmedien wurde der Agar vor dem Ausgießen auf etwa 55 °C abgekühlt und mit entsprechenden Antibiotikallösungen versehen.

2.5 Sterilisationsverfahren

Sämtliche Nährmedien, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen aus Kunststoff sowie Glaskolben mit Wattestopfen wurden vor ihrer Verwendung durch Autoklavieren sterilisiert bei 121 °C und 1,2 bar für die Dauer von 20 min. Reagenzgläser mit Metallkappe, Pasteurpipetten und Spatel aus Glas oder Metall wurden in einem Heißluftsterilisator sterilisiert bei 200 °C für die Dauer von 3 Stunden. Die Sterilisation der für die Präparation von RNA verwendeten Materialien wird in Abschnitt 2.6.3 gesondert beschrieben.

2.6 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.6.1 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit dem Presto Spin D Bug-Kit der Firma Molzym. Ausgehend von einer Übernachtskultur wurden 2 ml abgeerntet und nach Herstellervorgaben behandelt. Bei der Präparation von Staphylokokken wurde die Kultur vor Zugabe des Lysepuffers mit 5 µl Lysostaphin (5 mg/ml, Fa. Genmedics) versetzt, um einen optimalen Zellaufschluss zu ermöglichen und für 30 – 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Konzentration und die Reinheit der eluierten DNA wurden mittels Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.6.5) sowie durch photometrische Vermessung im Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Fa. Peqlab) bestimmt (siehe 2.6.4). Die Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas. Für eine Präparation wurden 2 ml einer Übernachtskultur abgeerntet und nach Handbuch des Herstellers weiter bearbeitet. Bei der Präparation von Staphylokokken wurden 5 µl Lysostaphin (5 mg/ml, Fa. Genmedics) zu 250 µl Resuspension Puffer gegeben und bei 37 °C für 30–60 Minuten inkubiert. Der zusätzliche Lyseschritt durch Lysostaphin wurde durchgeführt, um einen optimalen Zellwandabbau zu ermöglichen und sorgte so für eine maximale Ausbeute an Plasmid-DNA. Nach der Elution wurde die gewonnene Plasmid-DNA mittels Gelelektrophorese (2.6.5) sowie durch photometrische Messung mit dem Nanodrop Spectrophotometer (ND-100, Fa. Peqlab; siehe 2.6.4) auf Konzentration und Reinheit überprüft. Die Eluate wurden bis auf weiteres bei -20 °C gelagert.

2.6.3 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA wurde unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt, da ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (RNasen) die präparierte RNA unmittelbar abbauen. Ribonukleasen weisen eine außerordentliche Stabilität auf, so dass eine Inaktivierung sehr

aufwändig ist; sämtliche Arbeiten wurden mit Handschuhen ausgeführt, der komplette Arbeitsbereich mit RNase Zap Wipes (Fa. Ambion) dekontaminiert, alle Glaswaren bei 200 °C für 6 h sterilisiert und sämtliche Lösungen wurden vor dem Autoklavieren mit 0,1 % (v/v) DMPC-Lösung (Dimethylpyrocarbonat) versetzt.

Die erforderliche Menge Kultur wurde mit dem gleichen Volumen RNAprotect (Fa. Qiagen) versetzt, pelletiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Behandeln der Kultur mit RNAprotect bewirkt eine deutlich gesteigerte Ausbeute von qualitativ hochwertiger RNA, da es die bakterielle mRNA stabilisiert, die ansonsten nur eine Stabilität von wenigen Minuten aufweist und äußerst labil ist. Laut Herstellerangaben beugt RNAprotect ebenfalls der Entstehung von stressbedingter mRNA vor, was sich wiederum in der Qualität der gewonnenen RNA zeigt.

Die Präparation der RNA erfolgte mit dem Presto Spin R Bug-Kit der Firma Molzym mit einem leicht veränderten Herstellerprotokoll.

Die gefrorenen Pellets wurden bei RT aufgetaut, mit 720 µl RS-Puffer sowie 80 µl Lysostaphin (5 mg/ml, Fa. Genmedics) versetzt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Alle weiteren Schritte entsprechen den Vorgaben des Herstellers. Die Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der so gewonnenen RNA erfolgte sowohl durch Gelelektrophorese (siehe 2.6.5) als auch mit dem Spectrophotometer (Nanodrop ND-1000, Fa. Peqlab; siehe 2.6.4). Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -20 °C in einem separaten Kühlfach gelagert.

Die auf diese Weise gewonnene RNA ist in geringem Maß mit DNA kontaminiert. Zum vollständigen Abbau der kontaminierenden DNA wurde im Anschluss an die oben beschriebene Präparation ein erneuter Verdau mit DNase I eines anderen Herstellers (Fa. Fermentas) durchgeführt. Bei dem Enzym DNaseI handelt es sich um eine Endonuclease, die sowohl Einzel- wie auch doppelsträngige DNA in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen hydrolysiert. Die Aktivierung des Enzyms erfolgt sowohl über Mg^{2+} - als auch Mn^{2+} -Ionen. Bei der Aktivierung durch Mg^{2+} -Ionen erfolgt die Doppelstrangspaltung der DNA durch Hydrolyse eines Einzelstranges der doppelsträngigen DNA unabhängig vom komplementären Strang. Erfolgt die Aktivierung hingegen durch Mn^{2+} -Ionen, spaltet das Enzym die Phosphodiesterbindungen des Doppelstrangs (Sambrook und Russel, 2001). Letztere Aktivierung ist statistisch gesehen deutlich effektiver.

Der Verdau der DNA in der RNA erfolgte nach folgendem Schema:

RNA	1 µg
DNaseI [1 u/µl]	1 µl
Puffer	1 µl
<u>Mangan [100 mM]</u>	<u>1 µl</u>
ad. RNase-freies H ₂ O (DEPC-H ₂ O)	10 µl

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 3 µl EDTA [50 mM] versetzt und erneut für 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Zugabe von EDTA ist zwingend erforderlich, da RNA in Abwesenheit eines Chelators hydrolysiert, wenn sie in Gegenwart zweiwertiger Ionen erhitzt wird (Wiame et al., 2000).

Die auf diese Weise hergestellte DNA-freie RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C in einem separaten Gefrierfach gelagert.

2.6.4 Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren mittels Spectrophotometer

An dem Photometer Nanodrop[®]ND-1000 (Fa. Peqlab) wurden Konzentration und Reinheit der isolierten DNA und RNA bestimmt. Das Nanodrop bestimmt die Absorption bei 230, 260 und 280 nm Wellenlänge. Ein Absorptionswert von 1 bei 260 nm (A_{260}) in einem salzarmen Milieu bei neutralem pH-Wert entspricht einem Gehalt von 50 µg/ml an doppelsträngiger (ds) DNA, 40 µg/ml an RNA, 33 µg/ml bei einzelsträngiger (ss) DNA und ca. 20 µg/ml bei Oligonukleotiden. Die Reinheit der präparierten Nukleinsäuren kann über die Quotienten aus A_{260}/A_{280} sowie A_{260}/A_{230} beurteilt werden. Für den Quotienten aus A_{260}/A_{280} gilt: reine DNA hat einen Absorptionswert von 1,8. Ein höherer Wert als 2,0 deutet auf RNA-Bestandteile hin, ein Wert <1,8 hingegen auf Protein- oder aromatische Verunreinigungen. Reine RNA hat einen Quotienten von 2,0. Ein Quotient <2 weist auf Verunreinigungen mit Proteinen und Aromaten hin. Der Quotient aus A_{260}/A_{230} weist auf mögliche Verunreinigungen durch Polysaccharide hin, in einer qualitativ hochwertigen Präparation sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

2.6.5 Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente, PCR-Produkte oder Plasmide auf ihre Größe, Konzentration oder Reinheit zu überprüfen, wurden diese mittels horizontaler Gelelektrophoresesysteme der Firma Peqlab aufgetrennt. Hierfür wurden 0,8 - 2 % Agarosegele, abhängig von der erwarteten Produktgröße, mit einem Volumen von 30 bis 60 ml in TAE 1x Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) gegossen. Sämtliche aufzutrennende Nukleinsäuren wurden mit mindestens 20 % der Beschwererlösung „loading dye“ der Firma Fermentas versetzt. Zur Bestimmung der Produktgröße wurden zusätzlich Standards auf das Gel appliziert. Nach der Auftrennung der Produkte durch die angelegte Spannung (ca. 130 V) wurden die Gele in 0,015 % Ethidiumbromidlösung (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenlphenanthridiniumbomid) 15 min gefärbt und unter UV-Licht im ImageMaster VDS System (Fa. Pharmacia) fotografiert. Das Ethidiumbromid interkaliert aufgrund seiner planaren Struktur in die DNA, so dass die Banden unter UV-Licht sichtbar werden.

2.6.6 Gelelution von DNA-Fragmenten

Nach Anfärbung des Agarosegels in Ethidiumbromidlösung wurde das gewünschte DNA-Fragment mittels Skalpell aus der Matrix entfernt und die DNA nach Angaben des Herstellers herausgelöst. Hierfür wurde das GeneJet Gel Extraction Kit der Firma Fermentas verwendet. Die eluierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.6.7 Aufreinigung und Aufkonzentrierung von DNA

Um aus PCR-Produkten, Verdauansätzen oder Plasmid-DNA störende Substanzen wie Primer, Salze, Nukleotide oder Polymerasen zu entfernen und um die vorhandene DNA aufzukonzentrieren, wurde für DNA mit den Fragmentgrößen von 70 bp bis zu 4 kb das MinElute Purification Kit und für Fragmentgrößen von 100 bp bis zu 10 kb das QIAquick Purification Kit (beides Fa. Qiagen) verwendet.

2.6.8 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren für die *in vitro* Amplifizierung von ausgewählten Abschnitten der DNA bzw. RNA und wurde erstmalig von Kleppe im Jahr 1971 beschrieben (Kleppe et al., 1971). Jeder PCR liegen drei Zyklen zugrunde: Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95 - 98 °C in einzelsträngige DNA gespalten. Beim Annealing wird die Temperatur abgesenkt, so dass sich sequenzspezifische Primer anlagern können. Im Zyklusschritt der Elongation werden bei 72 °C die Primer von einer thermostabile Polymerase durch den Einbau von Nukleotiden (verwendet wurden die Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP in äquimolaren Verhältnissen) verlängert. Bei der anschließenden Denaturierung des nächsten Zyklus wird die doppelsträngige DNA erneut gespalten und in den nächsten beiden Schritten amplifiziert, so dass die zwischen den Primern befindliche DNA-Region exponentiell amplifiziert wird. Die Durchführung der PCR erfolgte im PCR-Express Thermal Cycler (Fa. Hybaid) sowie im SensoQuest Labcycler (Fa. SensoQuest).

Als Polymerasen wurde Phusion™ und Phusion™ Hot Start verwendet. Die thermostabile Phusion™ DNA-Polymerase basiert auf einem *Pyrococcus*-ähnlichem Enzym und zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate sowie eine schnelle und zuverlässige Amplifizierung von sehr geringen Template-Konzentrationen aus. Aufgrund der hohen Amplifizierungsrate kommt es teilweise auch zur Entstehung von unerwünschten Nebenprodukten, die sich bei der anschließenden Gelanalyse als Schatten zeigen und sich, beispielsweise bei Klonierungen, als störend erweisen.

Bei der verwendeten Phusion™ Hot Start Polymerase handelt es sich um eine „hot start“ Polymerase, die alle oben genannten Vorteile der konventionellen Phusion™ Polymerase besitzt. Durch den Zusatz von spezifischen Antikörpern erfolgt die Amplifizierung jedoch erst bei hohen Temperaturen, bei denen die Antikörper denaturieren und die Polymerase freigesetzt wird. Dies bewirkt, dass nur das Primer-Template-Produkt ab dem Zeitpunkt der Hybridisierung amplifiziert wird.

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert und sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

2.6.9 Herstellung von cDNA

Die, wie unter 2.6.3 beschrieben, präparierte RNA musste zunächst in cDNA umgeschrieben werden, da RNA von DNA-Polymerasen nicht als Matrize benutzt werden kann und daher keine Amplifizierung möglich ist.

Die cDNA-Synthese erfolgte im PCR-Express Thermal Cycler (Fa. Hybaid). Nach photometrischer Bestimmung wurden 3 µg Gesamt-RNA in den Reaktionsansatz eingesetzt:

3 µg Gesamt-RNA	x µl
Primer RNA100 for bzw. RNA89for	1 µl
RNAse freies H ₂ O (DEPC-H ₂ O)	ad 12 µl

Der Ansatz wurde nach vorsichtigem Mischen für 5 min bei 65 °C inkubiert, auf RT abgekühlt und mit folgenden Komponenten versetzt:

dNTP-Mix	1 µl
5 x First Strand Puffer	4 µl
RNAse Out	1 µl
DEPC-H ₂ O	1,75 µl

Der Ansatz wurde 10 min bei 25 °C inkubiert, für 2 min auf 42 °C erhitzt, mit 0,5 µl [200 u/µl] der DNA- und RNA-abhängigen DNA-Polymerase Bioscript™ (Fa. Bioline, Reverse Transcriptase) versetzt und für weitere 60 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch eine Inkubation bei 70 °C für 10 min abgestoppt und die sich noch im Ansatz befindliche RNA durch Zugabe von 5 µl NaOH (1 M) und Inkubation bei 65 °C für 15 min abgebaut. Im Anschluss erfolgte die Neutralisierung des NaOH durch die Zugabe von 12,5 µl Tris-HCl (1 M, pH 7,5). Die Ansätze wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.6.10 Real-Time PCR

Mithilfe der Real-Time PCR wurde u.a. das Vorhandensein der detektierten Gegenstrangpromotoren im IS256 über den Transkriptnachweis überprüft. Die Realtime-PCR wurde durchgeführt mit dem Sybr® GreenER™ Reagent System der Firma Invitrogen (Darmstadt) im LightCycler® 480 der Firma Roche. Über den Fluoreszenzfarbstoff im Reaktionsansatz konnte der gewünschte Nachweis in Echtzeit nachgewiesen werden, indem der Farbstoff mit doppelsträngiger DNA interkalierte. Die Fluoreszenz steigt somit nach jedem Elongationsschritt an, proportional zum gebildeten Produkt.

Die Proben wurden wie folgt zusammen pipettiert für den Lauf:

Ansatz für 1 Probe:

6,2 µl H₂O

10 µl Sybr Greener

0,4 µl Primer RNA100 for bzw. RNA89 for (10 pmol)

0,4 µl Primer RNA0 rev (10 pmol)

ges. 17µl

Zu dem Ansatz wurden 3 µl cDNA gegeben und in eine Mikrotiterplatte (Firma Roche) pipettiert. Das für den Lightcycler verwendete Programm lautete:

Tabelle 2.6: Das verwendete Protokoll für die RT-PCR

I. Initiale Denaturierung	Cycles	Analysis Mode	Schritt	
	1	None	Target Temperature	95 °C
			Incubation Time	5 min
			Ramp Rate	4,4 °C/s
II: PCR	Cycles	Analysis Mode	Schritt	Denaturierung
	45	Quantification	Target Temperature	95 °C
			Incubation Time	10 s
			Ramp Rate	4,4 °C/s

			Schritt	Annealing
			Target Temperature	60 °C
			Incubation Time	10 s
			Ramp Rate	2,2 °C/s
			Schritt	Elongation
			Target Temperature	72 °C
			Incubation Time	15 s
			Ramp Rate	4,4 °C/s
III. Melting	Cycles	Analysis Mode	Schritt	Denaturierung
	1	Melting Curve	Target Temperature	95 °C
			Incubation Time	1 min
			Ramp Rate	4,4 °C/s
			Schritt	Annealing
			Target Temperature	65 °C
			Incubation Time	1 min
			Transition Rate	2,2 °C/s
			Schritt	Elongation
			Target Temperature	97 °C
			Incubation Time	/
			Ramp Rate	0,11 °C/s
			Acquisition Mode	Continuous
IV. Cooling	Cycles	Analysis Mode	Schritt	
	1	None	Target Temperature	40 °C
			Incubation Time	10 s
			Ramp Rate	1,5 °C/s
			Acquisition Mode	None

Durch die Schmelzkurvenanalyse während der Real-Time PCR und die anschließende Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.6.5) wurden die Ergebnisse bestätigt.

2.6.11 DNA-Sequenzierungen

Die in dieser Arbeit aufgeführten Sequenzdaten wurden von der Firma Sequiserve ermittelt. Die Sequenzierungen beruhen auf dem Prinzip der Didesoxy-Methode zur Kettenabbruchsynthese nach Sanger (Sanger et al., 1977).

2.6.12 Restriktionsverdau und Ligation von DNA

Für die Restriktionsverdau bei den Klonierungen wurden die Fast Digest-Enzyme der Firma Fermentas mit dem dazugehörigen Universalpuffer nach Herstellervorgabe verwendet. Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase von der Firma Fermentas verwendet.

2.6.13 Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli*

Die Herstellung elektrokompenter Zellen von *E. coli* erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Dower (Dower et al., 1988). Hierfür wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur 500 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C im Schüttelwasserbad bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,65 angezogen. Die Zellen wurden 30 min auf Eis abgekühlt und dann abgeerntet (20 min, 4000 rpm, 4 °C, ohne Bremse). Das entstandene Pellet wurde in 500 ml kaltem MilliQ resuspendiert und anschließend abzentrifugiert (20 min, 4000 rpm, 4 °C, ohne Bremse). Nach erneuter Resuspension in 250 ml kaltem MilliQ und Zentrifugation (20 min, 4000 rpm, 4 °C, ohne Bremse) wurde das Pellet in 20 ml kaltem Glycerin aufgenommen. Die Bakterien wurden in sterile Falcon-Röhrchen überführt, abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 5800 rpm, keine Bremse) und das Pellet in 0,8 ml sterilem, kaltem Glycerin resuspendiert. Die entstandenen 2 - 3 ml Zellsuspension wurden in Aliquots a 50 µl aufgeteilt, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.6.14 Herstellung chemokompenter Zellen von *E. coli*

Die Erfolgsrate bei Transformationen mit chemokompenten Zellen von *E. coli* erwies sich im Lauf dieser Arbeit deutlich höher im Vergleich zur Transformation mit elektrokompenten Zellen.

Die Herstellung von chemokompenten Zellen erfolgte nach folgendem laborinternen Protokoll. Hierfür wurde 1 ml einer 5 ml Übernachtskultur des gewünschten Stammes zum Animpfen eines 50 ml Erlenmeyerkolbens mit TYM-Nährmedium verwendet. Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C und 140 rpm inkubiert und anschließend in einem Eiswasserbad abgekühlt. Das Abernten der Zellen erfolgte in einem 50 ml Falcon-Röhrchen bei 7000 rpm für 10 min bei 4 °C. Das resultierende Pellet

wurde in 5 ml kaltem TFB1-Puffer aufgenommen, resuspendiert und erneut abgeerntet bei 2500 rpm, 10 min und 4 °C. Das Pellet wurde in 2,5 ml kaltem TFB2-Puffer aufgenommen, resuspendiert und die entstandene Suspension in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße zu je 100 µl aliquotiert. Die Lagerung der chemokompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

Pufferzusammensetzung:

TYM-Nährmedium:

2 g Bactotrypton

0,5 g Hefeextrakt

584,4 mg 5 M NaCl

246,48 mg 1M MgSO₄

ad 100 ml Aqua dest.

Autoklaviert bei 120 °C für 20 min

TFB1-Puffer:

0,3 ml 5 M Kaliumacetat

2,5 ml 1M MnCl₂

2,5 ml 2 M KCl

0,5 ml 1 M CaCl₂

7,5 ml Glycerol

ad 50 ml Aqua dest.

Sterilfiltriert

TFB2-Puffer:

2,5 ml 2 M MOPS pH 7,0

3,7 ml 1 M CaCl₂

0,25 ml 2 M KCl

7,5 ml Glycerin

ad 50 ml Aqua dest.

Sterilfiltriert

Die Komponenten wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.6.15 Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Die Aufnahme von DNA aus der Umgebung wird als Transformation bezeichnet. Dieser Vorgang findet allerdings nur selten unter nicht selektiven Bedingungen statt, so dass die Elektroporation eine zweckmäßige Methode zur Transformation darstellt. Diese Methode ist an die von Dower beschriebene Methode angelehnt und leicht differenziert (Dower et al., 1988).

Für die Elektroporation wurden 50 μ l elektrokompetente Zellen auf Eis mit 2 μ l Plasmid-DNA versetzt und für 1 min inkubiert, damit sich die DNA an die Zelloberfläche anlagern kann. Der gesamte Ansatz wurde luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (25 x 2 mm Elektrodenlücke, Nr. 71-2020, Fa. Peqlab) pipettiert und sofort bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω elektroporiert (GenePulser, PulseController, Fa. BioRad). Hierbei wurde der Kondensator bei einer Spannung von 2,5 kV und einem Widerstand von 200 Ω auf eine Kapazität von 25 μ F aufgeladen. Die Zeitkonstante τ , der Zeitraum in dem der elektrische Impuls auf 37 % seiner Leistung abfällt, lag durchschnittlich bei 4,8 ms. Für optimale Ergebnisse sollte die Zeitkonstante τ einen Wert von 4,3 ms nicht unterschreiten. Um die Zellen nicht zu großem Stress auszusetzen, wurden sie unmittelbar nach der Elektroporation in 1 ml LB-Medium aufgenommen, in ein steriles Reagenzglas überführt und für 1,5 h im Schüttler (Certomat U, 150 rpm) bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen wurden die Zellen unverdünnt und 1:10 und 1:100 verdünnt auf LB-Amp 40 Platten ausgebracht. Das Verdünnen der Zellen erfolgte mit LB-Medium. Zur Aufkonzentrierung wurde die restliche Zellsuspension zentrifugiert (10.000 rpm, Bremse 7, RT, 3 min) und das Pellet in 100 μ l LB-Medium resuspendiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.6.16 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen nach Morrison (1977)

Für die Transformation wurden bis zu 5 μ l Plasmid-DNA zu 50 μ l frisch aufgetauten, chemokompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen im Wasserbad auf 42 °C erhitzt und dadurch einem so genannten heat shock unterzogen. Unmittelbar danach wurden die Zellen für die Dauer von drei Minuten auf Eis abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 500 μ l frischem LB-Medium, mit dem die Zellen in

sterile Reagenzgläser überführt wurden. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 135 rpm für die Dauer von 40 – 60 Minuten. Danach erfolgte das Ausplattieren auf Selektionsplatten, in der Regel in den Verdünnungsstufen unverdünnt, 1:10, 1:100 sowie 1:1000 verdünnt. Die Selektionsplatten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

2.6.17 Herstellung elektrokompetenter *S. aureus*-Zellen

Nach dem laborinternen Protokoll wurde mit einer Übernachtskultur in BHI eine Hauptkultur von 200 ml BHI im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 37 °C und 120 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5–0,55 inkubiert. Die Kultur wurde pelletiert (Sorval Evolution, 10 min, RT, 6.000 rpm, Bremse 4) und mehrere Male mit Glycerinlösung (10 %, verdünnt mit Aqua dest.) resuspendiert. Glycerin dient als Kryoprotektor und die Konzentration wurde stufenweise verringert: Zunächst wurden die Zellen mit 1 Volumen Glycerinlösung gewaschen, dann mit dem ½ Volumen, dem 1/20 Volumen und schlussendlich mit dem 1/50 Anteil an Glycerinlösung eingeeengt. Die Zellen wurden photometrisch vermessen und auf eine finale Konzentration von $1-5 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml verdünnt, wobei eine OD₆₀₀ von 1 einer Konzentration von 2×10^9 Zellen/ml entspricht. Die Zellen wurden zu je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden elektrokompetente Zellen von *S. aureus* RN4220, *S. aureus* HG001, *S. aureus* 8325, *S. aureus* 15981 sowie *S. aureus* USA300 hergestellt.

2.6.18 Transformation von elektrokompetenten *S. aureus*-Zellen

Die Transformation erfolgte im Wesentlichen nach der von Augustin und Götz beschriebenen Methode zur Elektroporation in Staphylokokken (Augustin und Götz, 1990).

Für eine Elektroporation von Plasmiden in die oben genannten Staphylokokkenstämme wurden 50 µl elektrokompetente Zellen bei RT aufgetaut, mit bis zu 5 µl Plasmid-DNA versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette (25 x 2 mm Elektrodenlücke, Nr. 71-2020, Fa. Peqlab) pipettiert und mit 2 kV, 100 Ω und 25 µF elektroporiert (Fa. BioRad, GenePulser, Gene Controller). Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen sofort mit 2 ml angewärmten BHI aus der Küvette entnommen und in ein steriles Reagenzglas überführt. Die Regeneration erfolgte durch

Schütteln bei 37 °C und 165 rpm (Fa. B. Braun, Certomat U) für die Dauer von 2 Stunden. Für die anschließende Selektion wurden die transformierten Zellen auf verschiedene Selektionsnährmedien ausplattiert in den Verdünnungsstufen: konzentriert, unverdünnt, 1/10 sowie 1/100. Das Verdünnen erfolgte mit BHI, zur Herstellung des Konzentrats wurde das Reaktionsgefäß kurz abzentrifugiert (15.300 rpm, 30 s, RT) und das entstandene Pellet in frisches BHI aufgenommen. Die Platten wurden bei 37 °C für 48 h inkubiert.

2.7 Bestimmung von Resistenzen

Das Vorhandensein von Resistenzen gegenüber Antibiotika wurde mit den im Folgenden vorgestellten Verfahren überprüft:

2.7.1 Agardiffusionstest

Beim Agardiffusionstest wurden mit Antibiotika versetzte Testplättchen (Fa. Oxoid) auf eine mit dem zu testenden Organismus überschichtete Platte aufgebracht. Die Überschichtung erfolgte, indem Zellmaterial in ein 5 ml TSB-Nährmedienröhrchen eingebracht wurde bis eine leichte Trübung zu erkennen war. Von dieser Suspension wurde 1 ml in ein weiteres TSB-Röhrchen mit 4 ml Inhalt überführt und gevortext. Mit dieser Suspension wurde eine Müller Hinton-Agarplatte überschichtet und das überschüssige Medium unmittelbar wieder abgenommen. Nach dem Abtrocknen der Platten wurden diese mit den Testplättchen beschickt und für die Dauer von 12 h bei 37 °C bebrütet. Zur Auswertung wurde der Hemmhofdurchmesser ausgemessen und mit den Referenzwerten der EUCAST (European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing) abgeglichen.

2.7.2 Minimale Hemmkonzentration (MHK)

Die minimale Hemmkonzentration beschreibt die geringste Antibiotikakonzentration, bei der kein bakterielles Wachstum mehr stattfinden kann. Durch eine schrittweise Halbierung der Antibiotikumkonzentration bietet die MHK gegenüber dem Agardiffusionstest den Vorteil,

dass relativ geringe Unterschiede in der Resistenz bzw. der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika festgestellt werden können.

Die MHK-Bestimmung erfolgte in 96 Well Polystyrolplatten mit rundem Boden (Fa. Greiner) in Müller Hinton-Nährmedium nach dem von Wiegand beschriebenen Protokoll (Wiegand et al., 2008).

Ausgehend von einer Übernachtskultur wurde die Hauptkultur im Verhältnis 1:200 angeimpft und im Schüttler bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert. Eine OD₆₀₀ entspricht dabei 1–2 x 10⁹ Zellen/ml. Es erfolgte eine serielle Verdünnung der Bakteriensuspension mit frischem Nährmedium bis zu der Stufe 10⁵.

In das jeweils erste Well einer Mikrotiterplatte wurde eine definierte Konzentration Antibiotikallösung gegeben und mit halbkonzentriertem Medium auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Durch serielle Passagierung von 100 µl wurde die Antibiotikakonzentration pro Well jeweils halbiert. Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl der verdünnten Bakteriensuspension, so dass eine finale Zellzahl von 5 x 10⁴ pro ml vorlag. Für eine optimale Durchmischung wurde die Mikrotiterplatte für 5 min bei 4000 rpm geschüttelt (Fa. Flow Laboratories, Titertek) und im Anschluss bei 37 °C bebrütet. Das Ablesen der MHK erfolgte nach 16, 24 und 48 h.

2.7.3 Epsilometer test (E-Test)

Der Epsilometer test oder E-Test ist eine simplifizierte MHK und wurde zur schnellen Resistenzbestimmung eingesetzt. Der E-Test besteht aus einem Plastikstreifen, der mit einem Antibiotikum in absteigender Konzentration versehen ist und mit einer aufgedruckten Skala versehen ist. Anhand der Skala kann bei erfolgtem Wachstum unmittelbar die minimale Hemmkonzentration abgelesen werden.

Der E-Teststreifen wurde auf eine, wie unter 2.7.1 beschrieben, frisch mit einer Bakteriensuspension beimpfte Agarplatte aufgelegt und angedrückt. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet und ausgewertet. Im Vergleich zum Agardiffusionstest ist diese Methode deutlich sensitiver und ermöglicht eine recht genaue Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration, im Vergleich zur regulären MHK ist diese Methode zwar etwas ungenauer, bietet allerdings einen enormen Zeitvorteil.

2.8 Klonierungsstrategie des Testsystems pA3

Zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz des IS-Elements 256 wurde ein Indikatortransposon nach Valle et al. (2007) konstruiert, um die Transpositionshäufigkeit des IS256 aus dem Plasmid in das Genom beurteilen zu können. Die sichere Detektion der erfolgreichen Transposition wurde ermöglicht durch eine an das IS256 angefügte Erythromycin-Resistenzkassette und einen temperatursensitiven *ori* im Plasmid. Erfolgt Wachstum auf Erythromycin-haltigen Nährmedien bei einer Temperatur, die keine Plasmidreplikation zulässt, kann von einer erfolgreichen Transposition des IS256 vom Plasmid in das Genom ausgegangen werden.

Ziel der Klonierung ist die funktionelle Einheit aus dem Plasmid pBT2 zusammen mit dem rekombinanten IS256-Element, bestehend aus dem nativen IS256-Element und der Erythromycin-Resistenzkassette.

Als Basis für das neue Plasmid diente das Plasmid pBT2 (Brückner et al., 1997). Dies ist ein Shuttlevektor für grampositive und gramnegative Organismen und verleiht gramnegativen Bakterien eine Resistenz gegenüber Ampicillin durch das Gen *bla*, das für eine Beta-Laktamase kodiert. Es verleiht grampositiven Bakterien eine Resistenz gegen Chloramphenicol durch das Resistenzgen Chloramphenicol Acetyltransferase (*cat*) und verfügt in grampositiven Bakterien zusätzlich über einen temperatursensitiven origin of replication (*ori*). Der Vektor pBT2 wurde aus dem Stamm *E. coli* WK6 präpariert.

Die Resistenzkassette gegenüber dem Makrolidantibiotikum Erythromycin *ermB* wurde aus dem Plasmid pUC19 Ery mit den Primern *ermBfor* und *ermBrev* amplifiziert, die Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich in Tabelle 2.3. Besonders zu erwähnen ist der Primer *ermBfor*, der dazu diente, einen Großteil des rechten inverted Repeats (IRR) des IS256 an die Resistenzkassette anzufügen. Daher war der Primer relativ groß - er hatte eine Länge von 54 Nukleotiden - und wies eine Schmelztemperatur von 84,0 °C auf. Es erfolgte eine PCR mit der Phusion-Polymerase, wie unter 2.6.8 beschrieben, unter Verwendung eines breiten Temperaturgradienten von 10 °C. Als Vorlage für das IS256 wurde das in dem *S. aureus*-Stamm SA 137/93G befindliche Element mit dem Primerpaar IS IRLfor und IS IRRrev per PCR amplifiziert. Die Sequenzen der Nukleotide wurden bereits in Tabelle 2.3, die Methode der PCR in Abschnitt 2.6.8 eingehend beschrieben.

Für die weiteren Arbeitsschritte wurden die drei Einzelkomponenten folgenden Restriktionsverdauen unterzogen: die Resistenzkassette *ermB* mit dem rechten IR ebenso wie

das Vektorrückgrat pBT2 wurden mit den Enzymen *HindIII* und *XbaI* verdaut, das IS256-Element wurde mit *EcoRI* sowie *XbaI* verdaut.

Im Anschluss an die Restriktionsverdauung erfolgte der erste Ligationsschritt: die Ligation des Vektors mit dem Insert der Resistenzkassette *ermB*.

Das Prinzip von Restriktionsverdauen und Ligationen wurde bereits unter 2.6.12 beschrieben. 5 µl des potentiell klonierten Plasmids wurden für eine CaCl₂-Transformation mit Zellen von *E. coli* JM83 verwendet wie unter 2.6.16 beschrieben. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar, dem 40 µg/ml Ampicillin zugesetzt wurden. Nach der Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C erfolgte das Überimpfen der Klone in das Flüssignährmedium LB, das ebenfalls mit 40 µg/ml Ampicillin angereichert wurde.

Die Plasmid-DNA der überprüften Klone wurde zu der Firma Sequiserve geschickt, um anhand der Sequenzen von einer erfolgreichen Klonierung ausgehen zu können. Sämtliche Sequenzen befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

Die erfolgreich klonierten Zellen wurden als pBT2 incl. *ermB* in *E. coli* JM83 bezeichnet und Aliquots bei -70 °C als Dauerkulturen angelegt.

Im nächsten Klonierungsschritt wurde das erfolgreich klonierte Plasmid pBT2 incl. *ermB* mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* im Doppelverdau geschnitten. Erneut folgte eine Ligation von dem verdauten Vektor pBT2 incl. *ermB* und dem IS256-Element mit T4-DNA Ligase nach den Angaben des Herstellers (Fa. Fermentas).

Ein Aliquot des Ansatzes von 5 µl wurde erneut für eine CaCl₂-Transformation von *E. coli* JM83-Zellen eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Die Zellen wurden auf Ampicillin-haltigem LB-Agar [40 µg/ml] ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Potentielle, gewachsene Klone wurden synchron auf Ampicillin-haltige LB-Platten und in flüssiges Ampicillin-haltiges LB-Medium überimpft (jeweils 40 µg/ml). Die Platten wurden bei 37 °C bebrütet, die Flüssigmedien ebenfalls bei 37 °C und bei 135 rpm geschüttelt.

Die aus den Flüssigkulturen gewonnene Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 2.6.2) wurde sowohl unverdaut als auch mit *EcoRI* verdaut mittels Gelelektrophorese auf Größe und Qualität untersucht.

Die auf diese Weise auf eine erfolgreiche Klonierung überprüften Plasmide wurden zusätzlich sequenziert (Fa. Sequiserve).

Von den Kulturen wurden, wie unter 2.4 beschrieben, Dauerkulturen angelegt und das Plasmid als pA3 bezeichnet. Die Klonkarte sowie die Vektorsequenz befinden sich im Anhang der vorliegenden Arbeit.

Das Plasmid pA3 wurde zunächst in den *S. aureus*-Stamm *S. aureus* RN4220 elektroporiert, um das staphylokokkenspezifische Restriktionssystem zu umgehen. Danach erfolgte die Elektroporation in die folgenden *S. aureus* Stämme: *S. aureus* HG001, *S. aureus* 8325 und *S. aureus* 15981. Die Methode zur Elektroporation in Staphylokokken wurde bereits in Abschnitt 2.6.18 beschrieben.

2.8.1 Klonierungsstrategie der Transposasemutante pA3 Δ tnptr

Um die Transpositionsfrequenz mit dem Plasmid pA3 sicher bestimmen zu können, wurde eine immobilisierte Variante des gleichen Plasmids generiert. Die Immobilisierung der Transposase wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Sowohl bei Loessner et al. (2002) als auch bei Valle et al. (2007) erfolgte die Inaktivierung durch die Deletion unterschiedlich großer Fragmente (20 bzw. 64 bp) innerhalb des Gens. Im Rahmen dieser Arbeit jedoch erfolgte die Inaktivierung durch das Einfügen eines Linker-Moleküls, so dass letztlich auch eine Rasterschubmutation hervorgerufen wurde.

Für den Linker wurde ein Oligonukleotid mit einer Länge von 10 bp verwendet (Fa. Metabion), so dass eine Rasterschubmutation entstand. Das Einfügen des Linkers erfolgte an Position 363 des IS256, an einer natürlich vorkommenden Restriktionsschnittstelle des Enzyms *MscI*. Der Verdau erfolgte nach den Angaben der Firma Fermentas. Das Einsetzen des Linkers erfolgte nach folgendem Protokoll:

Linearisierte DNA	5 μ l
Phosphorlierter Linker	5 μ l
Ligationspuffer (10x)	2 μ l
PEG 4000-Lösung (50 %)	2 μ l
<u>T4-DNA-Ligase (2 u)</u>	<u>1 μl</u>
MilliQ	ad 20 μ l

Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für die Dauer von 2 h inkubiert und anschließend zu gleichen Teilen aufgeteilt und zu jeweils 50 µl chemokompetenter Zellen gegeben und transformiert (wie unter 2.6.16 beschrieben).

Innerhalb des Linkers befindet sich eine Schnittstelle des Enzyms *SmaI*. Eine erfolgreiche Klonierung des Linkers konnte anhand des Restriktionsverhaltens der Klone also einfach beurteilt werden, denn eine erfolgreiche Klonierung zeigte sich in der Gelelektrophorese durch ein positives Restriktionsverhalten mit dem Enzym *SmaI*, während es in Anwesenheit des Enzyms *MscI* unverdaut blieb. Nach diesem erfolgreichen Test wurden die Plasmide zum Sequenzieren geschickt (Fa. Sequiserve) und als pA3Δtnptr bezeichnet. Die Sequenz des verwendeten Linkers wurde bereits in Tabelle 2.3 genannt und die Gesamtsequenz der Mutante befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

2.8.2 Klonierungsstrategie der pA3 σ^B -Mutanten

Für die Mutation des Plasmids pA3 wurden die Mutagenese-Primer SigB mut forward sowie SigB mut reverse generiert, die Sequenzen der Primer befinden sich in Tabelle 2.2 dieser Arbeit. Ziel der Mutation ist die Zerstörung bzw. erhebliche Veränderung der Zielsequenz des vermeintlichen Promotors. Die Primer wurden gemäß der Anleitung des Herstellers NEB konstruiert, nämlich HPLC-aufgereinigt und am 5'-Ende phosphoryliert. Die so hergestellten Primer wurden für das Phusion Site Directed Mutagenesis Kit verwendet. Dieses Kit kann zum Einfügen von verschiedenen Mutationen in Plasmide bis hin zu einer Größe von 10 kb verwendet werden. Bei diesem Kit beinhalten die Primer die gewünschten Mutationen und das lineare PCR-Produkt wird im Anschluss an die PCR religiert. Um zu verhindern, dass das unmutierte Template die weiteren Schritte verfälscht, wurde das Ursprungsplasmid in einer sehr geringen Konzentration vorgelegt (zwischen 10 pg und 1 µg). Während der Amplifikation kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten, mutierten Plasmids, so dass der Anteil von Template-DNA verschwindend gering ist.

