

Die Rolle von Insertionselementen in der  
Evolution der Antibiotikaresistenz von  
*Staphylococcus aureus*

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl.-Pharm. / Apothekerin

**Franziska Kleinert, geb. Schreiber**

aus Erfurt

Bonn, Februar 2015



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) angefertigt.

Erstgutachterin:	Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Sahl
Fachnahes Mitglied:	Prof. Dr. rer. nat. Gabriele König
Fachangrenzendes Mitglied:	Prof. Dr. med. Anna-Maria Eis-Hübinger
Tag der Promotion:	08. Juli 2015
Erscheinungsjahr:	2015



**Inhalt**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	3
2.2 Die Sigma-Faktoren von <i>S. aureus</i> .....	5
2.3 Resistenzentwicklung von <i>S. aureus</i> .....	7
2.4 Derzeitige Behandlungsstrategien bei MRSA-Infektionen.....	11
2.5 Mobile genetische Elemente der Bakterien.....	15
2.6 Insertionssequenzen .....	16
2.6.1 IS256 .....	18
2.6.2 Einfluss von IS256 auf die Resistenzentwicklung von <i>S. aureus</i> .....	20
2.6.3 Regulation der Transposition von IS256.....	21
2.7 Ziel dieser Arbeit .....	22
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.1 Chemikalien, Lösungen und Antibiotika .....	24
3.2 Bakterienstämme, Plasmide und Wachstumsbedingungen.....	25
3.3 Sterilisation von Medien, Geräten und Bakterienkulturen.....	28
3.4 Wachstumskurven .....	28
3.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration .....	29
3.6 Molekulargenetische Methoden .....	30
3.6.1 Isolierung von genomischer DNA.....	30
3.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA .....	30
3.6.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren.....	31
3.6.4 Agarosegelelektrophorese .....	31
3.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
3.6.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Extraktion aus dem Agarosegel.....	31
3.6.7 Inverse PCR.....	32
3.6.8 Restriktion und Ligation von DNA .....	34
3.6.9 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	34
3.6.10 Transformation von chemokompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	34
3.6.11 Herstellung elektrokompenter <i>S. aureus</i> -Zellen.....	35

3.6.12	Transformation von elektrokompetenten <i>S. aureus</i> -Zellen.....	36
3.6.13	Phagentransduktion .....	36
3.6.14	Arbeiten mit RNA / Isolierung von Gesamt-RNA.....	37
3.6.15	DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA .....	38
3.6.16	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	39
3.6.17	5' RACE-PCR.....	40
3.7	Arbeiten mit Insertionssequenzen.....	42
3.7.1	Untersuchung der Selektion von weißen <i>S. aureus</i> -Kolonien.....	42
3.7.2	Testsystem pA6/pA3 .....	43
3.7.3	Gezielte Selektion von <i>rsbU</i> -negativen Insertionsmutanten von <i>S. aureus</i> .....	44
3.7.4	Lokalisierung von Insertionssequenzen im Genom .....	44
3.7.5	Bestimmung der Transpositionsfrequenz.....	45
3.8	Shotgun-Genom-Sequenzierung .....	46
3.8.1	Sequenzierungsstrategie .....	46
3.8.2	Identifizierung von Insertionsstellen verschiedener IS-Elemente.....	47
3.8.3	Genome Accession Number.....	47
3.9	Analytische Verfahren .....	48
3.9.1	MALDI-TOF MS .....	48
3.9.2	Transmissionselektronenmikroskopie.....	48
3.9.3	Statistische Tests .....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
4.1	Shotgun-Genom-Sequenzierung von drei <i>S. aureus</i> -Stämmen des Sequenztyps 247 .....	50
4.1.1	Insertionsstellen von IS256 .....	52
4.1.2	Insertionen weiterer IS-Elemente.....	61
4.2	<i>rsbU</i> – ein Hotspot für spontane Insertionen von IS256 in <i>S. aureus</i> .....	63
4.2.1	Selektion weißer Kolonien bei verschiedenen <i>S. aureus</i> -Stämmen.....	63
4.2.2	Untersuchung der Zellwanddicke einiger <i>S. aureus</i> -Stämme unter verschiedenen Bedingungen.....	72
4.3	Autoaktivierung der Transposition von IS256.....	75
4.3.1	Konstruktion von pA6.....	75
4.3.2	Selektion von <i>rsbU</i> ::IS256- <i>spc</i> Insertionsmutanten von <i>S. aureus</i> HG001 in Anwesenheit von pA6 .....	77
4.3.3	MALDI-TOF MS Analyse der IS256- <i>spc</i> Insertionsmutanten von <i>S. aureus</i> HG001 .....	79

4.3.4	Aktivierung der Transpositionsfrequenz von IS256- <i>ermB</i> in der <i>rsbU::IS256-spc</i> Insertionsmutante von <i>S. aureus</i> HG001 .....	80
4.4	Charakterisierung der Antisense-RNA von IS256.....	83
4.4.1	Untersuchungen zum Nachweis der Antisense-RNAs von IS256 mithilfe verschiedener Plasmide und RT-PCR .....	83
4.4.2	Nachweis und Charakterisierung des 5' Endes der Antisense-RNA von IS256 mittels 5' RACE-PCR.....	88
4.5	Charakterisierung einer <i>guaA::IS256-ermB</i> Insertionsmutante von <i>S. aureus</i> HG001 .....	93
4.5.1	Passagerversuche.....	93
4.5.2	Rekonstitution der <i>guaA::IS256-ermB</i> Insertion im Wildtyp – Hintergrund von <i>S. aureus</i> HG001 über Phagentransduktion.....	94
4.5.3	Charakterisierung von <i>S. aureus</i> HG001 <i>guaA::IS256-ermB</i> .....	95
4.6	Charakterisierung einer <i>hemY::IS256-spc</i> Insertionsmutante von <i>S. aureus</i> HG001 .....	99
4.6.1	Wachstumseigenschaften und Hämin-Auxotrophie.....	100
4.6.2	Untersuchung der Antibiotikaresistenz .....	101
4.6.3	Entstehung von Revertanten.....	102
4.7	Charakterisierung der Antisense-RNA von IS1181 .....	103
4.7.1	Fakten und erste Untersuchungen .....	103
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>106</b>
5.1	Einfluss von IS256 auf die Genomvariabilität und die Resistenzentwicklung des Norddeutschen Epidemietyps von <i>S. aureus</i> .....	106
5.2	Einfluss von IS256 auf die Bildung von SCVs mit erhöhtem Resistenzlevel in <i>S. aureus</i> .....	111
5.3	Regulation der Transposition von IS-Elementen .....	116
5.3.1	Rolle von SigB bei der Antibiotika-induzierten Autoaktivierung von IS256 in <i>S. aureus</i> .....	117
5.3.2	Regulation der Transposition von IS256 durch Antisense-RNAs .....	131
5.4	Ausblick .....	136
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>139</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>168</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>174</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Aq. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
CA-MRSA	ambulant erworbener MRSA (Community-acquired MRSA)
CHL	Chloramphenicol
DNase	Desoxyribonulease
DNS	Daptomycin-unempfindlicher <i>Staphylococcus aureus</i> (Daptomycin-nonsusceptible <i>S. aureus</i> )
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DR	Direct Repeat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Erythromycin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HA-MRSA	Hospital-assoziiertes MRSA
HGT	Horizontaler Gentransfer
IR <sub>L</sub>	Linkes Inverted Repeat
IR <sub>R</sub>	Rechtes Inverted Repeat
IS	Insertionssequenz
LA-MRSA	Livestock-assoziiertes MRSA
LNS	Linezolid-unempfindlicher <i>Staphylococcus aureus</i> (Linezolid-nonsusceptible <i>S. aureus</i> )
LZD	Linezolid
LZZ	Lebendzellzahl
MALDI-TOF MS	"Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry"
MGE	Mobile genetische Elemente
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
NCR	nicht-kodierende Region (non-coding region)
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
ppGpp	Guanosin-3',5'-bispyrophosphat, Guanosintetraphosphat
pppGpp	Guanosinpentaphosphat
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin

---

5' RACE-PCR	PCR zur schnellen Amplifizierung des 5' Endes der cDNA (rapid amplification of cDNA ends)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SCV	"Small Colony Variants"
SPT	Spectinomycin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TIG	Tigecyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSD	Verdoppelung der Targetsequenz (Target site duplication)
TSP	Transkriptionsstartpunkt
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
VISA	Vancomycin-intermediär-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
VRSA	Vancomycin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
VSSA	Vancomycin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
$\sigma^A$ , SigA	Sigma-Faktor A
$\sigma^B$ , SigB	Sigma-Faktor B

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

## 1 Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* nimmt beim Menschen eine ambivalente Rolle ein, da er einerseits als Kommensale die Haut und Schleimhäute der oberen Atemwege besiedelt und andererseits als pathogener Organismus eine Vielzahl lebensbedrohlicher Krankheiten auslösen kann. Heute stellen Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA)-Isolate aus nosokomial oder ambulant erworbenen Infektionen, aufgrund der schnellen Resistenzentwicklung gegenüber nahezu allen verfügbaren Antibiotikaklassen, in vielen Ländern eine große Problematik im Gesundheitssystem dar. Die schnelle Anpassungsfähigkeit von *S. aureus* an verschiedene Umweltbedingungen ist häufig auf eine erhöhte Genomvariabilität zurückzuführen, die durch genomische Rearrangements, Mutationen, horizontalen Gentransfer sowie die Aktivität mobiler genetischer Elemente vermittelt werden kann. Insertionssequenzen (IS-Elemente), wie IS256, IS1181 oder IS257, spielen hierbei eine wichtige Rolle, da sie sowohl durch intragenische Insertionen Gene inaktivieren können als auch durch intergenische Insertionen die Genexpression benachbarter Gene beeinflussen können. Aufgrund der hohen Transpositionsaktivität wurde IS256 in den letzten 30 Jahren in verschiedenen Gram-positiven Bakterien, inklusive *S. aureus*, mit Resistenzentwicklungen und Phasenvariationen in Verbindung gebracht.

In einem Teil dieser Arbeit wurde die Regulation des Transpositionsprozesses von IS256 näher untersucht. Dabei wurde in *S. aureus* erstmals das 3' Ende des Gens *rsbU*, das für den positiven Regulator des Sigma-Faktors SigB kodiert, als Hotspot für spontane IS256-Insertionen identifiziert. Die selektierten *rsbU::IS256* Insertionsmutanten wiesen neben einer weißen Koloniefarbe - als Konsequenz der inhibierten SigB-abhängigen Staphyloxanthin-Synthese - eine stark ausgeprägte Hämolyse auf Blutagar auf. Des Weiteren förderten subinhibitorische Konzentrationen einiger Antibiotika aus der Gruppe der Proteinbiosynthese-Inhibitoren (Chloramphenicol, Linezolid, Spectinomycin oder Erythromycin) unter bestimmten Bedingungen die Selektion von *rsbU::IS256* Insertionsmutanten in klinischen *S. aureus*-Isolaten, die zahlreiche IS256-Kopien im Genom enthielten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die *rsbU::IS256* Insertionsmutanten des Vancomycin-intermediär-resistenten *S. aureus* (VISA)-Stammes SA137/93G eine dünnere Zellwand aufwiesen als die *rsbU*-positiven Insertionsmutanten. Die dünnere Zellwand könnte möglicherweise den deutlichen Überlebensvorteil der *rsbU::IS256* Insertionsmutanten in Anwesenheit der genannten Antibiotika bewirkt haben. Vorangegangene Studien zeigten, dass die Aktivität von SigB die Transposition von IS256 in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen

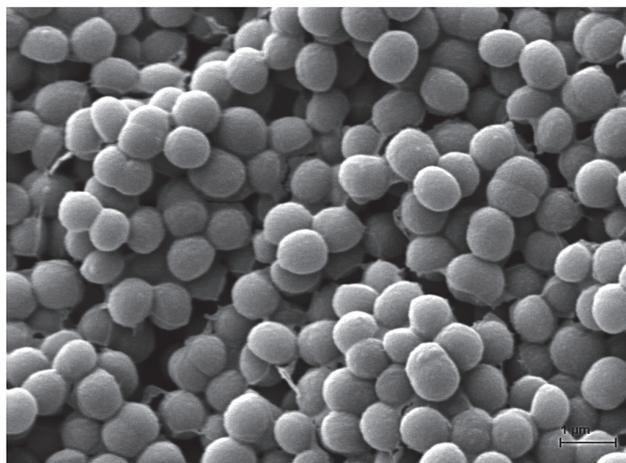
hemmte. Folglich wurde untersucht, ob die Inaktivierung von *rsbU* in den *rsbU::IS256* Insertionsmutanten zur Autoaktivierung der Transpositionsfrequenz von IS256 führte. Dies konnte schließlich mithilfe rekombinanter IS256-Elemente gezeigt werden. Die Inaktivierung von *rsbU* - durch eine spontane Insertion von IS256-*spc* - führte in *S. aureus* HG001 W5 (*rsbU::IS256-spc*) zu einer 4-fachen Erhöhung der Transpositionsfrequenz von IS256-*ermB*. Der intrinsische Regulationsmechanismus, über den SigB die Hemmung der Transpositionsfrequenz von IS256 kontrolliert, könnte auf die Bildung einer SigB-abhängigen Antisense-RNA zurückzuführen sein. Mittels 5' RACE-PCR wurden unter anderem in *S. aureus* SA137/93G die 5' Enden mehrerer *cis*-kodierter Antisense-RNAs von IS256 detektiert, die durch die Hybridisierung mit der mRNA der Transposase deren Translation hemmen könnten und somit die Transposition von IS256 auf einem niedrigen Level halten würden. Neben zwei SigA-abhängigen Antisense-RNAs wiesen die Untersuchungen auch auf die Bildung einer SigB-abhängigen Antisense-RNA von IS256 hin, die die Transposition von IS256 in Abhängigkeit verschiedener Umwelteinflüsse regulieren könnte. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen die Autoaktivierung von IS256 in *S. aureus* induzieren können.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass IS256 in der Lage ist, die Genomvariabilität von *S. aureus* zu erhöhen und dadurch dessen Resistenzentwicklung zu beeinflussen. Bei den Shotgun-Genom-Sequenzierungen dreier *S. aureus*-Stämme des Norddeutschen Epidemietyps (ST247) wurden mit 32 (SA1450/94 (MRSA)), 38 (SA137/93G (VISA)) und 44 IS256-Kopien (SA137/93A (VISA)) die bisher höchsten Kopienzahlen von IS256 im Genom klinischer MRSA-Isolate detektiert. Die Identifizierung von 67 verschiedenen IS256-Insertionsstellen in diesen drei Stämmen verdeutlichte die hohe Transpositionsaktivität von IS256 sowie dessen Einfluss auf die Genomvariabilität von *S. aureus*. Neben den bisher bekannten IS256-Insertionen in der Promotorregion von *yycF* (SA137/93A) und in *tcaA* (SA137/93G) könnten IS256-Insertionen in einem TagH-ähnlichen Transporter (SACOL1929) oder in SACOL1071, das für ein Chitinase-ähnliches Protein kodiert, sowie in der Promotorregion von *rot* im Zusammenspiel mit weiteren Hintergrundmutationen die Ausprägung des VISA-Phänotyps von *S. aureus* SA137/93A und SA137/93G beeinflusst haben. Des Weiteren verdeutlichten die Charakterisierungen der Small Colony Variants (SCVs) von *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* und *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* das Potenzial von IS256, die Genomflexibilität von *S. aureus* zu erhöhen und dadurch die Bildung phänotypischer Variationen mit erhöhter Resistenzprägung zu fördern. Die Revertierung der SCVs zum Wildtyp-Phänotyp konnte schließlich auf einen bisher nicht beschriebenen „cut-and-paste“-Transpositionsmechanismus von IS256 zurückgeführt werden.

## 2 Einleitung

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* ist ein Gram-positives Bakterium mit einem niedrigen GC-Gehalt, das 1884 von dem Chirurgen Friedrich Julius Rosenbach erstmals beschrieben wurde und zur Familie der *Staphylococcaceae* und der Ordnung der *Bacillales* innerhalb des Phylum der *Firmicutes* gehört. Der Gattungsname „*Staphylococcus*“ weist auf ein charakteristisches Wachstum hin, wobei die kugelförmigen Bakterienzellen (griechisch: *kokkos* – Kugel) mit einem Durchmesser von etwa 1 µm mikroskopisch sichtbare traubenförmige Ansammlungen (griechisch: *staphyle* – Traube) bilden (Abbildung 2.1), da die Zellteilung von Staphylokokken in drei Ebenen erfolgt (Tzagoloff und Novick, 1977). Der Speziesname „*aureus*“ (lateinisch: *aureus* – golden) weist auf die charakteristische goldgelbe Pigmentierung der Kolonien hin, die durch die Bildung des Triterpen-Carotinoids Staphyloxanthin verursacht wird (Marshall und Wilmoth, 1981). *S. aureus* ist ein nicht-sporenbildendes, unbewegliches, fakultativ anaerobes Bakterium, das die Fähigkeit besitzt in einem Temperaturbereich von 10 - 45°C, sowie in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen (bis zu 15% NaCl) zu wachsen. Die optimale Wachstumstemperatur von *S. aureus* liegt jedoch bei 30 - 37°C, was der Körpertemperatur des Menschen entspricht. *S. aureus* nimmt beim Menschen eine ambivalente Rolle ein, da er einerseits als Kommensale die Haut und Schleimhäute der oberen Atemwege besiedelt und andererseits als Pathogen eine Vielzahl von lebensbedrohlichen Krankheiten auslösen kann.



**Abbildung 2.1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. aureus* in 10.000-facher Vergrößerung. Der Maßstab entspricht 1 µm. Quelle: Diplomarbeit Franziska Schreiber (2010) / Universität Greifswald

Als Kommensale besiedelt *S. aureus* bei etwa 20% der gesunden Bevölkerung permanent und bei 30% zeitweilig die vordere Nasenhöhle (Gordon und Lowy, 2008). Es können jedoch auch andere Körperregionen, wie z.B. die Hände, die Achseln, die Leiste oder auch der Gastrointestinaltrakt besiedelt sein. Im Falle einer Schwächung des Immunsystems bekommt der Kolonisationskeim die Möglichkeit, sich auszubreiten. Zahlreiche Studien zeigten, dass die Kolonisation mit *S. aureus* das Risiko einer folgenden Infektion deutlich steigert und auch die Übertragung von *S. aureus* innerhalb der Bevölkerung ermöglicht (Kluytmans et al., 1997; Wertheim et al., 2005). Aufgrund der hohen Umweltresistenz gegenüber Austrocknung, Hitze und verschiedenen Desinfektionsmitteln, kann *S. aureus* für eine beträchtliche Zeit außerhalb des Wirtsorganismus, wie z.B. auf kontaminierten Oberflächen oder Gegenständen, überleben und kann somit leicht durch Schmierinfektion übertragen werden. Als Humanpathogen kann *S. aureus* unter anderem Haut-, Weichgewebe- und Wundinfektionen (Furunculosis, Impetigo contagiosa), invasive Entzündungen (Otitis, Sinusitis, Osteomyelitis) sowie lebensbedrohliche Erkrankungen wie Pneumonie, Endokarditis, Meningitis, Sepsis und Toxin-vermittelte Staphylokokken-Infektionen auslösen. Zu den Toxin-vermittelten Staphylokokken-Infektionen gehören das „Scalded Skin Syndrom“ (SSS), das Toxische Schock Syndrom (TSS) sowie die hochakute Gastroenteritis. Das SSS wird durch die epidermolysierenden Exfoliativtoxine A und B ausgelöst und führt zur lebensbedrohlichen toxischen epidermalen Nekrolyse, die mit großblasigen Hautablösungen und einer subepidermalen Spaltbildung einhergeht. Bei Erwachsenen liegt die Mortalitätsrate dieser Erkrankung bei 40-63% (Mockenhaupt et al., 2005). Das Toxische Schock Syndrom (TSS) wird durch Superantigene wie das Toxische-Schock-Syndrom-Toxin-1 ausgelöst, das durch die Hyperaktivierung der T-Lymphozyten eine massive, unkontrollierte Zytokinausschüttung (IL-1 und TNF- $\alpha$ ) induziert und somit zur lebensbedrohlichen Sepsis bis hin zu Multiorganversagen führen kann. Die hochakute Gastroenteritis, die mit einer Nahrungsmittelvergiftung einhergeht, wird durch die hitzestabilen Enterotoxine A, B, C1-3, D, E, G, H oder TSST-1 ausgelöst. Die Vielfalt der Krankheitsbilder von *S. aureus* wird durch zahlreiche Pathogenitätsfaktoren verursacht. Die Adhärenz von *S. aureus* an die Wirtszelle wird durch zahlreiche Zellwand-verankerte Oberflächenproteine, die sogenannten „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMs), ermöglicht. Dazu gehören die Clumpingfaktoren A und B (Fibrinogen-Rezeptoren, ClfA und ClfB), die Sdr-Proteine SdrC, D, E mit den charakteristischen Serin-Aspartat-Repeats (u. a. Bindung an Epithelzellen (Corrigan et al., 2009)), Fibronectin-Bindeproteine A und B (FnBPA, FnBPB) sowie Kollagen-bindende Proteine (CNA) (Foster et al., 2014). Die anschließende Invasion von *S. aureus* wird durch zahlreiche extrazelluläre Proteine wie Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Hyaluronidasen und

Phospholipase C begünstigt. Außerdem führt die Sekretion von Hämolytinen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) zur Lyse der Erythrozyten, während Leukozidine, wie das Pantan-Valentine-Leukozidin (PVL), die Zerstörung der Leukozyten hervorrufen. Weiterhin verfügt *S. aureus* über zahlreiche Pathogenitätsfaktoren, die den Schutz vor dem Immunsystem des Wirts ermöglichen und die Oponierung durch Phagozyten verhindern. Die Koagulase bindet Prothrombin und bildet das sogenannte Staphylothrombin, das Fibrinogen zu Fibrin konvertieren kann. Das gebildete Fibrinnetz kann dann zu einem späteren Zeitpunkt durch die Bildung der Staphylokinase aufgelöst werden, um die Invasion von *S. aureus* zu ermöglichen. Außerdem schützen Protein A, das den Fc-Teil der Immunglobuline bindet, sowie die Bildung einer Mikrokapsel (Typ 5 oder 8) vor Phagozytose. Die Expression der Virulenzfaktoren wird in *S. aureus* durch zahlreiche Regulatoren, wie kleine, nicht-kodierende RNAs (Felden et al., 2011), alternative Sigma-Faktoren, sowie *trans*-agierende Transkriptionsregulatoren koordiniert (Junecko, 2012). Zu den letzteren Regulatoren gehören zum Beispiel die Zwei-Komponentensysteme AgrAC (Peng et al., 1988), SaeRS (Novick und Jiang, 2003), ArlRS (Fournier und Hooper, 2000) und SrrAB (Yarwood et al., 2001), sowie einige Transkriptionsregulatoren, die nicht mit Zwei-Komponenten-Systemen assoziiert sind, wie Sar (Cheung et al., 1992), Rot (Said-Salim et al., 2003), CodY (Majerczyk et al., 2008), MgrA (Luong et al., 2003) oder Transkriptionsregulatoren der AraC/XylS-Familie (Lim et al., 2004; Lei et al., 2011).