Als Template diente das Plasmid pA3 aus *S. aureus* HG001, das über eine Standard-PCR mit Phusion-Polymerase vervielfältigt wurde. Um sicherzustellen, dass nur das gewünschte Produkt für eine Religation und eine anschließende Transformation in Frage kam, wurde das gewünschte Fragment per Gelelektion entfernt (siehe Abschnitt 2.6.6) und nach Anweisung des Herstellers religiert. Im Anschluss daran wurde eine Transformation mit chemokompetenten *E. coli*-Zellen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.6.16).

Bedingt durch die eingefügte Mutation entstand ein verändertes Restriktionsmuster des Plasmids, so dass eine erfolgreiche Klonierung durch einen *AseI*-Verdau überprüft werden konnte. Hierfür wurde die Plasmid-DNA isoliert (wie unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben) und mittels Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.6.12) auf ein verändertes Restriktionsmuster untersucht. Bei den Klonen, die *AseI*-verdaubar waren, erfolgte im Anschluss eine Sequenzierung durch die Firma Sequiserve.

Das erfolgreich klonierte Plasmid pA3 σ^B mut wurde zunächst in den *S. aureus*-Stamm *S. aureus* RN4220 elektroporiert und anschließend in den Stamm *S. aureus* HG001 sowie *S. aureus* USA300.

Die Gesamtsequenz des Plasmids befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

2.8.3 Klonierungsstrategie der pA3 σ^A -Mutanten

Die Klonierung des Plasmids pA3 σ^A mut verlief ähnlich zu der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Klonierung von pA3 σ^B mut. Die Mutationen wurden mit dem Primerpaar SigA -10mut for und SigA -10 mut rev eingeführt.

Unglücklicherweise ergab sich durch das Einführen der Mutation kein anderes Restriktionsmuster. Um das Sequenzieren sämtlicher Klone zu umgehen, wurde eine Selektions-PCR mit dem Primerpaar SigA mut checkfor und SigA mut checkrev durchgeführt. Nur bei Vorliegen einer Mutation kann der Reverse-Primer vollständig hybridisieren, so dass sich bei den mutierten Plasmiden in der anschließenden Gelelektrophorese eine stärkere Produktbande zeigte im Vergleich zu den unmutierten Plasmiden. Im Anschluss an die Selektions-PCR wurden die als erfolgreich mutierten Plasmide sequenziert. Nach Bestätigung der Mutation wurde das Plasmid zunächst in *S. aureus* RN4220 und im Anschluss in *S. aureus* HG001 elektroporiert.

2.8.4 Klonierung der pA3 $\sigma^{A/B}$ -Mutanten

Die Klonierung der $\sigma^{A/B}$ -Doppelmutante erfolgte unter der Verwendung des Plasmids pA3 σ^A mut als Template, dessen Klonierung im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde. Die Einführung der Mutation erfolgte mit dem bereits bei der pA3 σ^B mut-Klonierung verwendeten Primerpaar SigBmut forward und SigBmut reverse. Die Durchführung in dieser

Reihenfolge ermöglichte eine Überprüfung der erfolgreichen Klonierung per Restriktionsverdau mit dem Enzym *AseI*, ehe das Plasmid sequenziert wurde (Fa. Sequiserve). Das mutierte Plasmid wurde erneut zunächst in *S. aureus* RN4200 und dann in *S. aureus* HG001 elektroporiert.

2.9 Bestimmung der Transpositionsfrequenz

Für die Determinierung der Transpositionsfrequenz wurde, ausgehend von einer Übernacht-Vorkultur, eine Hauptkultur in TSB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft und bei 30 °C und 140 rpm geschüttelt. Nach 30 min Inkubationszeit wurde eine Probe genommen und photometrisch vermessen. Die Proben wurden entsprechend ihrer OD seriell verdünnt und auf Columbia-Agar, TSA mit Erythromycin [50 µg/ml] sowie TSA mit Erythromycin [50 µg/ml] und Chloramphenicol [40 µg/ml] ausgespatelt. Das Vermessen und Ausspateln wurden stündlich wiederholt.

Nach dem Ausspateln wurden die Platten bei exakt 45 °C für die Dauer von 48 h bebrütet. Das Ausspateln auf Columbia-Agar diente der Bestimmung der Lebendzellzahl, das Ausspateln auf Erythromycin-haltigem TSA der Determinierung der Transpositionsfrequenz und das Ausspateln auf dem Erythromycin- und Chloramphenicol-haltigem Agar erfolgte um die Anzahl der Zellen zu bestimmen, bei denen das Plasmid komplett ins Genom integriert wurde. Die eigentliche Berechnung der Transpositionsfrequenz ergab sich aus der Anzahl der Zellen mit transponiertem IS256r abzüglich der Zellen mit rekombiniertem Vektor dividiert durch die Lebendzellzahl.

Sämtliche Bestimmungen wurden im Doppelansatz durchgeführt, aus dem ein Mittelwert gebildet wurde. Zur sicheren Bestimmung wurden alle im Ergebnisteil aufgeführten Läufe mindestens dreimal wiederholt.

Für den Fall, dass die Transpositionsfrequenz unter dem Einfluss von Antibiotika durchgeführt wurde, erfolgte die Zugabe der Antibiotika zu dem Zeitpunkt der ersten Messung der optischen Dichte, also nach 30 min.

Die Zugabe der Antibiotika Ciprofloxacin, Linezolid und Vancomycin erfolgte in subinhibitorischer Konzentration (0,1 x MHK), die exakte Dosierung wurde anhand der in Kapitel 2.7.2 beschriebenen Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ausgerichtet, der wiederum ein Epsilometertest (siehe Abschnitt 2.7.3) vorausging.

2.10 Resistenzhöhung durch Passagierung mit stufenweise erhöhter Antibiotika-Konzentration

Der Versuch erfolgte in Reagenzgläsern mit je 5 ml BHI-Nährmedium und wurde bei 32 °C und 135 rpm durchgeführt. Verwendet wurden die *S. aureus* Stämme *S. aureus* HG001 pBT2, *S. aureus* HG001 incl. pA3SigBmut, *S. aureus* USA300 pBT2 sowie *S. aureus* USA300 incl. pA3SigBmut. Dem Nährmedium wurde stets Chloramphenicol in der Konzentration 20 µg/ml zugesetzt, um die Stabilität der Plasmide zu gewährleisten.

Mit jedem der genannten Bakterienstämme wurde eine Vorkultur angeimpft und über Nacht inkubiert. Mit jeder Vorkultur wurde jeweils drei neue Hauptkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und für 48 h inkubiert. Die Hauptkulturen wiesen eine Vancomycin-Anfangskonzentration von 1 µg/ml auf, die bei erfolgreichem Wachstum schrittweise erhöht wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Die Verbreitung von IS256 innerhalb von klinischen *S. aureus*-Isolaten

Dass IS-Elemente einen entscheidenden Beitrag zur Genomflexibilisierung und Steigerung der Pathogenität leisten können, wurde bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit beschrieben. Insbesondere das IS256 ist in der Lage, Resistenzentwicklungen zu fördern (Maki et al., 2004; Jansen et al., 2007). Aus diesem Grund wurde das Vorkommen des IS256 in verschiedenen, klinisch relevanten Stämmen untersucht. Um einen ersten Eindruck zu bekommen, wurden Isolate der Subtypen Rhein-Hessen (spa-Typ t002), Barnimer und CA-MRSA untersucht. Die Stämme wurden von Frau Oedenkoven vom Referenzlabor für Staphylokokken in Bonn freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die genomische DNA der Isolate wurde, wie in Abschnitt 2.6.1 beschrieben, isoliert und mittels PCR mit den Primern ISIRLfor sowie ISIRRrev spezifisch auf das Vorhandensein des IS256 untersucht (die verwendeten Primer wurden in Tabelle 2.3 aufgelistet und die PCR in Abschnitt 2.6.8 eingehend beschrieben). Ein Aliquot des PCR-Ansatzes wurde mit Beschwererlösung versetzt, auf Agarosegele appliziert und elektrophoretisch aufgetrennt wie unter 2.6.5 beschrieben.

Als Referenzorganismen wurden die Stämme *S. aureus* 137/93G sowie *E. coli* JM109 verwendet. Das Vorhandensein von IS256 im Stamm *S. aureus* 137/93G wurde bereits durch Jansen et al. (2007) beschrieben. Bei *Escherichia coli* wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt kein IS256 detektiert, daher wurde dieser Stamm als Negativkontrolle verwendet.

Die Nachweis-PCR wurde ausschließlich mit Filterspitzen angesetzt und das Pipettieren erfolgte in einem Nachbarlabor, in dem nicht mit Bakterien gearbeitet wird, um eine Kontamination möglichst auszuschließen.

Die untersuchten *S. aureus*-Stämme sind in der folgenden Abbildung aufgeführt.

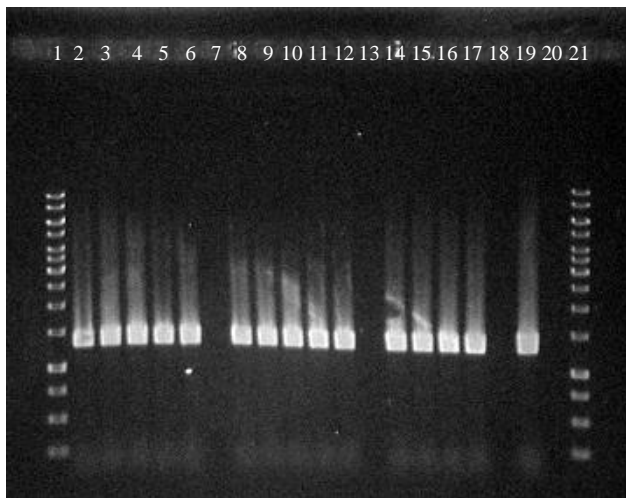


Abbildung 3.1: PCR-Produkte einer IS256-Nachweis-PCR, untersucht wurde die genomische DNA der rechts aufgeführten *S. aureus*-Stämme.

<u>Standards</u>
Spur 1/21: 1 kb ladder
<u>PCR-Produkte</u>
Spur 2: <i>S. a.</i> LT1123/09 (CA-MRSA)
Spur 3: <i>S. a.</i> LT61/09 (CA-MRSA)
Spur 4: <i>S. a.</i> LT205/09 (CA-MRSA)
Spur 5: <i>S. a.</i> LT808/09 (CA-MRSA)
Spur 6: <i>S. a.</i> LT846/09 (CA-MRSA)
Spur 8: <i>S. a.</i> LT566/09 (Barnimer)
Spur 9: <i>S. a.</i> LT1120/09 (Barnimer)
Spur 10: <i>S. a.</i> LT1356/09 (Barnimer)
Spur 11: <i>S.a.</i> LT1519/09 (Barnimer)
Spur 12: <i>S. a.</i> LT1589/09 (Barnimer)
Spur 14: <i>S. a.</i> LT1064/05 (Rhein-Hessen)
Spur 15: <i>S. a.</i> LT1772/04 (Rhein-Hessen)
Spur 16: <i>S. a.</i> LT586/05 (Rhein-Hessen)
Spur 17: <i>S. a.</i> LT1057/07 (Rhein-Hessen)
Spur 19: <i>S. a.</i> 137/93G (Positivkontrolle)
Spur 20: <i>E. c.</i> JM109 (Negativkontrolle)

Wie aus der Abbildung 3.1 hervorgeht, konnte das IS256 in allen untersuchten klinischen Stämmen nachgewiesen werden. Die Amplifikate weisen die errechnete Größe auf und entsprechen der Größe der Positivkontrolle. Zusätzlich wurden die PCR-Produkte der cMRSA (Spur 2-6) und des Rhein-Hessen Subtyps (Spur 14-17) per Sequenzierung als IS256 bestimmt. Ein Alignment der gefundenen Sequenzen befindet sich im Anhang dieser Arbeit. Bei der Negativkontrolle konnte erwartungsgemäß kein Produkt nachgewiesen werden.

3.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Um die subinhibitorischen Konzentrationen der Antibiotika Ciprofloxacin, Vancomycin sowie Linezolid für die nachfolgenden Experimente zu bestimmen, wurde die minimale Hemmkonzentration des verwendeten Stammes mit und ohne das gewünschte Plasmid (pA3 und pA3 Δ tnptr), wie unter 2.7.2 beschrieben, bestimmt und die ermittelten Werte in der folgenden Tabelle aufgelistet.

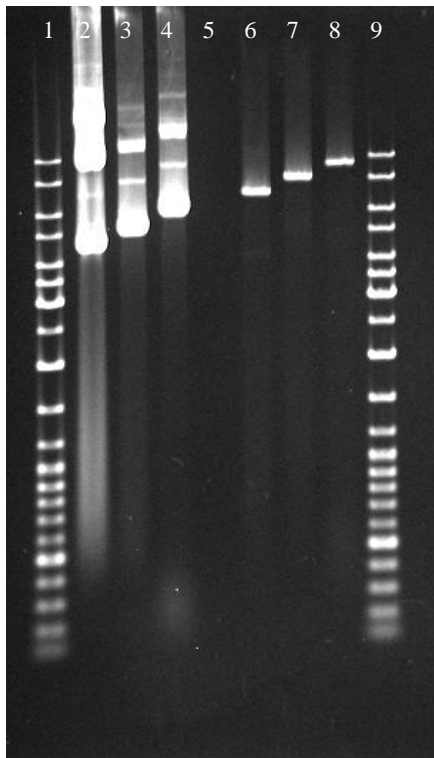
Tabelle 3.1: MHK-Werte des in dieser Arbeit verwendeten Stammes *S. aureus* HG001 mit und ohne die Plasmide pA3 und pA3 Δ tnptr.

Stamm	MHK Ciprofloxacin	MHK Vancomycin	MHK Linezolid	MHK Tigecyclin
<i>S. aureus</i> HG001	0,4 μ g/ml	2,0 μ g/ml	0,75 μ g/ml	0,075 μ g/ml
<i>S. aureus</i> HG001 pA3	0,4 μ g/ml	2,0 μ g/ml	0,75 μ g/ml	0,075 μ g/ml
<i>S. aureus</i> HG001 pA3 Δ tnptr	0,4 μ g/ml	2,0 μ g/ml	0,75 μ g/ml	0,075 μ g/ml

Wie aus der Tabelle 3.1 hervorgeht, führten weder das Plasmid pA3 noch sein Derivat in dem Stamm *S. aureus* HG001 gegenüber den getesteten Antibiotika (Ciprofloxacin, Linezolid, Vancomycin und Tigecyclin) zu einem Resistenzanstieg.

3.3 Das Testsystem pA3 zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz

Wie bereits von Valle et al (2007) und unter 2.8 eingehend beschrieben, erfolgte die Klonierung des Testplasmids pA3 (pBT2 incl. *ermB* und IS256) in mehreren Schritten. Die Produkte der einzeln durchgeführten Klonierungsschritte wurden in der folgenden Abbildung zusammengefasst. Abschließend wurde über die multiple cloning site (mcs) des Plasmids pBT2 sequenziert.



<u>Standards</u>	
Spur 1/9:	1 kb DNA ladder
<u>Plasmide</u>	
Spur 2:	Plasmid pBT2, unverdaut
Spur 3:	Plasmid pBT2 incl. <i>ermB</i> , unverdaut
Spur 4:	Plasmid pA3 (pBT2 incl. <i>ermB</i> und IS256), unverdaut
Spur 6:	Plasmid pBT2, linearisiert durch Verdau mit <i>EcoRV</i>
Spur 7:	Plasmid pBT2 incl. <i>ermB</i> , linearisiert durch Verdau mit <i>EcoRV</i>
Spur 8:	Plasmid pA3 (pBT2 incl. <i>ermB</i> und IS256), linearisiert durch Verdau mit <i>EcoRV</i>

Abbildung 3.2: Die Entstehung des Plasmids pA3. Zum Vergleich der Leervektor pBT2 (Spur 2 bzw. 6), der Übergangsvektor pBT2 incl. *ermB* (Spur 3 bzw. 7) und der Vektor pA3 (Spur 4 bzw. 8), jeweils verdaut mit *EcoRV* und unverdaut.

Die erfolgreiche Klonierung des Plasmids pA3 ist der Abbildung 3.2 zu entnehmen. In Spur 6 befand sich der, mittels Verdau mit *EcoRV*, linearisierte Vektor pBT2. Die mit dem Standard überprüfbare Größe von 7 kb entsprach der zu erwartenden Größe von 6971 bp. Gleiches gilt für die Plasmide pBT2 incl. *ermB* (Spur 7) und pA3 (Spur 8), deren Größen von 8007 bp und 9285 bp den Produkten im Gel entsprachen.

Das resultierende Plasmid pA3 wird in der folgenden Abbildung 3.3 schematisch dargestellt:

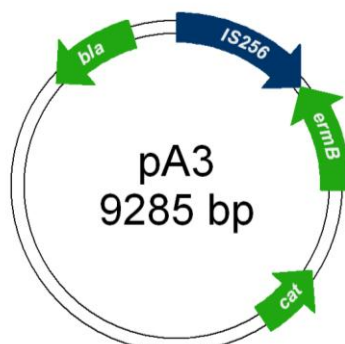


Abbildung 3.3: Das Testplasmid pA3, basierend auf dem Vektor pBT2 und einem IS256-Element in das eine Resistenzkassette gegen Erythromycin eingefügt wurde (IS256r).

Die für die Versuche verwendeten Bakterienstämme mit der gewünschten Plasmidvariante wurden jeweils frisch aus der Glycerinkultur auf TSA-Platten ausgestrichen, die mit Erythromycin [25 µg/ml] angereichert waren. Die Platten wurden für 36 h bei 30 °C inkubiert. Ausgehend von diesen Platten erfolgte das Animpfen der Vorkultur, mit der wiederum die Hauptkulturen angeimpft wurden.

Nach der Ausplattierung der verdünnten Kulturaliquots in Doppelbestimmung wurden die ausgespatelten Platten bei 45 °C für 48 h inkubiert und komplett ausgezählt, um statistische Fehler zu minimieren. Das angewendete Verdünnungsschema befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

3.4 Bestimmung der Transpositionsfrequenz

Transpositionen sind seltene Ereignisse und für das Bakterium nicht ohne Risiko, denn, wie bereits beschrieben, kann die Insertion eines IS-Elementes zu gravierenden Veränderungen innerhalb des Chromosoms führen (Ziebuhr et al., 1999; Kharat et al., 2006). Die quantitative Bestimmung der Transpositionen wurde daher über die Berechnung der Transpositionsfrequenz durchgeführt (siehe Abschnitt 2.9).

Für die Bestimmung der Transpositionsfrequenz wurde die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten (KBE), die auf Erythromycin-haltigem Nährmedium wuchsen durch die Anzahl der KBE, die auf Columbia-Agar wuchsen, dividiert. Um eventuelle Rekombinationsereignisse zu quantifizieren, wurde zuvor die Anzahl der KBE, die auf Erythromycin- und Chloramphenicol-haltigem Nährmedium wuchsen von der Anzahl der Erythromycin-resistenten Zellen subtrahiert.

Diese Methode wurde per PCR auf ihre Funktionalität überprüft. Hierbei wurde bei mehreren Kolonien, die auf den Selektionsnährmedien gewachsen sind, das Vorhandensein des IS256r-Elements im Genom ebenso kontrolliert (Primerpaar ISIRLfor und ISIRRrev) wie das mögliche Vorhandensein des Chloramphenicolresistenzgens *cat* (Primerpaar catpA3/884for und catpA3/1551rev). Dabei zeigte sich, dass diese Methode gut geeignet war um die Transpositionsfrequenz von IS256r möglichst genau zu bestimmen.

3.4.1 Transpositionsaktivität von pA3 in *S. aureus* RN4220

Die Verwendung des Stammes *S. aureus* RN4220 erfolgte aufgrund seiner besonderen Eigenschaften - der Stamm weist kein natürlich vorkommendes IS256-Element auf, das die Ergebnisse des rekombinant eingebrachten IS256r hätte verfälschen können. Aufgrund einer Mutation im *hsdR*-Gen des *SauI* Typ I-Restriktionssystems (Waldron und Lindsay, 2006) nimmt der Stamm nahezu problemlos jede Fremd-DNA auf und wurde daher ohnehin für die Klonierung verwendet.

Die Bestimmung der Transpositionsfrequenz erfolgte wie oben beschrieben. Leider zeigte sich in der Hauptkultur eine derart starke Verklumpung der Zellen, dass weder eine verlässliche Bestimmung der optischen Dichte möglich war, noch eine exakte Verdünnungsreihe der Kultur angelegt werden konnte. Die Homogenisierung der Kultur war weder durch intensives Vortexen noch durch die Einbeziehung eines Ultraschallbads möglich. Die ermittelten Transpositionsfrequenzen werden hier aus Gründen der schlechten Reproduzierbarkeit nicht angeführt.

3.4.2 Transpositionsaktivität von pA3 in *S. aureus* HG001

Nach der erfolgreichen Elektroporation des Plasmids pA3 in den Stamm *S. aureus* HG001, erfolgte die Bestimmung der Transpositionsfrequenz. Speziell dieser Stamm wurde für die Bestimmung der Transpositionsfrequenz ausgewählt, da er, ebenso wie der Stamm *S. aureus* RN4220, über kein natürlich vorkommendes IS256 verfügt. Dies wurde mit der unter 3.1 beschriebenen Nachweis-PCR überprüft, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Sequenz des Vollgenoms zugänglich war (Nair et al., 2011). Die später durchgeführte Analyse des Vollgenoms auf das Vorhandensein eines IS256 zeigte ebenfalls, dass es nicht im Genom vorhanden ist.

Dieser Stamm ist nahezu isogen zu dem Stamm *S. aureus* 8325, verfügt aber nicht über die natürlich vorkommende Deletion von 11 bp im *rsbU*-Gen, so dass der positive Aktivator von Sigma B (alternativ σ^B) aktiv ist (Kullik et al., 1998; Herbert et al., 2010).

Der alternative Sigmafaktor Sigma B übt einen reprimierenden Einfluss auf die Aktivität von IS256 aus (Valle et al., 2007) wie auch auf die Entstehung von small colony variants (SCV) bei *S. aureus* nach Kontakt mit Aminoglykosid-Antibiotika (Mitchell et al., 2010).

Da die Transpositionsfrequenzen, wie alle Mutationsereignisse stark schwankten, werden für alle Experimente die ermittelten Einzelwerte sowohl in einer Tabelle, als auch als Grafik dargestellt.

Tabelle 3.2: Transpositionsfrequenzen der einzelnen Versuchsreihen von IS256r aus dem Plasmid pA3 in *S. aureus* HG001 in Abhängigkeit der Zeit.

Zeit [h]	Kontr. I [x 10 ⁻⁷]	Kontr. II [x 10 ⁻⁷]	Kontr. III [x 10 ⁻⁷]	Kontr. IV [x 10 ⁻⁷]	Mittelwert [x 10 ⁻⁷]	Standardabweichung
0	2,89	1,18	0,69	1,11	1,467	0,972
1	3,26	1,95	1,9	3,72	2,707	0,923
2	2,74	1,94	0,98	3,57	2,307	1,107
3	2,33	1,96	4,76	5,49	3,635	1,752
4	6,06	1,33	3,85	0,83	3,017	2,420
5	3,67	3,68	3,57	3,61	3,632	0,051
6	3,31	2,48	1,83	4,48	3,025	1,143

Die berechneten Transpositionsfrequenzen eines Zeitpunkts wurden zu Mittelwerten zusammengefasst, die Standardabweichung berechnet und für eine bessere Übersicht in der folgenden Abbildung 3.4 grafisch umgesetzt.

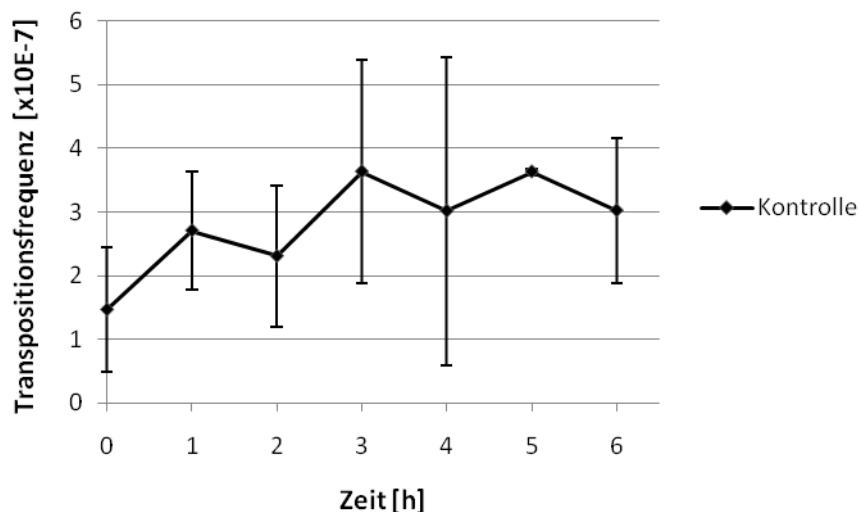


Abbildung 3.4: Transpositionsfrequenz von IS256r aus dem Vektor pA3 in dem Stamm *S. aureus* HG001 basierend auf dem berechneten Mittelwert aus vier Versuchsreihen.

Aus der gezeigten Abbildung geht hervor, dass es einen Anstieg in der Transpositionsrate mit zunehmender Zeit gab. Die minimale Transpositionsfrequenz nahm ihren Minimalwert von $\sim 1,47 \times 10^{-7}$ Transpositionen zum Zeitpunkt 0 an und wies einen Maximalwert von $3,635 \times 10^{-7}$ Transpositionen nach 3 Stunden auf.

Die auf diese Weise bestimmten Transpositionsfrequenzen wurden für die nächsten Versuche als Referenzwert verwendet, da bei den folgenden Versuchen die Transpositionsfrequenzen unter dem Einfluss subinhibitorischer Antibiotika-Konzentrationen aufgenommen wurden.

3.4.2.1 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Vancomycin

Die Behandlung von durch Staphylokokken hervorgerufene Infektionen erfolgt bis heute unter anderem mit dem seit fast fünfzig Jahren bekannten Antibiotikum Vancomycin (Miyazaki et al., 2011; Frei et al., 2010). Dieses Glykopeptid-Antibiotikum ist also von hoher therapeutischer Bedeutung für die Behandlung von nicht vancomycinresistenten Staphylokokken-Stämmen und wird entsprechend häufig in der klinischen Praxis angewendet. Aufgrund der steten Resistenzzunahme von Mikroorganismen gegenüber Vancomycin (Eckmann und Dryden, 2010) wurde der Einfluss von Vancomycin auf die Transpositionsfrequenz überprüft. Dazu erfolgte die Bestimmung der Transpositionsfrequenz in Gegenwart einer subinhibitorischen Konzentration Vancomycin [0,2 µg/ml] im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollkultur.

Die ermittelten Transpositionsfrequenzen werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.3: Transpositionsfrequenzen von IS256r aus dem Plasmid pA3 in *S. aureus* HG001 unter dem Einfluss von einer subinhibitorischen Konzentration Vancomycin zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zeit [h]	Vancomycin I [$\times 10^{-7}$]	Vancomycin II [$\times 10^{-7}$]	Vancomycin III [$\times 10^{-7}$]	Mittelwert [$\times 10^{-7}$]	Standardabweichung
0	1,91	1,8	4,19	2,633	1,349
1	1,64	1,29	6,15	3,026	2,710
2	1,63	1,37	7,96	3,653	3,731
3	10,34	6,9	16,28	11,173	4,745
4	11,24	3,31	14,29	9,613	5,667
5	10,08	5,29	13,93	9,766	4,328
6	5,0	3,43	10,19	6,206	3,537

Die Transpositionsfrequenzen wurden anschließend in eine Grafik überführt.

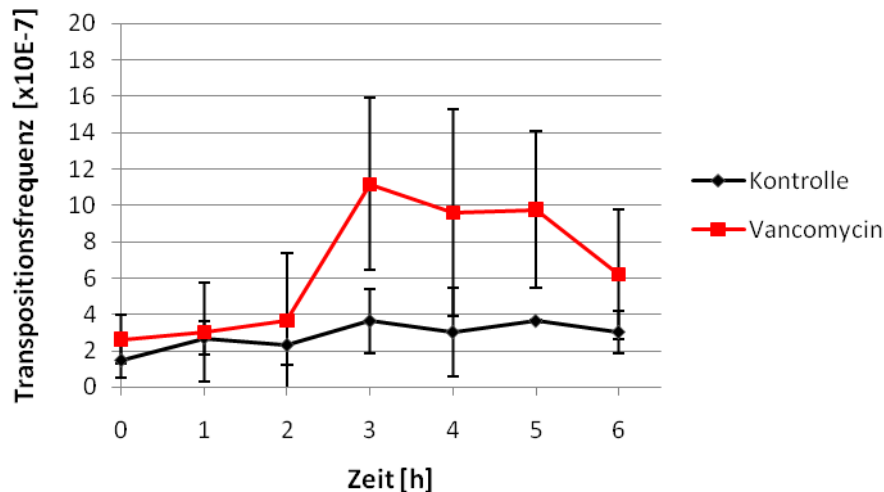


Abbildung 3.5: Transpositionsfrequenzen von IS256r aus dem Plasmid pA3 in *S. aureus* HG001 in Abwesenheit (Kontrolle) und in Anwesenheit einer subinhibitorischen Konzentration Vancomycin.

Die Abbildung zeigt, dass durch die Zugabe der subinhibitorischen Konzentration Vancomycin [0,2 µg/ml] eine deutliche Steigerung der Transpositionsfrequenz, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur, ausgelöst werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden trat der Maximalwert der Transpositionsfrequenz mit $3,185 \times 10^{-7}$ ein, die geringste Transpositionsfrequenz mit einem Wert von $1,17 \times 10^{-7}$ wurde nach 2 Stunden bestimmt. Aus der Abbildung geht deutlich hervor, dass die Zugabe einer subinhibitorischen Konzentration Vancomycin die Transpositionsfrequenz erhöhen konnte, am deutlichsten tritt dieser Effekt innerhalb des Intervalls zwischen den Stunden 3 und 4 auf.

3.4.2.2 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Ciprofloxacin

Ciprofloxacin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Chinolone und zählt mit bis zu 100 Millionen behandelten Patienten bis zum Jahr 1993 zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotika der Welt (King et al., 2000; Norrby und Lietman, 1993; Firma Bayer, Presseinformation aus dem Jahr 2007). Der Wirkmechanismus dieser Gruppe besteht darin, dass das Antibiotikum an die kleinen Untereinheiten der Topoisomerasen bindet und so eine Inhibierung der Rückligation der DNA hervorruft, was für die Bakterienzelle letal ist (Drlica und Zhao, 1997; Strahilevitz et al., 2009). Die resultierenden Doppelstrangbrüche lösen wiederum die SOS-Antwort aus und führen so zu einer Erhöhung der Mutationsrate (Cirz et al., 2007; Mesak und Davies, 2009). Um einen Zusammenhang zwischen der SOS-Antwort

und dem Transpositionsverhalten des IS256 herzustellen, wurde die Bestimmung der Transpositionsfrequenz mit einer subinhibitorischen Konzentration Ciprofloxacin [0,2 µg/ml] durchgeführt.

Die ermittelten Transpositionsfrequenzen sind in der folgenden Tabelle 3.4 aufgeführt und in der folgenden Abbildung 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.4: Transpositionsfrequenz von IS256r aus dem Plasmids pA3 in *S. aureus* HG001 unter Einfluss einer subinhibitorischen Konzentration des Antibiotikums Ciprofloxacin in Abhängigkeit zur Zeit.

Zeit [h]	Cipro. I [x 10 ⁻⁷]	Cipro. II [x 10 ⁻⁷]	Cipro. III [x 10 ⁻⁷]	Cipro. IV [x 10 ⁻⁷]	Mittelwert [x 10 ⁻⁷]	Standardabweichung
0	2,24	2,02	1,18	1,94	1,845	0,461
1	2,17	2,83	5,69	5,45	4,035	1,795
2	7,84	11,24	8,43	7,62	8,7825	1,673
3	18,18	33	19,05	35,29	26,380	9,021
4	25	28,13	21,05	34,48	27,165	5,672
5	11,76	11,94	19,7	21,57	16,242	5,129
6	18,18	26,76	22,62	25,71	23,317	3,849

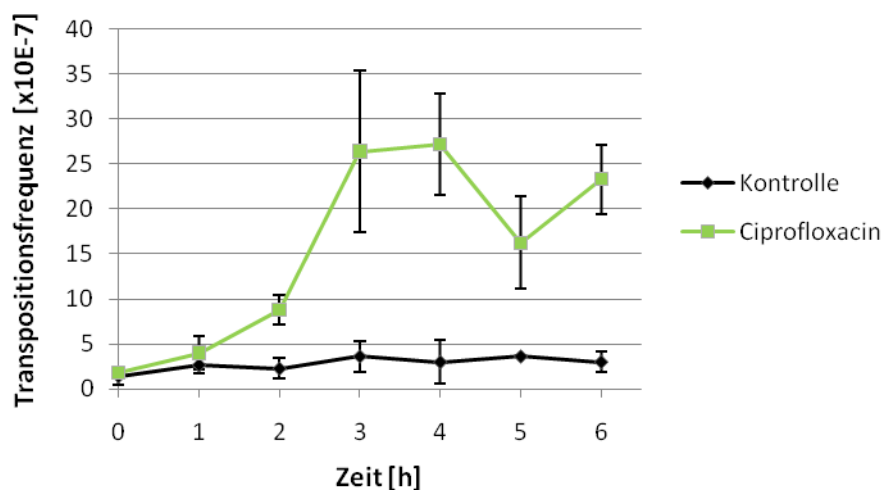


Abbildung 3.6: Transpositionsfrequenz von IS256r aus pA3 in *S. aureus* HG001 durch die Zugabe einer subinhibitorischen Konzentration Ciprofloxacin im Vergleich zu der unbehandelten Kultur.

Eine subinhibitorische Konzentration von Ciprofloxacin [0,2 µg/ml] löste einen deutlichen Anstieg der Transpositionsfrequenz von IS256r aus. Die Transpositionsfrequenz erreichte ihren Maximalwert nach 4 Stunden mit einem Wert von $27,165 \times 10^{-7}$, dies entspricht, im Vergleich zur Transpositionsfrequenz der unbehandelten Zellen, einer 9fachen Steigerung. Der Minimalwert von $1,845 \times 10^{-7}$ wurde zu dem Zeitpunkt 0 bestimmt.

3.4.2.3 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Linezolid

Das Antibiotikum Linezolid ist ein Antibiotikum aus der Familie der Oxazolidinone und wurde erst im Jahr 2000 auf dem US-amerikanischen Markt zugelassen. Es stellt das einzige Reserveantibiotikum zur Behandlung von MRSA-Infektionen dar, das gleichzeitig oral und intravenös verabreicht werden kann (Dryden, 2011; Norrby, 2001). Der Wirkungsmechanismus des Antibiotikums besteht in der Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese, indem es an die 23S rRNA der katalytischen Seite des 50S-Untereinheit des Ribosoms bindet (Leach et al., 2011).

Bereits wenige Jahre nach der Einführung des Antibiotikums wurden die ersten resistenten *S. aureus*-Isolate in den USA bei einem Dialyse-Patienten isoliert (Tsiodras et al., 2001). Da von verschiedenen Autoren bereits gezeigt wurde, dass insbesondere geringe Antibiotika-Konzentrationen einen Einfluss auf die Resistenzentstehung haben, wurde das Antibiotikum ebenfalls in einer subinhibitorischen Konzentration zugesetzt [0,2 µg/ml] (Tsui et al., 2004; Adhikari und Novick, 2005).

In der folgenden Tabelle 3.5 sind die ermittelten Transpositionsfrequenzen aufgeführt.

Tabelle 3.5: Einfluss einer subinhibitorischen Konzentration des Antibiotikums Linezolid auf Transpositionsverhalten von IS256r aus pA3 in *S. aureus* HG001 zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zeit [h]	Linezolid I [x 10 ⁻⁷]	Linezolid II [x 10 ⁻⁷]	Linezolid III [x 10 ⁻⁷]	Mittelwert [x 10 ⁻⁷]	Standardabweichung
0	4,33	2,87	4,8	4,000	1,006
1	3,23	6,79	7,86	5,960	2,424
2	13,34	11,21	10,24	11,563	1,530
3	24,07	11,76	42,86	26,230	15,662
4	19,35	41,18	60	40,176	20,343
5	7,77	33,33	36,67	25,923	15,809
6	4,76	4,76	31,43	13,650	15,397

Anhand der berechneten Mittelwerte der Transpositionsfrequenz wurde die Abbildung 3.7 erstellt.

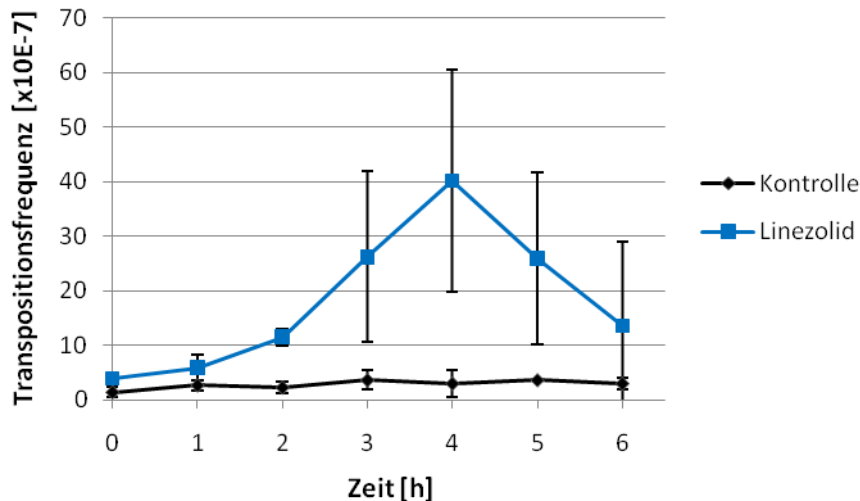


Abbildung 3.7: Transpositionsfrequenz von IS256r in *S. aureus* HG001 in Anwesenheit einer subinhibitorischen Konzentration von Linezolid, sowie in Abwesenheit des Antibiotikums (Kontrolle).

Das Antibiotikum Linezolid löste einen starken Anstieg der Transpositionsfrequenz aus, nach 4 Stunden erfuhr die Transpositionsfrequenz ihren Höhepunkt mit einem Wert von $40,176 \times 10^{-7}$, dies entspricht einer über 13fachen Erhöhung gegenüber den unbehandelten Zellen zu diesem Zeitpunkt. Die aufgenommene Transpositionsfrequenz beschränkt ihren Minimalwert zu dem Zeitpunkt 0 mit einem Wert von $2,20 \times 10^{-7}$.