## 2.2 Die Sigma-Faktoren von *S. aureus*

Sigma-Faktoren sind Proteine, die reversibel an die RNA-Polymerase binden. Als Untereinheit des gebildeten RNA-Polymerase-Holoenzym ist der Sigma-Faktor für die Bindung des katalytischen Zentrums an spezifische Promotorregionen verantwortlich, was schließlich den Transkriptionsstart stromabwärts lokalisierter Gene initiiert (Borukhov und Severinov, 2002). Sigma-Faktoren ermöglichen somit die simultane Transkription einer Vielzahl unterschiedlicher Gene, die die entsprechenden Erkennungssequenzen der -10- und -35- Promotorregion aufweisen. Die Mehrheit der bisher bekannten Sigma-Faktoren gehört zur Familie der  $\sigma^{70}$ -Faktoren. In *S. aureus* wurden bis heute vier Sigma-Faktoren identifiziert. Neben dem Haupt-Sigma-Faktor  $\sigma^A$  (auch  $\sigma^{70}$ ), der die konstitutive Expression zahlreicher „Housekeeping“-Gene kontrolliert (Deora und Misra, 1996), wurden die drei alternativen Sigma-Faktoren SigB ( $\sigma^B$ ) (Wu et al., 1996; Kullik und Giachino, 1997), SigH ( $\sigma^H$ ) (Morikawa et al., 2003) und SigS ( $\sigma^S$ ) (Shaw et al., 2008) identifiziert. Alternative Sigma-Faktoren spielen eine wichtige Rolle beim Überlebenskampf unter extremen Umweltbedingungen, da sie die Expression der Gene koordinieren, die eine Stressantwort

ermöglichen. Der Sigma-Faktor SigH reguliert in *S. aureus* die Expression von Kompetenzgenen sowie die Integration und Exzision von Prophagen (Tao et al., 2010; Morikawa et al., 2012), während SigS eine extrazytoplasmatische Funktion (ECF-Familie) aufweist und *S. aureus* sowohl vor intrazellulärem Stress (Nährstoffmangel, DNA- oder Zellwand-zerstörenden Antibiotika) als auch vor extrazytoplasmatischem Stress (Phagozytose) schützt (Shaw et al., 2008; Miller et al., 2012). Der alternative Sigma-Faktor SigB von *S. aureus* beeinflusst die Expression einer Vielzahl von Genen, die sowohl für Virulenzfaktoren als auch regulatorische Elemente kodieren (Kullik et al., 1998; Gertz et al., 2000; Bischoff et al., 2004; Karlsson-Kanth et al., 2006; Pané-Farré et al., 2006). Auch die Staphyloxanthin-Synthese wird in *S. aureus* durch einen SigB-abhängigen Promotor vor dem *crtOPQMN*-Operon kontrolliert (Marshall und Wilmoth, 1981; Pelz et al., 2005). Außerdem reguliert SigB die allgemeine Stressantwort (Kullik und Giachino, 1997; Chan et al., 1998; Gertz et al., 1999; Horsburgh et al., 2002). Darüber hinaus spielt SigB bei *S. aureus* eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung (Rachid et al., 2000; Houston et al., 2011), bei der Internalisierung in humane Zellen (Nair et al., 2003; Olivier et al., 2009; Pfortner et al., 2014), bei der Bildung von Persister-Zellen (Moisan et al., 2006; Mitchell et al., 2013), sowie bei der Ausprägung der Methicillin- und Glykopeptid-Resistenz (Bischoff und Berger-Bächli, 2001; Singh et al., 2003; Schulthess et al., 2009). Obwohl SigB die Expression zahlreicher Virulenzfaktoren reguliert, konnten bisher nur wenige Studien den Effekt von SigB auf die Pathogenität von *S. aureus* im Mausmodell zeigen (Jonsson et al., 2004; Depke et al., 2012). Die genetische Organisation des *sigB*-Operon von *S. aureus* ähnelt dem hinteren Teil des homologen *sigB*-Operons in *Bacillus subtilis* (Hecker und Völker, 2001). Es besteht aus *mazEF* (SACOL2059-SACOL2058)-*rsbU-rsbV-rsbW-sigB* (Kullik et al., 1998; Senn et al., 2005; Fu et al., 2007) und wird von drei verschiedenen Promotoren transkribiert (Senn et al., 2005, Abbildung 2.2A,C). Der SigA-abhängige Promotor  $P_{mazE}$  ist vor dem Toxin-Antitoxin-Modul *mazEF* lokalisiert, ist essentiell für die vollständige SigB-Aktivität und wird in einem negativen Feedback-Mechanismus durch SigB reprimiert. Während  $P_{mazE}$  und  $P_B$  (SigB-abhängig) für eine schnelle Stressantwort bei Umwelteinflüssen wie Hitze, Salz oder Antibiotika-Stress sorgen, ist die Expression des 2,6 kb Transkripts *rsbU-rsbV-rsbW-sigB* von  $P_A$  (SigA-abhängig) eher schwach (Senn et al., 2005; Donegan und Cheung, 2009). Die posttranslationale Regulation der SigB-Aktivität unterliegt zahlreichen Protein-Protein-Interaktionen (Abbildung 2.2B). Eine zentrale Rolle spielt dabei die Proteinkinase RsbW, die sowohl SigB als auch dephosphoryliertes RsbV binden kann („partner switching“ (Alper et al., 1994)). Die aktive Proteinkinase RsbW dient als Anti- $\sigma$ -Faktor, da sie ihren Antagonisten und Bindungspartner, den Anti-anti- $\sigma$ -Faktor RsbV, durch Phosphorylierung inaktiviert und

somit die Bildung des RsbW-SigB Komplexes ermöglicht (Benson und Haldenwang, 1993; Miyazaki et al., 1999). Solange RsbV in phosphorylierter Form vorliegt, wird SigB durch RsbW gebunden und dadurch inaktiviert. In Folge von Umweltstress wird in *S. aureus* der positive SigB-Regulator RsbU auf bisher unbekannte Weise aktiviert (Giachino et al., 2001; Palma und Cheung, 2001). Die Phosphatase-Aktivität von RsbU sorgt für die Dephosphorylierung von RsbV (Yang et al., 1996). Dephosphoryliertes RsbV bindet nun an RsbW, was zur Freisetzung von SigB führt. Die Bildung des RNA-Polymerase-Holoenzymkomplexes aktiviert schließlich die Transkription zahlreicher Gene, die den entsprechenden SigB-abhängigen Promotor aufweisen (Alper et al., 1996, Abbildung 2.2C).

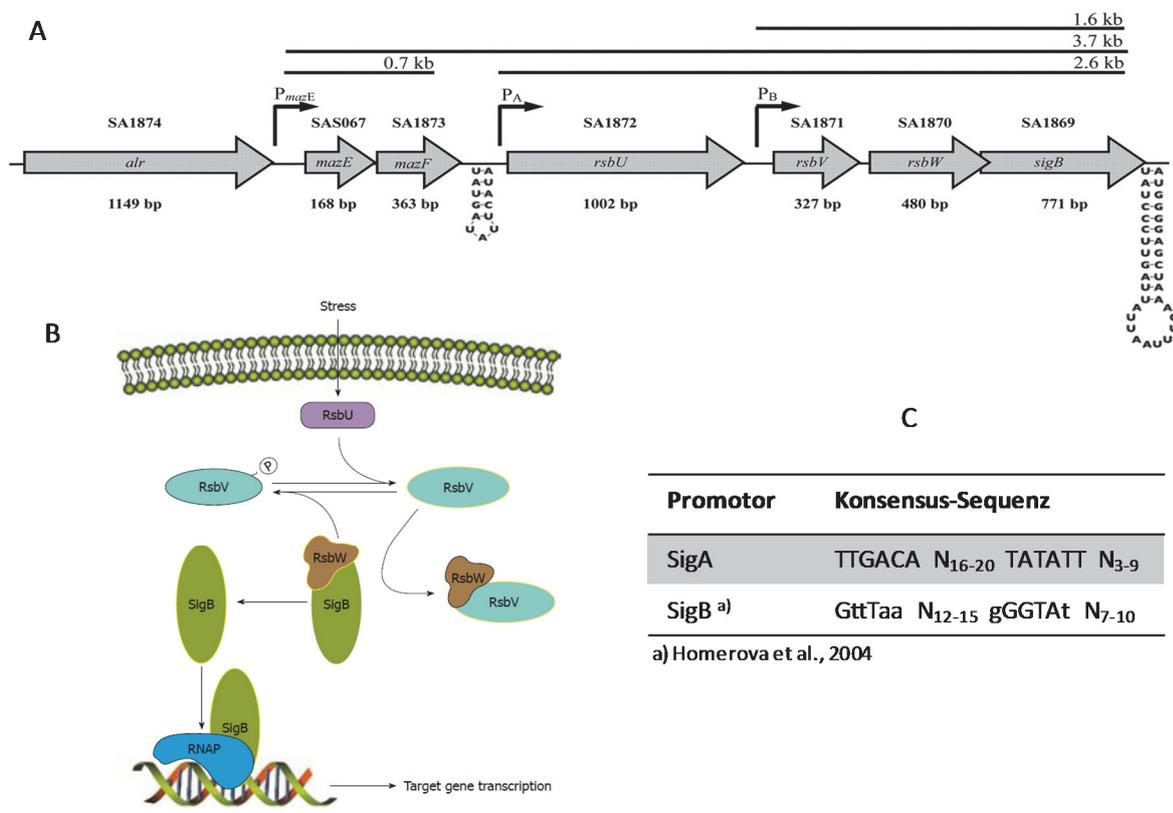


Abbildung 2.2: A) Genetische Organisation des *sigB*-Operons in *S. aureus* (modifiziert nach Donegan und Cheung, 2009). B) Posttranslationale Regulation der SigB-Aktivität (Quelle: Junecko et al., 2012). C) Konsensus-Sequenzen von SigA- bzw. SigB-abhängigen Promotoren inklusive -35-Region, Spacer und -10-Region.

### 2.3 Resistenzentwicklung von *S. aureus*

*S. aureus* gehört weltweit zu den häufigsten und gefährlichsten Erregern ambulant-erworbener und nosokomialer Infektionen, da er in der Lage ist schnell Resistenzen gegenüber zahlreichen Antibiotika zu akkumulieren. Die Studien von Lindsay und Holden (2004) zeigten, dass ~75% des Genom von *S. aureus* zum Kerngenom gehören, während die

restlichen ~25% das variable akzessorische Genom bilden. Das akzessorische Genom besteht hauptsächlich aus mobilen genetischen Elementen, wie Bakteriophagen, Pathogenitätsinseln, Plasmiden, Transposons, chromosomalen Kassetten und genomischen Inseln, die Virulenz- oder Resistenzgene tragen und diese über horizontalen Gentransfer (HGT) auf andere Stämme übertragen können. Die ersten resistenten *S. aureus* Stämme wurden in den 1940er Jahren, kurz nach der Einführung des Penicillins, beschrieben und beruhten auf der Bildung einer  $\beta$ -Laktamase (Kirby, 1944). Daraufhin erfolgte Ende der 1950er Jahre die Einführung der  $\beta$ -Laktamase-stabilen Penicilline, wie Methicillin und Oxacillin. Nach kurzer Zeit wurden in Großbritannien die ersten Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolate (MRSA) beschrieben (Jevons, 1961). Durch HGT wurde ein mobiles Element, die sogenannte SCCmec (staphylococcal cassette chromosome mec), von *Staphylococcus fleurettii* auf *S. aureus* übertragen (Tsubakishita et al., 2010). Die Integration der SCCmec am 3' Ende von *orfX* erfolgte mittels Rekombinasen (CcrA, CcrB oder CcrC - cassette chromosome recombinase). Die Expression von *mecA* führte zur Ausprägung der Methicillin-Resistenz in *S. aureus*, da es für das zusätzliche Penicillin-Bindeprotein 2a (PBP2a) kodiert, das eine geringere Affinität zu allen  $\beta$ -Laktamantibiotika aufweist. PBP2a führt somit die Quervernetzung des Peptidoglykans der bakteriellen Zellwand fort, während die ursprünglichen Penicillin-Bindeproteine durch  $\beta$ -Laktamantibiotika inhibiert werden. Der Anteil von MRSA an *S. aureus* - Infektionen in Krankenhäusern stieg laut EARS-Net in Deutschland zwischen 1999 und 2006 von ~8% auf ~20%, ist seitdem leicht rückläufig und erreichte im Jahr 2011 eine Rate von 16,1% (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC, 2012). Im Jahr 2008 traten in der EU, in Island und Norwegen 171.200 nosokomiale MRSA-Infektionen auf (Köck et al., 2014). Seit Ende der 1990er Jahre nahmen neben Hospital-assoziierten MRSA (HA-MRSA) weltweit die Zahlen der Community-assoziierten MRSA (CA-MRSA) zu, die aufgrund erhöhter Virulenz sehr aggressive, lebensbedrohliche Infektionen bei jungen bzw. immunkompetenten Menschen verursachen können. Die erhöhte Virulenz ist häufig auf die Bildung des PVL-Toxins, das durch die Gene *lukS* und *lukF* kodiert wird, zurückzuführen (Vandenesch et al., 2003). In einigen PVL-negativen CA-MRSA sind jedoch auch das  $\alpha$ -Toxin, das Phenol-soluble Modulin- $\alpha$  (PSM $\alpha$ ) oder AgrC in Lage die Virulenz zu beeinflussen (Li et al., 2010; DeLeo et al., 2011). Außerdem weisen CA-MRSA die kleineren SCCmec-Kassetten IV und V auf, die zu einer gesteigerten Fitness und Wachstumsrate von CA-MRSA im Vergleich zu HA-MRSA mit größeren SCCmec-Kassetten (I-III) beitragen (Okuma et al., 2002). Weltweit werden CA-MRSA fünf verschiedenen genetischen Linien zugeordnet: ST1-IV (USA400), ST8-IV (USA300), ST30-IV (Südwestpazifischer Klon), ST59 (USA1000, Taiwan Klon) und ST80-IV

(Europäischer Klon). ST8-IV und ST30-IV wurden bisher auf allen Kontinenten detektiert und werden demzufolge als pandemische Klone bezeichnet (DeLeo et al., 2010). Da MRSA-Stämme in der Lage sind weitere Resistenzen zu akkumulieren und Multiresistenzen gegen nahezu alle verfügbaren Antibiotika auszubilden, stellt die Behandlung von MRSA-Infektionen eine weitreichende Problematik im heutigen Gesundheitssystem dar. Da Vancomycin in den letzten Jahrzehnten als Reserveantibiotikum bei der Behandlung von MRSA-Infektionen sehr stark zum Einsatz kam, wurden bereits im Jahr 1997 in Japan die ersten Stämme mit geringerer Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin isoliert (Hiramatsu et al., 1997a; Hiramatsu et al., 1997b). Dazu gehörte beispielsweise der Vancomycin-intermediär resistente *S. aureus* (VISA) Mu50, der von einer chirurgischen Wunde eines Säuglings isoliert wurde und eine Vancomycin-MHK von 8 µg/ml aufwies (Hiramatsu et al., 1997b). In den Folgejahren verbreiteten sich VISA und heterogene VISA (hVISA) weltweit. In Deutschland traten die ersten VISA bereits Anfang der 1990er Jahre auf, wurden jedoch zu dieser Zeit aufgrund der problematischen Auswertung des Vancomycin-Hemmhofes übersehen. *S. aureus* SA137/93A wurde 1993 aus dem Trachealsekret eines Patienten isoliert. Dieser Stamm wurde 1998 bei einem Screening von 457 klinischen MRSA-Isolaten der Stammkollektion des Staphylokokken-Referenzzentrums in Bonn als hVISA mit einer Vancomycin-MHK von 8 µg/ml (E-Test) identifiziert und bei der Typisierung dem Norddeutschen Epidemietyp zugeordnet (Bierbaum et al., 1999; Reipert et al., 2003). Im Jahr 2002 wurde in Michigan (USA) der erste Vancomycin resistente *S. aureus* (VRSA) mit einer Vancomycin-MHK > 256 µg/ml isoliert. Die Vancomycin-Resistenz wurde durch die Akquisition des Transposons Tn1546 aus Enterokokken vermittelt, das das *vanA*-Operon trug (Centers for Disease and Prevention, 2002). Der *vanA*-abhängige Resistenzmechanismus beruht auf der Modifikation der Zielstruktur von Vancomycin, dem Zellwandvorläufer Lipid II. Der Austausch von D-Ala-D-Ala zu D-Ala-D-Lac führt dabei zu einer stark verringerten Affinität gegenüber Vancomycin (Perichon und Courvalin, 2009). Der *vanA*-unabhängige Resistenzmechanismus des VISA-Phänotyps ist hingegen multifaktoriell und beruht auf der Akkumulation zahlreicher Mutationen in unterschiedlichen Genen. Der VISA-Phänotyp ist u.a. charakterisiert durch eine Verdickung der Zellwand aufgrund einer beschleunigten Peptidoglykan-Synthese und einer gehemmten Autolyseaktivität (Cui et al., 2000; Boyle-Vavra et al., 2003; Reipert et al., 2003), sowie durch eine verringerte Quervernetzung des Peptidoglykans aufgrund einer verringerten PBP4-Aktivität (Sieradzki et al., 1999; Reipert et al., 2003). Außerdem ermöglicht die verdickte Zellwand mit dem erhöhten Anteil an freien D-Ala-D-Ala-Resten die Bindung von Vancomycin in den äußeren Schichten des Peptidoglykans, was die Penetration weiterer Vancomycin-Moleküle zum eigentlichen Target

Lipid II verhindert („Clogging-Effekt“ (Cui et al., 2000; Hiramatsu, 2001)). Nach der Norm des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) gelten seit 2006 *S. aureus*-Isolate mit Vancomycin-MHKs  $\leq 2\mu\text{g/ml}$  als Vancomycin sensible *S. aureus* (VSSA), während VISA durch MHKs von 4-8  $\mu\text{g/ml}$  und VRSA durch MHKs  $\geq 16\mu\text{g/ml}$  charakterisiert werden (Tenover und Moellering, 2007). Die Entwicklung der Antibiotikaresistenzen ist alarmierend, da global gesehen die Resistenzraten (inkl. neuer Resistenzmechanismen und Multiresistenzen) vieler bakterieller Spezies stetig steigen und nur eine geringe Anzahl neuer Antibiotika mit neuen Wirkmechanismen auf den Markt kommt (Boucher et al., 2009; Carlet et al., 2012). In Europa sterben jährlich 25000 Menschen an Infektionen, die durch Antibiotika-resistente Bakterien ausgelöst wurden (ECDC/EMA, 2009).

Als Ursachen für die steigende Resistenzentwicklung zahlreicher Mikroorganismen werden häufig übermäßige und unangemessene Antibiotika-Behandlungen mit Konzentrationen im Bereich der MHK diskutiert (Carlet et al., 2012). Das Potenzial subletaler bzw. subinhibitorischer Antibiotika-Konzentrationen, die in vielen Bereichen der Umwelt, wie in Flüssen und Seen, im Abwasser und im Trinkwasser, sowie im menschlichen und tierischen Körper (während der Antibiotika-Therapie) vorkommen, wird dabei jedoch stark unterschätzt (Andersson und Hughes, 2014). Auch in vielen Kompartimenten des Körpers treten, trotz des Einsatzes der höchst möglichen nicht-toxischen Antibiotika-Konzentrationen bei der Therapie, immer wieder subinhibitorische Konzentrationen auf. Die Gründe dafür sind mannigfaltig und können einerseits durch schlechte pharmakokinetische Eigenschaften des Antibiotikums zustande kommen, die zu einer schlechten Verteilung und Penetration in bestimmte Gewebe führen können. Andererseits spielen die Wahl des ungeeigneten Antibiotikums (aufgrund fehlender Antibiogramme), fehlerhafte Dosierungen und eine geringe Patientenaufklärung und Patient compliance eine wichtige Rolle bei der Entstehung subinhibitorischer Konzentrationen im menschlichen Körper. Außerdem werden in Abhängigkeit von der jeweiligen Antibiotikaklasse 30 – 90% des verabreichten Antibiotikums unverstoffwechselt über den Urin oder die Fäzes wieder an die Umwelt abgegeben (Liu et al., 1999; Huang et al., 2005).

Zahlreiche Studien zeigen, dass durch subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen sowohl die Selektion bereits vorhandener resistenter Bakterien (D'Costa et al., 2011; Gullberg et al., 2011; Trearichi et al., 2012), als auch die Neuentstehung resistenter Stämme (Lorian, 1975; Kohanski et al., 2010; Gullberg et al., 2011) gefördert werden. Das Potenzial subinhibitorischer Antibiotika-Konzentrationen, Resistenzen zu fördern, liegt darin begründet, dass der Mutationsspielraum bei subinhibitorischen Konzentrationen wesentlich größer ist, als bei letalen Konzentrationen, da die Bakterien nur im Wachstum gehemmt und nicht abgetötet

werden. Subletale Konzentrationen fördern somit die genotypische und phänotypische Variabilität der Bakterien, beispielsweise durch die Induktion der SOS-Antwort, die sowohl den horizontalen Gentransfer, als auch Rekombinationsereignisse und die Mutagenese fördern (Andersson und Hughes, 2014). Die Selektion der resistenten Stämme beruht letztendlich auf ihrer verbesserten Wachstumsrate im Vergleich zum empfindlichen Wildtyp, da die Mutationen häufig nur mit sehr geringen Fittesseinbußen („low-cost resistance“) verbunden sind (Andersson und Levin, 1999; Andersson und Hughes, 2010). Außerdem induzieren subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen die Entstehung von persistierenden Zellen, sogenannten „Small Colony Variants“ (SCVs), die häufig Resistenzen gegenüber zahlreichen Antibiotika aufweisen (Johnson und Levin, 2013). Persister-Zellen von *S. aureus* werden aufgrund eines langsamen Wachstums (inhibierte metabolische Aktivität), aufgrund einer geringeren Virulenz und häufig aufgrund einer erhöhten Biofilmbildung nicht vom Immunsystem des Wirts erkannt. Zu einem späteren Zeitpunkt können SCVs zu virulenten Wildtyp-Zellen revertieren und eine Infektion auslösen (Kahl, 2014). Subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen dienen außerdem als Signalmoleküle, die physiologische Prozesse wie die Adhärenz (Blickwede et al., 2005), die Biofilmbildung (Li et al., 2005) und die Virulenz (Doss et al., 1993; Goerke et al., 2006; Kuroda et al., 2007; Otto et al., 2013) von *S. aureus* beeinflussen können.

#### **2.4 Derzeitige Behandlungsstrategien bei MRSA-Infektionen**

Aufgrund der sich verändernden Epidemiologie der MRSA-Infektionen, der steigenden Resistenzproblematik und der zunehmenden Häufigkeit komplizierter CA-MRSA- und LA-MRSA-Infektionen („Lifestock-associated MRSA“) neben HA-MRSA-Infektionen weltweit (Fluit, 2012; Mediavilla et al., 2012), zählen MRSA - trotz der Markteinführung einiger neuer Antiinfektiva in den letzten zehn Jahren - weiterhin zu den schwer behandelbaren ESKAPE-Pathogenen (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* Spezies) (Boucher et al., 2009). Zur Behandlung von MRSA-Infektionen stehen zahlreiche Antibiotika zur Verfügung. Zu den eher älteren Antiinfektiva zählen Clindamycin, Cotrimoxazol (Trimethoprim + Sulfamethoxazol), Doxycyclin und Minocyclin. Außerdem stehen Rifampicin, Fosfomycin und Fusidinsäure als Kombinationspartner zur Verfügung, werden jedoch aufgrund schneller Resistenzentwicklungen nicht zur Monotherapie eingesetzt. Der Gebrauch der genannten Antibiotika in der klinischen Praxis ist jedoch limitiert. Die Gründe dafür sind die induzierbare Resistenz gegenüber Clindamycin, die Photosensibilisierung durch Tetracycline

sowie häufig auftretende Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Cotrimoxazol. Zur effektiven Therapie von MRSA-Infektionen stehen derzeit zehn Antibiotika zur Verfügung: Vancomycin, Teicoplanin, Telavancin, Oritavancin, Daptomycin, Linezolid, Tigecyclin, Ceftarolin, Ceftobiprol, Quinupristin/Dalfopristin. Der „Goldstandard“ bei schweren MRSA-Infektionen ist nach wie vor die parenterale Therapie mit Glykopeptiden (**Vancomycin** oder alternativ Teicoplanin), die je nach Antibiogramm und Lokalisation des Infektherdes mit Rifampicin, Clindamycin, Gentamicin, Fosfomycin oder Fusidinsäure kombiniert werden können. Vancomycin wurde 1956 erstmals aus *Amycolatopsis orientalis* isoliert und wurde 1958 von der US Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Vancomycin hemmt die Zellwandbiosynthese Gram-positiver Bakterien durch Bindung der D-Ala-D-Ala-Untereinheit des Undecaprenylphosphat-GlcNAc-MurNAc-Pentapeptides Lipid II, was die Transglykosylierung und die Transpeptidierung inhibiert. Aufgrund der graduellen Steigerung der Vancomycin-MHKs klinischer MSSA- und MRSA-Isolate in den letzten Jahren (Aguado et al., 2011; Holmes et al., 2011; van Hal et al., 2012), nahmen auch die Behandlungsmisserfolge bei MHKs < 2 µg/ml zu. Da bei Langzeit-Therapien mit hohen Vancomycin-Dosen die Gefahr der Nephrotoxizität besteht (Wong-Beringer et al., 2011), empfiehlt es sich bei Vancomycin-MHKs > 1 µg/ml alternative Therapien heranzuziehen (Gould et al., 2012). **Teicoplanin** ist ein Lipoglykopeptid, das in den 1970er Jahren aus *Actinoplanes teichomyceticus* isoliert wurde und weist einen dem Vancomycin ähnlichen Wirkungsmechanismus sowie ein vergleichbares Wirkspektrum auf. Teicoplanin wurde in Europa, jedoch nie in den USA, als Arzneimittel zugelassen. Teicoplanin-Resistenzen traten bereits Anfang der 1990er Jahre auf (Kaatz et al., 1990) und wurden mit der Inaktivierung des Membranproteins TcaA (Brandenberger et al., 2000) und einer erhöhten Expression von PBP2 assoziiert (Shlaes et al., 1993; Moreira et al., 1997). In *S. aureus* ist eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Teicoplanin nicht zwingend gekoppelt an eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin (Brunet et al., 1990). Auf der anderen Seite weisen jedoch alle VISA-Stämme eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Teicoplanin auf (Liu und Chambers, 2003). Die drei neueren halbsynthetischen Glykopeptide **Dalbavancin**, **Telavancin** und **Oritavancin** weisen im Vergleich zu Vancomycin zusätzliche Wirkungsmechanismen auf (Higgins et al., 2005; Malabarba und Goldstein, 2005; Zhanel et al., 2012). Während alle drei Lipoglykopeptide *in vitro* gute Wirksamkeiten gegenüber MRSA, hVISA und VISA zeigen, weist Oritavancin zusätzlich Aktivität gegenüber VRSA und *mecC*-MRSA auf (Zhanel et al., 2010; Arhin et al., 2014). Telavancin wurde 2011 in der EU als Reserveantibiotikum zur Behandlung der im Krankenhaus erworbenen, durch MRSA verursachten Pneumonie zugelassen, wenn alternative Antibiotika-Therapien versagten.