3.4.2.4 Vergleich der Auswirkung von Vancomycin, Ciprofloxacin und Linezolid auf die Transpositionsfrequenz von IS256r aus pA3 in *S. aureus* HG001

Um die im Einzelnen beschriebenen Auswirkungen der verwendeten Antibiotika besser miteinander vergleichen zu können, wurden die aufgenommenen Transpositionsfrequenzen in der folgenden Grafik zusammengeführt.

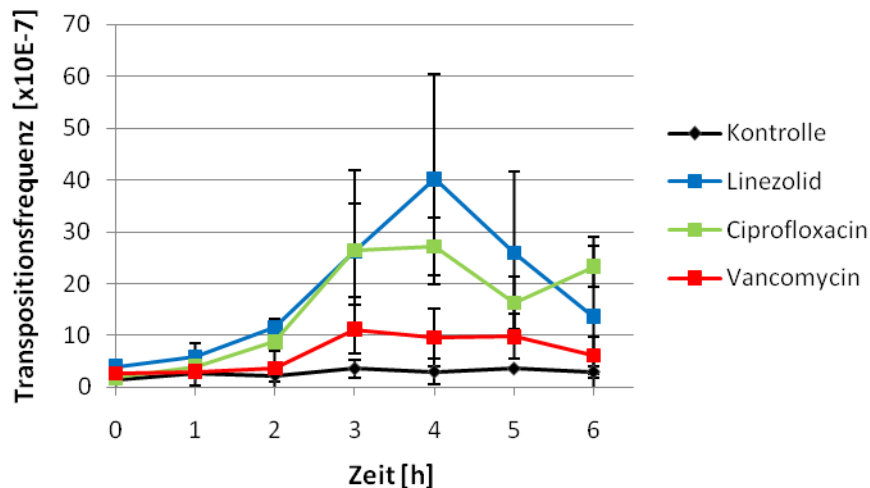


Abbildung 3.8: Die Auswirkungen von subinhibitorischen Konzentrationen der Antibiotika Ciprofloxacin, Linezolid und Vancomycin auf das Testsystem pA3 in *S. aureus* HG001 im Vergleich mit unbehandelten Zellen des Stammes.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle getesteten Antibiotika einen Einfluss auf die Transpositionsfrequenz des rekombinanten IS-Elements 256r ausübten. Die deutlichste Steigerung der Transpositionsfrequenz erfolgte durch die Zugabe einer subinhibitorischen Dosis Linezolid, gefolgt von Ciprofloxacin und Vancomycin. Alle aufgenommenen Kurven haben einen langsamen Anstieg der Transpositionsfrequenz gemeinsam, die nach 2 Stunden stark anstieg und ihr Maximum nach 3 bis 4 Stunden erfuhr. Dieses Maximum stellte einen Scheitelpunkt dar, nach diesem erfolgte ein Abstieg der Transpositionsfrequenz, sie blieb aber in dem gemessenen Zeitraum, signifikant über der Transpositionsfrequenz der Kontrolle, die mit nicht behandelten Zellen aufgenommen wurde.

3.4.3 Bestimmung der Transpositionsfrequenz der Mutante pA3 Δ tnptr

Um mögliche Fehlerquellen, wie beispielsweise die Rekombination des Plasmids pA3 in das Genom, auszuschließen, wurde die oben beschriebene Transpositionsfrequenzbestimmung mit einer immobilisierten Variante des Plasmids pA3 durchgeführt, dem Plasmid pA3 Δ tnptr. Wie bereits eingehend in Abschnitt 2.8.1 beschrieben wurde, erfolgte die Klonierung des Plasmids durch das Einfügen eines Linker-Moleküls (TAC CCG GGT A) an die Aminosäureposition 86 der Transposase des IS256r-Elements, so dass eine Transposition nicht mehr möglich war, da durch das Einfügen des Linkermoleküls eine Rasterschubmutation entstand. Bei einer erfolgreichen Klonierung sollten keine Zellen auf den Antibiotika-haltigen Medien wachsen

können, da bakterielles Wachstum bei 45 °C unter Selektionsdruck durch Erythromycin nicht mehr erfolgen konnte, weil das IS256r nicht in das Genom transponieren konnte. Nur durch Aufnahme des Plasmids durch Rekombination war noch Wachstum möglich.

Die Determinierung der Transpositionsfrequenz erfolgte wie bereits unter Abschnitt 2.9, 3.3 und 3.4 beschrieben.

3.4.3.1 Transpositionsaktivität von pA3 Δ tnptr in *S. aureus* HG001

Um die Transpositionsfrequenzen des IS256r in *S. aureus* HG001 zu verifizieren, erfolgte der Nachweis der Transposaseaktivität durch Bestimmung der Transpositionsfrequenz unter den gleichen Bedingungen wie oben in 3.3 und 3.4 beschrieben.

Die ermittelten Transpositionsfrequenzen sind in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle 3.6: Transpositionsfrequenzen der Transposasemutante pA3 Δ tnptr in *S. aureus* HG001.

Zeit [h]	Kontr. I [x 10 ⁻⁷]	Kontr. II [x 10 ⁻⁷]	Kontr. III [x 10 ⁻⁷]	Kontr. IV [x 10 ⁻⁷]	Mittelwert [x 10 ⁻⁷]	Standardabweichung
0	0,82	0	0,38	0,45	0,412	0,335
1	0,97	0	1,18	0,39	0,635	0,539
2	0,59	0	0,77	0	0,340	0,399
3	0	0,19	0,15	0	0,085	0,099
4	0	0,09	0	0	0,022	0,045
5	0	0,054	0	0	0,013	0,027
6	0	0,048	0	0	0,012	0,024

Für eine bessere Übersicht wurden die Mittelwerte gemeinsam mit den bestimmten Standardabweichungen in das folgende Diagramm eingefügt.

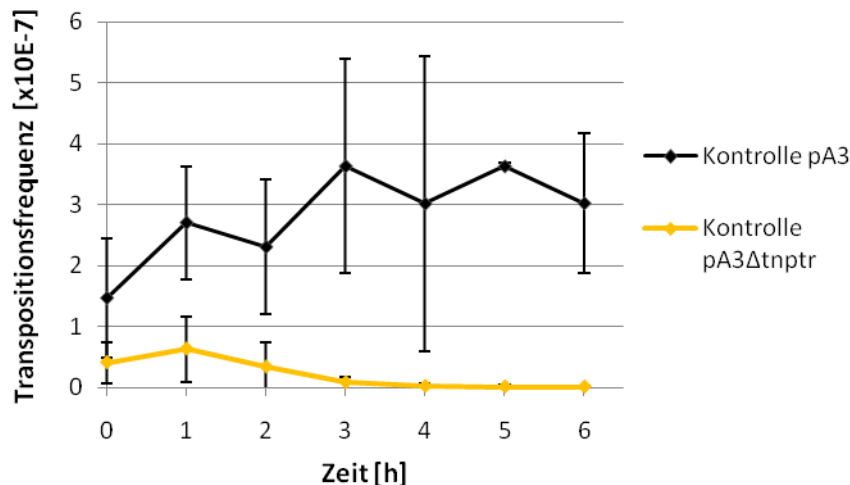


Abbildung 3.9: Die Abbildung zeigt die Transpositionsfrequenz der Transposase-Mutante pA3Δtnptr in *S. aureus* HG001 im Vergleich zum unmutierten Plasmid.

Mit dem Plasmid pA3Δtnptr konnte, wie der Tabelle 3.6 zu entnehmen und an der Abbildung 3.9 zu erkennen ist, keine nennenswerte Transpositionsfrequenz determiniert werden. Der erreichte Maximalwert betrug $0,635 \times 10^{-7}$, bestimmt nach einer Stunde. Die aufgenommene Transpositionsfrequenz zeichnete sich durch eine hohe Anzahl von KBE aus, die auf den Erythromycin- sowie Chloramphenicol-haltigen Agarplatten wuchsen. Diese wurden wiederum von der Anzahl der KBE abgezogen, die nur auf Erythromycin-haltigen Platten wuchsen. Das Wachstum auf den Agarplatten mit beiden Antibiotika konnte durch homologe Rekombination des Plasmids in das Chromosom erfolgen, dies konnte durch eine Nachweis-PCR des *cat*-Gens nachgewiesen werden.

Aufgrund der aufgenommenen Messreihen und der errechneten Transpositionsfrequenzen konnte von einer erfolgreichen Inaktivierung der Transposase ausgegangen werden.

Der Vergleich von dem mutierten Plasmid pA3Δtnptr zu dem unmutierten Plasmid pA3 zeigte weiterhin, dass auch ohne Selektionsdruck bzw. in Abwesenheit eines Antibiotikums Transpositionen des IS256r vom Plasmid in das Chromosom stattfanden – auf einem höheren Niveau als das immobilisierte IS256r in das Chromosom durch Rekombination integriert wurde.

3.4.3.2 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Ciprofloxacin

Durch die Zugabe von Ciprofloxacin wurde eine starke Erhöhung der Transpositionsfrequenz von IS256r auf dem Plasmid pA3 in das Chromosom festgestellt. Daher erfolgte die Bestimmung der Transpositionsfrequenz der Transposasemutante unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben und mit der gleichen subinhibitorischen Konzentration [0,2 µg/ml]. Die ermittelten Werte werden in der folgenden Tabelle aufgeführt. Ausgehend von dem Mittelwert der vier Versuchsreihen wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt, die in der folgenden Abbildung gezeigt werden.

Tabelle 3.7: Transpositionsfrequenz der Transposasemutante pA3Δtnptr in *S. aureus* HG001 unter dem Einfluss einer subinhibitorischen Konzentration von Ciprofloxacin.

Zeit [h]	Cipro. I [x 10 ⁻⁷]	Cipro. II [x 10 ⁻⁷]	Cipro. III [x 10 ⁻⁷]	Cipro. IV [x 10 ⁻⁷]	Mittelwert [x 10 ⁻⁷]	Standardabweichung
0	0	0	0,24	0	0,06	0,12
1	0,95	0	0	0	0,238	0,476
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0,42	0	0,105	0,21
4	0	0,96	0	0	0,240	0,481
5	0	0	0,13	0	0,032	0,065
6	0	0,97	0	0	0,242	0,485

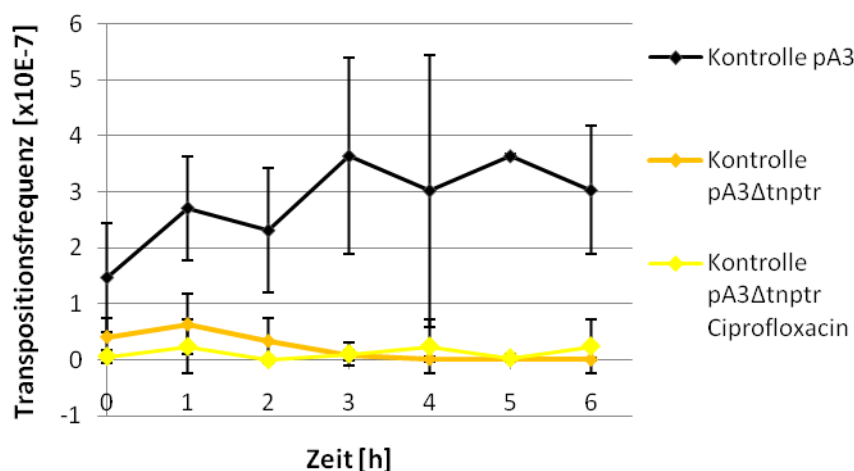


Abbildung 3.10: Transpositionsfrequenzen der Transposasemutante pA3Δtnptr in *S. aureus* HG001 mit und ohne den Einfluss von Ciprofloxacin in Abhängigkeit der Zeit.

Sowohl der Tabelle als auch der Abbildung ist zu entnehmen, dass auch durch den Zusatz von Ciprofloxacin keine Steigerung der Transpositionsfrequenz erreicht werden konnte, wie es bei den durchgeführten Versuchen von pA3 in *S. aureus* HG001 der Fall war. Die maximal erreichte Transpositionsfrequenz betrug $0,242 \times 10^{-7}$ nach 6 Stunden.

3.4.4 Transpositionsaktivität von pA3 in *S. aureus* 8325

Wie bereits von Valle et al. beschrieben (Valle et al., 2007), verursachte der Stressfaktor Sigma B eine Verringerung der Transpositionsfrequenz von IS256 über einen bisher nicht näher aufgeklärten Mechanismus. Die in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Transpositionsfrequenzen wurden im Stamm *S. aureus* HG001 aufgenommen, bei dem das *rsbU*-Gen wieder instand gesetzt worden war (Herbert et al., 2010). Dieses Gen ist von zentraler Bedeutung für den Stresssigmafaktor Sigma B. Wie von Giachino beschrieben, ist RsbU essentiell notwendig für die Aktivierung von σ^B (Giachino et al., 2001).

Bei RsbU handelt es sich um eine Phosphatase, die RsbV dephosphoryliert. Das dephosphorylierte RsbV kann mit RsbW interagieren und einen Komplex ausbilden, so dass das durch RSBW komplexierte Sigma B freigesetzt werden kann (Shaw et al., 2006; Panè-Farrè et al., 2009). Das folgende Schaubild zeigt das Sigma B-Operon (Shaw et al., 2006), auf die einzelnen Komponenten dieses Operons wird in der Diskussion dieser Arbeit näher eingegangen.

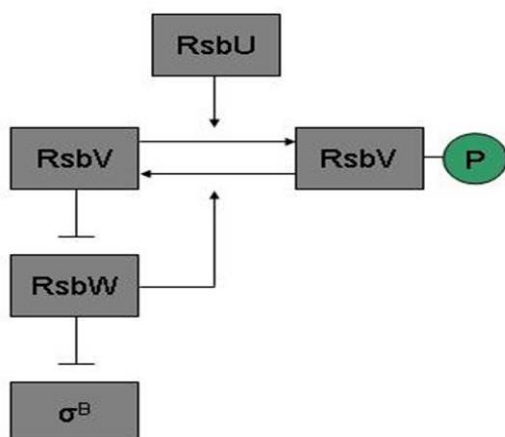


Abbildung 3.11: Aufbau des Sigma B-Operons in Staphylokokken (verändert nach Shaw et al., 2006).

Der Stamm *S. aureus* 8325 hingegen hat einen *rsbU*-Defekt aufgrund einer natürlich vorkommenden 11 bp Deletion (Kullik et al., 1998) und verfügt daher über keinen aktiven Sigma-Faktor B. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen von Sigma B mit und ohne Antibiotikaeinfluss auf die Transpositionsfrequenz von IS256r im Stamm *S. aureus* 8325 überprüft. Die Bedingungen entsprachen denen der vorausgegangenen Versuche.

Die folgende Tabelle zeigt die berechneten Transpositionsfrequenzen.

Tabelle 3.8: Transpositionsfrequenzen von IS256r in pA3 in dem Stamm *S. aureus* 8325 zu definierten Zeitpunkten.

Zeit [h]	Kontr. I [x 10 ⁻⁷]	Kontr. II [x 10 ⁻⁷]	Kontr. III [x 10 ⁻⁷]	Kontr. IV [x 10 ⁻⁷]	Mittelwert [x 10 ⁻⁷]	Standardabweichung
0	2,28	3,99	1,73	7,01	3,752	2,375
1	13,33	1,67	4,43	14,19	8,405	6,295
2	20	1,48	6,88	25,84	13,55	11,296
3	153,85	3,23	131,25	44,44	83,192	71,175
4	22,22	61,76	5,06	40,63	32,417	24,364
5	12,94	22,86	2,96	47,62	21,595	19,157
6	9,4	2,83	0,64	35,87	12,185	16,222

Der aus den einzelnen Versuchsreihen errechneten Mittelwerte wurden, versehen mit der jeweiligen Standardabweichung, in der folgenden Abbildung grafisch umgesetzt.

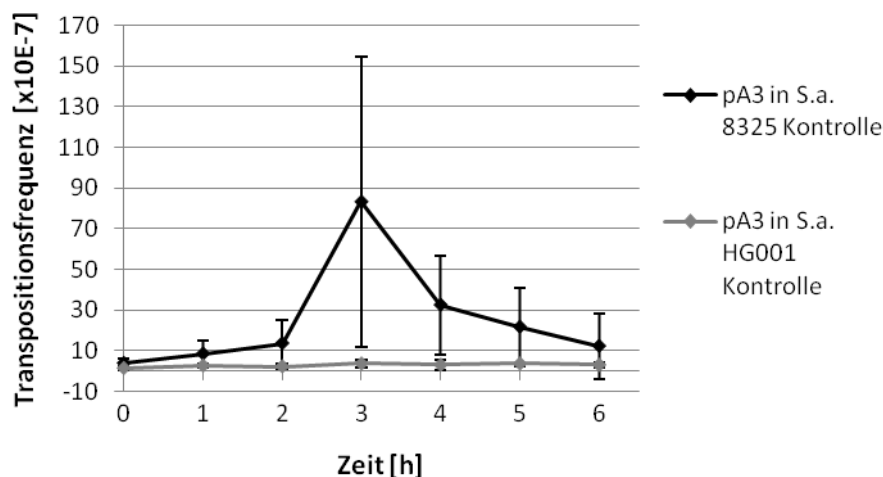


Abbildung 3.12: Transpositionsfrequenzen von IS256r aus pA3 in *S. aureus* 8325.

Aus Tabelle und Abbildung geht deutlich hervor, dass im Stamm *S. aureus* 8325 eine deutlich höhere Transpositionsfrequenz des IS256r im Vergleich zum Stamm *S. aureus* HG001 bestimmt werden konnte.

Ausgehend vom Mittelwert ergab sich eine maximale Transpositionsfrequenz von $83,192 \times 10^{-7}$ nach 3 Stunden. Der bestimmte Mittelwert der Kontrolle von pA3 in *S. aureus* HG001, ebenfalls ermittelt nach 3 Stunden, betrug lediglich $3,635 \times 10^{-7}$, dies entspricht einem Unterschied um den Faktor 22,886.

3.4.4.1 Transpositionsaktivität unter der Verwendung von Ciprofloxacin

Um einen eventuellen Effekt von Ciprofloxacin detektieren zu können, wurde die Transpositionsfrequenz von IS256r in pA3 in *S. aureus* 8325 unter Ciprofloxacin [0,2 µg/ml] bestimmt. Zusätzlich zu den stündlichen Messwerten wurden nach 2,5 und 3,5 Stunden ebenfalls Messwerte bestimmt, um verlässlichere Werte zu erzeugen bzw. den starken Anstieg der Transpositionsfrequenz in dieser Zeitspanne besser beurteilen zu können.

In der folgenden Tabelle werden die berechneten Transpositionsfrequenzen von IS256r in dem Vektor pA3 in dem Stamm *S. aureus* 8325 aufgeführt und werden in der folgenden Abbildung gezeigt.

Tabelle 3.9: Transpositionsfrequenzen von IS256r in pA3 in *S. aureus* 8325 unter der Einwirkung von Ciprofloxacin.

Zeit [h]	Cipro. I [$\times 10^{-7}$]	Cipro. II [$\times 10^{-7}$]	Cipro. III [$\times 10^{-7}$]	Mittelwert [$\times 10^{-7}$]	Standardabweichung
0	0,6	2,7	1,77	1,690	1,052
1	4,26	14,69	29,22	16,056	12,535
2	4,39	73,68	81,97	53,346	42,599
2,5	3,42	66,67	44,44	38,176	32,086
3	16,67	50	100	55,556	41,941
3,5	68,42	25	93,75	62,390	34,769
4	88,24	57,14	72,73	72,703	15,550
5	0	72,22	66,67	46,296	40,190
6	2,44	47,22	55,32	34,993	28,481

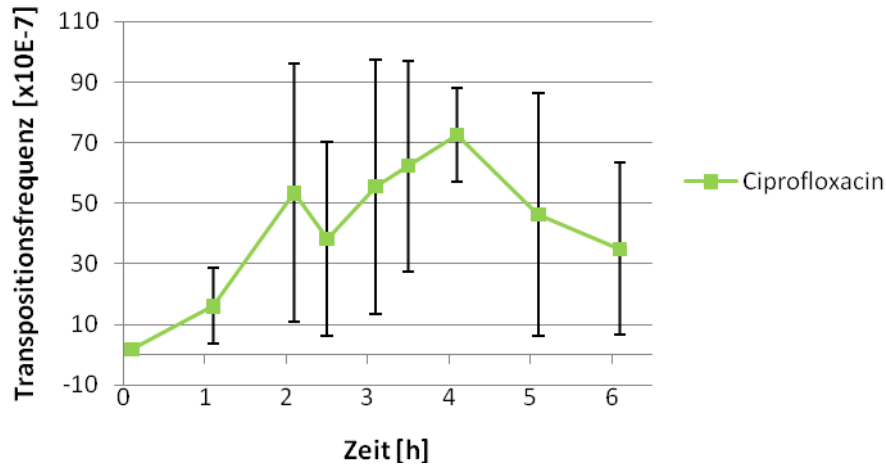


Abbildung 3.13: Die Transpositionsfrequenz von IS256r aus pA3 in *S. aureus* 8325 in Anwesenheit einer subinhibitorischen Konzentration Ciprofloxacin.

Die Transpositionsfrequenz erfuhr ihren Maximalwert nach 4 Stunden mit $72,703 \times 10^{-7}$. Der Minimalwert wurde zu Beginn der Messreihe zum Zeitpunkt 0 mit $1,690 \times 10^{-7}$ determiniert. Ebenfalls nach 4 Stunden erreichte die mit Ciprofloxacin behandelte Kultur *S. aureus* HG001 pA3 ihr Transpositionsmaximum von $27,165 \times 10^{-7}$, damit unterschieden sich die Transpositionsfrequenzen allerdings immer noch um den Faktor 2,676.

3.4.4.2 Vergleich der Auswirkung von Ciprofloxacin auf das Transpositionsverhalten von IS256r aus pA3 in *S. aureus* 8325

Für eine bessere Übersicht wurden die in den beiden vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Abbildungen in einer gemeinsamen Abbildung zusammengefasst.

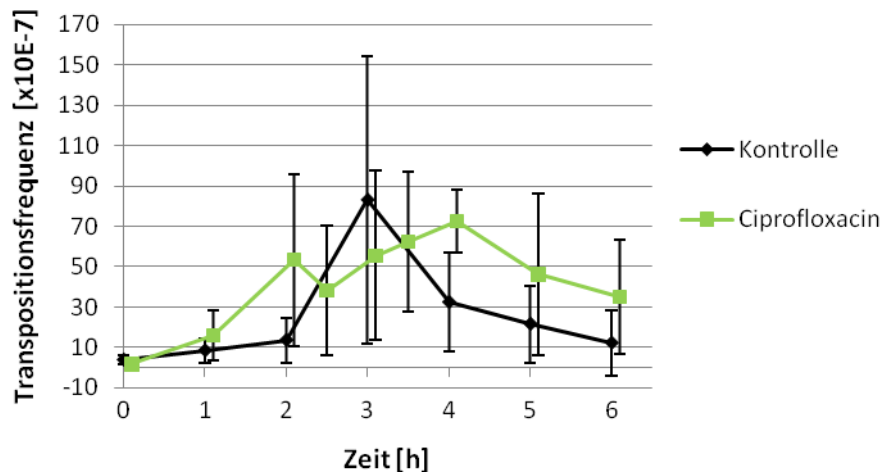


Abbildung 3.14: Transpositionsfrequenzen des IS256r aus pA3 in *S. aureus* 8325, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ciprofloxacin über einen Zeitraum von 6 Stunden.

Im direkten Vergleich der beiden Transpositionsfrequenzen fällt auf, dass sich beide Kurven nicht signifikant unterscheiden. Die mit Ciprofloxacin behandelte Kultur zeigte sogar einen geringeren Maximalwert bezüglich der Transpositionsfrequenz auf, dafür verlief diese aber auf einem höheren Niveau als in der Kontrollkultur.

3.5 Bestimmung der Transpositionsaktivität der Stämme mit verändertem Gegenstrangpromotor

Die Regulation der Transposition von IS-Elementen wurde bisher nur unzureichend erforscht. Bei dem IS-Element *10* wurde bereits 1988 das Vorhandensein einer antisense RNA nachgewiesen, die das Transpositionsverhalten reguliert (Case et al., 1988). Obwohl das IS256 nicht von minderer medizinischer Bedeutung ist, fehlen bislang weiterführende Untersuchungen zu dessen Transpositionsverhalten. Bei einer Analyse mit den Programmen Prodoric (Münch et al., 2005; <http://prodoric.tu-bs.de/vfp/>) und DBTBS (Sierro et al., 2008;

<http://dbtbs.hgc.jp/>) konnten potentielle Gegenstrangpromotoren identifiziert werden. Durch eine gezielte Mutagenese wurden stille Mutationen in die potentiellen Gegenstrangpromotoren eingeführt.

Durch das Einfügen von stillen Mutationen wurde erreicht, dass lediglich der entsprechende Gegenstrangpromotor inaktiviert wurde, die Transposase aber weiterhin funktional blieb.

Die jeweils eingeführten Mutationen werden in den entsprechenden Abschnitten beschrieben, die prinzipielle Vorgehensweise wurde bereits in den Abschnitten 2.8.2, 2.8.3 und 2.8.4 beschrieben und die verwendeten Nukleotide in Tabelle 2.3 aufgelistet. Die Gesamtsequenzen der hier vorgestellten Plasmide, die Lokalisierung der Primer innerhalb der Transposase ebenso die Vektorkarten befinden sich im Anhang dieser Arbeit.

3.5.1 Das Testsystem pA3 σ^B mut

Der potentielle Sigma B-Promotor konnte lediglich durch das oben vorgestellte Programm ProDoric (Münch et al., 2005) an der Position zwischen 1168 bp und 1195 bp auf der Gegenstrangsequenz des IS256 detektiert werden. In der folgenden Abbildung wird die Sequenz des Promotors dargestellt und mit der aus Motif Alignments ermittelten Weight Matrix verglichen.

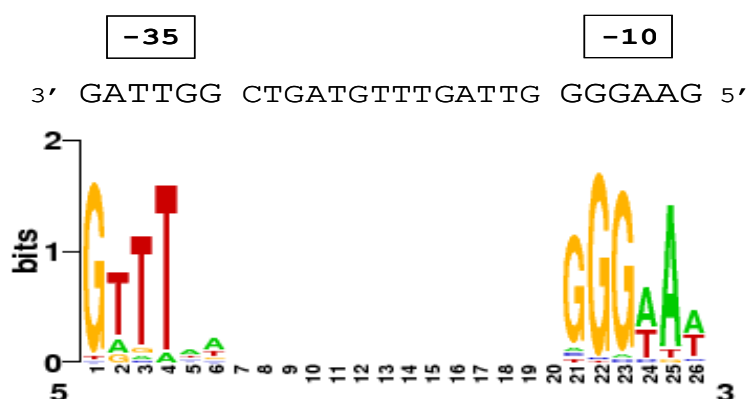


Abbildung 3.15: Sequenzvergleich des möglichen Sigma B-Promotors mit der Weight Matrix (DBTBS).

Mit dem Primerpaar SigB mut for Ph und SigB mut rev Ph wurde die gewünschte Mutation in den Sigma B Gegenstrangpromotor innerhalb des IS256 in dem Vektor pA3 mittels Mutagenese-PCR eingeführt. Mutiert wurde lediglich die -35er Region, wie in der folgenden Abbildung zu erkennen ist. Eine Veränderung der -10er Region zeigte sich als nicht möglich, da, unter der Vorgabe eine stille Mutation einzuführen, es die Promotorregion allenfalls optimiert hätte.

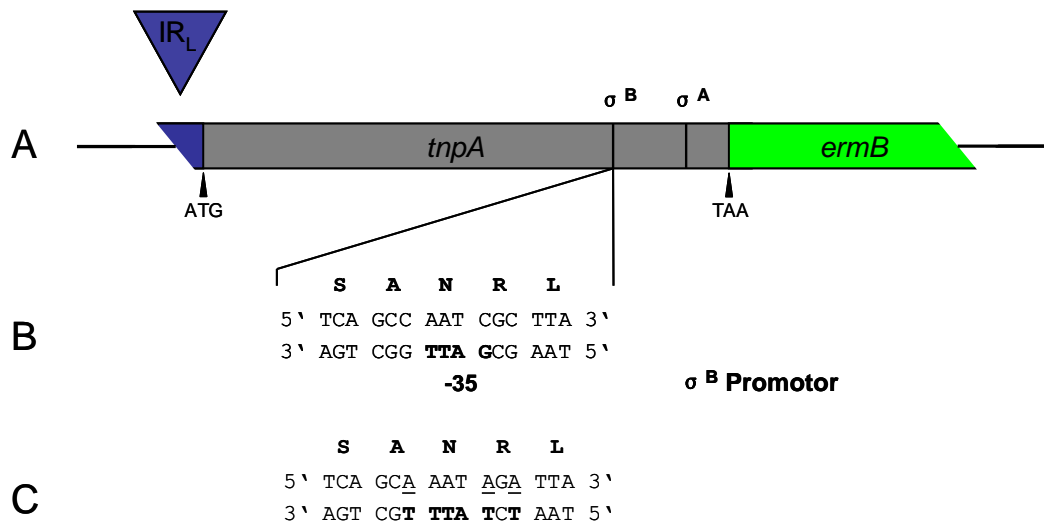


Abbildung 3.16: Die durchgeführte Mutagenese am IS256r-Element im Vektor pA3. Der Abschnitt B zeigt die -35er Box des σ^B -Promotors mit der resultierenden Aminosäureabfolge, der Abschnitt C die modifizierte Zielstruktur mit unveränderter Aminosäuresequenz.

Wie in der Abbildung 3.17 zu erkennen ist, wurde die in Abschnitt B gezeigte Sigma B-Gegenstrangpromotor-Sequenz durch das Austauschen der drei vorhandenen Basen (Guanin \rightarrow Thymin; Abschnitt C) abgewandelt (3' AGT CGG TTA GCG AAT 5' \rightarrow 3' AGT CGT TTA TCT AAT 5'). Durch diese Austausch wurde die daraus resultierende Aminosäuresequenz nicht verändert (Serin Alanin Asparagin Arginin Leucin), sehr wohl allerdings die Consensus Sequenz des Promotors von Sigma B. Auf diese Weise konnte Sigma B nicht mehr binden und keine Antisense-RNA der Transposase gebildet werden.

3.5.2 Transpositionsaktivität von pA3 σ^B mut in *S. aureus* HG001

Die Bestimmung der Transpositionsfrequenz erfolgte über das in Abschnitt 3.3 beschriebene Verfahren. Die ermittelten Frequenzen werden in der folgenden Tabelle aufgeführt und grafisch in der darauf folgenden Abbildung umgesetzt. Um die Höhe der Transpositionsfrequenz besser beurteilen zu können, wurden in die Abbildung zusätzlich die bereits gezeigten Transpositionsfrequenzen von IS256r aus pA3 in *S. aureus* HG001, mit und ohne den Einfluss von Ciprofloxacin, eingefügt.

Tabelle 3.10: Transpositionsfrequenzen des Plasmids pA3 σ^B mut in *S. aureus* HG001 zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zeit [h]	Kontrolle I [x 10 ⁻⁷]	Kontrolle II [x 10 ⁻⁷]	Kontrolle III [x 10 ⁻⁷]	Mittelwert [x 10 ⁻⁷]	Standardabweichung
0	43,57	38,08	41,61	41,086	2,782
1	80,42	91,19	68,72	80,110	11,238
2	94,69	94,74	81,6	90,343	7,571
3	84,85	64,86	56,25	68,653	14,672
4	95,18	180,85	80,56	84,820	9,019
5	83,89	77,34	73,02	78,083	5,472
6	84,47	82,21	74,55	80,410	5,199

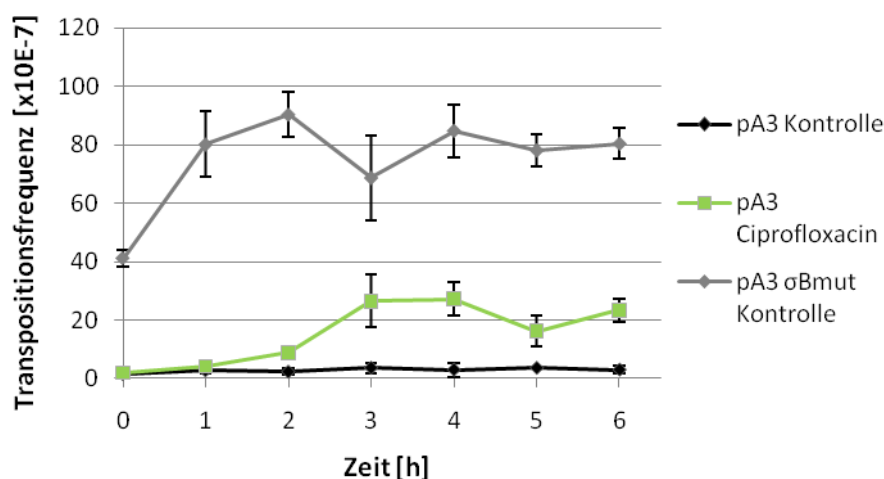


Abbildung 3.17: Transpositionsfrequenz des IS256r-Elements mit mutiertem Sigma B-Gegenstrangpromotor (pA3 σ^B mut) in *S. aureus* HG001 und zu Vergleichszwecken mit intaktem Sigma B-Promotor in demselben Stamm sowie in Gegenwart von Ciprofloxacin.

Durch die in den Sigma B-Gegenstrangpromotor des IS256r eingeführten Mutationen kam es zu einem sehr starken Anstieg der Transpositionsfrequenz. Der mittlere Maximalwert der Transpositionsfrequenz betrug $90,343 \times 10^{-7}$ nach 2 Stunden, der Minimalwert wurde unmittelbar zu Versuchsbeginn mit $41,086 \times 10^{-7}$ bestimmt.

Die Mutante des IS256r mit mutiertem σ^B -Antisense-Promotor zeigte nach einer Dauer von 2 Stunden, im Vergleich zum nativen Plasmid pA3, eine mehr als um den Faktor 39 erhöhte Transpositionsaktivität.

3.5.3 Transpositionsaktivität unter Verwendung von Ciprofloxacin

Die Transpositionsfrequenz der Sigma B-Mutante in pA3 in *S. aureus* HG001 wurde ebenfalls unter dem Einfluss von Ciprofloxacin untersucht. Erwartungsgemäß sollte keine Steigerung der Transpositionsfrequenz durch Ciprofloxacin erfolgen, da der Promotor des Sigma B-Faktors, der ansonsten auf Stresszustände reagiert, deaktiviert wurde.

Die aufgenommenen Transpositionsfrequenzen werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3.11: Transpositionsfrequenzen von IS256r in pA3 mit verändertem Sigma B-Gegenstrangpromotor unter der Einwirkung von Ciprofloxacin in Abhängigkeit der Zeit.

Zeit [h]	Ciproflox. I [$\times 10^{-7}$]	Ciproflox. II [$\times 10^{-7}$]	Ciproflox. III [$\times 10^{-7}$]	Mittelwert [$\times 10^{-7}$]	Standardabweichung
0	51,05	52,09	16,54	39,893	20,231
1	118,79	101,13	47,7	89,206	37,014
2	113,61	92,09	79,66	95,12	17,176
3	95,12	97,14	72	88,086	13,968
4	87,76	87,76	69,35	81,623	10,629
5	131,91	89,58	67,53	96,34	32,718
6	105,17	82,69	79,57	89,143	13,966

Anhand der berechneten Mittelwerte der Transpositionsfrequenz und deren Standardabweichung wurde die folgende Abbildung 3.18 erstellt.

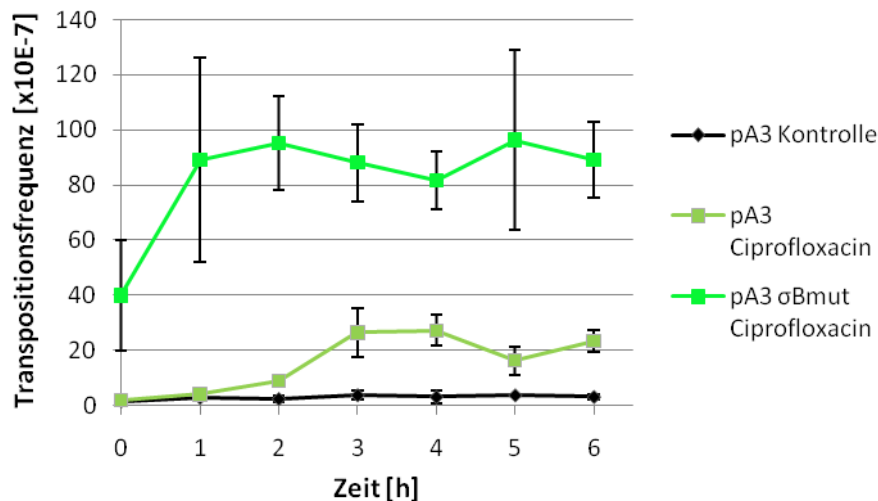


Abbildung 3.18: Transpositionsfrequenzen des unmutierten IS256r-Elements (aus pA3) in An- und Abwesenheit von Ciprofloxacin, als auch die mittleren Transpositionsfrequenz des IS256r mit mutiertem Sigma B-Gegenstrangpromotor (pA3 σ^B mut) in *S. aureus* HG001 in Anwesenheit von Ciprofloxacin zu verschiedenen Zeitpunkten.

Durch die Zugabe einer subinhibitorischen Konzentration des Antibiotikums Ciprofloxacin [0,2 $\mu\text{g/ml}$] konnte eine geringe Steigerung der Transpositionsfrequenz erreicht werden im Vergleich zur unbehandelten Kultur des Stammes HG001 mit IS256r σ^B mut in pA3. Die mittlere maximale Transpositionsfrequenz betrug $96,34 \times 10^{-7}$ nach 5 Stunden, die mittlere minimale Frequenz wurde zu Beginn des Versuchs mit $39,893 \times 10^{-7}$ bestimmt.

3.5.4 Vergleich der Auswirkung von Ciprofloxacin auf das Transpositionsverhalten von IS256r σ^B mut aus pA3 in *S. aureus* HG001

Um einen direkten Vergleich zwischen den mit Ciprofloxacin behandelten Zellen und der Kontrollkultur zu erheben, wurden die letzten beiden Abbildungen (3.17 und 3.18) in der folgenden Abbildung vereinigt. Die aufgenommenen Transpositionsfrequenzen von IS256r aus pA3 in *S. aureus* HG001 in An- sowie Abwesenheit von Ciprofloxacin in der gleichen Abbildung sollen der besseren Einschätzung der Steigerung der Transpositionsfrequenz dienen.

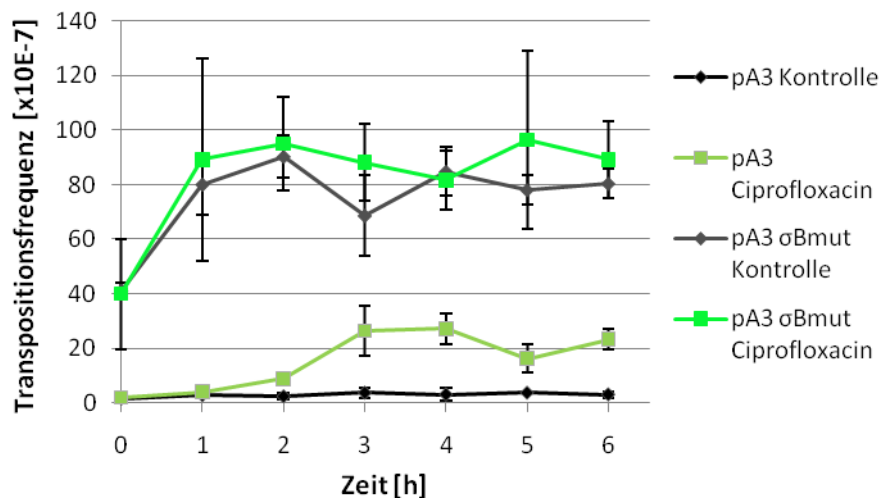


Abbildung 3.19: Transpositionsfrequenzen des nativen IS256r-Elements (aus pA3) und mit mutiertem Sigma B-Gegenstrangpromotor (pA3 σ^B mut) in *S. aureus* HG001, in An- und Abwesenheit von Ciprofloxacin zu verschiedenen Zeitpunkten.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, erfolgte durch die Zugabe von Ciprofloxacin lediglich ein schwacher Anstieg der Transpositionsfrequenz. Die bestimmten Mittelwerte beider Kurven liegen innerhalb der Standardabweichung der jeweils anderen Kurve, so dass von einer vergleichbar hohen Transpositionsfrequenz ausgegangen werden kann.

Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass die in den übrigen Versuchen mit *S. aureus* HG001 und IS256r aus pA3 hervorgerufene Transpositionssteigerung durch die Zugabe einer subinhibitorischen Konzentration Ciprofloxacin über den Sigma B-Gegenstrangpromotor hervorgerufen werden konnte. Allerdings muss die Beeinflussung indirekt erfolgen, da sich das Vorhandensein von Sigma B negativ auf die Transpositionsrate auswirkt (Valle et al., 2007).

3.5.5 Das Testsystem pA3 σ^A mut

Mit dem Programm DBTBS (Sierro et al., 2008) konnte ein weiterer Promotor innerhalb der Transposase des IS256 detektiert werden, ein Sigma A- Gegenstrangpromotor an Position von 999 bp bis einschließlich 1026 bp. Die folgende Abbildung 3.20 zeigt die Sequenz des detektierten Sigma A-Promotors im direkten Vergleich mit der Weight Matrix (DBTBS).

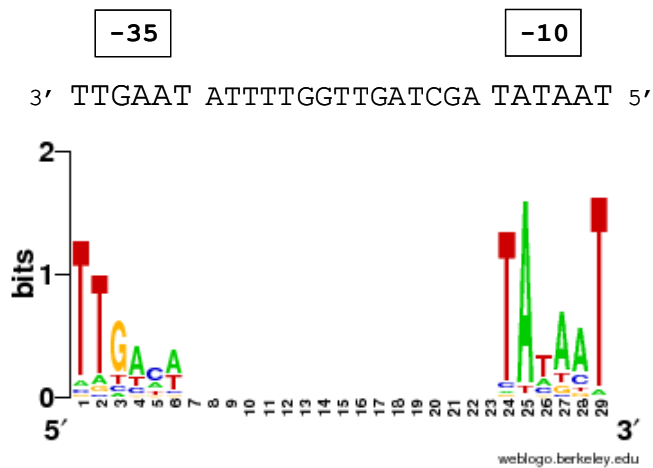


Abbildung 3.20: Sequenz des Sigma A-Promotors innerhalb des IS256 im direkten Vergleich zur Weight matrix des Sigma A-Promotors (DBTBS).

Mit dem Primerpaar SigA -10 mut for und SigA -10 mut rev wurden zwei Basenaustausche in der -10er Region des potentiellen Sigma A-Gegenstrangpromotor innerhalb des IS256r-Elements in das Plasmid pA3 eingeführt.

Der mutierte Ausschnitt aus dem Plasmid pA3 σ^A mut ist in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

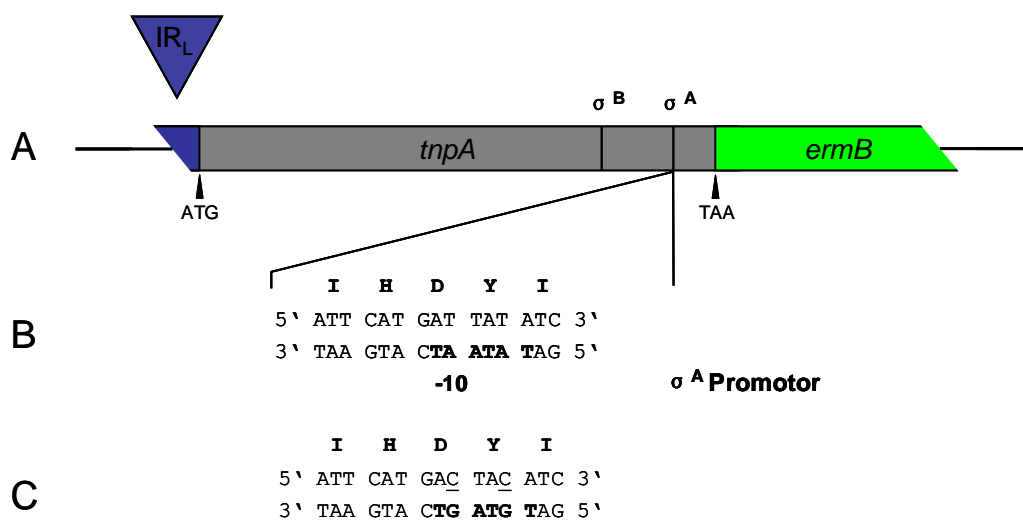


Abbildung 3.21: Die durchgeführte Mutagenese am IS256r-Element im Vektor pA3. Der Abschnitt B zeigt die -10er Box des Sigma A-Promotors mit der resultierenden Aminosäureabfolge, der Abschnitt C die modifizierte Zielstruktur mit unveränderter Aminosäuresequenz.

Aus der Abbildung 3.21 wurde deutlich, dass durch den gezielten Austausch von zwei Basen (Adenin → Guanin; Abbildung C) die Sigma A-Gegenstrangpromotor-Sequenz (Abschnitt B) abgewandelt werden konnte (3' TAA GTA CTA ATA TAG 5' → 3' TAA GTA CTG ATG TAG 5'). Auch durch diese Austausche wurde die resultierende Aminosäuresequenz nicht verändert (Isoleucin Histidin Asparaginsäure Tyrosin Isoleucin), aber die Consensus Sequenz des Promotors von Sigma A. Durch diese Veränderungen konnte Sigma A nicht mehr binden und keine Antisense-RNA der Transposase gebildet werden.

3.5.6 Transpositionsaktivität von pA3 σ^A mut in *S. aureus* HG001

Die Bestimmung der Transpositionsfrequenz erfolgte wie bereits unter Abschnitt 3.3 und 3.4 beschrieben, die ermittelten Werte werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3.12: Transpositionsfrequenzen des IS256r mit mutiertem Sigma A-Gegenstrangpromotor aus dem Plasmid pA3 in dem Stamm *S. aureus* HG001 zu definierten Zeitpunkten.

Zeit [h]	Kontrolle I [x 10 ⁻⁷]	Kontrolle II [x 10 ⁻⁷]	Kontrolle III [x 10 ⁻⁷]	Mittelwert [x 10 ⁻⁷]	Standardabweichung
0	26,84	16,48	25,14	22,820	5,556
1	51,68	28,29	63,36	47,776	17,857
2	56,59	56,61	37,72	50,306	10,900
3	56,67	55,56	82,5	64,910	15,243
4	86,54	27,78	101,25	71,856	38,873
5	59,06	29,2	69,4	52,553	20,874
6	48,74	39,88	46,86	45,160	4,668

Aus den gebildeten Mittelwerten und den errechneten Standardabweichungen wurde die folgende Abbildung erstellt.

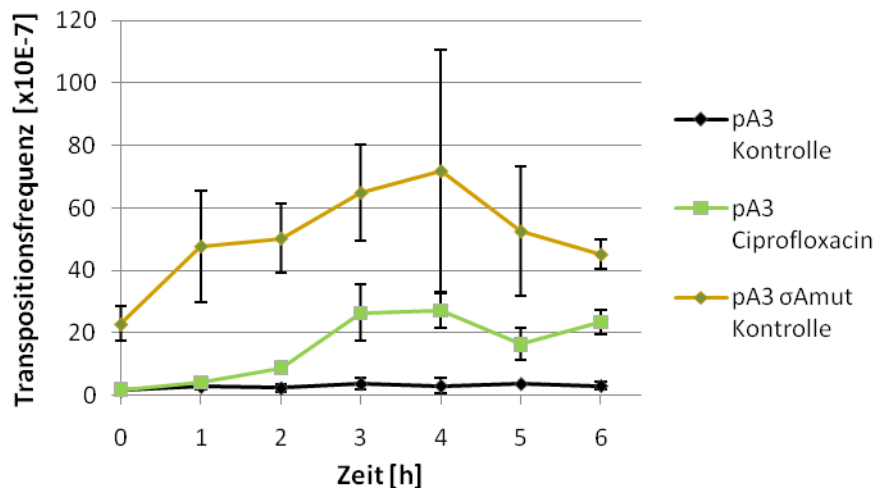


Abbildung 3.22: Das Transpositionsverhalten von IS256r mit mutiertem Sigma A-Gegenstrangpromotor aus pA3 in *S. aureus* HG001 ohne den Einfluss von Antibiotika im direkten Vergleich zu dem Transpositionsverhalten des unmutierten IS256r aus pA3 in *S. aureus* HG001 in An- sowie in Abwesenheit von Ciprofloxacin.

Durch das Mutieren des Sigma A–Gegenstrangpromotors konnte ebenfalls eine deutliche Steigerung der Transposition erreicht werden. Die Transpositionsfrequenz nahm ihren Maximalwert mit $71,856 \times 10^{-7}$ nach 4 Stunden an, der Minimalwert wurde zu Beginn der Messreihe mit $22,820 \times 10^{-7}$ bestimmt.

Da diese Kurve ohne den Einfluss von Ciprofloxacin aufgenommen wurde, wurden die aufgenommen Messwerte lediglich mit den Werten des Kontrollversuchs von pA3 mit nativem IS256r in *S. aureus* HG001 verglichen. Nach 4 Stunden wurde mit dem nativen IS256r eine Transpositionsfrequenz von $3,017 \times 10^{-7}$ bestimmt, somit unterschied sich die Transpositionsaktivität zu diesem Zeitpunkt um mehr als den Faktor 23.

3.5.7 Das Testsystem pA3 $\sigma^{A/B}$ mut

Als logische Konsequenz zu den durchgeführten Mutationen in den gefundenen Sigma A und Sigma B-Gegenstrangpromotoren, wurde eine Doppelmutante konstruiert, die die beiden beschriebenen Mutationen enthielt (siehe Abschnitt 3.5.1 und 3.5.5).

Wie bereits unter 2.8.4 beschrieben wurde, erfolgte die Klonierung über die Mutation des Templates der Sigma A-Mutante in pA3 (pA3 σ^A mut) mit den Primern SigB mut for Ph und SigB mut rev Ph.

Die eingefügten Mutationen sind in der nächsten Abbildung dargestellt.

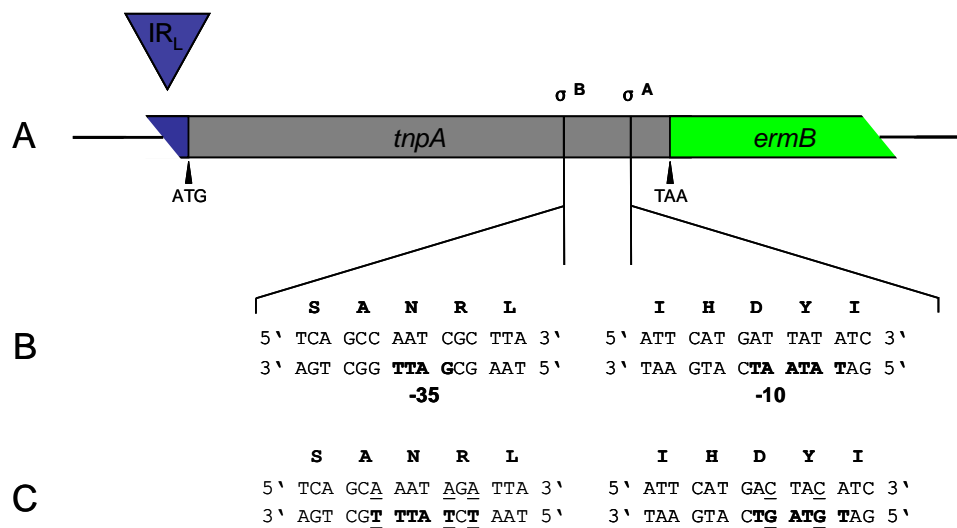


Abbildung 3.23: Die durchgeführten Mutageneseschritte am IS256r-Element im Vektor pA3. Der Abschnitt B zeigt die -10er Box des Sigma A- und die -35er Box des Sigma B-Promotors mit der resultierenden Aminosäureabfolge, der Abschnitt C die jeweils modifizierte Zielstruktur mit unveränderten Aminosäuresequenzen.

3.5.8 Transpositionsfrequenz von pA3 $\sigma^{A/B}$ mut in *S. aureus* HG001

Die, wie bereits unter 3.3 und 3.4 beschrieben, ermittelten Transpositionsfrequenzen von drei unabhängigen Versuchen werden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3.13: Transpositionsfrequenzen von IS256r mit Mutationen in den Gegenstrangpromotoren von Sigma A und Sigma B in dem Stamm *S. aureus* HG001 zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zeit [h]	Kontrolle I [x 10 ⁻⁷]	Kontrolle II [x 10 ⁻⁷]	Kontrolle III [x 10 ⁻⁷]	Mittelwert [x 10 ⁻⁷]	Standardabweichung
0	16,88	13,25	7,46	12,530	4,751
1	25	28,93	13,21	22,380	8,180
2	55,08	30,43	40,38	41,963	12,401
3	44,44	55,32	50	49,920	5,440
4	36,59	33,33	38,89	36,270	2,793
5	21,25	31,97	45	32,740	11,893
6	24,61	20,79	27,03	24,143	3,146

Zur Veranschaulichung wurden die, jeweils aus drei Einzelwerten berechneten Mittelwerte sowie die errechnete Standardabweichung in folgende Abbildung aufgenommen. Zu Vergleichszwecken wurden zusätzlich die berechneten Transpositionsfrequenzen von IS256r aus pA3 in *S. aureus* HG001 abgebildet.

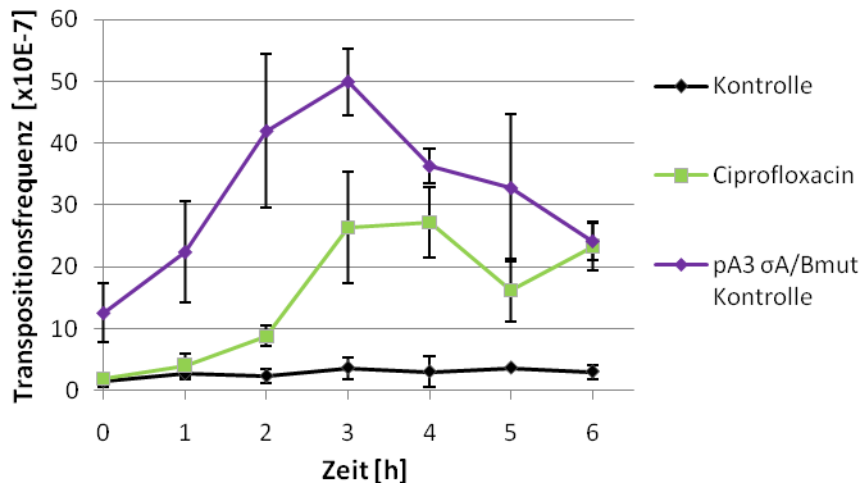


Abbildung 3.24: Transpositionsfrequenzen von IS256r $\sigma^{A/B}$ mut im Vergleich zu einem nativen IS256r Element in An- und Abwesenheit von Ciprofloxacin im Stamm *S. aureus* HG001.

Durch das Einführen von stillen Mutationen in die Gegenstrangpromotoren von Sigma A und Sigma B innerhalb des Transposasegens *tnpA* von IS256r konnte eine deutliche Steigerung der Transpositionsfrequenz ausgelöst werden. Die maximale Transpositionsfrequenz wurde nach 3 Stunden mit einem Wert von $49,920 \times 10^{-7}$ bestimmt, der Minimalwert hingegen wurde zu Versuchsbeginn mit $12,530 \times 10^{-7}$ determiniert.

Im Vergleich zum nativen IS256r-Element, bei dem die errechnete Transpositionsfrequenz zum gleichen Zeitpunkt, also 3 Stunden nach Versuchsbeginn, ebenfalls ihr Maximum erreichte, betrug diese lediglich $3,635 \times 10^{-7}$. Interessanterweise wurde die minimale Transpositionsfrequenz ebenfalls unmittelbar zu Versuchsbeginn detektiert mit einer Frequenz von $1,467 \times 10^{-7}$. Nach drei Stunden ergibt sich somit eine Differenz der Transpositionsfrequenz um den Faktor 34, die minimale Differenz zum Zeitpunkt null weist immerhin noch den Faktor 8,5 auf.

3.5.9 Vergleich der Auswirkungen der mutierten Sigma A und Sigma B-Gegenstrang-Promotoren auf die Transpositionsfrequenz von IS256r aus pA3 σ^B mut, pA3 σ^A mut sowie pA3 $\sigma^{A/B}$ mut in *S. aureus* HG001

Für eine abschließende Übersicht wurden die Messreihen der letzten Abbildungen in eine neue Abbildung zusammengefasst. Abschließend konnte festgestellt werden, dass alle durchgeführten Mutationen der Gegenstrangpromotoren (σ^A und σ^B) zu einem deutlichen Anstieg der Transpositionsfrequenz führten.

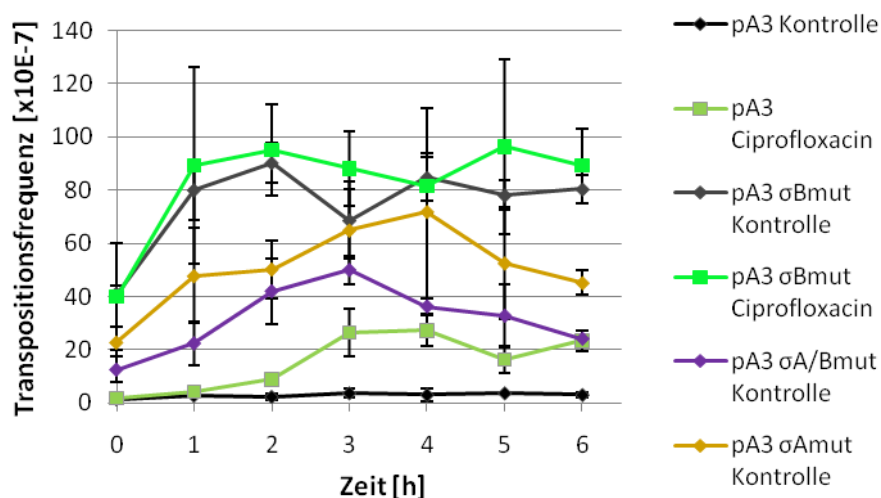


Abbildung 3.25: Transpositionsfrequenzen von IS256r mit Mutationen im σ^B -Gegenstrangpromotor, im σ^A -Gegenstrangpromotor sowie in beiden Promotoren ($\sigma^{A/B}$ mut). Zu Vergleichszwecken ebenfalls dargestellt: die Transpositionsfrequenz des nativen IS256r mit und ohne Einwirkung von Ciprofloxacin. Alle Kurven wurden im Stamm *S. aureus* HG001 bestimmt.

Der Austausch von drei Basen innerhalb des Sigma B-Gegenstrangpromotors in der Transposase des IS256r bewirkte den stärksten Anstieg der Transpositionsfrequenz. Dieser Effekt war auch durch die Zugabe von Ciprofloxacin nicht mehr steigerbar (siehe Abbildung 3.19), was darauf schließen ließ, dass der durch Ciprofloxacin hervorgerufene Effekt vermutlich indirekt über den Sigma B-Gegenstrangpromotor vermittelt wurde.

Die durchgeführte Mutation im Sigma A-Gegenstrangpromotor, basierend auf zwei Basenaustauschen, äußerte sich ebenfalls in einer gesteigerten Transpositionsfrequenz, auch wenn der beobachtete Effekt nicht so stark war, wie die durch die Mutation des σ^B -Gegenstrangpromotors hervorgerufene Steigerung.

Überraschenderweise zeigte die Doppelmutante, in der beide Gegenstrangpromotoren mutiert wurden eine stärkere Transpositionsfrequenz als die des nativen IS256r, allerdings eine schwächere im Vergleich zu den einzelnen Mutanten von Sigma A oder Sigma B.

3.6 Nachweis von Antisense-RNA bei IS256r und IS256r^Bmut

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass unter anderem der Sigma B-Gegenstrangpromotor einen starken Einfluss auf das Transpositionsverhalten von IS256r ausübt. Daher wurde das Vorhandensein einer Antisense-RNA untersucht, denn, wie bereits unter 3.5 beschrieben, wurde von Case et al. (1990) gezeigt, dass die Transposition des IS10-Elements maßgeblich durch eine Antisense-RNA gesteuert wird.

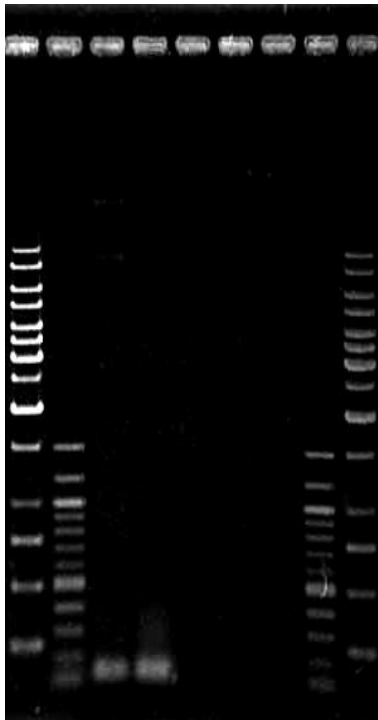
Aufgrund der gemachten Beobachtungen könnte der Sigma B-Promotor im IS256r eine Antisense-RNA der Transposase *tnpA* ablesen, die das Transpositionsverhalten bestimmt.

Um die Bildung eines solchen Produkts nachzuweisen, wurde die komplette RNA aus den Stämmen *S. aureus* HG001 pA3 und *S. aureus* HG001 pA3^Bmut, wie unter Kapitel 2, Abschnitt 6.3 beschrieben, präpariert. An dieser Stelle ist besonders hervorzuheben, dass die kontaminierende DNA in der RNA-Probe nur durch einen zusätzlichen, im Anschluss an die RNA-Präparation durchgeführten DNaseI-Verdau mit Manganpuffer entfernt werden konnte. Damit die enthaltenen Mangan-Ionen die weiteren Arbeitsschritte nicht inhibierten, wurden diese mittels des Chelators EDTA gebunden und somit inaktiviert.

Die Antisense-RNA wurde durch eine RT-PCR nachgewiesen. Dazu wurde die RNA spezifisch mit einem Primer in cDNA umgeschrieben, diese wurde als template in die RT-PCR eingesetzt (Cummings et al., 2003). Für die Generierung der cDNA wurde der Primer RNA100for (Sequenz siehe Abschnitt 2.3.3) verwendet.

Die aus der Antisense-RNA generierte cDNA wurde dann mit dem Primerpaar RNA100for und RNA0rev amplifiziert, so dass ein resultierendes Amplifikat eine maximale Größe von 100 bp aufwies.

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mit Beschwererlösung versetzt, auf ein 1 % Agarosegel appliziert und elektrophoretisch aufgetrennt.



<p><u>Standards</u> Spur 1: Gene Ruler 1 kb DNA ladder Spur 2: Quick load 100 bp DNA ladder</p> <p><u>PCR-Produkte</u> Spur 3: DNA pA3, Positivkontrolle Spur 4: cDNA von <i>S. a.</i> HG001 incl. pA3, Spur 5: RNA von <i>S. a.</i> HG001 incl. pA3, ohne RT, Negativkontrolle Spur 6: cDNA von <i>S. a.</i> HG001 incl. pA3σ^B mut Spur 7: RNA von <i>S. a.</i> HG001 incl. pA3σ^B mut, ohne RT, Negativkontrolle</p> <p><u>Standards</u> Spur 8: Quick load 100 bp DNA ladder Spur 9: Gene Ruler 1 kb DNA ladder</p>
--

Abbildung 3.26: Gelelektrophorese der Amplifikate der RT-PCR von pA3 und pA3 σ^B mut. Zu sehen sind 2 Produkte basierend auf der RNA des Transposase-Gens *tnpA*.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte zeigte ein Produkt von 100 bp Größe aus der cDNA aus *S. aureus* HG001 pA3 (Spur 4), im Gegensatz zu der cDNA aus *S. aureus* HG001 pA3 σ^B mut (Spur 6), bei der kein Amplifikat zu sehen war. Die durchgeführten Negativkontrollen (Spur 5 und 7) differenzierten sich lediglich dadurch, dass den Proben bei der Herstellung der cDNA keine Reverse Transkriptase (RT) zugesetzt wurde. In den Proben war also keine kontaminierende DNA vorhanden, da diese ein positives Signal ausgelöst hätten. Die DNA des nativen Plasmids pA3 konnte erfolgreich als Positivkontrolle verwendet werden (Spur 3).

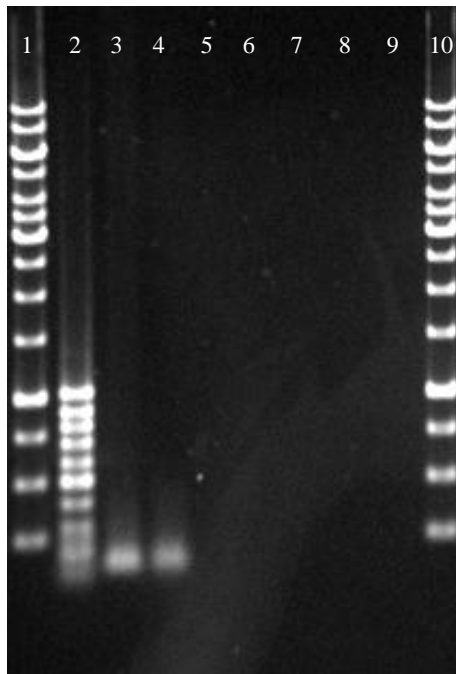
Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass vom Sigma B-Promotor eine Antisense-RNA generiert wurde. Bei Inaktivierung des Promotors wurde keine RNA mehr gebildet.

3.6.1 Nachweis von Antisense-RNA bei IS256r und IS256r σ^A mut

Auch der potentielle Sigma A-Promotor zeigte in den vorangegangenen Versuchen eine Auswirkung auf das Transpositionsverhalten von IS256r. Analog zu der oben beschriebenen

Vorgehensweise wurde daher erneut die Gesamt-RNA der Stämme *S. aureus* HG001 pA3 sowie *S. aureus* HG001 pA3 σ^A mut auf das Vorhandensein einer Antisense-RNA untersucht. Die Vorgehensweise entsprach der oben beschriebenen, allerdings wurde für die Herstellung der cDNA der Primer RNA89for verwendet. Für die Amplifikation kam das Primerpaar SigA89for und SigA0rev zum Einsatz.

Das Produkt sollte erwartungsgemäß eine Größe von 89 bp aufweisen. Die folgende Abbildung zeigt die Produkte der durchgeführten RT-PCR.



<p><u>Standards</u> Spur 1: Gene Ruler 1 kb DNA ladder Spur 2: Quick load 100 bp DNA ladder</p> <p><u>PCR-Produkte</u> Spur 3: DNA pA3, Positivkontrolle Spur 4: cDNA von <i>S. a.</i> HG001 incl. pA3, Spur 5: RNA von <i>S. a.</i> HG001 incl. pA3, ohne RT, Negativkontrolle Spur 6: cDNA von <i>S. a.</i> HG001 incl. pA3σ^Amut Spur 7: RNA von <i>S. a.</i> HG001 incl. pA3σ^Amut, ohne RT, Negativkontrolle</p> <p><u>Standard</u> Spur 10: Gene Ruler 1 kb DNA ladder</p>
--

Abbildung 3.27: Gelelektrophorese der Amplifikate der RT-PCR von pA3 und pA3 σ^A mut. Zu sehen sind 2 Produkte basierend auf der RNA des Transposase-Gens *tnpA*.

Auch bei der durchgeführten RT-PCR des Plasmids pA3 sowie pA3 σ^A mut konnten Produkte um 100 bp nachgewiesen werden (Spuren 3 und 4). Wie aus der Legende ersichtlich wird, handelte es sich in Spur 3 um die Positivkontrolle, also DNA von pA3. Die cDNA von pA3 wies ebenfalls das gewünschte Produkt auf. Die Mutante pA3 σ^A mut, bei der der Sigma A-Gegenstrangpromotor verändert wurde, zeigte kein Produkt. Ebenso wenig wie beide Negativkontrollen in den Spuren 5 und 7, bei denen keine reverse Transkriptase zugegeben wurde.

Anhand dieser Ergebnisse konnte geschlussfolgert werden, dass nicht nur der Sigma B-Gegenstrangpromotor sondern auch der Sigma A-Gegenstrangpromotor eine Antisense-RNA zur Transposase generiert.

3.6.2 Verifizierung der Nachweise der Antisense-RNA

Um die in den beiden vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Produkte der Antisense-RNA zu bestätigen, erfolgte folgende Nachweis-PCR. Die RNA des Stammes *S. aureus* HG001 pA3^Bmut wurde erneut mit einem Primer in cDNA umgeschrieben, diesmal jedoch erfolgte die Generierung der cDNA mit dem Primer SigA89for. Die anschließende Amplifizierung wurde mit dem Primerpaar SigA89for sowie SigA0rev durchgeführt, also dem Primerpaar, welches für den Nachweis der Antisense-RNA bei den Plasmiden pA3 sowie pA3^Amut verwendet wurde. Ebenso wurde mit *S. aureus* HG001 pA3^Amut mit dem Primer bzw. dem Primerpaar RNA100 for bzw. RNA0 rev verfahren. Dieses System setzt voraus, dass der jeweils unmutierte Gegenstrangpromotor in der Lage ist eine Antisense-RNA zu generieren. Als Positivkontrolle wurde bei beiden Nachweisen das unmutierte Plasmid pA3 eingesetzt. Die Produkte der PCR sind in der folgenden Abbildung zu sehen.

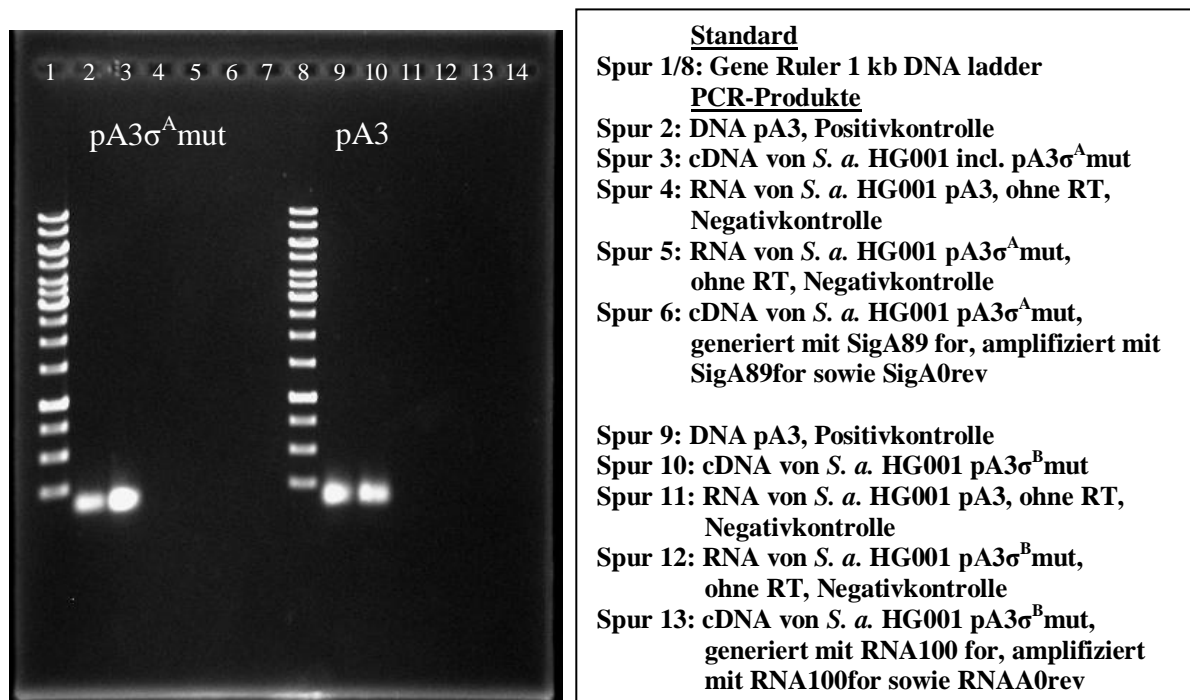


Abbildung 3.28: Gelelektrophorese der PCR-Produkte von pA3, pA3^Amut und pA3^Bmut.

Aus der Abbildung geht hervor, dass die verwendeten Positivkontrollen in Spur 2 und 9 erfolgreich amplifiziert wurden und die eingesetzten Negativkontrollen nicht detektierbar waren (Spur 4, 5, 11 und 12). Bei der cDNA von *S. aureus* HG001 mit dem Plasmid pA3 σ^A mut konnte mit dem Primerpaar RNA100for und RNA0rev eine Antisense-RNA nachgewiesen werden (Target SigB-Antisense-RNA; Spur 3), ebenso wie bei der cDNA von *S. aureus* HG001 mit dem Plasmid pA3 σ^B mut mit dem Primerpaar SigA89for und SigA0rev (Target SigA-Antisense-RNA; Spur10).

Erwartungsgemäß war in den Spuren 6 und 13 kein Produkt zu sehen, da bereits in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Plasmide mit den mutierten Gegenstrangpromotoren keine Antisense-RNA ausbilden konnten.

Die verwendeten Primer RNA100 for und RNA0rev konnten jeweils nur im Bereich vor dem Sigma A-Gegenstrangpromotor binden, so dass eine versehentliche Amplifizierung dessen Antisense-RNA ausgeschlossen werden konnte. Dies wird aus der sich im Anhang befindlichen Abbildung über die Lage der Primer zur Nachweis der Antisense-RNA deutlich.

3.7 Passagerversuche zur Erhöhung der Antibiotika-Resistenz

Die Tatsache, dass das mobile Element einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung von Biofilmen und Entstehung von Methicillinresistenz bei *S. aureus* ausübt, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Fujimura und Murakami, 2008; Schoenfelder et al., 2010). Dies geschieht durch das Inserieren in bestimmte Gene oder durch Insertionen in der Nähe von resistenzvermittelnden Regulatoren. Ebenfalls kann es zur Ausbildung von Hybridpromotoren kommen, so dass Resistenzgene stärker exprimiert werden (Maki und Murakami, 1997; Maki et al., 2004).

Um die Bedeutung von IS256 für die Resistenzausprägung in *S. aureus* besser beurteilen zu können, wurde ein Passagerversuch durchgeführt. Da nicht alle *S. aureus* Stämme über IS-Elemente bzw. im Besonderen über das IS256-Element verfügen, wurden für den Versuch die beiden Stämme *S. aureus* HG001 sowie *S. aureus* USA300 ausgewählt. Der erste Stamm wurde bereits umfassend im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschrieben. Der Stamm *S. aureus* USA300 birgt ein enormes pathogenetisches Potential, er ist die Hauptverursacher von Haut- und Weichteilinfektionen sowie bakterieller nekrotisierender Pneumonien in den USA, Kanada und Europa (Diep et al., 2006; Hidron et al., 2009). Keiner der beiden Stämme

verfügt über IS256, so dass die durchgeführten Versuche nicht durch das Vorhandensein von Kopien des natürlichen IS256 verfälscht werden konnten.

Die beiden Stämme wurden jeweils mit den Plasmiden pA3 σ^B mut sowie pBT2 transformiert und über die eingebrachte Chloramphenicol-Resistenz selektiert. Zur Kontrolle wurden die eingebrachten Plasmide präpariert und mittels Gelelektrophorese nachgewiesen.

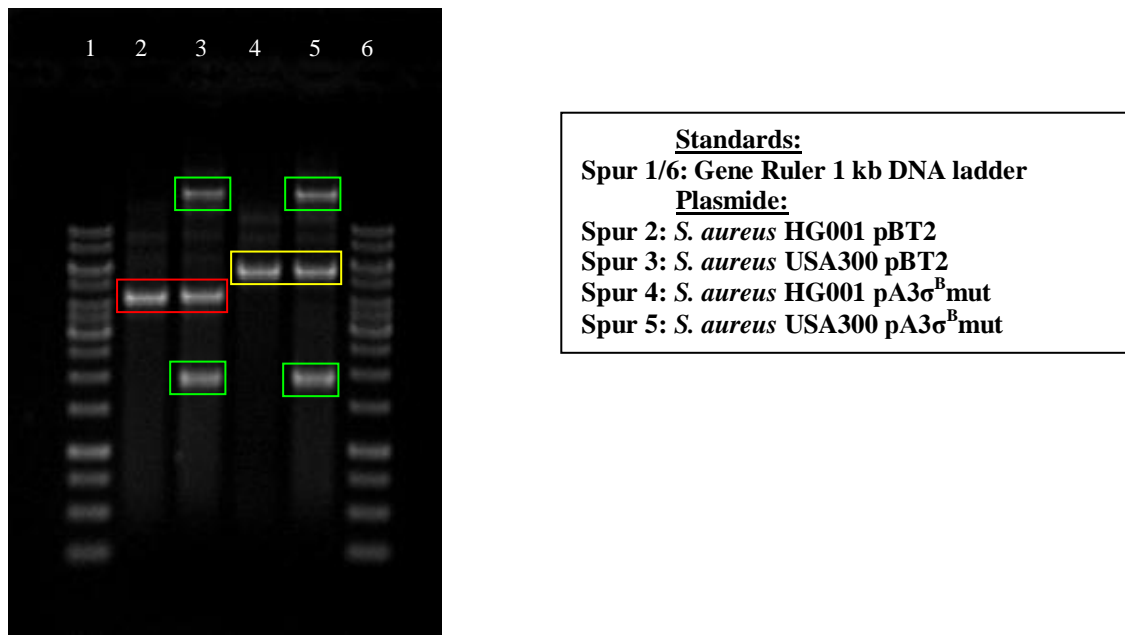


Abbildung 3.29: Gelelektrophorese der Plasmide pBT2 (rot umrandet) sowie pA3 σ^B mut (gelb umrandet) aus den Stämmen *S. aureus* HG001 und *S. aureus* USA300.