Sowohl Dalbavancin als auch Oritavancin erhielten 2014 die Zulassung der FDA zur Behandlung akuter bakterieller Hautinfektionen, die durch Gram-positive Bakterien, wie MRSA, verursacht werden. Auch in Europa ist die Zulassung für Dalbavancin und Oritavancin zur Behandlung komplizierter Hautinfektionen bereits beantragt (Stand: November 2014). **Daptomycin** (Cubicin®) ist ein zyklisches Lipopeptid-Antibiotikum mit Aktivität gegenüber Gram-positiven Organismen, einschließlich MRSA und Vancomycin-resistenten Enterokokken (Schriever et al., 2005). Der Wirkungsmechanismus von Daptomycin ist bislang nicht vollständig aufgeklärt worden. Bekannt ist, dass Daptomycin in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen das Membranpotenzial und die Membranpermeabilität der bakteriellen Zellmembran verändert und auf diese Weise den Zelltod herbeiführt (Silverman et al., 2003). In der EU wurde Daptomycin erstmals im Januar 2006 zugelassen. Mittlerweile wird es zur Behandlung von schweren Haut- und Weichteilinfektionen, Endokarditis und Bakteriämien eingesetzt. Trotz sehr guter Verträglichkeit und seltener Therapiemisserfolge nach Daptomycin-Behandlung, traten in den letzten Jahren Daptomycin-Resistenzen bei *S. aureus* (DNS – Daptomycin-nonsusceptible *S. aureus*) auf. Verringerte Daptomycin-Empfindlichkeit in *S. aureus* ist multifaktoriell und geht häufig mit Veränderungen der Zellmembran und der Zellwand einher (Fischer et al., 2011; Bayer et al., 2013). Diesbezüglich wurden Mutationen in Proteinen der Phospholipidsynthese (MprF, Cls2, PgsA), des Zwei-Komponenten-Regulationssystems WalKR oder der RNA-Polymerase RpoB und RpoC detektiert (Peleg et al., 2012). **Linezolid** (Zyvoxid®) ist das erste Antibiotikum aus der Gruppe der Oxazolidinone und hemmt die Proteinbiosynthese durch die spezifische Bindung an die 23S-rRNA der 50S-Untereinheit bakterieller Ribosomen, sodass die Bildung des 70S-Initiationskomplexes (50S-rRNA, 30S-rRNA, Methionyl-tRNA) verhindert wird. Linezolid wurde 2001 in Deutschland zur Behandlung ambulant- oder im Krankenhaus erworbener Pneumonien sowie zur Behandlung komplizierter Haut- und Weichgewebeeinfektionen zugelassen. Es kann sowohl peroral als auch parenteral verabreicht werden und weist eine Bioverfügbarkeit von 100% auf. In zahlreichen Studien wurde der Zusatznutzen von Linezolid gegenüber Vancomycin jedoch kontrovers diskutiert (Liu et al., 2011; Wunderink et al., 2012). Bereits kurz nach der Markteinführung wurden erste Resistenzen von *S. aureus* gegenüber Linezolid detektiert (Tsiodras et al., 2001). Am häufigsten wurden Mutationen in einem oder mehreren Allelen des 23S-rRNA Gens *rrn* (G2576T, G2447T, T2500A) mit Linezolid-Resistenz assoziiert. Die schrittweise Akkumulation von Mutationen in diesen Genen (5-6 Kopien in *S. aureus*) führte zu Konformationsänderungen der ribosomalen 23S-rRNA-Untereinheit, was die Bindungsaffinität von Linezolid senkte (Kloss et al., 1999; Meka et al., 2004). Ein hohes

Resistenzlevel und eine reduzierte Fitness wurden jedoch nur durch Veränderungen aller 23S-rRNAs erreicht (Besier et al., 2008). Aus diesem Grund blieb die Rate der Linezolid-Resistenz in den letzten 14 Jahren laut der Surveillance Programme ZAAPS und LEADER relativ gering und stabil (Gu et al., 2013; Mendes et al., 2014a; Mendes et al., 2014b). Weiterhin wurden Mutationen in den Genen, die für die 50S ribosomalen Proteine L3 und L4 kodieren, mit Linezolid-Resistenz in Verbindung gebracht (Wolter et al., 2005; Locke et al., 2009). Eine sehr wichtige und besorgniserregende Rolle in der Resistenzentwicklung gegenüber Linezolid spielt jedoch das horizontal transferierbare Gen *cfr*, das für eine ribosomale Methyltransferase kodiert (Kehrenberg et al., 2005). Cfr methyliert A2503 der 23S-rRNA (Kehrenberg et al., 2005) und vermittelt Resistenz gegenüber Phenicolen, Lincosamiden, Oxazolidinonen, Pleuromutilinen und Streptogramin A (PhLOPS<sub>A</sub>-Phänotyps; Long et al., 2006). Cfr wurde erstmals auf dem Plasmid pSCSF1 von *Staphylococcus sciuri* identifiziert, der 1997 von bei einem Nasenabstrich eines mit Florfenicol behandelten Kalbs in Deutschland isoliert wurde (Schwarz et al., 2000). Seitdem wurde *cfr* über horizontalen Gentransfer - vermittelt durch Insertionssequenzen wie IS256 oder IS21-558 - auf zahlreiche Plasmide Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien (*Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Jeotgalicoccus* und *Macroccoccus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*) übertragen (Shen et al., 2013). Das erste klinische MRSA-Isolat, das ein chromosomales *cfr* Gen enthielt, wurde 2005 von einem Patienten in Medellin (Kolumbien) isoliert, der vorher mit Linezolid behandelt wurde (Toh et al., 2007). In den letzten Jahren wurden weltweit klinische Linezolid-resistente Staphylokokken nachgewiesen. Bei einem Viertel der *cfr*-positiven Isolate handelte es sich um *S. aureus*. Die meisten *cfr*-positiven Isolate waren jedoch Koagulase-negative Staphylokokken (Locke et al., 2012). In *S. aureus* ist die Akquisition von Cfr generell mit nur geringen Fitnessseinbußen verbunden, was zukünftig eine schnelle Verbreitung des *cfr*-Gens ermöglichen kann (LaMarre et al., 2011).

**Tedizolid** (Torezolid, TR-700) ist ein neues Oxazolidinon, das sowohl gegen MRSA als auch gegen Linezolid-unempfindliche *S. aureus*-Isolate (LNS – linezolid-nonsusceptible *S. aureus*), inklusive *cfr*-positive Stämme, wirksam ist (Locke et al., 2010; Locke et al., 2014). In den USA wurde Tedizolid im Juni 2014 zur Behandlung von komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen durch Gram-positive Bakterien zugelassen. In Europa wurde die Zulassung für die gleiche Indikation im Juli 2014 beantragt. **Tigecyclin** ist ein halbsynthetisches Glycylcyclin, das, ähnlich wie die Tetracycline, die bakterielle Proteinbiosynthese durch Anlagerung an die ribosomale 30S-Untereinheit hemmt. Obwohl Tigecyclin eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Organismen, einschließlich Tetracyclin-resistenten Bakterien, MRSA und VRE, aufweist,

wird es aufgrund zu geringer klinischer Erfahrungen und hoher Nebenwirkungsraten nur als zweite bzw. dritte Wahl bei MRSA-Infektionen eingesetzt (Liu et al., 2011; Tasina et al., 2011). Außerdem zeigen die Cephalosporine der 5. Generation **Ceftarolin und Ceftobiprol** eine gute Aktivität gegenüber MRSA. Ceftarolin (Ceftarolinfosamil) hat eine hohe Affinität zu PBP2a (Zhanel et al., 2009; Moisan et al., 2010) und wurde 2012 sowohl von der FDA als auch in Europa zur Behandlung komplizierter Haut- und Weichgewebeeinfektionen sowie zur Behandlung ambulant erworbener Pneumonien zugelassen (Lodise und Low, 2012). *In vitro* zeigte Ceftarolin eine Aktivität gegenüber hVISA und Daptomycin-unempfindlichen *S. aureus*-Isolaten (Werth et al., 2013; Werth et al., 2014). Außerdem wurde Ceftobiprol in Europa im Oktober 2013 zur Behandlung der im Krankenhaus oder ambulant erworbenen Lungenentzündung durch Gram-negative oder Gram-positive Bakterien, u.a. MRSA, zugelassen (Basilea Pharmaceutica). Leider wurden für Ceftarolin bereits die ersten Resistenzentwicklungen, z.B. durch Mutationen in PBP2a, die zu geringeren Bindungsaffinitäten von Ceftarolin führten, beschrieben (Mendes et al., 2012; Saravolatz et al., 2014). **Quinupristin/Dalfopristin** (Synecid<sup>®</sup>) ist ein Gemisch aus Streptograminen (zyklische Peptid-Antibiotika), das die bakterielle Proteinbiosynthese hemmt. Der starke synergistische Effekt der beiden Streptogramine führt zur bakteriziden Wirkung gegenüber MRSA und Vancomycin-resistenten Enterokokken. Da Quinupristin/Dalfopristin zur MLS<sub>B</sub>-Gruppe (Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B) gehören, wird die bakterizide Wirkung durch zahlreiche Resistenzgene, wie z.B. *cfp*, abgeschwächt (Long et al., 2006). Außerdem ist Synecid<sup>®</sup>, aufgrund zahlreicher unerwünschter Wirkungen (Myalgie, Venenreizung durch parenteraler Gabe), eines hohen Interaktionspotentials und hoher Therapiekosten, ein absolutes Reserveantibiotikum (Drew et al., 2000). Obwohl die Entwicklung **neuer Antinfektiva** in den letzten 10-15 Jahren aus zahlreichen Gründen sank, haben bereits einige neue Antibiotika gegen MRSA die Phase III der klinischen Studien erreicht (Rodvold und McConeghy, 2014). Dazu gehören u. a. das Aminoglykosid Plazomicin (ACHN-490 (Lin et al., 2010)), das Fluorochinolon Delafloxacin (Remy et al., 2012), das Oxazolidinon Radezolid (Lemaire et al., 2010) oder das Streptogramin-Gemisch Linopristin/Flopristin (XRP-2868 (Mabe und Champney, 2005)).