Wie aus der Abbildung deutlich hervorgeht, war die Transformation der Plasmide pBT2 und pA3 σ^B mut in die beiden *S. aureus* –Stämme erfolgreich. Des Weiteren konnten beim Stamm *S. aureus* USA300 zwei weitere Plasmide detektiert werden (grün umrandet). Das Vorhandensein von in der Regel zwei weiteren Plasmiden in diesem Stamm wurde bereits von Kennedy et al. beschrieben (Kennedy et al., 2010). Das größere der beiden Plasmide codiert für eine Schwermetallresistenz und in manchen Isolaten für eine Resistenz gegenüber Antibiotika. Die Funktion des kleineren Plasmids ist teilweise ebenfalls mit Antibiotika-Resistenz assoziiert. So konnte für das Plasmid pUSA02, mit einer Größe von etwa 4,4 kb, aus dem Stamm *S. aureus* USA300 FPR3757 eine Resistenz gegenüber Tetracyclin nachgewiesen werden (Diep et al., 2006).

Die zwei zu untersuchenden Stammpaare wurden, unter Zugabe von Chloramphenicol [20 $\mu\text{g/ml}$], in 5 ml BHI inokuliert und bei 32 °C und 130 rpm geschüttelt. Nach 24 h erfolgte das Überimpfen der angewachsenen Kulturen im Verhältnis 1:100 in jeweils drei Reagenzgläser

mit 5 ml BHI-Medium, das ebenfalls mit Chloramphenicol [20µg/ml] versetzt wurde. Zusätzlich wurden drei unterschiedliche Konzentrationen Vancomycin zugegeben, um die Bakterien zu selektieren, die in Anwesenheit von Vancomycin überleben konnten. Dieser Vorgang wurde täglich wiederholt, wobei zwei Röhrchen mit leicht steigender Vancomycin-Konzentration im Medium und ein Röhrchen als Rettungskultur mit der Vancomycin-Konzentration der Vorkultur angeimpft wurden.

Als Inokulum wurden jeweils 50 µl der Kultur mit der höchsten Vancomycin-Konzentration, bei der sichtbares Wachstum stattgefunden hat, verwendet.

Die folgende Abbildung verdeutlicht die beschriebene Vorgehensweise.

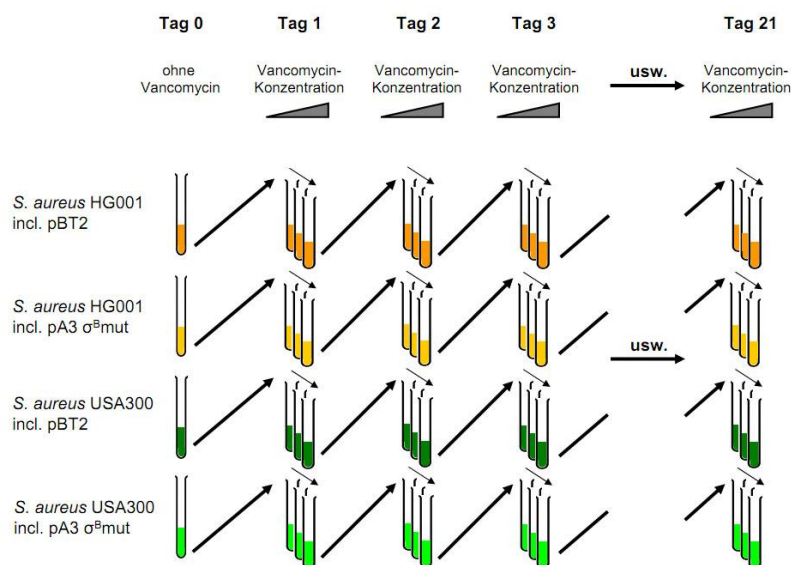


Abbildung 3.30: Schematische Darstellung des Passagierversuchs mit den *S. aureus*-Stämmen HG001 und USA300, jeweils mit den Plasmiden pA3 σ^B mut sowie pBT2. Die im Medium enthaltenen Vancomyinkonzentrationen wurden schrittweise erhöht.

Die Konzentration von zugesetztem Vancomycin bei den Stämmen *S. aureus* HG001 sowie *S. aureus* USA300, jeweils mit den Plasmiden pA3 σ^B mut oder pBT2, sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

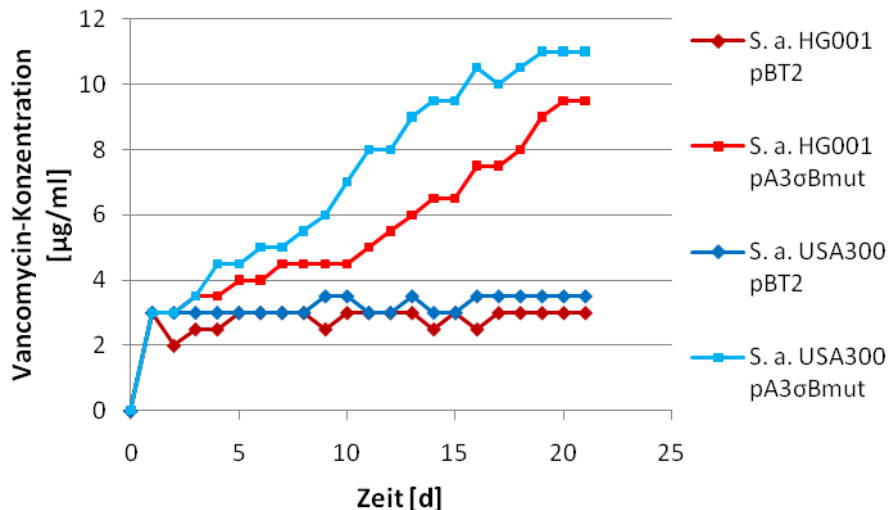


Abbildung 3.31: Die Stämme *S. aureus* HG001 und USA300, jeweils mit dem Plasmid pA3 σ^B mut oder pBT2, inkubiert über die Dauer von 21 Tagen mit individuell ansteigender Vancomycin-Konzentration.

Aus der Abbildung geht deutlich hervor, dass das Plasmid pBT2, also ohne das Insert bestehend aus IS256 und der *ermB*-Kassette, in keinem der beiden Stämme zu einer deutlich gesteigerten Vancomycin-Resistenz führte. Auch im direkten Vergleich der beiden Stämme *S. aureus* HG001 und USA300, jeweils incl. pBT2, zueinander konnte kein signifikanter Unterschied in der Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin festgestellt werden. Die maximale Differenz der Resistenz wurde an den Tagen 2, 9 sowie 16 bestimmt und betrug lediglich 1 µg/ml.

Die beobachtete Resistenzsteigerung des jeweiligen Stamms, der sich nur durch das Vorhandensein des IS256r unterschied, war jedoch gravierender. Bei *S. aureus* HG001 wurde in Anwesenheit des Plasmids pA3 σ^B mut eine Vancomycin-Resistenz von 9,5 µg/ml bestimmt. In Gegenwart des Plasmids pBT2 im gleichen Stamm konnte lediglich ein Wert von 3,0 µg/ml nach 21-tägiger Inkubationsdauer festgestellt werden.

Durch das Vorhandensein des Plasmids pA3 σ^B mut konnte demnach die Resistenz des Stammes *S. aureus* HG001 gegenüber Vancomycin auf mehr als das Dreifache gesteigert werden (Faktor 3,167).

Ähnliche Auswirkungen zeigten sich ebenfalls im Stamm *S. aureus* USA300: Die mit dem Plasmid pA3 σ^B mut versehene Kultur zeigte nach 21 Tagen eine Vancomycin-Resistenz bis zu einer Konzentration von 11,0 µg/ml, die das Leerplasmid pBT2 enthaltende Kultur erreichte bei gleicher Bebrütungsdauer lediglich einen Toleranzwert von 3,5 µg/ml. Die Vancomycin-

Resistenz des Stamms *S. aureus* USA300 konnte also durch das Plasmid pA3 σ^B mut etwa um den Faktor 3 (3,143) gesteigert werden.

Besonders bemerkenswert ist die Entwicklung der Resistenz im Vergleich der Stämme *S. aureus* HG001 und USA300, jeweils mit dem Plasmid pA3 σ^B mut, zueinander. Nach 11, 13, 14, 15 und 16 Tagen wurde eine Differenz in der Resistenz gegenüber Vancomycin von 3 $\mu\text{g/ml}$ aufgezeichnet. Zudem zeigte der Stamm *S. aureus* USA300 incl. pA3 σ^B mut über den gesamten aufgenommenen Zeitraum eine schnellere Resistenzentwicklung als der Stamm *S. aureus* HG001 incl. pA3 σ^B mut.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein des IS256r in zwei verschiedenen *S. aureus* Stämmen zu einer Resistenzzunahme gegenüber Vancomycin führte.

4 Diskussion

4.1 Resistenzentwicklung aufgrund mobiler Elemente bei klinisch relevanten Bakterienarten (mit besonderer Berücksichtigung von Staphylokokken)

Die Tatsache, dass mobile genetische Elemente einen entscheidenden Einfluss bzw. positiven Effekt auf die Genomplastizität, Virulenz- und Resistenzentwicklung einiger Bakterienarten ausüben, ist in der gegenwärtigen Literatur hinreichend belegt. Dabei wurde insbesondere dieser Zusammenhang kontrovers diskutiert und die IS-Elemente zunächst als molekulare Parasiten des Wirts betrachtet (Doolittle und Sapienza, 1980; Orgel und Crick, 1980).

Doch bereits 1985 wurde von Chao und McBroom beschrieben, dass sich das Vorhandensein eines IS10 in *E. coli* positiv auswirkt und im Vergleich zu den *E. coli*-Stämmen, bei denen das IS-Element deletiert wurde, zu einer erhöhten Fitness führt (Chao und McBroom, 1985).

Auch in *Mycobacterium tuberculosis* kann das spezifische IS-Element 6110 das Expressionslevel von nachfolgenden Genen regulieren, da es am 3'-Ende über einen nach außen führenden Promotor verfügt (Safi et al., 2004).

In *Streptococcus agalactiae* führt das IS-Element 1548 zu einer erhöhten Kompetenz an Fibronektin und Laminin zu binden, indem es in *scpB-lmB* Region inseriert (Al Safadi et al., 2010). Die Autoren postulieren, dass das IS1548 eine entscheidende Rolle spielen kann neonatale Endocarditis und Meningitis zu verursachen.

In einem klinischen *S. aureus*-Stamm wurde durch die Insertion von IS1182 und die damit verbundene Inaktivierung des *lytH*-Gens der MHK-Wert gegenüber Methicillin verdoppelt (Fujimura und Murakami, 2008).

Auch für das IS-Element IS256 sind resistenzsteigernde Eigenschaften beschrieben, so hat es entscheidend zur Genomplastizität und Resistenzentwicklung von Enterokokken und Staphylokokken beigetragen (Rice und Thorisdottir, 1994; Kozitskaya et al., 2004; Jansen et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte im kleinen Maßstab gezeigt werden, dass, wie bereits von diversen Autoren beschrieben wurde, das IS256 im Genom von Staphylokokken weit verbreitet sein könnte (Dyke et al., 1992; Kozitskaya et al., 2004; Hennig und Ziebuhr, 2008). Der genaue Nachweis durch die Lokalisierung der Elemente steht allerdings noch aus.

Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass das IS256 vermutlich auch sehr häufig im Genom von CA-MRSA vorhanden ist.

Bereits in vorausgegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte bewiesen werden, dass das Element in den zu den norddeutschen Epidemiotyp zählenden Stämmen *S. aureus* 137/93A und *S. aureus* 137/93G (MLST-Typ 247) mit mindestens 14 Kopien vertreten ist (Jansen et al., 2007). Der aus einem Trachealsekret isolierte Elternstamm *S. aureus* 137/93A (Bierbaum et al., 1999) weist eine intermediäre Vancomycinresistenz bis zu 8 µg/ml auf, der Tochterstamm *S. aureus* 137/93G hingegen von bis zu 12 µg/ml (Reipert et al., 2003). Beide Stämme zeichnen sich im Vergleich zu dem Vancomycin-sensiblen Stamm *S. aureus* 8325 durch eine verdickte Zellwand aus (Faktor 1,4). Die Generierung der erhöhten Resistenz gegenüber Vancomycin im Stamm *S. aureus* 137/93G beruht zumindest teilweise auf einer Insertion des IS256 in dem Gen *tcaA*. Die Inaktivierung dieses Membranprotein-Gens bewirkt eine Resistenz gegenüber Glykopeptidantibiotika, insbesondere gegenüber Teicoplanin (Reipert et al., 2003; Maki et al., 2004; McCallum et al., 2007).

Ein weiterer Hinweis auf den Zusammenhang zwischen IS256 und einer Resistenzentstehung konnte im Rahmen der Diplomarbeit von Tina Reuter beschrieben werden. Der Stamm *S. aureus* 1450/94, der ebenfalls zum norddeutschen Epidemiotyp zählt, trägt eine Insertion von IS256 in dem Gen *mutS*. Durch die Inaktivierung des Gens kann das postreplikative Reparatursystem (mismatch repair system, MMR) weder durch die Replikation hervorgerufene Fehler erkennen (MutS) noch beheben (MutL). Mutationen in diesen Genen führen zu einem enormen Anstieg der Mutationsrate (100 bis 1000fach) und somit zur Entstehung eines Mutatorstamms (Horst et al., 1999; O'Neil und Chopra, 2002).

Diese Mutatorstämme werden, bedingt durch ihre hohen Mutationsraten, schneller gegen Antibiotika resistent als Stämme mit intaktem MMR-System. Das Auftreten von Mutatorstämmen wurde bereits für *S. aureus* beschrieben (Prunier et al., 2003; Ba et al., 2010), ist aber glücklicherweise, mit der Ausnahme von Isolaten von Patienten mit zystischer Fibrose und bei SCV-Mutanten, recht selten (Prunier et al., 2003; Besier et al., 2008). Auch der derzeit häufig diskutierte Anstieg der MHK-Werte (engl. MIC creep) speziell gegenüber Vancomycin, Daptomycin und Linezolid in nur einigen Institutionen könnte mit dem Auftreten von Mutatorstämmen in einzelnen Regionen begründet sein (Steinkraus et al., 2007; Sader et al., 2009).

Auch spielt das IS-Element 431 bzw. IS257 eine wichtige Rolle bei der Resistenzentwicklung von Staphylokokken, es ist fester Bestandteil aller bislang detektierten SCCmec-Kassette von MRSA-Stämmen (Tuchscherr et al., 2007; Malachowa und DeLeo, 2010).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Veränderung der Genexpressionen durch Insertion von IS-Elementen, auch für IS256, hinreichend beschrieben ist. Die Häufigkeit, mit der ein IS-Element transloziert, wurde in dieser Arbeit untersucht und wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.2 Untersuchungen zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz in *S. aureus* HG001

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig über eine quantitative Bestimmung der Transpositionsfrequenz des IS256r gezeigt werden, dass subinhibitorische Konzentrationen der klinisch relevanten Antibiotika Ciprofloxacin, Linezolid und Vancomycin zu einer starken Erhöhung von Transpositionen und damit einer erhöhten Genomplastizität führen. In vorherigen Publikationen war bereits die Insertionshäufigkeit des IS256 in das *ica*-Operon beschrieben worden (Ziebuhr et al., 1999).

Die aufgenommenen Transpositionsfrequenzen des IS256r, also des nativen IS256-Elementes, das mit einer Erythromycin-Resistenzkassette versehen wurde, in dem *S. aureus*-Stamm HG001 zeigte deutlich, dass unter Selektionsdruck durch Antibiotika im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine merkliche Steigerung der Transpositionsrate erfolgte. Dies bestärkt die Theorie, dass die Entstehung von Mutationen durch die Zugabe von Antibiotika gefördert wird (Cirz und Romesberg, 2007). Die stärkste Veränderung der Transpositionsaktivität wurde nach der Zugabe des Antibiotikums Linezolid beobachtet. Dies ist für den klinischen Gebrauch des Antibiotikums nicht unbedenklich, da es speziell für die Therapie von Infektionen, die durch resistente Staphylokokken hervorgerufen werden, eingesetzt wird (Presseinformation der Firma Pfizer). Wie bereits oben für *S. aureus* und von Kozitskaya et al. (2003) für *S. epidermidis* beschrieben, verfügen insbesondere klinische Staphylokokken häufig über das IS256-Element. Demzufolge könnte der Einsatz dieses Antibiotikums in zu geringer Dosierung über eine Erhöhung der Transpositionsfrequenz zu unerwünschten Mutationen führen.

Ebenfalls wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Steigerung der Transpositionsaktivität durch subinhibitorische Konzentrationen des Antibiotikums Ciprofloxacin nachgewiesen. Ciprofloxacin ist ein bekanntes Agens, das Prophagen mobilisiert und die SOS-Antwort in Bakterien auslöst (Cirz et al., 2007). Es wurde bisher aber nicht als Aktivator der Transposition von IS256 beschrieben. Die Kombination aus der hier gezeigten Steigerung der Transpositionsfrequenz, dem Auslösen der SOS-Antwort und der Erhöhung der Mutationsrate durch Ciprofloxacin deutet auf eine schnelle Resistenzentstehung bei *S. aureus* hin (Mesak et al., 2009). Interessanterweise finden sich Hinweise in der Literatur, dass Ciprofloxacin, bedingt durch eine schnelle Resistenzentstehung, nicht als ein adäquates Medikament für durch MRSA verursachte Infektionen eingestuft wird (Raviglione et al., 1990). Dennoch erfolgt seine Anwendung aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums sehr häufig im Rahmen einer durchgeführten Initialtherapie. Laut Presseinformation der Firma Bayer zählt es zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotika der Welt und übt daher mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit sehr oft einen Selektionsdruck auf Staphylokokken aus, auch wenn das Antibiotikum nicht das optimale Therapeutikum ist.

Glücklicherweise konnte festgestellt werden, dass das am häufigsten eingesetzte Antibiotikum zur Behandlung von durch MRSA hervorgerufenen Infektionskrankheiten, Vancomycin, die geringste Steigerung der Transpositionsaktivität der getesteten Antibiotika auslöste. Dies könnte mit der bakteriostatischen Eigenschaft des Antibiotikums korrelieren. Denn bei den beiden bakteriozid wirkenden Antibiotika Ciprofloxacin und Linezolid konnte eine stärkere Transpositionsfrequenz determiniert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für die SOS-Antwort gemacht. Von Jolivet-Gougeon wurde beschrieben dass bakteriostatische Antibiotika wie β -Laktame oder Tetracykline in der Regel keine SOS-Antwort auslösen, ganz im Gegensatz zu bakteriozid-wirkenden Antibiotika wie den Fluorochinolonen oder Metronidazol (Jolivet-Gougeon et al., 2011).

4.3 Steuerung der Transposition

Die Transposition erfolgt, im Vergleich zur Zellzahl, stets auf einem geringen Niveau. Vermutlich ist diese Tatsache auf die mutagenen Effekte zurückzuführen, die IS-Elemente ausüben können und das Bakterium so vor einer Überflexibilisierung seines Genoms

schützen, beispielsweise vor Deletionen durch Rekombinationen (Doolittle et al., 1984; Mahillon und Chandler, 1998).

Die Transposition ist ein Vorgang, der von vielen Faktoren beeinflusst werden kann, sowohl durch das mobile Element selbst als auch durch den Wirt, indem es sich befindet. Die jeweiligen Faktoren sind spezifisch für den Wirt als auch für das jeweilige Element, so dass im Folgenden nur einige häufig diskutierte Regulationsmöglichkeiten aufgegriffen werden.

Von elementarer Bedeutung für die Transposition sind das Vorhandensein der letzten 2-3 bp der terminalen inverted Repeats und eine intakte Transposase (Mahillon und Chandler, 1998). Durch die Inaktivierung der Transposase wird das IS-Element immobilisiert und ist untransponierbar, wie hier durch die Mutante des IS256r in dem Plasmid pA3Δtnptr gezeigt werden konnte. Dass die Transposase einen solch wichtigen Einfluss ausübt, wurde bereits im Vorfeld beschrieben (Valle et al., 2007).

Zu den Wirtsfaktoren zählen viele DNA-Bindeproteine wie IHF (integration host factor) und Fis (factor for inversion stimulation). Viele IS-Elemente haben eine Bindestelle für den IHF innerhalb der terminalen inverted repeats, beispielsweise IS1, IS903 und IS10. Für IS10 wurde gezeigt, dass IHF ein positiver Regulator für die Transposition von IS10 ist (Signon und Kleckner, 1995; Sakai et al., 1995). Für das IS50, das ebenfalls zur IS10-Familie gehört, wirken das Protein Fis wie auch das Replikationsstarter Protein DnaA hemmend auf die Transposition (Reznikoff, 1993). Gleiches gilt für das Gen *hfq* des RNA-Bindeproteins Hfq oder HF-I; durch seine Inaktivierung steigt die IS10 Transpositionsfrequenz deutlich an (Ross et al., 2010).

Auch der Einfluss der bakteriellen SOS-Antwort auf das Transpositionsverhalten von IS-Elementen wird häufig und kontrovers diskutiert. Zentraler Bestandteil der SOS-Antwort sind die antagonistisch wirkenden Proteine LexA und RecA, wobei LexA als Repressor und RecA als Aktivator fungieren (Gudas und Pardee, 1975; Horii et al., 1981). LexA bindet an die SOS-Box innerhalb der Promotorregion der durch die SOS-Antwort regulierten Gene und beeinträchtigt deren Transkription (Little et al., 1981). Inwieweit diese Beeinträchtigung erfolgt, ist abhängig von der Lage und der Sequenz der SOS-Box sowie der Stärke des jeweiligen Promotors. In Anwesenheit von einzelsträngiger DNA bindet RecA an diese, wird aktiviert und initiiert die autokatalytische Spaltung von LexA, so dass die SOS-Gene abgelesen werden können (Arenson et al., 1999). Nach Reparatur der entstandenen DNA-

Schäden verliert RecA seine Funktion als Co-Protease, so dass LexA wieder an die SOS-Box bindet und ein weiteres Ablesen der SOS-Gene erschwert (Janion, 2008).

Für eine direkte Regulierung durch die SOS-Antwort ist also das Vorhandensein einer LexA- oder SOS-Box unerlässlich (Janion, 2008).

Für IS10 und IS1 wurde in *E. coli* bereits gezeigt, dass die SOS-Antwort in Anwesenheit großer Mengen Transposase ausgelöst wird (Roberts und Kleckner, 1988; Lane et al., 1994). Für IS50 ist ein regulierender Effekt in beide Richtungen beschrieben. So beschreibt Weinreich eine Hemmung der Transposition bei Auslösung der SOS-Antwort, während Kuan eine Hochregulierung beobachten konnte (Weinreich et al., 1991; Kuan et al., 1991a; Kuan et al., 1991b; Kuan et al., 1992). Die letztere Beobachtung wurde durch Ahmed bestätigt, der ebenfalls eine Hochregulierung von IS50 bzw. Tn5 sowie Tn9 in Anwesenheit von RecA feststellen konnte (Ahmed, 1986).

Die für die Steuerung durch die SOS-Antwort notwendige LexA-Box ist bei IS256 nicht vorhanden. Die Transpositionsfrequenz von IS256r in *S. aureus* HG001 kann daher nur indirekt über die SOS-Antwort durch Ciprofloxacin gesteigert werden.

Durch Anderson wurde gezeigt, dass *sigB* im Rahmen der SOS-Antwort reguliert wird. Die durch die Zugabe von Mitomycin C ausgelöste SOS-Antwort in dem Stamm *S. aureus* UAMS-1 bewirkte eine Repression von *sigB* (Anderson et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation wäre über den Einfluß des Gens *pknB*, welches für die Serin/Threonin-Kinase PknB codiert. Es ist vielen in Bakterien vorhanden und übt einen Einfluss auf die Zellteilung, die Zellform und den Zellwandmetabolismus aus (Fernandez et al., 2006; Donat et al., 2009; Tamber et al., 2010). Durch Anderson wurde gezeigt, dass PknB (Locus 1063 in *S. aureus* N315) im Stamm *S. aureus* UAMS-1 während der SOS-Antwort reprimiert wird (Anderson et al., 2006). PknB wiederum übt einen Einfluss auf die Sigma B Aktivität aus. So zeigte eine *pknB*-Mutante des Stammes *S. aureus* USA300 eine deutlich verringerte Sigma B-Aktivität (Tamber et al., 2010). Sigma B ist als Regulator der IS256-Aktivität bekannt (Lyon et al., 1987; Valle et al., 2007).

4.3.1 Der Einfluss von σ^B auf die Transpositionsfrequenz von IS256 und IS256r

Bei der Bestimmung des Transpositionsverhaltens von IS256r in dem σ^B -defizienten Stamm *S. aureus* 8325 fiel auf, dass deutlich höhere Transpositionsfrequenzen erreicht wurden als in dem Stamm *S. aureus* HG001, der über ein funktionales *rsbU* verfügt, das als Aktivator von σ^B dient. Durch das Programm ProDoric wurde ein potentieller Sigma B-Gegenstrangpromotor innerhalb der Transposase des IS256 identifiziert, der durch das Einbringen von stillen Mutationen inaktiviert wurde. Nach der Inaktivierung stieg die Transpositionsfrequenz sehr stark an.

Der regulierende Effekt von Sigma B auf die Transpositionsfrequenz von IS256 wurde erstmalig von Lyon beschrieben (Lyon et al., 1987). Dabei wurde festgestellt, dass das IS256 in dem ebenfalls *rsbU*-defizienten Stamm *S. aureus* RN450 auffallend häufig transponierte. Ähnliche Beobachtungen wurden von Valle et al. beschrieben, die eine um den Faktor 3 erhöhte Insertionsfrequenz eines ebenfalls rekombinanten IS256 in dem σ^B -defizienten Stamm *S. aureus* 15981 $\Delta\sigma^B$ beobachteten (Valle et al., 2007).

Die von Valle beobachtete dreifache Steigerung der Transpositionsfrequenz von IS256r wurde im Rahmen dieser Arbeit in *S. aureus* 8325 mit dem Faktor von 22,8 weit übertroffen. Durch Inaktivierung des Sigma B-Gegenstrangpromotors innerhalb des IS256r konnte auch in dem Stamm *S. aureus* HG001, der, wie bereits beschrieben, über ein intaktes *rsbU*-Gen verfügt, eine Transpositionsfrequenz bestimmt werden, die die des IS256r mit intaktem Gegenstrangpromotor bis um den Faktor 39 übertraf. Dies zeigt deutlich einen Einfluss von Sigma B auf die Transposition von IS256r an.

Doch nicht nur hinsichtlich der Transposition ist der Sigmafaktor σ^B wichtig für das Bakterium: Die Fähigkeit von *S. aureus* im Wirt zu überleben und zu persistieren, basiert auf der Kombination von Virulenzfaktoren und der koordinierten Expression von Stress-Genen, beispielsweise nach der Einwirkung von Hitze, Säure oder Wasserstoffperoxid (Chan et al., 1998; Gertz et al., 2000). Die hier beteiligten Proteine werden zumindest teilweise durch den alternativen Sigmafaktor SigB abgelesen, der ebenfalls in anderen humanpathogenen Bakterien detektiert und charakterisiert wurde, beispielsweise in *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium tuberculosis* (Becker et al., 1998; Chan et al., 1998; DeMaio et al., 1996).

Der Sigmafaktor B ist von zentraler Bedeutung für *S. aureus*, er transkribiert eine Vielzahl von Virulenzfaktoren und wird reguliert über *rsbU*, *rsbV* und *rsbW*, die in einem Operon

angeordnet sind (Kullik et al., 1998). Zu den durch Sigma B kontrollierten Virulenzfaktoren gehört unter anderem auch die Ausbildung von Biofilmen (Van Schaik und Abee, 2005). Die Fähigkeit an Oberflächen von Implantaten und Prothesen zu binden, ist der Hauptgrund für gravierende Infektionen nach chirurgischen Eingriffen, insbesondere da auch adäquate Antibiotika nicht in der Lage sind diesen Schutzwall zu durchdringen (Costerton et al., 1999; Stewart und Costerton, 2001; Ziebuhr, 1999). Die Biofilmbildung in *S. aureus* wird maßgeblich durch Sigma B gesteuert (Kim et al., 2008), wobei auch die Regulatorgene *agr* und *sarA* einen Einfluss auszuüben scheinen (Pratten et al., 2001; Valle et al., 2003). Durch die Insertion von IS256 in das *ica*-Gencluster kann die Biofilmbildung sowohl bei *S. aureus* als auch bei *S. epidermidis* wiederum selektiv an- und ausgeschaltet werden (Ziebuhr et al., 1999; Cho et al., 2002; Kiem et al., 2004).

Der Sigmafaktor SigB wird nicht kontinuierlich, sondern gezielt während des Übergangs zwischen der log- und der stationären Wachstumsphase und bei Stresszuständen gebildet (Halgasova et al., 2001). Die Halbwertszeit der *sigB*-Transkripte ist aus diesem Grund auch sehr kurz, sie beträgt beispielsweise in *Myobacterium tuberculosis* lediglich wenige Minuten (Hu und Coates, 1999).

Paradoxerweise nahmen die Transpositionsfrequenzen von IS256r in *S. aureus* HG001 ihren Maximalwert in der Regel während des Übergangs von der log- in die stationäre Phase an, also genau zu der gleichen Zeit mit der höchsten SigB Transkriptionsrate. Dementsprechend müsste die Transpositionsfrequenz eigentlich ab diesem Zeitpunkt abnehmend sein. Auch die Transpositionsfrequenzen des IS256r mit inaktiviertem σ^B -Promotor in *S. aureus* HG001 oder des IS256r in *S. aureus* 8325 beginnen zwar auf einem höheren Niveau und die Transpositionsfrequenz bleibt annähernd konstant hoch, aber dennoch ist mindestens innerhalb der ersten Stunde eine Anlaufphase zu erkennen. Dies deutet auf weitere regulatorische Mechanismen hin, die die Transposition von IS256r beeinflussen, beispielsweise durch den ebenfalls in der Transposase detektierten Gegenstrangpromotor für Sigma A.

4.3.2 Der Einfluss von σ^A auf die Transpositionsfrequenz von IS256 und IS256r

Der in der Transposase identifizierte Sigma A-Gegenstrangpromotor übt ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die Transpositionsfrequenz von IS256r aus. Durch seine Inaktivierung konnte die Transpositionsfrequenz ebenso deutlich gesteigert werden (Faktor

23), auch wenn sich dieser Effekt als nicht so stark zeigte wie die Inaktivierung des Sigma B-Gegenstrangpromotors. Daraus kann gefolgert werden, dass der σ^B -Gegenstrangpromotor einen stärker hemmenden Einfluss auf die Transposition des IS256r ausübt als der σ^A -Gegenstrangpromotor. Für diese Annahme spricht, dass das IS256r mit verändertem σ^A -Promotor weiterhin über einen intakten σ^B -Gegenstrangpromotor verfügt, der die Transposition negativ beeinflusst und dementsprechend eine geringere Transpositionsfrequenz zeigt. Und in der unter 4.3.1 diskutierten Transpositionsfrequenz des IS256r mit verändertem σ^B -Gegenstrangpromotor ist der σ^A -Gegenstrangpromotor noch intakt, verursacht aber lediglich eine schwache Hemmung der Transpositionsfrequenz.

Die Funktion von σ^A auf das Transpositionsverhalten von mobilen Elementen ist in der gegenwärtigen Literatur nicht beschrieben. Der Sigmafaktor Sigma A liest konstitutiv exprimierte Gene ab und ist in allen Bakterien ständig vorhanden (Deora und Misra, 1996). SigA ist daher nicht abhängig von bestimmten Wachstumsphasen, wie etwa der Sigmafaktor Sigma B (Halgasova et al., 2001).

In *Mycobacterium tuberculosis* wurden ebenfalls die beiden Sigmafaktoren Sigma A und Sigma B detektiert und untersucht (Hu und Coates, 1999). Das *sigA*-Transkript hat eine sehr lange Halbwertszeit, was für seine Rolle als Regulator bei konstitutiv exprimierter Regulator spricht. Das Transkriptions-Niveau von *sigA* während der log-Phase und stationären Phase, wie auch bei Stresszuständen bleibt konstant, da es in der Regulierung von „housekeeping“-Genen aktiv ist (Hu und Coates, 1999). Dennoch gibt es Untersuchungen über *sigA* in *M. tuberculosis*, die postulieren, dass *sigA* einen Einfluss auf die Virulenz des Erregers hat, indem es das Wachstum in den Makrophagen der menschlichen Immunabwehr beschleunigt (Wu et al., 2004). So konnte im Rahmen dieser Versuche nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von *sigA* zu einem stärkeren Wachstum von *M. tuberculosis* in den Makrophagen führte, während eine Mutante, die nur eine antisense-RNA von *sigA* ausbilden konnte, ein geringeres Wachstum zeigte (Wu et al., 2004). Allerdings steht diese Untersuchung nicht im Widerspruch zu den durch Hu und Coates gemachten Ergebnissen, dass *sigA* „housekeeping-Gene“ reguliert, da das Wachstum nicht zu den pathogenen Eigenschaften eines Bakteriums zählt.

4.3.2.1 Die Auswirkungen der Inaktivierung beider Gegenstrangpromotoren auf die Transpositionsfrequenz des IS256r

Durch die Inaktivierung beider Gegenstrangpromotoren innerhalb des IS256r nahm die Transpositionsfrequenz des IS256r im Vergleich zu den Transpositionsfrequenzen, die jeweils nur mit einem veränderten Gegenstrangpromotor aufgenommen wurden, paradoxerweise ab. Theoretisch sollte in diesem speziellen Fall eine enorm hohe Transpositionsfrequenz ermittelt werden können, da das IS256r keiner Regulierung mehr durch σ^A oder σ^B erfährt. Möglicherweise erfolgt ein alternativer Kontrollmechanismus um das Genom des Bakteriums vor übermäßiger Flexibilisierung zu schützen, ähnlich der für das IS10 im folgenden Abschnitt beschriebenen multi copy inhibition (MCI).

Dennoch ist die in der Doppelmutante bestimmte Transpositionsfrequenz um ein Vielfaches stärker als die Transpositionsfrequenz des unmutierten IS256r.

4.3.3 Nachweise von Gegenstrang-RNA zur Steuerung der Transposition

Aufgrund des Vorhandenseins von durch bioinformatisch vorhergesagten Promotoren wurde angenommen, dass die Steuerung der Transposition über die Ausbildung einer Antisense-RNA erfolgt, die mit der mRNA der Transposase (*tnpA*) interagiert.

Um den Nachweis für den oben unter 4.3.1 und 4.3.2 beschriebenen Einfluss durch σ^A und σ^B auf das Transpositionsverhalten des IS256r in dem Stamm *S. aureus* HG001 zu erbringen, wurden die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Sigma A- und Sigma B-Gegenstrangpromotoren durch das Einfügen von stillen Mutationen verändert. Die resultierenden IS256r-Elemente mit inaktivierten Promotoren zeigten erwartungsgemäß deutlich höhere Transpositionsfrequenzen als das IS256r-Element mit intakten Promotoren – bei dem IS256r mit verändertem Sigma A-Gegenstrangpromotor konnte die Transpositionsfrequenz um den Faktor 23 gesteigert werden. Die Veränderung des Bindemotivs des Sigma B-Promotors bewirkte sogar eine Steigerung der Transpositionsfrequenz um den Faktor 39.

Nach der Gesamt-RNA-Präparationen der Plasmide pA3, pA3 σ^A mut und pA3 σ^B mut in *S. aureus* HG001 erfolgte eine spezifische cDNA-Synthese mit jeweils nur einem Primer (Cummings et al., 2003). Im Anschluss an die danach durchgeführten RT-PCR zeigte sich ein Produkt basierend auf dem jeweiligen Promotor innerhalb des IS256r und *tnpA* bei dem

unmutierten Plasmid pA3, aber nicht bei den beiden mutierten Plasmiden. Das zeigte, dass von beiden Promotoren im unmutierten Zustand eine Gegenstrang-RNA von *tnpA* abgelesen wird.

Die über die PCR-Amplifikate detektierte Antisense-RNA des SigB-Promotors hatte eine Länge von mindestens 100 bp, die des SigA-Gegenstrangpromotors von mindestens 89 bp.

Die Existenz von regulatorischen RNAs wurde 1981 erstmals im Zusammenhang mit dem Plasmid ColE1 beschrieben, bei dem eben diese RNA-Moleküle die Primerausbildung für die Initiierung der Replikation regulierten (Tomizawa et al., 1981).

Kleine regulatorische RNA-Moleküle lassen sich prinzipiell in drei Gruppen einteilen: cis und trans codierte RNAs sowie sRNAs. Die in cis codierten Antisense-RNAs sind komplementär zu ihrer Ziel-RNA und haben eine einzige Zielsequenz. Die in trans codierten Antisense-RNAs werden an einer anderen Stelle im Chromosom gebildet, sind mit ihrer Ziel-RNA nur teilweise komplementär und können mehrere Zielsequenzen haben. Sowohl cis als auch trans codierte Antisense-RNAs bilden Komplexe mit der Ziel-RNA aus und führen so entweder zu einer Inhibierung oder Aktivierung der eigentlichen Funktion. Die letztgenannten sRNAs wirken über Proteinbindungen und interagieren entweder mit RNA-Polymerasen oder Translationsregulatorproteinen (Brantl et al., 2007).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit detektierten Antisense-RNAs handelt es sich demnach um in cis codierte RNAs, da sie mit spezifischen Primern amplifiziert werden konnten, die anhand der potentiellen mRNA entworfen wurden. Zudem bilden grampositive Bakterien häufiger in cis codierte Antisense-RNAs aus als in trans codierte (Irnov et al., 2010). Alle bisher detektierten cis Antisense-RNAs sind klein (50–300 bp), diffusionsfähig, meist untranslatiert und stark strukturiert (bis zu 4 Stem-Loops). Sie regulieren durch Hybridisierung die Genexpression ihrer Ziel-RNA. Ihre Funktion umfasst die Kontrolle der Replikation, Stabilität und Konjugation von Plasmiden sowie die Transpositionskontrolle einiger Transposons (Brantl et al., 2007).

Die einzigen bislang beschriebenen IS-Elemente, deren Aktivität über die Ausbildung einer Antisense-RNA kontrolliert wird, sind *IS10* und *IS30*, wobei die Erstbeschreibung einer Regulation der Transpositionsaktivität bei *IS10* erfolgte. Das *IS10* hat eine Größe von 1329 bp und gehört zur *IS4* Familie (Simons und Kleckner, 1983; Case et al., 1989; Case et al., 1990; Kleckner et al., 1996).

Die Autoren Simons und Kleckner beschrieben, dass das *IS10* in der Lage ist, die Expression der Transposase auf der Ebene der Translation negativ zu regulieren (Simons und Kleckner,

1983). Diese Inhibierung erfolgt aufgrund eines Phänomens, das von den Autoren als MCI (engl.: multy copy inhibition) bezeichnet wurde (Simons und Kleckner, 1988). Sie beobachteten, dass das auf einem multicopy Plasmid vorhandene *IS10* die Transposition eines chromosomalen Transposons *Tn10*, welches ebenfalls zwei *IS10*-Elemente enthält, unterdrückt, indem es die Expression der Transposase reprimiert. Für die Ausbildung der regulierenden cis Antisense-RNA ist der Promotor pOUT elementar, er befindet sich innerhalb des linken inverted repeats des *IS10* ab Position 81. Der Promotor reguliert eine kurze Antisense-RNA von 70 bp Länge, die als RNA-OUT bezeichnet wird (Case et al., 1989). Die RNA-OUT weist mit einer Halbwertszeit von 60 min eine außergewöhnliche Stabilität auf, die durch die besondere Haarnadelform hervorgerufen wird. Die mRNA der Transposase (RNA-IN) wird von dem schwächeren Promotor pIN gebildet, der zwischen der Transposase und des linken inverted repeats ab Position 115 lokalisiert ist (Case et al., 1990). Da sich die Promotoren pIN und pOUT fast gegenüberliegen, sind RNA-IN und RNA-OUT über einen Bereich von 35 bp zueinander komplementär, in diesem Bereich befindet sich ebenfalls die ribosomale Bindestelle für *tnp*.

Die Hybridisierung beider RNA-Moleküle bewirkt, dass die mRNA RNA-IN nicht an das Ribosom binden kann und somit keine Translation erfolgt (Ma und Simons, 1990). Der entstandene Komplex wird abschließend durch RNaseIII abgebaut, wobei die einzelsträngigen RNA-Moleküle durch das Enzym nicht abgebaut werden (Case et al., 1990).

Die außergewöhnlichen Stabilität von RNA-OUT und das Vorhandensein eines stärkeren Promotors beschreibt die Wichtigkeit für die Regulation der MCI. Durch den stärkeren Promotor und die längere Halbwertszeit der Gegenstrang-RNA verändert sich deren Konzentration nur langsam, so dass eine unerwünschte Transposition wirkungsvoll unterbunden wird (Case et al., 1989; Case et al., 1990).

Das *IS30* bildet eine eigene Familie innerhalb der IS-Elemente aus, hat eine Länge von 1221 bp, ist stabil im Genom und wurde erstmal in *E. coli* K12 beschrieben (Dalrymple et al., 1984; Dalrymple und Arber, 1985; Mahillon und Chandler, 1998). Die mRNA der Transposase (*orfA*) wird von dem recht schwachen Promotor p30A abgelesen, der sich im linken inverted Repeat befindet. Der für die Ausbildung der Antisense-RNA notwendige Promotor p30C befindet sich innerhalb von *orfA* auf dem Gegenstrang. Die daraus entstehende RNA, RNA-C, hat eine Länge von 150 bp (Arini et al., 1997). Ebenfalls von Arini wurde beschrieben, dass sich eine Überproduktion von RNA-C negativ auf die Transposition von *IS30* auswirkte, während sich eine Reduzierung der Promotoraktivität positiv auf das Transpositionsverhalten

auswirkte. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen initialen Hemmung der Translation durch eine Antisense-RNA, erfolgt die Hemmung in diesem Fall durch die Hybridisierung von RNA-C mit *orfA* in einem mittleren Bereich, so dass die Translation zwar initial stattfindet, dann aber unterbrochen wird (Arini et al., 1997).

Die IS-Elemente *IS10*, *IS30* und *IS256* scheinen demnach nicht viele Gemeinsamkeiten zu haben, abgesehen davon, dass alle drei eine Antisense-RNA ausbilden um die Expression der Transposase und somit ihre Transposition zu steuern. *IS10* und *IS256* sind Bestandteile von Resistenz-vermittelnden Plasmiden, das *IS10* ist Bestandteil des Transposons *Tn10*, welches eine Tetrazyklin-Resistenz vermittelt (Foster, 1977) und, wie bereits in der Einleitung der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, stammt das *IS256* aus dem Transposon *Tn4001*, das für eine Resistenz gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika codiert. Auch die Längen der mobilen Elemente korrelieren weitgehend: das *IS30* mit 1221 bp, das *IS256* mit 1324 bp und das *IS10* mit 1329 bp.

Auch die Transpositionsmechanismen der drei Elemente sind völlig unterschiedlich: das *IS10* transponiert stets über einen cut and paste-Mechanismus (Mahillon und Chandler, 1998), das *IS30* transponiert über Cointegrate (Arini et al., 1997), während sich das *IS256* über die Ausbildung zirkulärer Intermediate transponiert (Loessner et al., 2002). Die von Case beschriebene multi copy inhibition (MIC) für *IS10*, mit der das Element die Transposition inhibiert (Case et al., 1989; Case et al., 1990), ist für das *IS256* nicht nachzuvollziehen. In vorausgegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass das *IS256* in hoher Anzahl im Genom vorkommt (Dyke et al., 1992; Jansen et al., 2007). Ob das *IS30* häufig im Genom vorkommt oder ob es ebenfalls eine MIC gibt, kann anhand der Literatur nicht beurteilt werden.

Ob die Antisense-RNA eine frühe oder späte Hemmung der Translation bei *IS256* bewirkt, kann nicht sicher beurteilt werden. Da die Gegenstrangpromotoren allerdings weit vom Promotor der Transposase bzw. mRNA entfernt liegen, ist tendenziell eher von einer späten Hemmung auszugehen.

4.3.4 Alternativen zur Beeinflussung der Transpositionsfrequenz

In der gegenwärtigen Literatur sind weitere Möglichkeiten beschrieben, die einen Einfluss auf das Transpositionsverhalten von IS-Elementen haben. Durch das Ausüben von osmotischem Stress, beispielsweise durch Zugabe von NaCl oder KCl in das Nährmedium, wird die

Transposition des IS256 auch in Abwesenheit von Sigma B unterdrückt (Rachid et al., 2000; Valle et al., 2007). Von Kharat wurde beschrieben, dass der Zusatz von hohen Glucosekonzentrationen die Transposition von IS1 fördert (Kharat et al., 2006). Bestrahlungen mit UV-Licht sind ebenfalls ein erprobtes Mittel in *E. coli* um Transpositionen von IS10 hervorzurufen (Eichenbaum und Livneh, 1998). Der Einfluss von hohen Temperaturen bewirkt ebenfalls eine Erhöhung der Transposition von mobilen Elementen, beispielsweise in *Burkholderia multivorans* oder bei dem Transposon Tn3 (Kretschmer und Cohen, 1979; Ohtsubo et al., 2005).

Eine besondere Beobachtung hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung der Transpositionsfrequenz wurde während der Arbeit mit IS256 gemacht. In den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.3 wurde der Einfluss von SigB auf die Transposition des IS256 ausführlich beschrieben. Allerdings ist auch das Gen *rsbU* als ein potentieller Hot Spot für Insertionen von IS256 für *S. epidermidis* bekannt (Conlon et al., 2004). Die Lage des positiven Aktivatorgens *rsbU* innerhalb des Operons *rsbUVWsigB* wurde in der Abbildung 3.12 gezeigt. Durch eine Insertion von IS256 in *rsbU* verliert das Bakterium, wie bereits beschrieben, die Fähigkeit den Sigmafaktor SigB auszubilden, was sich optisch wiederum durch weiße Kolonien zeigt. Denn die Staphyloxanthinsynthese beruht auf dem σ^B -abhängigen Promotor des *crtOPQMN*-Operons (Pelz et al., 2005). Das Vorhandensein dieser weißen Kolonien wurde häufiger während der Bestimmung der Transpositionsfrequenz bei *S. aureus* HG001 pA3 beobachtet. Wenn der negative Regulator SigB inaktiviert ist, kann die Transpositionsfrequenz sehr deutlich ansteigen, was der Effekt dieser Selbstaktivierung durch Inaktivierung des *rsbU* wäre.

4.4 Resistenzsteigerung durch Vorhandensein des IS256

Die Inkubation mit subinhibitorischen Antibiotika-Konzentrationen hat einen besonderen Effekt auf Mikroorganismen hinsichtlich der Transkription von Genen (Tsui et al., 2004; Gillespie et al., 2005; Adhikari und Novick, 2005; Yim et al., 2006). Durch den Zusatz von bestimmten Antibiotika wird die Mutationsrate erhöht, was sich wiederum in einer veränderten Genexpression äußert (Cuirolo et al., 2009). Dies trifft vor allem auf Antibiotika zu, die DNA-Schäden generieren und/oder das SOS-Reparatursystem oder MMR-System (methyl mismatch repair) aktivieren (Mesak et al., 2008).

Besonders gut zu beobachten ist dieser Effekt durch Inkubation der Bakterien mit geringer Antibiotika-Konzentration über einen längeren Zeitraum (Passagerversuche). Denn durch die stetige Erhöhung einer ursprünglich subinhibitorischen Antibiotika-Konzentration erfolgt eine gerichtete Selektion der mutierten Bakterien. Von den Autoren Kosowska-Shick und Clark wird ein Bakterium als resistent betrachtet, sobald es den initial erreichten MHK-Wert um den Faktor 4 steigern konnte (Kosowska-Shick et al., 2009; Clark et al., 2009). Aus medizinischer Sichtweise ist dies jedoch stark simplifiziert. In der praktischen Anwendung ist ein Bakterium resistent, wenn die maximale Höchstkonzentration eines Antibiotikums im Patienten geringer ist als der ermittelte MHK-Wert.

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Passagerversuch, unter dem Einfluss des Antibiotikums Vancomycin, konnte dies annähernd erreicht werden. Es kam bei beiden Stämmen, die ein rekombinantes IS256-Element aufwiesen, zu einer Verdreifachung des ursprünglichen MHK-Wertes. Dabei ist besonders bemerkenswert, dass sich der Stamm *S. aureus* USA300 durch die Fähigkeit auszeichnet besonders schnell Antibiotika-Resistenzen auszubilden (Diep et al., 2006). Im direkten Vergleich zu *S. aureus* HG001 kam es nicht zur Ausbildung einer deutlich höheren Resistenz, allerdings verlief die Adaption an die steigende Antibiotikakonzentration deutlich schneller, so dass sich, wie bereits unter 3.7 beschrieben, eine Differenz von bis zu 3 µg/ml ergab.

In einer von Farrell durchgeführten Studie wurde der Stamm *S. aureus* USA300 ebenfalls unter dem Einfluss einer subinhibitorischen Konzentration Vancomycin passagiert. Nach 20 Passagen wies der Stamm einen MHK-Wert von 8 µg/ml gegenüber Vancomycin auf, verglichen mit einem ursprünglichem MHK-Wert von 1 µg/ml (Farrell et al., 2011). In Rahmen dieser Studie wurden ebenfalls die Stämme *S. aureus* USA100, *S. aureus* USA400 und *S. aureus* USA800 hinsichtlich ihrer Resistenzzunahme gegenüber Vancomycin untersucht. Der Stamm *S. aureus* USA100 zeigte eine etwas langsamere Resistenzzunahme als *S. aureus* USA300, nach 32 Passagierschritten wies er einen MHK-Wert gegenüber Vancomycin von 8 µg/ml auf, der initiale MHK-Wert betrug ebenfalls 1 µg/ml. Erstaunlicherweise konnte weder bei dem Stamm *S. aureus* USA400 noch bei *S. aureus* USA800 eine Resistenz per Definition erreicht werden. Der initiale MHK-Wert betrug ebenfalls 1 µg/ml und konnte nach 55 Passagierungen lediglich auf 4 µg/ml angehoben werden (Farrell et al., 2011).

Auch aus diesem Versuch ging hervor, dass sich der Stamm *S. aureus* USA300 durch eine schnelle Resistenzentstehung in Gegenwart von Antibiotika auszeichnet.

Der hier beobachtete Resistenzanstieg wurde nicht auf Insertionen des IS256r in bestimmten Regionen oder Genen zurückgeführt, was beispielsweise über die von Jansen beschriebene Methode der reversen PCR um das IS256r zu lokalisieren möglich ist (Jansen et al., 2007). Dennoch ist es auffällig, dass bei beiden Stämmen mit IS256r eine gesteigerte Resistenz beobachtet werden konnte. Die Entstehung von Antibiotika-Resistenzen, insbesondere gegenüber Chinolonen, Rifampicin, Linezolid und Daptomycin, erfolgt bei *S. aureus* normalerweise über Punktmutationen (Feil et al., 2003), dennoch könnte die gesteigerte Resistenz zumindest teilweise auf das Vorhandensein des IS256r zurückzuführen sein. Wobei festgestellt wurde, dass eine Linezolidresistenz nicht nur über Punktmutationen entstehen kann, sondern ebenfalls durch das für eine Methyltransferase codierende *cfr*-Gen ausgelöst werden kann. Dieses *cfr*-Gen wird häufig über Plasmide bzw. Transposons horizontal übertragen (Locke et al., 2010; LaMarre et al., 2011). Von Kehrenberg wurde postuliert, dass die Verbreitung des *cfr*-Gens innerhalb von Staphylokokken über das Transposon Tn558 erfolgen könnte (Kehrenberg et al., 2007).

Beobachtungen zur Fitnesssteigerung durch IS10 wurden bereits von Chao gemacht. Die Bakterien, die das Element durch rekombinantes Crossing-over verloren hatten, wiesen eine deutlich geringere Fitness auf als die Stämme, bei denen das IS10 detektiert werden konnte (Chao et al., 1985).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die Inkubation der *S. aureus*-Stämme mit einer zu geringen Antibiotika-Konzentration das Resistenzniveau gesteigert werden konnte, insbesondere bei den *S. aureus*-Stämmen, die ein IS256r enthielten.

Weiterführende Informationen zu Durchführung und Zweck von Passagierversuchen werden über die ASTM (American Society for Testing and Materials) unter der Referenznummer WK30842 abrufbar sein.

4.5 Etablierung von IS256 als Pathomarker

Durch das Vorhandensein und die Lage des IS6110 im Genom *M. tuberculosis* kann das Bakterium sowohl identifiziert als auch typisiert werden, was prinzipiell eine schnelle und günstige Diagnostik ermöglicht (Poroca et al., 2009; Thorne et al., 2011). Hierfür ist es allerdings unerlässlich, dass das IS-Element möglichst inert ist und an Ort und Stelle verbleibt. Durch das Vorhandensein des IS256 im Genom von *S. epidermidis* kann der

Organismus zumindest grob als pathogener oder kommensaler Stamm charakterisiert werden (Gu et al., 2005; Hennig und Ziebuhr, 2008). Für diese Differenzierung ist die Beständigkeit an einer bestimmten Stelle im Genom nicht ausschlaggebend. Für *S. aureus* ist die Rolle des IS256 als Pathomarker derzeit denkbar aber unwahrscheinlich. Zum einen fehlen ausreichende Daten über das Vorhandensein des IS256 in klinischen wie auch in nicht-klinischen Isolaten. Zunächst wurde das IS256 als stabil im Genom von *S. aureus* und *S. epidermidis* angesehen und zur Typisierung von Staphylokokken vorgeschlagen (Deplano et al., 1997). Eine Typisierung anhand von IS256 ist aufgrund der hier beschriebenen hohen Transpositionsfrequenz allerdings nur schwer vorstellbar. Aufgrund der relativ simplen Transponierbarkeit könnte das IS256 tendenziell eher für kurzfristige epidemiologische Studien geeignet sein.

4.6 Das Problem der Resistenzentstehung aus historischer Sicht

Die richtige Konzentration eines Antibiotikums bei der Behandlung einer Infektion ist von zentraler Bedeutung, wie auch aus diesen Versuchen abgeleitet werden kann. Denn bei einer bakteriziden Konzentration eines Antibiotikums erfolgt logischerweise keine Transposition mehr. In diesem Zusammenhang scheint sich das Credo des Bakteriologen Paul Ehrlich von 1913 auch nach fast 100 Jahren zu bewahrheiten: frapper fort et frapper vite – schlage fest und hart (Ehrlich, 1913). Denn nur auf diese Weise können viele Mechanismen der bakteriellen Resistenzgenerierung umgangen werden, wie beispielsweise die SOS-Antwort oder die beschriebene Transposition von mobilen Elementen.

4.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mobile genetische Elemente, im speziellen das IS256, einen entscheidenden Einfluss auf die Genomflexibilität und die Resistenzentstehung bei *S. aureus* ausüben.

Transpositionsfrequenz

Die hier aufgenommenen Transpositionsfrequenzen des IS256r in *S. aureus* HG001 repräsentieren auch die Häufigkeit von potentiellen Mutationen und damit assoziierten Ausbildungen von Resistenzen, da für die Aufnahme der Transpositionsfrequenz die Häufigkeit der Integration des IS256r in das Genom bestimmt wurde. Um dies weiter zu überprüfen, ist es zwingend erforderlich die neue Lage des rekombinanten Elements im Genom zu bestimmen, beispielsweise über die Methode der reversen PCR.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Antibiotika einen Einfluss auf die Transpositionsfrequenz oder auch die Mutationsfrequenz ausüben und somit auch die Mutationsrate beeinflussen. Der Einfluss der beiden ebenfalls zur Behandlung von MRSA-Infektionen zugelassenen Antibiotika Daptomycin und Tigecyclin sollte dringend mit diesem Testsystem untersucht werden, die Bestimmung der MHK-Werte gegenüber Tigecyclin ist bereits erfolgt und wurde im Ergebnisteil vorgestellt. Auch ist das IS256 bei weitem nicht das einzige IS-Element in *S. aureus*, das seine Lage im Genom verändern kann. Aus diesem Grund sollten ebenfalls weitere häufig im Genom vorkommende IS-Elemente bezüglich ihres Transpositionsverhaltens unter Stress untersucht werden, beispielsweise das IS257/431 oder das IS1181. Das hier etablierte Testsystem kann prinzipiell auf jedes IS-Element angewendet werden.

Antisense-RNA

Die beiden hier beschriebenen Antisense-RNAs bedürfen ebenfalls weiterer Untersuchungen. Elementar ist die Bestimmung der Größe, aus der sich teilweise die räumliche Struktur der gefundenen RNAs ableiten lässt oder auch die Sequenz des 5'-Ende über eine RACE-PCR.

Ein weiterer Aspekt ist die Beurteilung der Aktivität der RNAs. Um diese zu bestimmen kann die jeweilige RNA durch das Plasmid pTX15 überexprimiert werden, um so die Auswirkung auf die Transposition zu testen.

Ebenfalls kann ein möglicher Abbau der mRNA von *tnpA* bestimmt werden durch den Vergleich zwischen den Plasmiden mit veränderten Antisense-Promotoren oder der Doppelmutante und dem nativen Plasmid pA3, denn bei dem Letztgenannten sollte ein stärkerer Abbau der mRNA erfolgen bzw. die mRNA in geringerer Konzentration vorhanden sein.

Die Bestimmung der Halbwertszeit der Antisense-RNA sollte bestimmt werden, um diese mit der Halbwertszeit der Antisense-RNA von *IS10* vergleichen zu können.

Selbstaktivierung der Transposition durch Insertion in *rsbU*

Die bereits angesprochene mögliche Selbstaktivierung der Transposition durch eine gezielte Insertion des IS256 in den positiven Regulator des Sigmafaktors SigB sollte ebenfalls untersucht werden. Nach der Determinierung der Insertionsfrequenz in das Gen *rsbU* erfordert es die Klonierung eines weiteren Testplasmids. Denn das im Rahmen dieser Arbeit klonierte Testplasmid pA3 beinhaltet zwei Resistenzgene, die für eine Resistenz gegenüber Erythromycin sowie Chloramphenicol codieren, wobei sich ersteres innerhalb des rekombinanten IS-Elements befindet (IS256r), während letzteres im Plasmid lokalisiert ist. Nach der detektierten Insertion des IS256r in *rsbU* muss das Bakterium mit einem zweiten rekombinanten IS256 transformiert werden, das anstelle eines Resistenzgens gegenüber Erythromycin über eines mit einer Tetrazyklinresistenz verfügt. Auf diese Weise kann die Transpositionsfrequenz über eine Selektion mit Tetrazyklin, Chloramphenicol und Erythromycin bestimmt werden.

Resistenzsteigerung durch das Vorhandensein eines IS256

Der Transfer von resistenzvermittelnden Transposons spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von multiresistenten Bakterien, wie beispielsweise der Transfer des „*vanA*-Transposons“ (Tn1546) von Enterokokken auf Staphylokokken, das eine Resistenz gegenüber Vancomycin verursacht. Durch den hier durchgeführten Initialversuch zur Steigerung der Resistenz gegenüber Vancomycin zeigte sich deutlich, dass sich das Vorhandensein eines IS256r positiv auf diese Entwicklung auswirkt. Um die ermittelnden Ergebnisse zu bekräftigen, sollte dieser Versuchsansatz um das Plasmid pA3 in den beiden verwendeten Stämmen *S. aureus* HG001 und *S. aureus* USA300 erweitert werden. Erwartungsgemäß sollte sich die Resistenzsteigerung durch das Plasmid pA3 im Mittelfeld zwischen pBT2 und

pA3 σ^B mut befinden, da das Plasmid pBT2 kein IS256 enthält und pA3 σ^B mut ein IS256r beinhaltet, wie in dieser Arbeit gezeigt, das eine außerordentlich hohe Transpositionsfrequenz zeigt.

Im Anschluss an diesen Passagerversuch sollten die IS-Elemente ebenfalls im Genom lokalisiert werden, um die an der Resistenzentstehung beteiligten Gene bzw. Bereiche zu identifizieren. Dies könnte ebenfalls über die Methode der reversen PCR erfolgen.

5 Zusammenfassung

S. aureus ist ein bedeutender Krankheitserreger und verantwortlich für eine Vielzahl von Infektionen beim Menschen. Seine fortwährende Resistenzzunahme gegenüber nahezu allen Antibiotika, die klinisch angewendet werden, macht ihn zu einem großen Problem des Gesundheitswesens. Im Lauf der Zeit wurde er resistent gegen die meisten Antibiotika wie Penicillin, Methicillin (MRSA), Vancomycin (VISA bzw. VRSA) und auch Linezolid (LRSA). Aus diesen Beschreibungen geht hervor, dass *S. aureus* ein sehr anpassungsfähiges Bakterium ist, das sich sehr schnell an neue Umweltbedingungen adaptieren kann. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Insertionssequenz 256 im Genom von klinischen *S. aureus*-Isolaten vorhanden ist und ob diese zur Flexibilisierung des Genoms und Entstehung von Resistenzen gegenüber Antibiotika beiträgt. Da das mobile Element nur über Transposition zur Adaptation beitragen kann, wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mögliche Aktivatoren bzw. Effektoren der Transposition des IS256 und der zugrunde liegende Mechanismus untersucht.

Das IS256 ist eine 1324 bp lange DNA-Sequenz und Bestandteil des Transposons Tn4001, das eine Resistenz gegenüber Aminoglykosid-Antibiotika verursacht. Es bildet eine eigene Familie innerhalb der IS-Elemente aus, die 31 weitere Mitglieder umfasst. Durch eine direkte Insertion des IS256 in Gene können diese inaktiviert werden, durch das Inserieren in das Umfeld eines Gens können Promotorstrukturen verändert und so die Expressionsstärken geändert werden.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das IS256 zu der Generierung einer erhöhten Resistenz gegenüber Vancomycin in einem Stammpaar geführt hat, indem es in das Gen *tcaA* inserierte und dieses inaktivierte. Um die Transpositionsfrequenz zu messen, wurde ein Testsystem generiert, das die Transpositionen eines mit einer Antibiotika-Resistenzkassette versehenen IS256-Elementes (IS256r) von einem Plasmid (pA3) in die chromosomale DNA anzeigt.

Dabei zeigte sich, dass das IS256r unter dem Einfluss subinhibitorischer Antibiotika-Konzentrationen wesentlich stärker transponierte als ohne deren Einfluss. Hierfür wurden die klinisch bedeutsamen Antibiotika Ciprofloxacin, Tigecyclin und Vancomycin verwendet, wobei die beiden letztgenannten als Mittel der Wahl zur Behandlung von durch MRSA-hervorgerufenen Infektionen beschrieben sind.

Die Transpositionsfrequenz des IS256r wurde ebenfalls in dem Stamm *S. aureus* 8325 untersucht, der einen inaktivierten Sigmafaktor SigmaB aufweist. Hier zeigte sich eine gesteigerte Transpositionsfrequenz, was auf eine Beteiligung dieses Faktors an der Transposition schließen ließ.

Durch Sequenzanalysen wurden zwei Gegenstrangpromotoren mit Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SigmaA (σ^A) und SigmaB (σ^B) innerhalb der Transposase des IS256 detektiert. Durch gezielte Basenaustausche wurden die Bindemotive innerhalb der Promotorsequenz stark verändert, ohne die Aminosäuresequenz zu beeinflussen. Die resultierenden Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Transpositionsfrequenz untersucht und zeigten eine enorme Steigerung im Vergleich zu der Transpositionsfrequenz des unveränderten IS256r. Dabei zeigte sich deutlich, dass der Sigmafaktor B einen sehr viel stärkeren Einfluss auf die Transpositionsfrequenz ausübt als der Sigmafaktor A. Paradoxerweise führte die Veränderung in beiden Promotoren nicht zu einer erneuten Steigerung der Transposition sondern zu deren Verringerung.

Des Weiteren konnte von jedem Promotor die Bildung einer cis-codierte Antisense-RNA der Transposase detektiert werden, die aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse einen Einfluss auf die Transposition ausüben bzw. diese zu regulieren scheinen. Die Literatur zeigt noch zwei weitere Beispiele für IS-Elemente auf, deren Transposition durch Antisense-RNA reguliert werden (IS10 und IS30).

Um zu überprüfen, dass das Vorhandensein des IS256 einen Vorteil für das Bakterium in evolutiver Hinsicht darstellt, wurde das Element mit einer sehr hohen Transpositionsrate (mit verändertem Gegenstrangpromotor) sowie der leere Kontrollvektor in zwei verschiedene *S. aureus*-Stämme transformiert. Die Plasmid-tragenden Stämme wurden für 21 Tage mit dem Antibiotikum Vancomycin passagiert, dessen Konzentration stetig erhöht wurde. Dabei zeigte sich, dass in den Stämmen mit dem IS256r-Element schneller eine Resistenz generiert werden konnte als bei den Kontrollstämmen. Als besonders schnell anpassungsfähig zeigte sich der bekannte CA-MRSA-Stamm *S. aureus* USA300. Dies lässt auf eine durch das IS256r hervorgerufene Genomflexibilisierung schließen, die letztendlich zu einer schnelleren Anpassung führte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben einen deutlichen Hinweis auf einen direkten Zusammenhang zwischen IS-Elementen, ihrer Transposition und der Ausbildung von Resistenzen bei *S. aureus*, insbesondere unter Selektionsdruck, hervorgerufen durch subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen.

6 Literaturverzeichnis

- Adhikari, R.P., Novick, R.P.** 2005. Subinhibitory cerulenin inhibits staphylococcal exoprotein production by blocking transcription rather than by blocking secretion. *Microbiology* 151(Pt 9), 3059-3069.
- Ahmed, A.** 1986. Evidence for replicative transposition of Tn5 and Tn9. *J. Mol. Biol.* 191(1), 75-84.
- Al Safadi, R., Amor, S., Hery-Arnaud, G., Spellerberg, B., Lanotte, P., Mereghetti, L., Gannier, F., Quentin, R., Rosenau, A.** 2010. Enhanced expression of *lmb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS1548 in *scpB-lmb* intergenic region. *PloS one* 5(5), e10794.
- Anderson, K. L., Roberts, C., Disz, T., Vonstein, V., Hwang, K., Overbeek, R., Olson, P. D., Projan, S. J., Dunman, P. M.** 2006. Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *J. Bacteriol.* 188(19), 6739-6756.
- Arenson, T.A, Tsodikov, O.V., Cox, M.M.** 1999. Quantitative analysis of the kinetics of end-dependent disassembly of RecA filaments from ssDNA. *J. Mol. Biol.* 288(3), 391-401.
- Arini, A., Keller, M.P., Arber, W.** 1997. An antisense RNA in IS30 regulates the translational expression of the transposase. *Biol. Chem.* 378(12), 1421-1431.
- Augustin, J., Götz, F.** 1990. Transformation of *Staphylococcus epidermidis* and other staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 54(1-3), 203-207.
- Ba, B.B., Arpin, C., Bikie Bi Nso, B., Dubois, V., Saux, M.C., Quentin, C.** 2010. Activity of linezolid in an *in vitro* pharmacokinetic-pharmacodynamic model using different dosages and *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* strains with and without a hypermutator phenotype. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 54(4), 1443-1452.
- Becker, L.A., Cetin, M.S., Hutkins, R.W., Benson, A.K.** 1998. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. *J. Bacteriol.* 180(17), 4547-4554.
- Bennett P. M.** 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 153(Suppl. 1), S347-S357.
- Besier, S., Zander, J., Kahl, B. C., Kraiczy, P., Brade, V., Wichelhaus, T. A.** 2008. The thymidine-dependent small-colony-variant phenotype is associated with hypermutability and antibiotic resistance in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 52(6), 2183-2189.

- Bierbaum, G., Fuchs, K., Lenz, W., Szekat, C., Sahl, H.G.** 1999. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 18(10), 691-696.
- Brantl, S.** 2007. Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 10(2), 102-109.
- Brückner, R.**, 1997. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151(1), 1-8.
- Bugg T.D., Wright G.D, Dutka-Malen, S., Arthur , M., Courvalin, P., Walsh, C.T.** 1991. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry.* 30(43), 10408-10415.
- Camargo, I.L.B.C., Gilmore, M. S.** 2008. *Staphylococcus aureus*--probing for host weakness? *J. Bacteriol* 190(7), 2253-2256.
- Case, C.C., Roels, M., Gonzblez, J.E, Simons, E. L., Simons, R.W.** 1988 Analysis of the promoters and transcripts involved in *IS10* anti-sense RNA control. *Gene*72(1-2), 219-236.
- Case, C.C., Roels, M., Jensen, P.D., Lee, J., Kleckner, N., Simons, R.W.** 1989. The unusual stability of the *IS10* anti-sense RNA is critical for its function and is determined by the structure of its stem-domain. *EMBO J.* 8(13), 4297-4305.
- Case, C., Simons, E., Simons, R.** 1990. The *IS10* transposase mRNA is destabilized during antisense RNA control. *EMBO J.* 9(4), 1259-1266.
- Chambers, H.F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(4) 781-791.
- Chan, P.F., Foster, S.J., Ingham, E., Clements, M. O.** 1998. The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J. Bacteriol.* 180(23), 6082-6089.
- Chao, L.,. McBroom, S.M.** 1985. Evolution of transposable elements: an *IS10* insertion increases fitness in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 2(5) 359-369.
- Cho, S.H., Naber, K., Hacker, J., Ziebuhr, W.** 2002. Detection of the *icaADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 19(6), 570-575.
- Chua, K., Laurent, F., Coombs, G., Grayson, M.L., Howden, B.P.** 2011. Not community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)! A clinician's guide to community MRSA - its evolving antimicrobial resistance and implications for therapy. *Clin. Infect. Dis.* 52(1), 99-114.
- Cirz, R.T., Romesberg, F.E.** 2007. Controlling mutation: intervening in evolution as a therapeutic strategy. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42(5), 341-354.

- Cirz, R. T., Jones, M. B., Gingles, N. A., Minogue, T. D., Jarrahi, B., Peterson, S. N., Romesberg, F. E.** 2007. Complete and SOS-Mediated Response of *Staphylococcus aureus* to the antibiotic ciprofloxacin. *J. Bacteriol.* 189(2), 531-539.
- Clark, C., Kosowska-Shick, K., McGhee, P., Dewasse, B., Beachel, L., Appelbaum, P. C.** 2009. Resistance selection studies comparing the activity of razupenem (PTZ601) to vancomycin and linezolid against eight methicillin-resistant and two methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(7), 3118-3121.
- Conlon, K. M., Humphreys, H., O’Gara, J. P.** 2004. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 186(18), 6208-6219.
- Costerton, J.W.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284(5418), 1318-1322.
- Cui, L., Murakami, H., Kuwahara-Arai, K., Hanaki, H., Hiramatsu, K.** 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(9), 2276-2285.
- Cuirolo, A., Plata, K., Rosato, A.E.** 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(1), 37-45.
- Cummings, M., McGurk, C., Masters, J.R.** 2003. Rapid identification of antisense mRNA-expressing clones using strand-specific RT-PCR. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13(2), 115-117.
- Dalrymple, B., Caspers, P., Arber, W.** 1984. Nucleotide sequence of the prokaryotic mobile genetic element IS30. *EMBO J.* 3(9), 2145-2149.
- Dalrymple, B., Arber, W.** 1985. Promotion of RNA transcription on the insertion element IS30 of *E. coli* K12. *EMBO J.* 4(10), 2687-2693.
- Demaio, J., Zhang, Y., Ko, C., Youngt, D.B., Bishai, W. R.** 1996. A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2790-2794.
- Deora, R., Misra, T.K.** 1996. Characterization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 271(36), 21828-21834.
- Deplano, A., Vanechoutte, M., Verschraegen, G., Struelens, M.** 1997. Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 35(10), 2580-2587.
- Deurenberg, R.H., Stobberingh, E.E.** 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution : Infect. Genet. Evol.* 8(6), 747-763.

- Diep, B.A., Gill, S.R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson, M.G., Lin, F., Lin J., Carleton, H.A., Mongodin, E.F., Sensabaugh, G.F., Perdreau-Remington, F.** 2006. Complete genome sequence of USA300 , an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 367(9512), 731-739.
- Donat, S., Streker, K., Schirmeister, T., Rackette, S., Stehle, T., Liebeke, M., Lalk, M., Ohlsen, K.** 2009. Transcriptome and functional analysis of the eukaryotic-type serine/threonine kinase PknB in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 191(13), 4056-69.
- Doolittle, W.F., Sapienza, C.** 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*. 284(5757), 601-603.
- Doolittle W.F., Kirkwood T.B, Dempster M.A.** 1984. Selfish DNAs with self-restraint. *Nature*. 307, 501-502.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16(13), 6127-6145.
- Drlica, K., Zhao, X.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(3), 377-392.
- Dryden M.S.** 2011. Linezolid pharmacokinetics and pharmacodynamics in clinical treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 66 (Suppl 4), iv7-iv15.
- Dyke, K. G., Aubert, S., El Solh, N.** 1992. Multiple copies of IS256 in staphylococci. *Plasmid* 28(3), 235-246.
- Eckmann, C., Dryden, M.** 2010. Treatment of complicated skin and soft-tissue infections caused by resistant bacteria: value of linezolid, tigecycline, daptomycin and vancomycin. *Eur. J. Med. Res.* 15(12), 554-563.
- Ehrlich, P.** 1913. Address in Pathology on Chemiotherapy: Delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine. *Br. Med. J.* 2(2746), 353-359.
- Eichenbaum, Z., Livneh, Z.** 1998. UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. *Genetics* 149(3), 1173-1181.
- Eisen, J.A., Benito, M.I., Walbot, V.** 1994. Sequence similarity of putative transposases links the maize Mutator autonomous element and a group of bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 22(13), 2634-2636.
- Farrell, D.J., Robbins, M., Rhys-Williams, W., Love, W. G.** 2011. Investigation of the potential for mutational resistance to XF-73, retapamulin, mupirocin, fusidic acid, daptomycin, and vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates during a 55-passage study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(3), 1177-1181.
- Feil, E.J., Cooper, J.E., Grundmann, H., Robinson, D.A., Enright, M.C., Berendt, T., Peacock, S.J., Smith, J.M., Murphy, M., Spratt, B.G.** 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J. Bacteriol* 185(11), 3307-3316.

Fernandez, P., Saint-Joanis, B., Barilone, N., Jackson, M., Gicquel, B., Cole, S.T., Alzari, P.M. 2006. The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth. *J. Bacteriol* 188(22), 7778-7784.

Foster, T.J. 1977. Insertion of the tetracycline resistance translocation unit Tn10 in the *lac* operon of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 154(3), 305-309.

Frei, C.R., Miller, M.L., Lewis, J.S., Lawson, K.A., Peddaiahgari, R., Talbert, R.L. 2010. Retrospective cohort study of hospitalized adults treated with vancomycin or clindamycin for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections. *Clin. Ther.* 32(12), 2024-2029.

Fujimura T., Murakami, K. 2008. *Staphylococcus aureus* clinical isolate with high-level methicillin resistance with an *lytH* mutation caused by IS1182 insertion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(2), 643-647.

Georgiev, G.P., Tchurikov, N.A., Ilyin, Y.V, Georgieva, S.G., Mizrokhi, L.J., Priimägi, A.F, Gerasimova, T.I., Georgiev, P.G., Simonova, O.B., Kiselev, S.L. 1989. Mobile genetic elements in *Drosophila melanogaster* (recent experiments). *Genome.* 31(2), 920-928.

Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A.K., Tischer, K., Scharf, C., Hacker, J., Hecker, M. 2000. Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182(24):6983-6991.

Giachino, P., Engelmann, S., Bischoff, M. 2001. σ^B activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183(6), 1843-1852.

Gillespie, S.H., Basu, S., Dickens, A.L., O'Sullivan, D.M., McHugh, T.D. 2005. Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J. Antimicrob. Chemother.* 56(2), 344-348.

Götz F., Bannerman, T., Schleifer, K.H. 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *The Prokaryotes*. Springer New York.

Gu, J., Li, H., Li, M., Vuong, C., Otto, M., Wen, Y., Gao, Q. 2005. Bacterial insertion sequence IS256 as a potential molecular marker to discriminate invasive strains from commensal strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Hosp. Infect.* 61(4), 342-348.

Gudas, L.J., Pardee, A.B. 1975. Model for regulation of *Escherichia coli* DNA repair functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72(6), 2330-2334.