## 2.5 Mobile genetische Elemente der Bakterien

Auf der Erde gibt es ungefähr  $5 \times 10^{30}$  Bakterien (Whitman et al., 1998), die die Ökologie des Planeten sowie die Evolution der lebenden Organismen wesentlich beeinflussen. Während das bakterielle Genom von einer Generation zur nächsten Generation relativ stabil ist, ist es - auf

die gesamte Evolution bezogen - sehr plastisch. Die Balance zwischen genomischer Integrität und genomischer Instabilität ist wichtig für das Überleben der Bakterien. Bezogen auf unser Gesundheitssystem limitiert die genomische Variabilität der Bakterien jedoch stark die Kontrolle verschiedenster Krankheiten. Der Grund dafür ist die gesteigerte Anpassungsfähigkeit der Bakterien unter verschiedenen Umweltbedingungen, einschließlich der Behandlung mit Antibiotika. Die genomische Variabilität wird hauptsächlich durch horizontalen Gentransfer, genomische Rearrangements (z.B. Deletionen, Insertionen, Amplifikationen, Inversionen) und die Aktivität verschiedener mobiler genetischer Elemente beeinflusst. Mobile genetische Elemente (MGEs) sind DNA-Sequenzen mit definierten Enden, den sogenannten „Inverted Repeats“ (IR), die sich innerhalb eines Genoms oder zwischen verschiedenen Genomen bewegen können (McClintock, 1950; Cohen, 1976). Das Ausschneiden und Integrieren des Elementes wird durch die Funktion einer Transposase (Tpase) ermöglicht. In Abhängigkeit von der jeweiligen Insertionsstelle sind MGEs in der Lage die Expression der benachbarten Gene positiv oder negativ zu beeinflussen. Intragenische Insertionen von MGEs können auf direktem Wege eine Geninaktivierung auslösen, während intergenische Insertionen die Genexpression auf indirektem Wege, zum Beispiel durch polare Effekte, Änderung der DNA-Topologie oder Insertionen in Regulatorregionen (z. B. Bildung von Hybridpromotoren oder Abschwächung von Promotoren), beeinflussen können. Unpräzises Ausschneiden von MGEs kann zu Mutationen führen. Außerdem kann die Interaktion eines MGEs mit ähnlichen DNA-Sequenzen große genomische Deletionen, Duplikationen oder Inversionen verursachen (Darmon und Leach, 2014). Zu den MGEs der Bakterien zählen Transposons, transponierbare Bakteriophagen, genomische Inseln, „miniature inverted-repeat transposable elements“ (MITEs), „repetitive extragenic palindromic sequences“ (REP sequences), „bacterial interspersed mosaic elements“ (BIMEs), Insertionssequenzen (IS-Elemente) und in gewissem Maße auch Integrons, Inteine, Introns und Retroelemente (Darmon und Leach, 2014).

## 2.6 Insertionssequenzen

Insertionssequenzen oder IS-Elemente sind weit verbreitet und kommen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor. Bis heute wurden über 4000 verschiedene bakterielle Insertionssequenzen in der Datenbank „IS-Finder“ hinterlegt (Siguier et al., 2006; Siguier et al., 2012). Zu den eukaryotischen Insertionssequenzen, die sowohl in Insekten, Säugetieren, Pilzen als auch in Fischen und Pflanzen verbreitet sind, zählen u.a. *mariner*, P-Elemente oder MuDR (Mahillon und Chandler, 1998). Eine einheitliche Nomenklatur für alle IS-Elemente

gibt es bis heute nicht. Mahillon und Chandler (1998) haben jedoch eine systematische Klassifizierung vorgenommen, die die IS-Elemente basierend auf Ähnlichkeiten in Struktur, Organisation, Nukleotid- und Proteinsequenz sowie Transpositionsmechanismus in verschiedene Familien einteilt. Demzufolge werden heute die ~ 4000 bakteriellen IS-Elemente in 26 Familien eingeordnet (Siguier et al., 2014). IS-Elemente sind kleine DNA-Segmente (0,7 – 2,5 kb). Sie tragen maximal drei ORFs, die nur für Proteine kodieren, die die Mobilität des IS-Elementes ermöglichen (Transposase, Integrase). Die meisten Transposasen sind durch ein sogenanntes DDE-Motiv gekennzeichnet (Bsp.: IS3-, IS30-, IS5-, IS256-Familie, *mariner* (Mahillon und Chandler, 1998)), das aus einer Triade von drei hochkonservierten Aminosäuren Aspartat (D), Aspartat (D) und Glutamat (E) besteht und das aktive Zentrum der Transposase bildet (Haren et al., 1999). Bei DDE-Transposasen ist die DNA-Bindedomäne am N-Terminus lokalisiert, während der C-Terminus die katalytische Domäne enthält. Bis auf wenige Ausnahmen (IS91, IS110 und IS200/605-Familie) wird die Mehrheit der IS-Elemente durch terminale IRs (10 - 40 bp) flankiert, die sowohl die Bindung der Transposase als auch die Transpositionsreaktion (Exzision und Strangtransfer) ermöglichen. Bei der Integration eines IS-Elementes entstehen häufig Duplikationen der Targetsequenz, die sogenannten Direct Repeats (DRs), die das IS-Element flankieren. Die Länge der DRs (2 - 14 bp) ist charakteristisch für das jeweilige IS-Element (Siguier et al., 2006). Einige IS-Elemente weisen jedoch DRs mit atypischer Länge auf, wie die Elemente der IS1182-Familie (0-60 bp) (Siguier et al., 2014). Einige IS-Familien, wie IS110 oder IS91, enthalten keine DRs (Mahillon und Chandler, 1998). Das Fehlen von DRs kann auch durch homologe inter- oder intramolekulare Rekombination zweier IS-Elemente verursacht werden. Das entstandene Hybridelement trägt dann jeweils eine der ehemaligen DR-Sequenzen der elterlichen IS-Elemente (Mahillon und Chandler, 1998). Die Spezifität der Targetsequenz ist abhängig von der jeweiligen Transposase und reicht von sehr spezifisch (Tn7 (Craig, 1991) oder IS91 (Mendiola und de la Cruz, 1989)) bis wenig spezifisch (IS1 (Galas et al., 1980)). Für den Vorgang der Transposition von IS-Elementen sind drei verschiedene Mechanismen beschrieben. Beim konservativen „cut-and-paste“-Mechanismus wird das IS-Element durch Doppelstrangbrüche der DNA an der einen Stelle ausgeschnitten und an einer anderen Stelle wieder in das Genom integriert, wie es für die IS4-Familie (IS10, IS50 und IS231A) beschrieben wurde (Leonard und Mahillon, 1998). Einige IS-Elemente (z.B. IS6 und IS1-Familie) werden durch semikonservative Replikation transponiert, die die Bildung eines Kointegrats beinhaltet. Bei diesem Mechanismus wird nur ein Strang der DNA am 3' Terminus durch die DDE-Transposase geschnitten, wobei der 5' Terminus vorerst fest verbunden bleibt. Die Transposition des IS-Elementes zur neuen Insertionsstelle wird bei

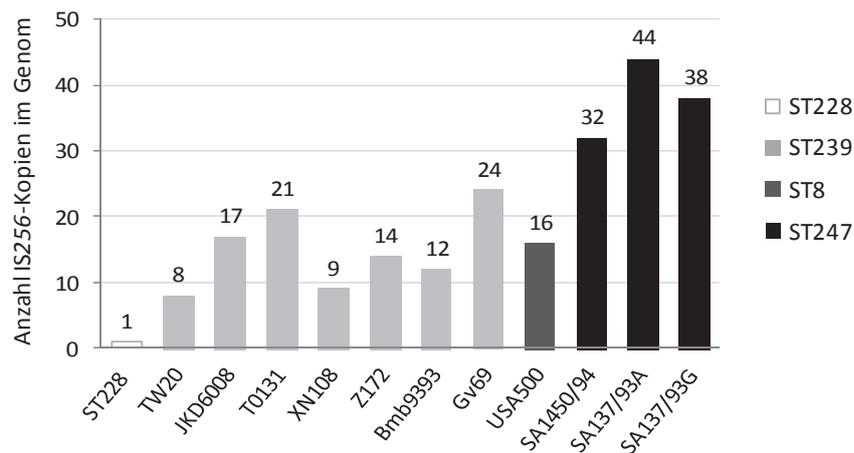
beiden genannten Mechanismen durch den nukleophilen Angriff der freien 3'OH-Gruppe an der Phosphodiesterbindung der neuen Insertionsstelle ermöglicht. Die Bildung des Kointegrats beinhaltet die Fusion von Donor- und Target-Replikon mit zeitgleicher Replikation des IS-Elementes (Shapiro-Intermediat (Shapiro, 1979)). Die Auflösung des Kointegrats erfolgt anschließend durch einen Rekombinationsvorgang zwischen den duplizierten IS-Elementen. Ein dritter Mechanismus ist ein „copy-and-paste“-Mechanismus in zwei Schritten (Duval-Valentin et al., 2004), der am häufigsten bei DDE-Transposasen detektiert wurde. Im ersten Schritt erfolgt der Einzelstrangbruch am 3' Ende des IS-Elementes durch die DDE-Transposase. Die freie 3'OH-Gruppe wird anschließend zum anderen Ende desselben Stranges transferiert, was zur Bildung eines zirkulären Intermediats führt. Die IRs des jeweiligen IS-Elementes sind dabei durch eine Art „Spacer“ (einige Basen der Target-DNA) voneinander getrennt. Im zweiten Schritt wird das doppelsträngige zirkuläre Intermediat durch Einzelstrangbrüche an den 3' Enden und Angriff der freien 3'OH-Gruppe an der Phosphodiesterbindung der Target-DNA integriert (Lewis et al., 2012). Dieser Mechanismus wurde bisher für Mitglieder der IS-Familien IS3 (wie IS911 (Polard und Chandler, 1995)), IS30 (Kiss und Olasz, 1999), IS21 (Berger und Haas, 2001) und IS256 (z. B. IS256 (Loessner et al., 2002; Prudhomme et al., 2002)) beschrieben.

### 2.6.1 IS256

IS256 ist ein IS-Element, das im Jahre 1987 als aktive Komponente des Transposons Tn4001 erstmals beschrieben wurde (Lyon et al., 1987). Hier flankieren zwei inverse IS256-Elemente das Gen *aacA-aphD*, das für ein bifunktionales Aminoglykosid-modifizierendes Enzym (N-Acetyltransferase [AAC(6')], O-Phosphotransferase [APH(2'')]) kodiert und Resistenz gegenüber Gentamicin, Tobramycin und Kanamycin vermittelt (Lyon et al., 1984; Rouch et al., 1987; Byrne et al., 1989). Die inversen IS256-Elemente ermöglichten die Übertragung von Tn4001 vom Plasmid pSK1 auf das Chromosom von *S. aureus* (Lyon et al., 1984; Gillespie et al., 1987; Lyon et al., 1987). IS256 bildet zusammen mit weiteren 217 IS-Elementen die IS256-Familie (Siguier et al., 2014), deren Mitglieder sich über viele Genera (u.a. *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Yersinia*, *Corynebacterium*, *Clostridium*) erstrecken. Interessanterweise weist die Transposase der IS256-Familie leichte Ähnlichkeiten mit dem eukaryotischen *mudrA* Genprodukt aus dem Mutatorelement MuDR aus dem Mais auf (Eisen et al., 1994). Wie Abbildung 2.3 zeigt, weist IS256 eine Länge von 1324 bp auf. Das Gen *tnpA* kodiert für eine DDE-Transposase und wird durch zwei verschieden große nicht-kodierende Regionen (NCR) flankiert, die an den Enden



N-Terminus eine DNA-Bindedomäne enthält, die eine spezifische Bindung mit den IRs von IS256 während des Transpositionsprozesses eingeht (Hennig und Ziebuhr, 2010). Dieser Transpositionsmechanismus erklärt die zum Teil sehr hohe Anzahl von IS256-Kopien im Chromosom von *S. aureus*. Außerdem wurde für IS256 der Mechanismus des „exakten Ausscheidens“ von einer Insertionsstelle beschrieben, bei dem sogar die duplizierten 8 bp der DRs beseitigt werden (Ziebuhr et al., 1999). Dieser Mechanismus beruht auf einer Transposase-unabhängigen illegitimen Rekombination, die sowohl von der Intaktheit als auch vom Abstand der DRs abhängig ist (Hennig und Ziebuhr, 2008). Entdeckt wurde dieser Mechanismus im Zuge der Aufklärung der Phasenvariationen der Biofilmbildung in *S. epidermidis* und *S. aureus*, bei der die reversible Insertion von IS256 in *icaADBC* oder *sarA* die Biofilmbildung an- bzw. ausschaltete und somit die Virulenz beeinflusste (Ziebuhr et al., 1999; Conlon et al., 2004; Kiem et al., 2004). In *S. epidermidis* wurde auch die Insertion in *rsbU* mit der Bildung Biofilm-negativer Varianten in einen Zusammenhang gebracht (Conlon et al., 2004).