Halgasova, N., Bukovska, G., Timko, J., Kormanec, J. 2001. Cloning and Transcriptional Characterization of Two Sigma Factor Genes, *sigA* and *sigB*, from *Brevibacterium flavum*. *Curr. Microbiol.* 43(4), 249-254.

Haren, L., Ton-Hoang, B., Chandler, M. 1999. Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 245-281.

Hennig, S., Ziebuhr, W. 2008. A transposase-independent mechanism gives rise to precise excision of IS256 from insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 190(4):1488-1490.

- Hennig S., Ziebuhr, W.** 2010. Characterization of the transposase encoded by IS256, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements. *J. Bacteriol.* 192(16), 4153-63.
- Herbert, S., Ziebandt, A. K., Ohlsen, K., Schäfer, T., Hecker, M., Albrecht, D., Novick, R., Götz, F.** 2010. Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.* 78,2877-2889.
- Hidron, A.I., Low, C.E., Honig, E.G., Blumberg, H.M.** 2009. Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 as a cause of necrotising community-onset pneumonia. *Lancet Infect. Dis.* 9(6), 384-392.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F.C.** 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.* 40(1), 135-136.
- Holzgrabe, U.** 2010. Return to the pre-Semmelweis-age - MRSA, NDM-1 and what is to come? *Pharm. Unserer Zeit* 39(6), 426-427.
- Horii, T., Ogawa, T., Nakatani, T., Hase, T., Matsubara, H., Ogawa, H.** 1981. Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell.* 27(3 Pt 2), 515-522.
- Horst, J. P., Wu, T. H., Marinus, M. G.** 1999. *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol.* 7, 29-36.
- Hu, Y., Coates, A R.** 1999. Transcription of two sigma 70 homologue genes, *sigA* and *sigB*, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 181(2):469-476.
- Irnov, I., Sharma, C.M., Vogel, J., Winkler, W.C.** 2010. Identification of regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 38 (19), 6637-6651.
- Janion, C.** 2008. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Sci.* 4(6), 338-344.
- Jansen, A., Türck, M., Szekat, C., Nagel, M., Clever, I., Bierbaum, G.** 2007. Role of insertion elements and *yycFG* in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 297(4), 205-215.
- Jolivet-Gougeon, A., Kovacs B., Le Gall-David, S., Le Bars, H., Bousarghin, L., Bonnaure-Mallet, M., Lobel, B., Guillé, F., Soussy, C.J., Tenke, P.** 2011. Bacterial hypermutation: clinical implications. *J. Med. Microbiol.* 60(Pt 5), 563-573.
- Jordan, E., Saedler, H., Starlinger, P.** 1968. 0° and strong polar mutations in the *gal* operon are insertions. *Mol. Gen. Genet.* 102(4), 353-363.
- Karlsson, A., Saravia-Otten, P., Tegmark, K., Morfeldt, E., 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.

- Kayser, F., Böttger, E., Zinkernagel, R., Haller, O., Eckert, J., Deplazes, P.** 2005. Medizinische Mikrobiologie, 11th ed. Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Kehrenberg, C., Aarestrup, F.M., Schwarz, S.** 2007. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene *cf*r. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(2), 483-487.
- Kennedy, A.D., Porcella, S.F., Martens, C., Whitney, A.R., Braughton, K.R., Chen, L., Craig, C.T., Tenover, F.C, Kreiswirth, B.N, Musser, J.M., DeLeo, F.R.** 2010. Complete nucleotide sequence analysis of plasmids in strains of *Staphylococcus aureus* clone USA300 reveals a high level of identity among isolates with closely related core genome sequences. *J. Clin. Biol.* 48(2), 4504-4511.
- Kharat, A.S., Coursange, E., Noirclerc-Savoie, M., Lacoste, J., Blot, M.** 2006. IS1 transposition is enhanced by translation errors and by bacterial growth at extreme glucose levels. *Acta biochim. Pol.* 53(4), 729-738.
- Kiem, S., Oh, W.S., Peck, K.R., Lee, N.Y., Lee, J.Y., Song, J.H., Hwang, E.S., Kim, E.C., Cha, C.Y., Choe, K.W.** 2004. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. *J. Korean Med. Sci.* 19, 779-782.
- Kim, J.H., Kim, C.H., Hacker, J., Ziebuhr, W., Lee, B.K., Cho, S.H.** 2008. Molecular characterization of regulatory genes associated with biofilm variation in a *Staphylococcus aureus* strain. *J. Microbiol. and Biotechnol.* 18, 28-34.
- King, D.E., Malone, R., and Lilley, S.H.** 2000. New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am. Fam. Physician* 61(9), 2741-2748.
- Kleckner, N., Chalmers, R.M., Kwon, D., Sakai, J., Bolland, S.** 1996. Tn10 and IS10 transposition and chromosome rearrangements: mechanism and regulation in vivo and in vitro. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 204, 49-82.
- Kleppe K., Ohtsuka, E., and Khorana, H.G.** 1971. Repair and replication of short synthetic DNAs by DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 56(2), 341-361.
- Knobloch, J.K., Horstkotte, M.A., Rohde, H., Mack, D.** 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol.*, 191(2), 101-106.
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R.L., Struelens, M.J., Tacconelli, E., Navarro Torné, A, Witte, W., Friedrich, A.W.** 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 15(41), 19688.
- Köhler, W., Eggers, H., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H., Pulverer, G.** 2001. Medizinische Mikrobiologie, 8th ed. Urban & Fischer München, Jena.

- Kosowska-Shick, K., Clark, C., Pankuch, G.A, McGhee, P., Dewasse, B., Beachel, L., Appelbaum, P.C.** 2009. Activity of telavancin against staphylococci and enterococci determined by MIC and resistance selection studies. *Antimicrob. Agents Chemother* 53(10), 4217-4224.
- Kozitskaya,S.,Cho, S.H, Dietrich, K., Marre, R., Naber, K., Ziebuhr, W.** 2004. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect. Immun* 72(2),1210-1215.
- Kreiswirth, B. N., Löfdahl, S., Betley, M.J, O'Reilly, M., Schlievert, P.M., Bergdoll, M.S., Novick, R.P.** 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305(5936), 709-712.
- Kretschmer, P.J., Cohen, S.N.** 1979. Effect of temperature on translocation frequency of the Tn3 element. *J. Bacteriol.* 139(2), 515-519.
- Kuan, C.T., Tessman, I.** 1991. LexA protein of *Escherichia coli* represses expression of the Tn5 transposase gene. *J. Bacteriol.* 173 (20), 6406-6410.
- Kuan, C.T., Liu, S.K., Tessman, I.** 1991. Excision and Transposition of Tn5 as an SOS Activity in *Escherichia coli*. *Genetics* 128(1), 45-57.
- Kuan, C.T., Tessman, I.** 1992. Further evidence that transposition of Tn5 in *Escherichia coli* is strongly enhanced by constitutively activated RecA proteins. *J. Bacteriol.* 174 (21), 6872-6877.
- Kullik, I., Giachino, P., Fuchs, T.** 1998. Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *J. Bacteriol.* 180(18), 4814-4820.
- LaMarre, J.M., Locke, J.B., Shaw, K.J., and Mankin, A.S.** 2011. Low fitness cost of the multidrug resistance gene *cfr*. *Antimicrob. Agents Chemother.* [Epub ahead of print].
- Lane, D., Cavallé, J., Chandler, M.** 1994. Induction of the SOS response by IS1 transposase. *J. Mol. Biol.* 242(4), 339-350.
- Leach, K.L., Brickner ,S.J., Noe, M.C, Miller, P.F.** 2011. Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1222, 49-54.
- Lederberg E.M.** 1981. Plasmid reference center registry of transposon (Tn) allocations through July 1981. *Gene* 16(1-3), 59-61.
- Lindsay, J.A., and Holden, M.T.G.** 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? *Trends Microbiol.* 12(8), 378-385.
- Little, J.W., Mount D.W., Yanisch-Perron, C.R.** 1981. Purified lexA protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78(7), 4199-4203.

- Locke, J.B., Morales, G., Hilgers, M., C, K.G., Rahawi, S., José Picazo, J., Shaw, K.J., Stein, J.L.** 2010. Elevated linezolid resistance in clinical cfr-positive *Staphylococcus aureus* isolates is associated with co-occurring mutations in ribosomal protein L3. *Antimicrob. Agents Chemother* 54 (12), 5352-5355.
- Löffler, B., Hussain, M., Grundmeier, M., Brück, M., Holzinger, D., Varga, G., Roth, J., Kahl, B.C., Proctor, R. A, Peters, G.** 2010. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog.* 6(1), e1000715.
- Loessner, I., Dietrich, K., Dittrich, D., Hacker, J., Ziebuhr, W.** 2002. Transposase-Dependent Formation of Circular IS256 Derivatives in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 184(17), 4709-4714.
- Lowy, F.D.** 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111, 1265–1274.
- Lyon, B.R., Iuorio J.L, May, J.W, and Skurray, R.A.** 1984. Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus aureus* in Australian hospitals. *J.Med. Microbiol.* 17(1), 79-89.
- Lyon, B.R., Gillespie, M.T, Skurray, R.A.** 1987. Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*. *J.Gen. Microbiol.*, 133(11), 3031-3038.
- Ma, C., Simons R.W.** 1990. The IS10 antisense RNA blocks ribosome binding at the transposase translation initiation site. *EMBO J.* 9(4), 1267-1274.
- Mahairas, G.G., Lyon, B.R., Skurray, R.A, Pattee P.A.** 1989. Genetic analysis of *Staphylococcus aureus* with Tn4001. *J. Bacteriol.* 171(7), 3968-3972.
- Mahillon, J., Chandler, M.** 1998. Insertion sequences. *Microbiology and molecular biology reviews.* *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3), 725-774.
- Maki, H., McCallum, N., Bischoff, M., Wada, A., Berger-Bächli, B.** 2004. *tcaA* Inactivation Increases Glycopeptide Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(6),1953-1959.
- Maki, H., Murakami, K.** 1997. Formation of potent hybrid promoters of the mutant *llm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179, 6944-6948.
- Malachowa, N., DeLeo, F.R.** 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(18), 3057-3071.
- McCallum, N., Brassinga, A.K.C., Sifri, C.D., Berger-Bächli, B.** 2007. Functional characterization of TcaA: minimal requirement for teicoplanin susceptibility and role in *Caenorhabditis elegans* virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(11), 3836-3843.
- McClintock, B.** 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 36(6), 344-355.

- Mesak, L.R., Davies, J.** 2009. Phenotypic changes in ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus*. Res. Microbiol. 160, 785-791.
- Mesak, L.R., Miao, V., Davies, J.** 2008. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on SOS and DNA repair gene expression in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 3394-3397.
- Messing, J., Vieira, J.** 1982. A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. Gene. 19(3), 269-276.
- Meziane-Cherif, D., Saul F.A, Moubareck, C., Weber, P., Haouz, A., Courvalin, P., Périchon, B.** 2010. Molecular basis of vancomycin dependence in VanA-type *Staphylococcus aureus* VRSA-9. J. Bacteriol. 192(20), 5465-5471.
- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., Cohen, S.N.** 2004. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. Science 305(5690), 1629-1631.
- Mitchell, G., Brouillette, E., Séguin, D.L., Asselin, A.E., Jacob, C.L., Malouin, F.** 2010. A role for sigma factor B in the emergence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants and elevated biofilm production resulting from an exposure to aminoglycosides. Microbial pathogenesis. 48(1), 18-27.
- Miyazaki, M., Takata, T., Yoshimura, H., Matsunaga, A., Ohta, D., Ishikura H., Futo, M., Hara, S., Kamimura, H., Tamura, K., Ngo, D., and Tsuji, B.T.** 2011. Vancomycin bactericidal activity as a predictor of 30-day mortality in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Antimicrob. Agents Chemother 55(4), 1819-1820.
- Monecke, S., Coombs, G., Shore, A.C., Coleman, D.C., Akpaka, P., Borg, M., Chow, H., Ip, M., Jatzwauk, L., Jonas, D., Kadlec, K., Kearns, A., Laurent, F., O'Brien, F.G., Pearson, J., Ruppelt, A., Schwarz, S., Scicluna, E., Slickers, P., Tan, H.L., Weber, S., Ehricht, R.** 2011. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 6(4), e17936.
- Morrison, D.A.** 1977. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. J. Bacteriol. 132, 349-351.
- Münch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M., Jahn, D.** 2005. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. Bioinformatics 21, 4187-4189.
- Nagel, M., Reuter, T., Jansen, A., Szekat, C., Bierbaum, G.** 2010. Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 301(3), 229-236.
- Nair, D., Memmi, G., Hernandez, D., Bard, J., Beaume, M., Gill, S., Francois, P., Cheung, A.L.** 2011. Whole-genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. J. Bacteriol. 193(9), 2332-2335.

- Newsom S.W.B.** 2008. Ogston's coccus. *J. Hosp. Infect.* 70(4), 369-372.
- Norrby, R.** 2001. Linezolid - a review of the first oxazolidinone. *Exp. Opin. Pharmacother.* 2(2), 293-302.
- Norrby, S., Lietman, P.** 1993. Safety and tolerability of fluoroquinolones. *Drugs* 45(Suppl. 3), 59-64.
- Ohtsubo, Y., Genka, H., Komatsu, H., Nagata, Y., Tsuda, M.** 2005. High-temperature-induced transposition of insertion elements in *Burkholderia multivorans* ATCC 17616. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(4), 1822-1828.
- Old, L.A., Russell, R.R.** 2008. Distribution and activity of IS elements in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 287(2), 199-204.
- O'Neill, A.J., Chopra, I.** 2002. Insertional inactivation of *mutS* in *Staphylococcus aureus* reveals potential for elevated mutation frequencies, although the prevalence of mutators in clinical isolates is low. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 161-169.
- Orgel, L.E., Crick, F.H.** 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature.* 284(5757), 604-607.
- Otto, M.** 2009. Looking toward basic science for potential drug discovery targets against community-associated MRSA. *Med. Res. Rev.* 30(1), 1-22.
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Hardwick, S.W., Gronau, K., Lewis, R.J., Hecker, M., Engelmann, S.** 2009. Role of RsbU in controlling SigB activity in *Staphylococcus aureus* following alkaline stress. *J. Bacteriol.* 191(8), 2561-2573.
- Pelz, A., Wieland, K.P., Putzbach, K., Hentschel, P., Albert, K., Götz, F.** 2005. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 280(37), 32493-32498.
- Périchon, B., Courvalin, P.** 2009. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(11), 4580-4587.
- Poroca, D.R., Lima, A.S., Lima, J. F., Cruz, H.L., Montenegro, R.A., Melo, F.L., Schindler, H.C., Montenegro, L.M.** 2009. Differentiation of micobacteria by multiplex PCR. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42(6), 716-722.
- Pratten, J., Foster, S.J., Chan, P.F., Wilson, M., Nair, S.P.** 2001. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. *Microbes Infect.* 3(8), 633-637.
- Prunier, A.L., Malbruny, B., Laurans, M., Brouard, J., Duhamel, J.F., Leclercq, R.** 2003. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J. Infect. Dis.* 187, 1709-1716.
- Rabe, C., Gorschlüter, M., Wasmuth, J.C., Woitas, R.** 2008. Empfehlungen zur Antibiotika- und Antimykotika-Therapie, 7th ed. Universitätsklinikum Bonn.

- Rachid, S., Cho, S., Ohlsen, K., Hacker, J., Ziebuhr, W.** 2000. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor sigB. *Adv. Exp. Med. Biol.* 485, 159-166.
- Raviglione, M.C., Boyle, J.F., Mariuz, P., Pablos-Mendez, A., Cortes, H., Merlo, A.** 1990. Ciprofloxacin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an acute-care hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34(11), 2050-2054.
- Reipert, A., Ehlert, K., Kast, T., Bierbaum, G.** 2003. Morphological and genetic differences in two isogenic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 568-576.
- Reznikoff, W.S.** 1993. The Tn5 transposon. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 945-963.
- Rice, L.B., Thorisdottir, A.S.** 1994. The prevalence of sequences homologous to IS256 in clinical enterococcal isolates. *Plasmid* 32(3), 344-349.
- Rice, L.B., Marshall, S.H.** 1994. Insertions of IS256-like element flanking the chromosomal beta-lactamase gene of *Enterococcus faecalis* CX19. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38(4), 693-701.
- Rice, L.B., Carias, L.L.** 1998. Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 180(3), 714-721.
- Roberts, D., Kleckner, N.** 1988. Tn10 transposition promotes RecA-dependent induction of a lambda prophage. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85(16), 6037-6041.
- Ross, J.A., Wardle, S.J., Haniford, D.B.** 2010. Tn10/IS10 transposition is downregulated at the level of transposase expression by the RNA-binding protein Hfq. *Mol. Microbiol.* 78(3), 607-621.
- Sader, H.S., Fey P.D., Fish, D.N., Limaye, A.P., Pankey, G., Rahal, J., Rybak, M.J., Snyderman, D.R., Steed, L.L., Waites, K., Jones, R.N.** 2009. Evaluation of vancomycin and daptomycin potency trends (MIC creep) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in nine U.S. medical centers from 2002 to 2006. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(10), 4127-4132.
- Safi, H., Barnes, P.F., Lakey, D.L., Shams, H., Samten, B., Vankayalapati, R., Howard, S.T.** 2004. IS6110 functions as a mobile, monocyte-activated promoter in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 52(4), 999-1012.
- Sakai J., Chalmers, R.M., Kleckner, N.** 1995 Identification and characterization of a pre-cleavage synaptic complex that is an early intermediate in Tn10 transposition. *EMBO J.* 14(17), 4374-4383.
- Sambrook J., and D. Russel.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 74(12), 5463-5467.

- Schoenfelder, S.M., Lange C., Eckart M., Hennig S., Kozytska S., Ziebuhr W.** 2010. Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int. J. Med. Microbiol.* 300(6), 380-386.
- Shaw, L.N., Aish, J., Davenport, J.E., Brown, M.C., Lithgow, J.K., Simmonite, K., Crossley, H., Travis, J., Potempa, J., Foster S.J.** 2006. Investigations into sigmaB-modulated regulatory pathways governing extracellular virulence determinant production in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 188(17), 6070-6080.
- Sierro, N., Makita, Y., de Hoon, M., Nakai, K.** 2008. DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. *Nucleic Acids Res.* 36, D93-6.
- Signon, L., Kleckner N.** 1995. Negative and positive regulation of Tn10/IS10-promoted recombination by IHF: two distinguishable processes inhibit transposition off of multicopy plasmid replicons and activate chromosomal events that favor evolution of new transposons. *Genes Dev.* 9(9), 1123-1136.
- Siguiet, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., Chandler, M.** 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34, D32-6.
- Simons, R.W., Kleckner, N.** 1983. Translational control of IS10 transposition. *Cell* 34(2), 683-691.
- Simons, R.W., Kleckner, N.** 1988. Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 22, 567-600.
- Smith, I., Vickers, A.** 1960. Natural history of 338 treated and untreated patients with staphylococcal septicaemia. *Lancet.* 1(7138), 1318-1322.
- Starlinger, P., Saedler, H.** 1976. IS-elements in microorganisms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 75, 111-152.
- Steinkraus G., White R., Friedrich L.** 2007. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05. *J. Antimicrob. Chemother.* 60(4), 788-794.
- Stewart G.T., Holt, R.J.** 1963. Evolution of natural resistance to the newer penicillins. *Br. Med. J.* 1(5326), 308-311.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358(9276), 135-138.
- Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A.** 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(4), 664-689.
- Tamber, S., Schwartzman, J., Cheung, A.L.** 2010. Role of PknB kinase in antibiotic resistance and virulence in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300. *Infect. Immun.* 78, 3637-3646.

- Thorne, N., Borrell, S., Evans, J., Magee, J., García de Viedma, D., Bishop, C., Gonzalez-Martin, J., Gharbia, S., Arnold, C.** 2011. IS6110-based global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Gen. Evol.* 11(1), 132-138.
- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G., Som, T.** 1981. Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78(3), 1421-1425.
- Tsiodras, S., Gold, H.S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering, R.C., Ferraro, M.J.** 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 358(9277), 207-208.
- Tsui, W.H., Yim, G., Wang, H.H., McClure, J.E., Surette, M.G., Davies, J.** 2004. Dual effects of MLS antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome. *Chem. Biol.* 11(09), 1307-1316.
- Tuscherr, L.P., Gomez, M.I., Buzzola, F.R., Calvino, L.F., Lee, J.C., Sordelli, D.O.** 2007. Characterization of a new variant of IS257 that has displaced the capsule genes within bovine isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 75(11), 5483-5488.
- Udo, E.E., Pearman J.W., Grubb, W.B.** 1993. Genetic analysis of community isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Western Australia. *J. Hosp. Infect.* 25(2), 97-108.
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.M., Amorena, B., Penadés, J.R., Lasa I.** 2003. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 48(4), 1075-1087.
- Valle, J., Vergara-Irigaray, M., Merino, N., Penadés, J.R., Lasa, I.** 2007. SigmaB regulates IS256-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotypic variation. *J. Bacteriol.* 189, 2886-2896.
- Van Schaik, W., Abee, T.** 2005. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria -- targets for food preservation and safety. *Cur. Opin. Biotechnol.* 16(2), 218-224.
- Vicient, C.M.** 2010. Transcriptional activity of transposable elements in maize. *BMC Genomics.* 11, 601.
- Voyich, J.N., Otto, M., Mathema, B., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Welty, D., Long, R.D., Dorward, D.W., Gardner, D.J., Lina, G., Kreiswirth, B.N., DeLeo F.R.** 2006. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? *J. Infect. Dis.* 194(12), 1761-1770
- Waldron, D.E., J.A Lindsay.** 2006. Sau1: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *J. Bacteriol.* 188(15), 5578-5585.
- Weinreich, M.D., Makris, J.C., Reznikoff, W.S.** 1991. Induction of the SOS response in *Escherichia coli* inhibits Tn5 and IS50 transposition. *J. Bacteriol.* 173(21), 6910-6918.
- Wiame, I., Remy, S., Swennen, R., Sági, L.** 2000. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *Biotechniques.* 29(2), 252-254, 256.

Wiegand, I., Hilpert K., Hancock, R.E.W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols* **3**(2), 163-175.

Wu, S., Howard, S.T., Lakey, D.L., Kipnis, A., Samten, B., Safi, H., Gruppo, V., Wizel, B., Shams, H., Basaraba, R.J., Orme, I. M., Barnes, P. F. 2004. The principal sigma factor sigA mediates enhanced growth of *Mycobacterium tuberculosis in vivo*. *Mol. Microbiol.* **51**(6), 1551-1562.

Xing, J., Zhang, Y., Han, K., Salem, A.H., Sen, S.K., Huff, C.D., Zhou, Q., Kirkness, E.F., Levy, S., Batzer, M.A., Jorde, L.B. 2009. Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome Res.* **19**(9), 1516-1526.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1), 103-119.

Yim, G., Wang, H.H., Davies, J. 2006. The truth about antibiotics. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**(2-3), 163-170.

Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Löbner, I., Götz, F., Hacker, J. 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* **32**, 345-356.

7 Anhang

7.1 Sequenz IS256

Mit der nachfolgend genannten Sequenz des IS256 erfolgten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen und das Primerdesign.

```

GAT AAA GTC CGT ATA ATT GTG TAA AAG TAA AAA GGC CAT ATA ACA
GTC CTT TTA CGG TAC AAT GTT TTT AAC GAC AAA AAC ATA CCC AGG
AGG ACT TTT ACA TGA CCC AAG TAC ATT TTA CAC TGA AAA GCG AAG
AGA TTC AAA GCA TTA TTG AAT ATT CTG TAA AGG ATG ACG TTT CTA
AAA ATA TTT TAA CAA CGG TAT TTA ATC AAC TAA TGG AAA ATC AAC
GAA CAG AAT ATA TTC AAG CAA AAG AAT ATG AAC GAA CAG AAA ACC
GAC AAA GTC AAC GAA ATG GCT ATT ATG AGC GCA GCT TTA CGA CAC
GTG TAG GCA CGC TAG AAT TAA AAG TAC CCA GAA CAC GTG ATG GCC
ATT TTT CAC CCA CAG TGT TTG AAC GTT ATC AAC GAA ACG AAA AAG
CCC TCA TGG CTT CAA TGT TGG AAA TGT ATG TAT CAG GCG TTT CAA
CTC GTA AAG TAT CAA AAA TTG TGG AAG AAC TTT GTG GTA AAT CCG
TCT CTA AGT CCT TCG TTT CTA GCT TAA CAG AAC AGC TAG AAC CTA
TGG TTA ACG AGT GGC AGA ATC GTT TAT TAT CAG AAA AAA ATT ATC
CTT ACT TAA TGA CCG ATG TAC TCT ATA TAA AAG TAC GAG AAG AAA
ATC GAG TAC TCT CAA AAA GCT GTC ATA TAG CGA TTG GAA TAA CCA
AAG ATG GCG ACC GTG AAA TTA TCG GCT TCA TGA TTC AAA GTG GCG
AAA GCG AAG AGA CCT GGA CAA CAT TTT TTG AAT ACC TAA AAG AAC
GCG GTT TAC AAG GTA CGG AAC TCG TTA TTT CTG ATG CGC ACA AAG
GAT TAG TCT CTG CCA TTA GAA AAT CCT TCA CCA ACG TAA GTT GGC
AAA GAT GCC AAG TTC ACT TCC TAA GAA ATA TCT TTA CCA CCA TTC
CTA AAA AAA ATT CAA AAT CTT TCA GAG AAG CTG TTA AAG GAA TTT
TTA AGT TCA CAG ATA TTA ACT TAG CGC GTG AGG CTA AAA ATC GAT
TGA TTC ATG ATT ATA TCG ATC AAC CAA AAT ATT CAA AAG CTT GCG
CAT CAT TGG ATG ATG GAT TCG AAG ACG CCT TTC AAT ATA CCG TAC
AAG GAA ATT CCC ACA ATC GAC TAA AGA GTA CCA ATC TAA TTG AAC
GAC TGA ATC AAG AAG TAC GCA GAA GAG AAA AGA TTA TTC GCA TCT
TCC CCA ATC AAA CAT CAG CCA ATC GCT TAA TTG GAG CCG TTC TTA
TGG ACC TAC ATG ATG AAT GGA TTT ATT CTT CAA GAA AAT ACA TCA
ATT TTG ATA AGT AGA AAT GGT AAA AAC ATT GTA TAG CAT TTT ACA
CAG GAG TCT GGA CTT GAC T

```

- inverted repeat left
- inverted repeat right

7.2 Sequenz Plasmid pA3

Die nachfolgend angeführte Sequenz des Plasmids pA3 wurde durch die Firma Sequiserve ermittelt und die erwartete Sequenz somit bestätigt. Das Plasmid pA3 basiert, wie bereits beschrieben, auf dem Plasmid pBT2. Für eine kürzere Darstellung der Sequenz wurde das Rückgrat des pBT2 nicht aufgeführt, sondern lediglich das eingebrachte Insert. Um die Lage des Inserts innerhalb der mcs des pBT2 zu verdeutlichen, wurden die äußeren verwendeten Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* in blau gedruckt. Dies gilt auch für alle weiteren hier aufgeführten Plasmidsequenzen.

```

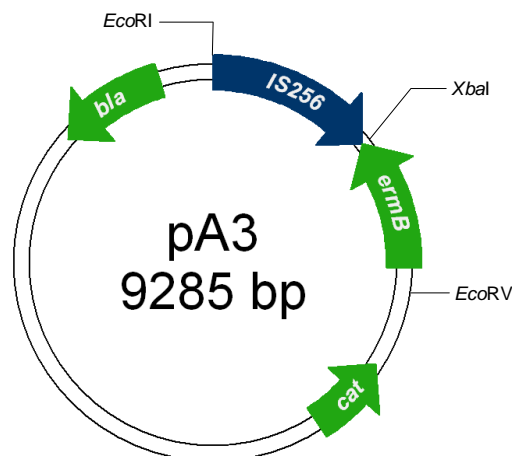
GAA TTC GGA TAA AGT CCG TAT AAT TGT GTA AAA GTA AAA AGG CCA
TAT AAC AGT CCT TTT ACG GTA CAA TGT TTT TAA CGA CAA AAA CAT
ACC CAG GAG GAC TTT TAC ATG ACC CAA GTA CAT TTT ACA CTG AAA
AGC GAA GAG ATT CAA AGC ATT ATT GAA TAT TCT GTA AAG GAT GAC
GTT TCT AAA AAT ATT TTA ACA ACG GTA TTT AAT CAA CTA ATG GAA
AAT CAA CGA ACA GAA TAT ATT CAA GCA AAA GAA TAT GAA CGA ACA
GAA AAC CGA CAA AGT CAA CGA AAT GGC TAT TAT GAG CGC AGC TTT
ACG ACA CGT GTA GGC ACG CTA GAA TTA AAA GTA CCC AGA ACA CGT
GAT GGC CAT TTT TCA CCC ACA GTG TTT GAA CGT TAT CAA CGA AAC
GAA AAA GCC CTC ATG GCT TCA ATG TTG GAA ATG TAT GTA TCA GGC
GTT TCA ACT CGT AAA GTA TCA AAA ATT GTG GAA GAA CTT TGT GGT
AAA TCC GTC TCT AAG TCC TTC GTT TCT AGC TTA ACA GAA CAG CTA
GAA CCT ATG GTT AAC GAG TGG CAG AAT CGT TTA TTA TCA GAA AAA
AAT TAT CCT TAC TTA ATG ACC GAT GTA CTC TAT ATA AAA GTA CGA
GAA GAA AAT CGA GTA CTC TCA AAA AGC TGT CAT ATA GCG ATT GGA
ATA ACC AAA GAT GGC GAC CGT GAA ATT ATC GGC TTC ATG ATT CAA
AGT GGC GAA AGC GAA GAG ACC TGG ACA ACA TTT TTT GAA TAC CTA
AAA GAA CGC GGT TTA CAA GGT ACG GAA CTC GTT ATT TCT GAT GCG
CAC AAA GGA TTA GTC TCT GCC ATT AGA AAA TCC TTC ACC AAC GTA
AGT TGG CAA AGA TGC CAA GTT CAC TTC CTA AGA AAT ATC TTT ACC
ACC ATT CCT AAA AAA AAT TCA AAA TCT TTC AGA GAA GCT GTT AAA
GGA ATT TTT AAG TTC ACA GAT ATT AAC TTA GCG CGT GAG GCT AAA
AAT CGA TTG ATT CAT GAT TAT ATC GAT CAA CCA AAA TAT TCA AAA
GCT TGC GCA TCA TTG GAT GAT GGA TTC GAA GAC GCC TTT CAA TAT
ACC GTA CAA GGA AAT TCC CAC AAT CGA CTA AAG AGT ACC AAT CTA
ATT GAA CGA CTG AAT CAA GAA GTA CGC AGA AGA GAA AAG ATT ATT
CGC ATC TTC CCC AAT CAA ACA TCA GCC AAT CGC TTA ATT GGA GCC
GTT CTT ATG GAC CTA CAT GAT GAA TGG ATT TAT TCT TCA AGA AAA
TAC ATC AAT TTT GAT AAG TAG AAA TGG TAA AAA CAT TGT ATA GCA
TCT AGA TTA TTT CCT CCC GTT AAA TAA TAG ATA ACT ATT AAA AAT
AGA CAA TAC TTG CTC ATA AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC TTT
GGC GTG TTT CAT TGC TTG ATG AAA CTG ATT TTT AGT AAA CAG TTG
ACG ATA TTC TCG ATT GAC CCA TTT TGA AAC AAA GTA CGT ATA TAG
CTT CCA ATA TTT ATC TGG AAC ATC TGT GGT ATG GCG GGT AAG TTT
TAT TAA GAC ACT GTT TAC TTT TGG TTT AGG ATG AAA GCA TTC CGC
TGG CAG CTT AAG CAA TTG CTG AAT CGA GAC TTG AGT GTG CAA GAG
CAA CCC TAG TGT TCG GTG AAT ATC CAA GGT ACG CTT GTA GAA TCC

```

```
TTC TTC AAC AAT CAG ATA GAT GTC AGA CGC ATG GCT TTC AAA AAC
CAC TTT TTT AAT AAT TTG TGT GCT TAA ATG GTA AGG AAT ACT CCC
AAC AAT TTT ATA CCT CTG TTT GTT AGG GAA TTG AAA CTG TAG AAT
ATC TTG GTG AAT TAA AGT GAC ACG AAT GTT CAG TTT TAA TTT TTC
TGA CGA TAA GTT GAA TAG ATG ACT GTC TAA TTC AAT AGA CGT TAC
CTG TTT ACT TAT TTT AGC CAG TTT CGT CGT TAA ATG CCC TTT ACC
TGT TCC AAT TTC GTA AAC GGT ATC GGT TTC TTT TAA ATT CAA TTG
TTT TAT TAT TTG GTT GAG TAC TTT TTC ACT CGT TAA AAA GTT TTG
AGA ATA TTT TAT ATT TTT GTT CAT GTA ATC ACT CCT TCT TAA TTA
CAA ATT TTT AGC ATC TAA TTT AAC TTC AAT TCC TAT TAT ACA AAA
TTT TAA GAT ACT GCA CTA TCA ACA CAC TCT TAA GTT TGC TTC TAA
GTC TTA TTT CCA TAA CTT CTT TTA CGT TTC CGC CAT TCT TTG CTG
TTT CGA TTT TTA TGA TAT GGT GCA AGT CAG CAC GAA CAC GAA CCG
TCT TAT CTC CCA TTA TAT CTT TTT TTG CAC TGA TTG GTG TAT CAT
TTC GTT TTT CTT TAC ACA GGA GTC TGG ACT TGA CT AAG CTT ...
```

- Sequenz IS256
- Sequenz *ermB*
- **inverted repeat left**
- **inverted repeat right**
- Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII*

7.2.1 Plasmidkarte pA3



7.3 Sequenz Plasmid pA3 Δ tnptr

```

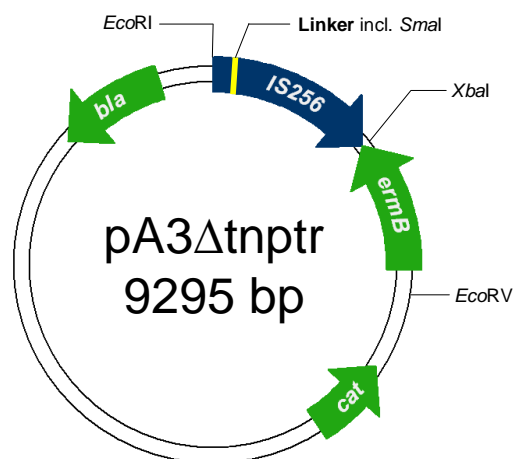
GAA TTC GGA TAA AGT CCG TAT AAT TGT GTA AAA GTA AAA AGG CCA
TAT AAC AGT CCT TTT ACG GTA CAA TGT TTT TAA CGA CAA AAA CAT
ACC CAG GAG GAC TTT TAC ATG ACC CAA GTA CAT TTT ACA CTG AAA
AGC GAA GAG ATT CAA AGC ATT ATT GAA TAT TCT GTA AAG GAT GAC
GTT TCT AAA AAT ATT TTA ACA ACG GTA TTT AAT CAA CTA ATG GAA
AAT CAA CGA ACA GAA TAT ATT CAA GCA AAA GAA TAT GAA CGA ACA
GAA AAC CGA CAA AGT CAA CGA AAT GGC TAT TAT GAG CGC AGC TTT
ACG ACA CGT GTA GGC ACG CTA GAA TTA AAA GTA CCC AGA ACA CGT
GAT GG TAC CCG GGT A C CAT TTT TCA CCC ACA GTG TTT GAA CGT
TAT CAA CGA AAC GAA AAA GCC CTC ATG GCT TCA ATG TTG GAA ATG
TAT GTA TCA GGC GTT TCA ACT CGT AAA GTA TCA AAA ATT GTG GAA
GAA CTT TGT GGT AAA TCC GTC TCT AAG TCC TTC GTT TCT AGC TTA
ACA GAA CAG CTA GAA CCT ATG GTT AAC GAG TGG CAG AAT CGT TTA
TTA TCA GAA AAA AAT TAT CCT TAC TTA ATG ACC GAT GTA CTC TAT
ATA AAA GTA CGA GAA GAA AAT CGA GTA CTC TCA AAA AGC TGT CAT
ATA GCG ATT GGA ATA ACC AAA GAT GGC GAC CGT GAA ATT ATC GGC
TTC ATG ATT CAA AGT GGC GAA AGC GAA GAG ACC TGG ACA ACA TTT
TTT GAA TAC CTA AAA GAA CGC GGT TTA CAA GGT ACG GAA CTC GTT
ATT TCT GAT GCG CAC AAA GGA TTA GTC TCT GCC ATT AGA AAA TCC
TTC ACC AAC GTA AGT TGG CAA AGA TGC CAA GTT CAC TTC CTA AGA
AAT ATC TTT ACC ACC ATT CCT AAA AAA AAT TCA AAA TCT TTC AGA
GAA GCT GTT AAA GGA ATT TTT AAG TTC ACA GAT ATT AAC TTA GCG
CGT GAG GCT AAA AAT CGA TTG ATT CAT GAT TAT ATC GAT CAA CCA
AAA TAT TCA AAA GCT TGC GCA TCA TTG GAT GAT GGA TTC GAA GAC
GCC TTT CAA TAT ACC GTA CAA GGA AAT TCC CAC AAT CGA CTA AAG
AGT ACC AAT CTA ATT GAA CGA CTG AAT CAA GAA GTA CGC AGA AGA
GAA AAG ATT ATT CGC ATC TTC CCC AAT CAA ACA TCA GCC AAT CGC
TTA ATT GGA GCC GTT CTT ATG GAC CTA CAT GAT GAA TGG ATT TAT
TCT TCA AGA AAA TAC ATC AAT TTT GAT AAG TAG AAA TGG TAA AAA
CAT TGT ATA GCA TCT AGA TTA TTT CCT CCC GTT AAA TAA TAG ATA
ACT ATT AAA AAT AGA CAA TAC TTG CTC ATA AGT AAC GGT ACT TAA
ATT GTT TAC TTT GGC GTG TTT CAT TGC TTG ATG AAA CTG ATT TTT
AGT AAA CAG TTG ACG ATA TTC TCG ATT GAC CCA TTT TGA AAC AAA
GTA CGT ATA TAG CTT CCA ATA TTT ATC TGG AAC ATC TGT GGT ATG
GCG GGT AAG TTT TAT TAA GAC ACT GTT TAC TTT TGG TTT AGG ATG
AAA GCA TTC CGC TGG CAG CTT AAG CAA TTG CTG AAT CGA GAC TTG
AGT GTG CAA GAG CAA CCC TAG TGT TCG GTG AAT ATC CAA GGT ACG
CTT GTA GAA TCC TTC TTC AAC AAT CAG ATA GAT GTC AGA CGC ATG
GCT TTC AAA AAC CAC TTT TTT AAT AAT TTG TGT GCT TAA ATG GTA
AGG AAT ACT CCC AAC AAT TTT ATA CCT CTG TTT GTT AGG GAA TTG
AAA CTG TAG AAT ATC TTG GTG AAT TAA AGT GAC ACG AAT GTT CAG
TTT TAA TTT TTC TGA CGA TAA GTT GAA TAG ATG ACT GTC TAA TTC
AAT AGA CGT TAC CTG TTT ACT TAT TTT AGC CAG TTT CGT CGT TAA
ATG CCC TTT ACC TGT TCC AAT TTC GTA AAC GGT ATC GGT TTC TTT
TAA ATT CAA TTG TTT TAT TAT TTG GTT GAG TAC TTT TTC ACT CGT
TAA AAA GTT TTG AGA ATA TTT TAT ATT TTT GTT CAT GTA ATC ACT
CCT TCT TAA TTA CAA ATT TTT AGC ATC TAA TTT AAC TTC AAT TCC
TAT TAT ACA AAA TTT TAA GAT ACT GCA CTA TCA ACA CAC TCT TAA
GTT TGC TTC TAA GTC TTA TTT CCA TAA CTT CTT TTA CGT TTC CGC

```

CAT TCT TTG CTG TTT CGA TTT TTA TGA TAT GGT GCA AGT CAG CAC
GAA CAC GAA CCG TCT TAT CTC CCA TTA TAT CTT TTT TTG CAC TGA
TTG GTG TAT CAT TTC GTT TTT CTT TAC ACA GGA GTC TGG ACT TGA CT
AAG CTT ...