**Abbildung 2.4: Vorkommen von IS256 in klinischen *S. aureus* Isolaten.** (Quelle: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> – BLAST der IS256- Sequenz, ST247 siehe Kapitel 4.1.1)

## 2.6.2 Einfluss von IS256 auf die Resistenzentwicklung von *S. aureus*

Zahlreiche Studien der letzten Jahre zeigten, dass IS256, neben der Übertragung der Aminoglykosid-Resistenz auf *S. aureus*, auch bei der Resistenzentwicklung gegenüber anderen Antibiotika in verschiedenen Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielt. Die Modulation der Genexpression von Resistenz-beeinflussenden Genen kann sowohl durch direkte Geninsertionen als auch durch Insertionen in Promotorregionen entsprechender Gene erfolgen (Depardieu et al., 2007). Da IS256 am 3' Ende eine nach außen gerichtete -35-Region eines SigA-abhängigen Promotors (TTGACT) enthält, können in Folge der Insertion

in Promotorregionen benachbarter Gene, sowohl stärkere Hybridpromotoren entstehen, als auch bereits vorhandene Promotoren abgeschwächt werden. Die Bildung eines stärkeren Hybridpromotors durch eine IS256-Insertion führte beispielsweise in *S. sciuri* zur Aktivierung der Genexpression von *mecA*, was die Entwicklung klinischer Methicillin-resistenter *S. sciuri*-Isolate zur Folge hatte (Couto et al., 1996; Couto et al., 2003). In *S. aureus* führte die Bildung eines Hybridpromotors vor *llm*, einem Membranprotein, zur gesteigerten Methicillin-Heteroresistenz (Maki und Murakami, 1997). In zwei isogenen VISA-Stämmen des Norddeutschen Epidemietyps beeinflusste IS256 die Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin (Bierbaum et al., 1999; Reipert et al., 2003). Im klinischen MRSA-Isolat *S. aureus* SA137/93A, das einen hVISA-Phänotyp aufwies, führte die Bildung eines stärkeren Hybridpromotors vor dem Regulatorprotein *yycF* (*walR*) durch eine IS256-Insertion zur Überexpression des essentiellen Zwei-Komponentensystems WalKR, was folglich die Vancomycin-Empfindlichkeit reduzierte (Jansen et al., 2007). Im Gegensatz dazu, zeigten McEvoy et al. (2013), dass die IS256-Insertion an einer anderen Stelle vor *yycF* in *S. aureus* JKD6008 (ST239) die Expression von *walKR* reduzierte und folglich die Vancomycin-Resistenz stieg. Der Tochterstamm SA137/93G, eine spontane Labormutante von SA137/93A, wies einen homogenen VISA-Phänotyp mit gesteigerter Vancomycin-Resistenz auf, was hauptsächlich auf die Inaktivierung von *tcaA* durch IS256 zurückzuführen war (Maki et al., 2004; Jansen et al., 2007). Außerdem wurde sowohl der Verlust der IS256-Insertion vor *yycF* als auch die Deletion eines großen chromosomalen Bereiches, einschließlich der SCC*mec*, mit der gesteigerten Vancomycin-Resistenz in Verbindung gebracht (Reipert et al., 2003; Jansen et al., 2007). In *S. aureus* SA1450/94 (Wernigerode), dem Referenzstamm des Norddeutschen Epidemietyps (ST247), führte die Inaktivierung von *mutS* durch eine Insertion von IS256 zur Ausbildung eines Mutator-Phänotyps mit einer erhöhten Mutationsfrequenz (Nagel et al., 2011). Außerdem zeigten mehrere Studien, dass IS256 und IS256-ähnliche Elemente eine wichtige Rolle bei der Verbreitung des Resistenzgens *cfrr* unter verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien spielen (Shen et al., 2013).

### 2.6.3 Regulation der Transposition von IS256

Die Transpositionsaktivität von mobilen Elementen wird in Bakterien durch eine Vielzahl von intrinsischen und extrinsischen Mechanismen reguliert (Nagy und Chandler, 2004). Bezüglich IS256 konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass die Behandlung von *S. aureus* mit subinhibitorischen Konzentrationen von Ciprofloxacin und Vancomycin zu einer Erhöhung der Transpositionsfrequenz von IS256 führte (Nagel et al., 2011). Auf der

anderen Seite verursachte die Aktivität von SigB in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen eine Hemmung der Transposition von IS256 (Valle et al., 2007; Nagel et al., 2011). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Bildung der SigB-abhängigen Antisense-RNA von IS256 sein, deren Promotor per *in silico* Analyse auf dem Gegenstrang von IS256 identifiziert wurde (Nagel et al., 2011). Bei diesen Untersuchungen wurde außerdem ein SigA-abhängiger Promotor auf dem Gegenstrang von IS256 identifiziert, der auf die Synthese einer weiteren Antisense-RNA hinweisen könnte (Dissertation Michael Nagel, 2011). Eine komplementäre Bindung der jeweiligen Antisense-RNA an die *tnpA*-mRNA könnte das Translationslevel der *tnpA*-mRNA reduzieren und folglich die Transposition von IS256 hemmen. Dieser Regulationsmechanismus der Transposition wurde bereits für andere IS-Elemente, wie IS10 (Case et al., 1988) oder IS30 (Arini et al., 1997), beschrieben.

## 2.7 Ziel dieser Arbeit

In Zeiten der Antibiotika-Krise führen steigende Resistenzen und ein Mangel an neuen antibiotischen Wirkstoffen zu einer Vielzahl therapeutischer Misserfolge, die schwere Infektionen zur Folge haben können. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, die Anpassungsstrategien von Bakterien in Anwesenheit von Antibiotika aufzuklären, damit zukünftig neue Therapieoptionen entwickelt werden können. Mobile genetische Elemente, wie Insertionssequenzen, verleihen dem Genom eine gewisse Variabilität und können die Anpassungsfähigkeit der Bakterien fördern. Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses chromosomaler IS256-Insertionen auf die Resistenzentwicklung von *S. aureus*. Dazu wurden die Genome dreier *S. aureus*-Stämme des Norddeutschen Epidemietyps (ST247) sequenziert und ausgewertet, um weitere Hinweise auf den Mechanismus der Resistenzentwicklung der VISA-Stämme SA137/93A und SA137/93G im Vergleich zum Referenzstamm SA1450/94 (VSSA) zu erhalten. Außerdem wurden zwei IS256-Insertionsmutanten von *S. aureus* HG001 hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften und Resistenzentwicklung untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Regulation des Transpositionsprozesses von IS256 in *S. aureus*. In vorangegangenen Studien wurde *rsbU*, der positive Regulator von SigB, sowohl in *S. epidermidis* (Conlon et al., 2004) als auch in *S. aureus* SA137/93G als Hotspot für IS256-Insertionen identifiziert. Bei SA137/93G führte die Anwesenheit von Chloramphenicol bei 45°C zur Selektion weißer *rsbU::IS256* Insertionsmutanten. Um die Gründe für die Selektion weißer *rsbU::IS256* Insertionsmutanten erörtern zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene *S. aureus*-Stämme unter verschiedenen Bedingungen auf die Selektion weißer *rsbU::IS256*

Insertionsmutanten untersucht. Die selektierten *rsbU::IS256* Insertionsmutanten wurden anschließend mithilfe von Passagierversuchen, Wachstumsexperimenten und elektronenmikroskopischen Aufnahmen charakterisiert. Des Weiteren sollte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *rsbU* in einer weißen *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutante von *S. aureus* HG001 zur Autoaktivierung der Transpositionsfrequenz eines zweiten rekombinanten IS256-Elementes (*IS256-ermB*) führt. Schließlich sollte die Regulation der Transposition von IS256 durch potentielle SigB- und SigA-abhängige Antisense-RNAs näher untersucht werden, was die Charakterisierung des 5' Endes der Antisense-RNAs einschloss.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Lösungen und Antibiotika

**Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Lösungen.**

<b>Chemikalie/Lösung</b>	<b>Hersteller</b>
Agar	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Agarose	Bio-Budget Technologies GmbH, Gießen
Ampuwa®, PCR-Wasser	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Bacto™ Trypton	BD, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Developer KODAK PROFESSIONAL D-19	Science Services GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt
dNTPs	Roche Applied Science GmbH, Mannheim
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EMbed 812 Embedding Kit	Science Services GmbH, München, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt
Fixierlösung Agefix	Science Services GmbH, München
Glutaraldehyde	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerol	Merck KgaA, Darmstadt
Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Guanin*HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hämin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
HCl	Merck KgaA, Darmstadt
Hefeextrakt	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
Blei(II)-citrat Trihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lysostaphin	Textilchemie Dr. Petry GmbH, Reutlingen
Midori Green Advanced DNA Stain	Nippon Genetics EUROPE GmbH, Düren
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
O'GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Osmiumtetroxid	Science Services GmbH, München
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase + 5x Reaktionspuffer	Thermo Scientific, Schwerte
Primer	Microsynth AG, Lindau
Propylenoxid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck KgaA, Darmstadt
NaOH	Merck KgaA, Darmstadt
T4 DNA Ligase + 10x Reaktionspuffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Merck KgaA, Darmstadt
Uranylacetat	Leica Biosystems GmbH, Nussloch

**Tabelle 3.2: Die in dieser Arbeit verwendete Antibiotika.**

Antibiotikum	Lösungsmittel	Hersteller
Amikacin-Sulfat	PCR-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampicillin	PCR-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloramphenicol	Ethanol	Calbiochem®; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ciprofloxacin (Ciprobay®)	Infusionslösung	Bayer Healthcare, Leverkusen, Deutschland
Erythromycin	Ethanol	Calbiochem®; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gentamicin-Sulfat	PCR-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kanamycin	PCR-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Linezolid	Infusionslösung	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Oxacillin	PCR-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Rifampicin (Eremfat®)	PCR-Wasser	Riemser Arzneimittel AG, Deutschland
Spectinomycin	PCR-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tetracyclin-HCl	PCR-Wasser	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tigecyclin (Tygacil®)	PCR-Wasser	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin
Vancomycin-HCl	PCR-Wasser	Ratiopharm, Ulm, Deutschland

### 3.2 Bakterienstämme, Plasmide und Wachstumsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Von allen Bakterienstämmen wurden Dauerkulturen (50% (v/v) Glycerin) angelegt, die bei -70°C gelagert wurden und bei Bedarf auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen wurden. *Staphylococcus aureus* wurde in Tryptic-Soja-Bouillon (TSB; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Brain-Heart-Infusion (BHI) - Bouillon (Oxoid, Wesel, Deutschland) oder Müller-Hinton-Bouillon (MHB; Oxoid, Wesel, Deutschland) kultiviert. *E. coli* wurde in Lysogenic-Broth (LB; 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,5 (Bertani, 1951; Bertani, 2004)) kultiviert. Die Kulturen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Als Festmedien wurden Columbia-Agarplatten mit 5% Schafsblut (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) oder selbst hergestellte Festmedien aus den oben genannten Nährmedien verwendet. Zur Herstellung der Festmedien wurden dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 14 g/l Agar-Agar (Bacto™-Agar; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 55°C wurde der Agar gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotika versetzt und zum Erkalten in sterile Petrischalen (Fa. Greiner Bio-One; 94x16 mm, Polystyren) gegossen.