- Sequenz IS256
- Sequenz *ermB*
- Eingefügtes Linkermolekül
- inverted repeat left
- inverted repeat right
- Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII*

7.3.1 Plasmidkarte pA3Δtnptr



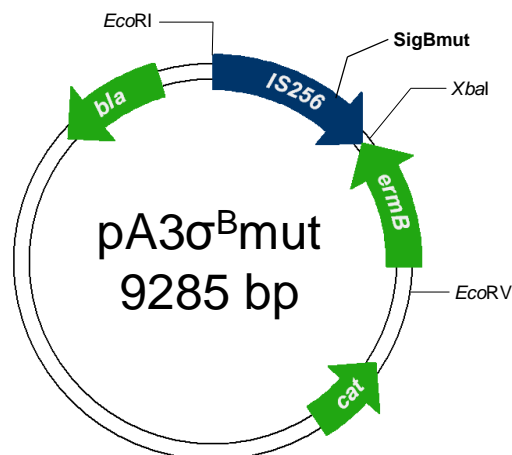
7.4 Sequenz Plasmid pA3 σ^B mut

GAA TTC GGA TAA AGT CCG TAT AAT TGT GTA AAA GTA AAA AGG CCA
TAT AAC AGT CCT TTT ACG GTA CAA TGT TTT TAA CGA CAA AAA CAT
ACC CAG GAG GAC TTT TAC **ATG** ACC CAA GTA CAT TTT ACA CTG AAA
AGC GAA GAG ATT CAA AGC ATT ATT GAA TAT TCT GTA AAG GAT GAC
GTT TCT AAA AAT ATT TTA ACA ACG GTA TTT AAT CAA CTA ATG GAA
AAT CAA CGA ACA GAA TAT ATT CAA GCA AAA GAA TAT GAA CGA ACA
GAA AAC CGA CAA AGT CAA CGA AAT GGC TAT TAT GAG CGC AGC TTT
ACG ACA CGT GTA GGC ACG CTA GAA TTA AAA GTA CCC AGA ACA CGT
GAT GGC CAT TTT TCA CCC ACA GTG TTT GAA CGT TAT CAA CGA AAC
GAA AAA GCC CTC ATG GCT TCA ATG TTG GAA ATG TAT GTA TCA GGC
GTT TCA ACT CGT AAA GTA TCA AAA ATT GTG GAA GAA CTT TGT GGT
AAA TCC GTC TCT AAG TCC TTC GTT TCT AGC TTA ACA GAA CAG CTA
GAA CCT ATG GTT AAC GAG TGG CAG AAT CGT TTA TTA TCA GAA AAA
AAT TAT CCT TAC TTA ATG ACC GAT GTA CTC TAT ATA AAA GTA CGA
GAA GAA AAT CGA GTA CTC TCA AAA AGC TGT CAT ATA GCG ATT GGA
ATA ACC AAA GAT GGC GAC CGT GAA ATT ATC GGC TTC ATG ATT CAA
AGT GGC GAA AGC GAA GAG ACC TGG ACA ACA TTT TTT GAA TAC CTA
AAA GAA CGC GGT TTA CAA GGT ACG GAA CTC GTT ATT TCT GAT GCG
CAC AAA GGA TTA GTC TCT GCC ATT AGA AAA TCC TTC ACC AAC GTA
AGT TGG CAA AGA TGC CAA GTT CAC TTC CTA AGA AAT ATC TTT ACC
ACC ATT CCT AAA AAA AAT TCA AAA TCT TTC AGA GAA GCT GTT AAA
GGA ATT TTT AAG TTC ACA GAT ATT AAC TTA GCG CGT GAG GCT AAA
AAT CGA TTG ATT CAT GAT TAT ATC GAT CAA CCA AAA TAT TCA AAA
GCT TGC GCA TCA TTG GAT GAT GGA TTC GAA GAC GCC TTT CAA TAT
ACC GTA CAA GGA AAT TCC CAC AAT CGA CTA AAG AGT ACC AAT CTA
ATT GAA CGA CTG AAT CAA GAA GTA CGC AGA AGA GAA AAG ATT ATT
CGC ATC TTC CCC AAT CAA ACA TCA GCA AAT AGA TTA ATT GGA GCC
GTT CTT ATG GAC CTA CAT GAT GAA TGG ATT TAT TCT TCA AGA AAA
TAC ATC AAT TTT **GAT AAG** TAG AAA TGG TAA AAA CAT TGT ATA GCA
TCT AGA TTA TTT CCT CCC GTT AAA TAA TAG ATA ACT ATT AAA AAT
AGA CAA TAC TTG CTC ATA AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC TTT
GGC GTG TTT CAT TGC TTG ATG AAA CTG ATT TTT AGT AAA CAG TTG
ACG ATA TTC TCG ATT GAC CCA TTT TGA AAC AAA GTA CGT ATA TAG
CTT CCA ATA TTT ATC TGG AAC ATC TGT GGT ATG GCG GGT AAG TTT
TAT TAA GAC ACT GTT TAC TTT TGG TTT AGG ATG AAA GCA TTC CGC
TGG CAG CTT AAG CAA TTG CTG AAT CGA GAC TTG AGT GTG CAA GAG
CAA CCC TAG TGT TCG GTG AAT ATC CAA GGT ACG CTT GTA GAA TCC
TTC TTC AAC AAT CAG ATA GAT GTC AGA CGC ATG GCT TTC AAA AAC
CAC TTT TTT AAT AAT TTG TGT GCT TAA ATG GTA AGG AAT ACT CCC
AAC AAT TTT ATA CCT CTG TTT GTT AGG GAA TTG AAA CTG TAG AAT
ATC TTG GTG AAT TAA AGT GAC ACG AAT GTT CAG TTT TAA TTT TTC
TGA CGA TAA GTT GAA TAG ATG ACT GTC TAA TTC AAT AGA CGT TAC
CTG TTT ACT TAT TTT AGC CAG TTT CGT CGT TAA ATG CCC TTT ACC
TGT TCC AAT TTC GTA AAC GGT ATC GGT TTC TTT TAA ATT CAA TTG
TTT TAT TAT TTG GTT GAG TAC TTT TTC ACT CGT TAA AAA GTT TTG
AGA ATA TTT TAT ATT TTT GTT **CAT** GTA ATC ACT CCT TCT TAA TTA
CAA ATT TTT AGC ATC TAA TTT AAC TTC AAT TCC TAT TAT ACA AAA
TTT TAA GAT ACT GCA CTA TCA ACA CAC TCT TAA GTT TGC TTC TAA
GTC TTA TTT CCA TAA CTT CTT TTA CGT TTC CGC CAT TCT TTG CTG

```
TTT CGA TTT TTA TGA TAT GGT GCA AGT CAG CAC GAA CAC GAA CCG  
TCT TAT CTC CCA TTA TAT CTT TTT TTG CAC TGA TTG GTG TAT CAT  
TTC GTT TTT CTT TAC ACA GGA GTC TGG ACT TGA CT AAG CTT ...
```

- Sequenz IS256
- Sequenz *ermB*
- SigB-Gegenstrangpromotor (durchgeführte Basenaustausche)
- **inverted repeat left**
- **inverted repeat right**
- Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII*

7.4.1 Plasmidkarte pA3 σ^B mut



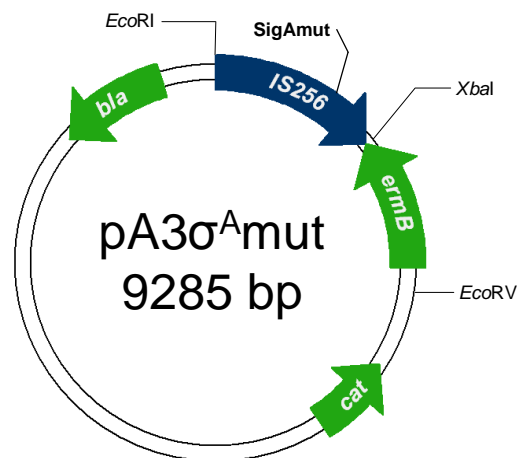
7.5 Sequenz pA3 σ^A mut

GAA TTC GGA TAA AGT CCG TAT AAT TGT GTA AAA GTA AAA AGG CCA
 TAT AAC AGT CCT TTT ACG GTA CAA TGT TTT TAA CGA CAA AAA CAT
 ACC CAG GAG GAC TTT TAC **ATG** ACC CAA GTA CAT TTT ACA CTG AAA
 AGC GAA GAG ATT CAA AGC ATT ATT GAA TAT TCT GTA AAG GAT GAC
 GTT TCT AAA AAT ATT TTA ACA ACG GTA TTT AAT CAA CTA ATG GAA
 AAT CAA CGA ACA GAA TAT ATT CAA GCA AAA GAA TAT GAA CGA ACA
 GAA AAC CGA CAA AGT CAA CGA AAT GGC TAT TAT GAG CGC AGC TTT
 ACG ACA CGT GTA GGC ACG CTA GAA TTA AAA GTA CCC AGA ACA CGT
 GAT GGC CAT TTT TCA CCC ACA GTG TTT GAA CGT TAT CAA CGA AAC
 GAA AAA GCC CTC ATG GCT TCA ATG TTG GAA ATG TAT GTA TCA GGC
 GTT TCA ACT CGT AAA GTA TCA AAA ATT GTG GAA GAA CTT TGT GGT
 AAA TCC GTC TCT AAG TCC TTC GTT TCT AGC TTA ACA GAA CAG CTA
 GAA CCT ATG GTT AAC GAG TGG CAG AAT CGT TTA TTA TCA GAA AAA
 AAT TAT CCT TAC TTA ATG ACC GAT GTA CTC TAT ATA AAA GTA CGA
 GAA GAA AAT CGA GTA CTC TCA AAA AGC TGT CAT ATA GCG ATT GGA
 ATA ACC AAA GAT GGC GAC CGT GAA ATT ATC GGC TTC ATG ATT CAA
 AGT GGC GAA AGC GAA GAG ACC TGG ACA ACA TTT TTT GAA TAC CTA
 AAA GAA CGC GGT TTA CAA GGT ACG GAA CTC GTT ATT TCT GAT GCG
 CAC AAA GGA TTA GTC TCT GCC ATT AGA AAA TCC TTC ACC AAC GTA
 AGT TGG CAA AGA TGC CAA GTT CAC TTC CTA AGA AAT ATC TTT ACC
 ACC ATT CCT AAA AAA AAT TCA AAA TCT TTC AGA GAA GCT GTT AAA
 GGA ATT TTT AAG TTC ACA GAT ATT AAC TTA GCG CGT GAG GCT AAA
 AAT CGA TTG ATT CAT **GAC TAC ATC GAT CAA CCA AAA TAT TCA AAA**
 GCT TGC GCA TCA TTG GAT GAT GGA TTC GAA GAC GCC TTT CAA TAT
 ACC GTA CAA GGA AAT TCC CAC AAT CGA CTA AAG AGT ACC AAT CTA
 ATT GAA CGA CTG AAT CAA GAA GTA CGC AGA AGA GAA AAG ATT ATT
 CGC ATC TTC CCC AAT CAA ACA TCA GCC AAT CGC TTA ATT GGA GCC
 GTT CTT ATG GAC CTA CAT GAT GAA TGG ATT TAT TCT TCA AGA AAA
 TAC ATC AAT TTT **GAT AAG** TAG AAA TGG TAA AAA CAT TGT ATA GCA
TCT AGA TTA TTT CCT CCC GTT AAA TAA TAG ATA ACT ATT AAA AAT
 AGA CAA TAC TTG CTC ATA AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC TTT
 GGC GTG TTT CAT TGC TTG ATG AAA CTG ATT TTT AGT AAA CAG TTG
 ACG ATA TTC TCG ATT GAC CCA TTT TGA AAC AAA GTA CGT ATA TAG
 CTT CCA ATA TTT ATC TGG AAC ATC TGT GGT ATG GCG GGT AAG TTT
 TAT TAA GAC ACT GTT TAC TTT TGG TTT AGG ATG AAA GCA TTC CGC
 TGG CAG CTT AAG CAA TTG CTG AAT CGA GAC TTG AGT GTG CAA GAG
 CAA CCC TAG TGT TCG GTG AAT ATC CAA GGT ACG CTT GTA GAA TCC
 TTC TTC AAC AAT CAG ATA GAT GTC AGA CGC ATG GCT TTC AAA AAC
 CAC TTT TTT AAT AAT TTG TGT GCT TAA ATG GTA AGG AAT ACT CCC
 AAC AAT TTT ATA CCT CTG TTT GTT AGG GAA TTG AAA CTG TAG AAT
 ATC TTG GTG AAT TAA AGT GAC ACG AAT GTT CAG TTT TAA TTT TTC
 TGA CGA TAA GTT GAA TAG ATG ACT GTC TAA TTC AAT AGA CGT TAC
 CTG TTT ACT TAT TTT AGC CAG TTT CGT CGT TAA ATG CCC TTT ACC
 TGT TCC AAT TTC GTA AAC GGT ATC GGT TTC TTT TAA ATT CAA TTG
 TTT TAT TAT TTG GTT GAG TAC TTT TTC ACT CGT TAA AAA GTT TTG
 AGA ATA TTT TAT ATT TTT GTT **CAT** GTA ATC ACT CCT TCT TAA TTA
 CAA ATT TTT AGC ATC TAA TTT AAC TTC AAT TCC TAT TAT ACA AAA
 TTT TAA GAT ACT GCA CTA TCA ACA CAC TCT TAA GTT TGC TTC TAA
 GTC TTA TTT CCA TAA CTT CTT TTA CGT TTC CGC CAT TCT TTG CTG

```
TTT CGA TTT TTA TGA TAT GGT GCA AGT CAG CAC GAA CAC GAA CCG
TCT TAT CTC CCA TTA TAT CTT TTT TTG CAC TGA TTG GTG TAT CAT
TTC GTT TTT CTT TAC ACA GGA GTC TGG ACT TGA CT AAG CTT ...
```

- Sequenz IS256
- Sequenz *ermB*
- SigA-Gegenstrangpromotor (durchgeführte Basenaustausche)
- inverted repeat left
- inverted repeat right
- Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII*

7.5.1 Plasmidkarte pA3 σ^A mut



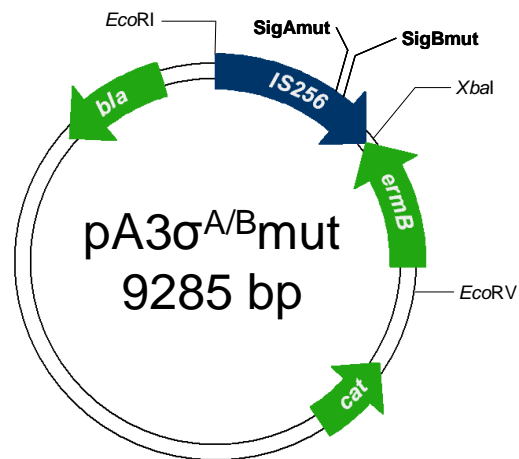
7.6 Sequenz pA3 $\sigma^{A/B}$ mut

GAA TTC GGA TAA AGT CCG TAT AAT TGT GTA AAA GTA AAA AGG CCA
TAT AAC AGT CCT TTT ACG GTA CAA TGT TTT TAA CGA CAA AAA CAT
ACC CAG GAG GAC TTT TAC **ATG** ACC CAA GTA CAT TTT ACA CTG AAA
AGC GAA GAG ATT CAA AGC ATT ATT GAA TAT TCT GTA AAG GAT GAC
GTT TCT AAA AAT ATT TTA ACA ACG GTA TTT AAT CAA CTA ATG GAA
AAT CAA CGA ACA GAA TAT ATT CAA GCA AAA GAA TAT GAA CGA ACA
GAA AAC CGA CAA AGT CAA CGA AAT GGC TAT TAT GAG CGC AGC TTT
ACG ACA CGT GTA GGC ACG CTA GAA TTA AAA GTA CCC AGA ACA CGT
GAT GGC CAT TTT TCA CCC ACA GTG TTT GAA CGT TAT CAA CGA AAC
GAA AAA GCC CTC ATG GCT TCA ATG TTG GAA ATG TAT GTA TCA GGC
GTT TCA ACT CGT AAA GTA TCA AAA ATT GTG GAA GAA CTT TGT GGT
AAA TCC GTC TCT AAG TCC TTC GTT TCT AGC TTA ACA GAA CAG CTA
GAA CCT ATG GTT AAC GAG TGG CAG AAT CGT TTA TTA TCA GAA AAA
AAT TAT CCT TAC TTA ATG ACC GAT GTA CTC TAT ATA AAA GTA CGA
GAA GAA AAT CGA GTA CTC TCA AAA AGC TGT CAT ATA GCG ATT GGA
ATA ACC AAA GAT GGC GAC CGT GAA ATT ATC GGC TTC ATG ATT CAA
AGT GGC GAA AGC GAA GAG ACC TGG ACA ACA TTT TTT GAA TAC CTA
AAA GAA CGC GGT TTA CAA GGT ACG GAA CTC GTT ATT TCT GAT GCG
CAC AAA GGA TTA GTC TCT GCC ATT AGA AAA TCC TTC ACC AAC GTA
AGT TGG CAA AGA TGC CAA GTT CAC TTC CTA AGA AAT ATC TTT ACC
ACC ATT CCT AAA AAA AAT TCA AAA TCT TTC AGA GAA GCT GTT AAA
GGA ATT TTT AAG TTC ACA GAT ATT AAC TTA GCG CGT GAG GCT AAA
AAT CGA TTG ATT CAT GAC TAC ATC GAT CAA CCA AAA TAT TCA AAA
GCT TGC GCA TCA TTG GAT GAT GGA TTC GAA GAC GCC TTT CAA TAT
ACC GTA CAA GGA AAT TCC CAC AAT CGA CTA AAG AGT ACC AAT CTA
ATT GAA CGA CTG AAT CAA GAA GTA CGC AGA AGA GAA AAG ATT ATT
CGC ATC TTC CCC AAT CAA ACA TCA GCA AAT AGA TTA ATT GGA GCC
GTT CTT ATG GAC CTA CAT GAT GAA TGG ATT TAT TCT TCA AGA AAA
TAC ATC AAT TTT **GAT** **AAG** TAG AAA TGG TAA AAA CAT TGT ATA GCA
TCT AGA **TTA** TTT CCT CCC GTT AAA TAA TAG ATA ACT ATT AAA AAT
AGA CAA TAC TTG CTC ATA AGT AAC GGT ACT TAA ATT GTT TAC TTT
GGC GTG TTT CAT TGC TTG ATG AAA CTG ATT TTT AGT AAA CAG TTG
ACG ATA TTC TCG ATT GAC CCA TTT TGA AAC AAA GTA CGT ATA TAG
CTT CCA ATA TTT ATC TGG AAC ATC TGT GGT ATG GCG GGT AAG TTT
TAT TAA GAC ACT GTT TAC TTT TGG TTT AGG ATG AAA GCA TTC CGC
TGG CAG CTT AAG CAA TTG CTG AAT CGA GAC TTG AGT GTG CAA GAG
CAA CCC TAG TGT TCG GTG AAT ATC CAA GGT ACG CTT GTA GAA TCC
TTC TTC AAC AAT CAG ATA GAT GTC AGA CGC ATG GCT TTC AAA AAC
CAC TTT TTT AAT AAT TTG TGT GCT TAA ATG GTA AGG AAT ACT CCC
AAC AAT TTT ATA CCT CTG TTT GTT AGG GAA TTG AAA CTG TAG AAT
ATC TTG GTG AAT TAA AGT GAC ACG AAT GTT CAG TTT TAA TTT TTC
TGA CGA TAA GTT GAA TAG ATG ACT GTC TAA TTC AAT AGA CGT TAC
CTG TTT ACT TAT TTT AGC CAG TTT CGT CGT TAA ATG CCC TTT ACC
TGT TCC AAT TTC GTA AAC GGT ATC GGT TTC TTT TAA ATT CAA TTG
TTT TAT TAT TTG GTT GAG TAC TTT TTC ACT CGT TAA AAA GTT TTG
AGA ATA TTT TAT ATT TTT GTT **CAT** GTA ATC ACT CCT TCT TAA TTA
CAA ATT TTT AGC ATC TAA TTT AAC TTC AAT TCC TAT TAT ACA AAA
TTT TAA GAT ACT GCA CTA TCA ACA CAC TCT TAA GTT TGC TTC TAA
GTC TTA TTT CCA TAA CTT CTT TTA CGT TTC CGC CAT TCT TTG CTG

```
TTT CGA TTT TTA TGA TAT GGT GCA AGT CAG CAC GAA CAC GAA CCG  
TCT TAT CTC CCA TTA TAT CTT TTT TTG CAC TGA TTG GTG TAT CAT  
TTC GTT TTT CTT TAC ACA GGA GTC TGG ACT TGA CT AAG CTT ...
```

- Sequenz IS256
- Sequenz *ermB*
- SigB-Gegenstrangpromotor (durchgeführte Basenaustausche)
- SigA-Gegenstrangpromotor (durchgeführte Basenaustausche)
- inverted repeat left
- inverted repeat right
- Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII*

7.6.1 Plasmidkarte pA3 $\sigma^{A/B}$ mut



7.7 Alignment der gefundenen IS256-Elemente mit dem detektierten Element aus klinischen Isolaten

Die nachfolgende Abbildung zeigt ein Alignment von der Referenzsequenz des IS256 mit dem PCR-Produkt der IS256 Nachweis-PCR aus dem Stamm *S. aureus* 1123/09. Die Sequenz des PCR-Produkts bricht aufgrund der gewählten Sequenzierungsart vorzeitig ab; die Sequenzen sind über eine Länge von 779 bp identisch zueinander. Da die ermittelten Sequenzen der PCR-Produkte zueinander identisch waren, wird hier lediglich ein exemplarisches Alignment gezeigt.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

IS256 Referenz  GGATAAAGTCCGTATAAATTGTGTAAGTAAAAAGGCCATATAACAGTCCTTTTACGGTA 60
IS256/SA1123/09 -----AAAAGTAAAAAGGCCATATAACAGTCCTTTTACGGTA 37
                        *****

IS256 Referenz  CAATGTTTTTAAACGACAAAAACATACCCAGGAGGACTTTTACATGACCCAAGTACATTTT 120
IS256/SA1123/09CAATGTTTTTAAACGACAAAAACATACCCAGGAGGACTTTTACATGACCCAAGTACATTTT 97
                        *****

IS256 Referenz  ACACTGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGCATTATTGAATATTCTGTAAAGGATGACGTTTCT 180
IS256/SA1123/09 ACACTGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGCATTATTGAATATTCTGTAAAGGATGACGTTTCT 157
                        *****

IS256 Referenz  AAAAAATATTTTAAACAACGGTATTTAATCAACTAATGGAAAATCAACGAACAGAATATATT 240
IS256/SA1123/09 AAAAAATATTTTAAACAACGGTATTTAATCAACTAATGGAAAATCAACGAACAGAATATATT 217
                        *****

IS256 Referenz  CAAGCAAAGAATATGAACGAACAGAAAACCGACAAAAGTCAACGAAATGGCTATTATGAG 300
IS256/SA1123/09 CAAGCAAAGAATATGAACGAACAGAAAACCGACAAAAGTCAACGAAATGGCTATTATGAG 277
                        *****

IS256 Referenz  CGCAGCTTTACGACACGTGTAGGCACGCTAGAATTTAAAGTACCCAGAACACGTGATGGC 360
IS256/SA1123/09 CGCAGCTTTACGACACGTGTAGGCACGCTAGAATTTAAAGTACCCAGAACACGTGATGGC 337
                        *****

IS256 Referenz  CATTTTTCACCCACAGTGTTTGAACGTTATCAACGAAACGAAAAAGCCCTCATGGCTTCA 420
IS256/SA1123/09 CATTTTTCACCCACAGTGTTTGAACGTTATCAACGAAACGAAAAAGCCCTCATGGCTTCA 397
                        *****

IS256 Referenz  ATGTTGGAATGTATGTATCAGGCGTTTCAACTCGTAAAGTATCAAAAATTGTGGAAGAA 480
IS256/SA1123/09 ATGTTGGAATGTATGTATCAGGCGTTTCAACTCGTAAAGTATCAAAAATTGTGGAAGAA 457
                        *****

IS256 Referenz  CTTTGTGGTAAATCCGTCTCTAAGTCCTTCGTTTCTAGCTTAAACAGAACAGCTAGAACCT 540
IS256/SA1123/09 CTTTGTGGTAAATCCGTCTCTAAGTCCTTCGTTTCTAGCTTAAACAGAACAGCTAGAACCT 517
                        *****

IS256 Referenz  ATGGTTAACGAGTGGCAGAATCGTTTATTATCAGAAAAAAATTATCCTTACTTAATGACC 600
IS256/SA1123/09 ATGGTTAACGAGTGGCAGAATCGTTTATTATCAGAAAAAAATTATCCTTACTTAATGACC 577
                        *****

IS256 Referenz  GATGTACTCTATATAAAAGTACGAGAAGAAAATCGAGTACTCTCAAAAAGCTGTCATATA 660
IS256/SA1123/09 GATGTACTCTATATAAAAGTACGAGAAGAAAATCGAGTACTCTCAAAAAGCTGTCATATA 637
                        *****

```

```

IS256 Referenz GCGATTGGAATAACCAAAGATGGCGACCGTGAAATTATCGGCTTCATGATTCAAAGTGGC 720
IS256/SA1123/09 GCGATTGGAATAACCAAAGATGGCGACCGTGAAATTATCGGCTTCATGATTCAAAGTGGC 697
*****

IS256 Referenz GAAAGCGAAGAGACCTGGACAACATTTTTTTGAATACCTAAAAGAACGCGGTTTACAAGGT 780
IS256/SA1123/09 GAAAGCGAAGAGACCTGGACAACATTTTTTTGAATACCTAAAAGAACGCGGTTTACAAGGT 757
*****

IS256 Referenz ACGGAACTCGTTATTTCTGATGCGCACAAAGGATTAGTCTCTGCCATTAGAAAATCCTTC 840
IS256/SA1123/09 ACGGAACTCGTTATTTCTGATG----- 779
*****

IS256 Referenz ACCAACGTAAGTTGGCAAAGATGCCAAGTTCACCTTCTAAGAAATATCTTTACCACCATT 900
IS256/SA1123/09 -----

IS256 Referenz CCTAAAAAAATTCAAAATCTTTCAGAGAAGCTGTTAAAGGAATTTTAAAGTTCACAGAT 960
IS256/SA1123/09 -----

IS256 Referenz ATTAAGTTCAGCGCTGAGGCTAAAAATCGATTGATTGATTATATCGATCAACCAAAA 1020
IS256/SA1123/09-----

IS256 Referenz TATTCAAAGCTTGCGCATCATTTGGATGATGGATTGGAAGACGCCTTCAATATACCGTA 1080
IS256/SA1123/09-----

IS256 Referenz CAAGGAAATCCCACAATCGACTAAAGAGTACCAATCTAATTGAACGACTGAATCAAGAA 1140
IS256/SA1123/09-----

IS256 Referenz GTACGCAGAAGAGAAAAGATTATTCGCATCTTCCCAATCAAACATCAGCCAATCGCTTA 1200
IS256/SA1123/09-----

IS256 Referenz ATTGGAGCCGTTCTTATGGACCTACATGATGAATGGATTTATCTTCAAGAAAATACATC 1260
IS256/SA1123/09-----

IS256 Referenz AATTTTGATAAGTAGAAATGGTAAAAACATTGTATAGCATTTTACACAGGAGTCTGGACT 1320
IS256/SA1123/09-----

IS256 Referenz TGAC 1324
IS256/SA1123/09----

```

Sequenziert wurden die PCR-Produkte von *S. aureus* LT1123/09, *S. aureus* LT61/09, *S. aureus* LT205/09, *S. aureus* LT808/09, *S. aureus* LT846/09, *S. aureus* LT1064/05, *S. aureus* LT1772/04, *S. aureus* LT586/05 und *S. aureus* LT1057/07.

7.8 Durchgeführte Verdünnungsreihen zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz

Die folgende Tabelle zeigt das standardmäßig angewandte Verdünnungsschema für die Ausplattierung der Zellen auf verschiedenen Nährmedien zu verschiedenen Zeitpunkten.

Zeit [h]	OD ₆₀₀ (Kontrolle)	Verdünnungsstufe	
		Columbia-Agar	Selektions-Agar
0	~ 0,05	unverdünnt	5×10^{-5}
1	~ 0,1	1/4	$2,5 \times 10^{-5}$
2	~ 0,25	10^{-1}	10^{-5}
3	~ 0,5	10^{-2}	10^{-6}
4	~ 1,0	10^{-2}	10^{-6}
5	~ 1,6	10^{-2}	10^{-6}
6	~ 3,0	10^{-2}	10^{-6}

7.9 Lokalisierung der Primer innerhalb der Transposase des IS256r zur Bestimmung der Gegenstrang-RNA

```

GAA TTC GGA TAA AGT CCG TAT AAT TGT GTA AAA GTA AAA AGG CCA
TAT AAC AGT CCT TTT ACG GTA CAA TGT TTT TAA CGA CAA AAA CAT
ACC CAG GAG GAC TTT TAC ATG ACC CAA GTA CAT TTT ACA CTG AAA
AGC GAA GAG ATT CAA AGC ATT ATT GAA TAT TCT GTA AAG GAT GAC
GTT TCT AAA AAT ATT TTA ACA ACG GTA TTT AAT CAA CTA ATG GAA
AAT CAA CGA ACA GAA TAT ATT CAA GCA AAA GAA TAT GAA CGA ACA
GAA AAC CGA CAA AGT CAA CGA AAT GGC TAT TAT GAG CGC AGC TTT
ACG ACA CGT GTA GGC ACG CTA GAA TTA AAA GTA CCC AGA ACA CGT
GAT GGC CAT TTT TCA CCC ACA GTG TTT GAA CGT TAT CAA CGA AAC
GAA AAA GCC CTC ATG GCT TCA ATG TTG GAA ATG TAT GTA TCA GGC
GTT TCA ACT CGT AAA GTA TCA AAA ATT GTG GAA GAA CTT TGT GGT
AAA TCC GTC TCT AAG TCC TTC GTT TCT AGC TTA ACA GAA CAG CTA
GAA CCT ATG GTT AAC GAG TGG CAG AAT CGT TTA TTA TCA GAA AAA
AAT TAT CCT TAC TTA ATG ACC GAT GTA CTC TAT ATA AAA GTA CGA
GAA GAA AAT CGA GTA CTC TCA AAA AGC TGT CAT ATA GCG ATT GGA
ATA ACC AAA GAT GGC GAC CGT GAA ATT ATC GGC TTC ATG ATT CAA
AGT GGC GAA AGC GAA GAG ACC TGG ACA ACA TTT TTT GAA TAC CTA
AAA GAA CGC GGT TTA CAA GGT ACG GAA CTC GTT ATT TCT GAT GCG
CAC AAA GGA TTA GTC TCT GCC ATT AGA AAA TCC TTC ACC AAC GTA
AGT TGG CAA AGA TGC CAA GTT CAC TTC CTA AGA AAT ATC TTT ACC
ACC ATT CCT AAA AAA AAT TCA AAA TCT TTC AGA GAA GCT GTT AAA
GGA ATT TTT AAG TTC ACA GAT ATT AAC TTA GCG CGT GAG GCT AAA
AAT CGA TTG ATT CAT GAT TAT ATC GAT CAA CCA AAA TAT TCA AAA
GCT TGC GCA TCA TTG GAT GAT GGA TTC GAA GAC GCC TTT CAA TAT
ACC GTA CAA GGA AAT TCC CAC AAT CGA CTA AAG AGT ACC AAT CTA
ATT GAA CGA CTG AAT CAA GAA GTA CGC AGA AGA GAA AAG ATT ATT
CGC ATC TTC CCC AAT CAA ACA TCA GCC AAT CGC TTA ATT GGA GCC
GTT CTT ATG GAC CTA CAT GAT GAA TGG ATT TAT TCT TCA AGA AAA
TAC ATC AAT TTT GAT AAG TAG AAA TGG TAA AAA CAT TGT ATA GCA
TCT AGA ... (→ ermB)

```

- Schnittstelle *EcoRI*
- inverted repeat left
- SigmaB-Gegenstrangpromotor
 - Primer RNA 100 for
 - Primer RNA 0 rev
- SigmaA-Gegenstrangpromotor
 - Primer SigA 89 for
 - Primer SigA 0 rev

8 Publikationen

Veröffentlichungen

Mazur, N., **Nagel, M.***, Leppin, U., Bierbaum, G., & Rust, J. (in preparation). Dissolubility of Indian amber and its implementation.

*The first two authors contribute equally to this work

Nagel, M., Reuter, T., Jansen, A., Szekat, C., Bierbaum, G. 2010. Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 301(3), 229-236.

Jansen, A., Türck, M., Szekat, C., **Nagel, M.**, Clever, I., Bierbaum, G. 2007. Role of insertion elements and *yycFG* in the development of decreased susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiol. 297(4), 205-215.

Poster-Präsentationen

M. Nagel and G. Bierbaum: “Antibiotic treatment provokes activity of IS256r in *S. aureus* strains”; VAAM, Karlsruhe, 2011

M. Nagel and G. Bierbaum: “Influence of antibiotics on the transposition frequency of IS256r in *Staphylococcus aureus*“; DGHM/VAAM, Hannover, 2010

T. Reuter, **M. Nagel**, A. Jansen, G. Bierbaum: “The role of the bacterial SOS response in the evolution of resistance against antibiotics in *Staphylococcus aureus*“; DGHM/VAAM, 2010

M. Nagel and G. Bierbaum: “Antibiotic stress triggers the transposition frequency of IS256r in *Staphylococcus aureus*“; ProkaGenomics, Göttingen, 2009

M. Nagel and G. Bierbaum: “Influence of antibiotic stress and SigmaB on the transposition frequency of IS256r in *Staphylococcus aureus*“; DGHM, Göttingen, 2009

M. Nagel and G. Bierbaum: “Effect of antibiotic stress on the transposition frequency of IS256r in *Staphylococcus aureus*“; VAAM, Bochum, 2009

M. Nagel, A. Jansen, M. Türk and G. Bierbaum. “Antibiotic stress and transposition frequency of IS256r in *Staphylococcus aureus*“; Workshop of the Transregional Collaborative Research Center 34 (Greifswald, Tübingen, Würzburg) at the Kloster Banz, Bad Staffelstein, 2008

M. Nagel, A. Jansen, M. Türck and G. Bierbaum. “Influence of antibiotic stress on transposition and mutation frequency in *Staphylococcus aureus*“; DGHM, Dresden, 2008

M. Nagel, A. Jansen, M. Türck and G. Bierbaum. “Influence of the SOS response on the development of intermediate vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*“; Dechema, Frankfurt/ Main, 2008

M. Nagel, A. Jansen, M. Türck and G. Bierbaum. “Localisation of the IS-elements in a clinical *Staphylococcus aureus* strain with decreased sensitivity to vancomycin“; ProkaGenomics, Göttingen, 2007

M. Nagel, A. Jansen, M. Türck and G. Bierbaum. “Characterization of the role of IS256 in the development of intermediate vancomycin resistance in a clinical *Staphylococcus aureus* isolate“; DGHM, Göttingen, 2007

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gabriele Bierbaum für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Überlassung des interessanten Themas, die sehr gute Betreuung und ihre stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei meinem Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Sahl möchte ich mich bedanken für die bereitwillige Übernahme des Korreferats, seinem Interesse an meiner Arbeit, seine guten Ratschläge und aufbauenden Worte.

Bei Herrn Prof. Dr. Theo C. M. Bakker sowie Herrn Prof. Dr. Tom McCann möchte ich mich bedanken für ihre unmittelbare Bereitschaft an der Prüfungskommission teilzunehmen und ihr Interesse an diesem Thema.

Herrn Dr. Michael Türck danke ich für viele gute Ratschläge, die sehr fruchtbaren Diskussionen und seine unermüdliche Bereitschaft für mich als Vorleser bei diversen Tagungen zu fungieren.

Bei Frau Tina Reuter und Frau Jasmin Dischinger möchte ich mich für eine sehr schöne Zeit bedanken, die ich für immer in sehr guter Erinnerung behalten werde. Außerdem danke ich den beiden für das kritische Lesen meiner Arbeit.

Der ganzen AG Bierbaum/Sahl danke ich für die gute und nette Arbeitsatmosphäre und das kollegiale Verhalten.

Bei Herrn Dr. Jan Felix Drexler möchte ich mich ebenfalls für die vielen interdisziplinären Gespräche und Anregungen, den hervorragenden Kaffee und die Hilfe bei der Real-Time PCR bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Geschwistern für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich noch bei all denen bedanken, die mich in der letzten Zeit unterstützt haben, auf welche Art und Weise auch immer. Vielen Dank, ihr habt enorm zu dem Gelingen beigetragen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich für die Anfertigung der vorliegenden Dissertation nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe und dass die Stellen und Zitate, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, unter Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht sind.

Diese Dissertation ist weder identisch noch teilidentisch mit einer Arbeit, die an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn oder einer anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorgelegt wurde.

Bonn, im Juli 2011