**Tabelle 3.3: Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.**

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
<b><i>S. aureus</i></b>		
RN4220	restriktionsnegatives Derivat von <i>S. aureus</i> NCTC8325	Kreiswirth et al., 1983; Nair et al., 2011
NCTC8325	Laborstamm, MSSA, 11-bp Deletion in <i>rsbU</i> , <i>agr</i> -negativ	Novick und Richmond, 1965; Iandolo et al., 2002
NCTC8325 Tübingen	Laborstamm, MSSA, 11-bp Deletion in <i>rsbU</i> , <i>agr</i> -positiv	Novick und Richmond, 1965
SG511-Berlin	Empfindlicher Kontrollstamm, Mutation in <i>graS</i>	RKI Berlin, Deutschland; Sass und Bierbaum, 2009
HG001	Derivat von NCTC8325, <i>rsbU</i> repariert	Herbert et al., 2010
HG001 W5	<i>rsbU::IS256-spc</i> Insertionsmutante, DR : TTTAATTA	diese Arbeit; Schreiber et al., 2013
HG001 G2	intergenische <i>IS256-spc</i> Insertionsmutante (SAOUHSC_0967/SAOUHSC_0968), DR: TTTTACG	diese Arbeit; Schreiber et al., 2013
HG001 <i>guaA::IS256-ermB</i>	<i>guaA::IS256-ermB</i> Insertionsmutante, DR: CAATTCGG	diese Arbeit
HG001 <i>hemY::IS256-spc</i>	<i>hemY::IS256-spc</i> Insertionsmutante, DR: TATTAGGA	diese Arbeit
HG001 $\Delta$ <i>sigB</i>	<i>sigB</i> -Deletionsmutante von <i>S. aureus</i> HG001, EM <sup>r</sup>	Depke et al., 2012; erhalten von AG Susanne Engelmann, Universität Greifswald
SA1450/94	MRSA, Referenzstamm des Norddeutschen Epidemiotyps, ST247, <i>mutS::IS256</i> , <i>rsbU</i> -positiv	Referenzzentrum für Staphylokokken, Wernigerode, Deutschland
SA137/93A	Klinisches hVISA-Isolat, Norddeutscher Epidemiotyp (MRSA), ST247, MRSA, <i>rsbU</i> - positiv	Bierbaum et al., 1999; Reipert et al., 2003
SA137/93G	Spontane Labormutante von SA137/93A; $\Delta$ <i>SCCmec</i> (MSSA), <i>tcaA::IS256</i> , <i>rsbU</i> -positiv	Bierbaum et al., 1999; Reipert et al., 2003
SA137/93G wG6	<i>rsbU::IS256</i> Insertionsmutante, DR: CTTCAAAA	diese Arbeit; Schreiber et al., 2013
SA137/93G wG7	<i>rsbU::IS256</i> Insertionsmutante, DR: AAAAGATG	diese Arbeit; Schreiber et al., 2013
SA137/93G wG8	<i>rsbU::IS256</i> Insertionsmutante, DR: ATGATATG	diese Arbeit; Schreiber et al., 2013
SA137/93G wG12	<i>sigB::IS256</i> Insertionsmutante, DR: TTTGAAGC	diese Arbeit

**Fortsetzung von Tabelle 3.3 : Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.**

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
SA137/93G yG6	<i>rsbU</i> -positiver Kontrollstamm	diese Arbeit; Schreiber et al., 2013
SA137/93G yG7	<i>rsbU</i> -positiver Kontrollstamm	diese Arbeit; Schreiber et al., 2013
SA137/93G yG8	<i>rsbU</i> -positiver Kontrollstamm	diese Arbeit; Schreiber et al., 2013
Mu50	klinischer VISA-Stamm	Hiramatsu et al., 1997
ST239-BW	MRSA-Isolat des Sequenztyps 239, Ursprung Australien, zahlreiche IS256-Kopien im Genom	Coombs et al., 2004
<b><i>E. coli</i></b>		
K12 JM83	Zwischenwirt zum Klonieren	Yanisch-Perron et al., 1985
K12 JM109	Zwischenwirt zum Klonieren	Yanisch-Perron et al., 1985

Die Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Zur Aufrechterhaltung von pBT2 und seiner Derivate in *E. coli* JM109 wurde Ampicillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Konzentration 40 µg/ml verwendet. *S. aureus* Stämme, welche das temperatursensitive Plasmid pBT2 oder dessen Derivate pA3 oder pA6 enthielten, wurden in Anwesenheit von 20 µg/ml Chloramphenicol, 25 µg/ml Erythromycin bzw. 100 µg/ml Spectinomycin bei 30°C inkubiert (Plasmidkarte pBT2 siehe Abbildung A 1). Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in Tabelle A 1 aufgeführt.

**Tabelle 3.4: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.**

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pBT2	<i>E. coli</i> – <i>S. aureus</i> Shuttle-Vektor mit temperatursensitivem Replikationsursprung für grampositive Bakterien, <i>cat</i>	Brückner, 1997
pA3	pBT2 mit rekombinalem IS256- <i>ermB</i> , bestehend aus IS256 und einer Erythromycin-Resistenz-Kassette ( <i>ermB</i> ) stromabwärts von IS256	Nagel et al., 2011
pA3sigBmut	pA3 mit veränderter -35-Region des potentiellen SigB-abhängigen Gegenstrangpromotors in IS256- <i>ermB</i>	Nagel et al., 2011
pA3sigAmut	pA3 mit veränderter -10-Region des potentiellen SigB-abhängigen Gegenstrangpromotors in IS256- <i>ermB</i>	Nagel et al., 2011

**Fortsetzung von Tabelle 3.4: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.**

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
pA3-2	pBT2 mit rekombinalem IS256- <i>ermB</i> , bestehend aus IS256 und einer Erythromycin-Resistenz-Kassette ( <i>ermB</i> ) stromaufwärts von IS256	diese Arbeit; Masterarbeit Christine Lämmer, 2014
pA3-2sigBmut	pA3-2 mit veränderter -35-Region des potentiellen SigB-abhängigen Gegenstrangpromotors in IS256- <i>ermB</i>	diese Arbeit; Masterarbeit Christine Lämmer, 2014
pA6	pBT2 mit rekombinalem IS256- <i>spc</i> , bestehend aus IS256 und einer Spectinomycin-Resistenz-Kassette ( <i>spc</i> aus <i>S. aureus</i> Mu50 (GenBank accession no. BA000017.4))	diese Arbeit; Schreiber et al., 2013
pJet1.2/blunt	linearisierter Vektor (EcoRV), Amp <sup>r</sup> , Religation ohne Insert führt zur Expression eines letalen Restriktionsenzym in <i>E. coli</i>	Fermentas
pJet-vraX	pJet1.2/blunt mit <i>vraX</i> (SAOUHSC_00561) als Insert, über EcoRV ist der Vektor linearisierbar	Dissertation Anne Berscheid, 2013
pJet-170G	pJet1.2/blunt mit 170-bp Fragment der 5' RACE-PCR von SA137/93G als Insert	diese Arbeit
pA7	pBT2 mit rekombinalem IS1181- <i>ermB</i> , bestehend aus IS1181 und einer Erythromycin-Resistenz-Kassette ( <i>ermB</i> )	diese Arbeit; Masterarbeit Christine Lämmer, 2014

**3.3 Sterilisation von Medien, Geräten und Bakterienkulturen**

Die Sterilisation von Nährmedien, Lösungen, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen aus Kunststoff erfolgte durch Autoklavieren (Varioklav® 75S; H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Germany) bei 121°C für 20 min. Glaswaren wurden im Heißluftsterilisator (Kelvitron® t; Heraeus, Langenselbold, Germany) bei 180°C für 4 h sterilisiert. Bakterienkulturen und kontaminierter Laborfestmüll wurden bei 134°C für 30 min autoklaviert.

**3.4 Wachstumskurven**

Vor Versuchsbeginn wurde ausgehend von der Glycerinkultur eine frische Agarplatte mit dem jeweiligen Bakterienstamm angelegt. Anschließend wurde eine Vorkultur angeimpft und bei 30°C bzw. 37°C und 150 - 170 rpm über Nacht inkubiert. Die Vorkultur wurde nun mit frischem BHI- bzw. TSB-Medium mit oder ohne Zugabe eines Antibiotikums auf eine Optische Dichte bei 600nm (OD<sub>600</sub>) von 0,05 bis 0,1 verdünnt und unter den gleichen

Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde im Abstand von 15 – 30 min die OD<sub>600</sub> der Kultur mithilfe eines Spektralphotometers (UV-160; Shimadzu, Duisburg, Deutschland) gemessen. Einige Wachstumsexperimente wurden in RPMI-1640 Medium R7509 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) nach Moore et al. (1967) durchgeführt. Vor jedem Versuch wurden 500 ml RPMI-1640 Medium R7509 unter sterilen Bedingungen mit 5 ml einer frisch hergestellten 200 mM Glutamin-Stammlösung [Endkonzentration 2mM Glutamin] und mit 10 ml einer sterilen Lösung der Wolf'schen Spurenelemente (500 mg/l Titriplex I, 180 mg/l ZnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 50 mg/l CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O, 170 mg/l CoCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O, 130 mg/l CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 11 mg/l NaMoO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 26 mg/l Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 10 mg/l H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, 5 ml/l 1M NaOH) versetzt. Da bei diesen Experimenten die Guanin-Auxotrophie eines bestimmten *S. aureus* Stammes untersucht werden sollte, wurde zum Animpfen der Hauptkultur keine Vorkultur angelegt, sondern es wurden 2 - 3 Kolonien von einer frischen Agarplatte in modifiziertem RPMI-Medium resuspendiert, um damit die Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 - 0,1 anzupfen. Für automatisierte Wachstumsexperimente wurde der Mikroplatten-Reader (Sunrise™; Tecan, Crailsheim, Deutschland) verwendet. Die Vorkultur wurde mit frischem BHI- oder TSB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 verdünnt und gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotikakonzentrationen versetzt. Anschließend wurden jeweils 150 µl der Zellsuspension in die Vertiefungen (Wells) der 96-Well-Polystyren-Mikrotiterplatten mit rundem Boden (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt und im Mikroplatten-Reader bei 37°C für 12 h inkubiert. Die OD<sub>600</sub> wurde im Abstand von 12 min gemessen. Die Mikrotiterplatte wurde sowohl zwischen den Messungen als auch kurz vor der Messung für jeweils 3 min geschüttelt. Die erhaltenen Daten wurden mithilfe der Magellan™ Data Analysis Software (Tecan, Crailsheim, Deutschland) ausgewertet.

### 3.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, bei der kein sichtbares Wachstum des Mikroorganismus erkennbar ist. Die Bestimmung der MHK wurde mithilfe des Mikrobouillonverdünnungstests in einer 96-Well-Polystyren-Mikrotiterplatte mit rundem Boden in halbkonzentriertem MHB oder BHI-Medium durchgeführt. Ausgehend von einer Vorkultur des zu testenden Bakterienstammes wurde frisches Medium 1:200 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 inkubiert und anschließend auf 1-2 x 10<sup>5</sup> CFU/ml verdünnt. Danach wurden 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl der jeweiligen zu testenden Antibiotika-Verdünnung in den Wells der Mikrotiterplatte vermischt, dann erst 10 min bei RT auf dem

Mikrotiterplattenschüttler (Titertek; Flow Laboratories, Meckenheim, Deutschland) und anschließend bei 37°C ohne Bewegung inkubiert. Die MHK wurde nach 24 h (und nach 48 h bei sehr langsam wachsenden Stämmen) abgelesen. Alle MHK-Werte sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen.

### **3.6 Molekulargenetische Methoden**

#### **3.6.1 Isolierung von genomischer DNA**

Die Isolierung der genomischen DNA von *S. aureus*, die für PCR oder inverse PCR benötigt wurde, erfolgte mithilfe des Presto Spin D Bug-Kits (Molzym, Bremen, Deutschland). Dafür wurden 2-5 ml einer Übernachtskultur abgeerntet und wie nach Anweisung des Herstellers resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C in Anwesenheit von 50-100 µg/ml Lysostaphin (Genmedics, Reutlingen, Deutschland) für 0,5-2 h lysiert. Danach wurde die genomische DNA nach Anweisung des Herstellers extrahiert. Die Isolierung der genomischen DNA von *S. aureus*, die für die Genomsequenzierung benötigt wurde, erfolgte mithilfe des MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kits (Epicentre Biotechnologies, Madison, USA). Dafür wurde 1 ml einer Übernachtskultur (BHI-Medium) abgeerntet und nach Anweisung des Herstellers resuspendiert. Anschließend folgten der Zellaufschluss bei 37°C in Anwesenheit von 50-100 µg/ml Lysostaphin für 1,5 h und die Extraktion der genomischen DNA nach Anweisung des Herstellers. Die extrahierte DNA wurde anschließend in TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentration und Reinheit der genomischen DNA wurde durch photometrische Messung mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Die genomische DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **3.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *S. aureus* oder *E. coli* Zellen erfolgte mithilfe des GeneJet™ Plasmid Miniprep Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Zuerst wurden 2-5 ml einer Übernachtskultur abgeerntet und anschließend folgte die Präparation der Plasmid-DNA nach Anweisung des Herstellers. Zur Unterstützung des Zellaufschlusses von *S. aureus*-Zellen wurde vor dem Lyse-Schritt des Protokolls eine Inkubation bei 37°C in Anwesenheit von 50-100 µg/ml Lysostaphin für 0,5 h durchgeführt. Die Konzentration und Reinheit der eluierten Plasmid-DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese sowie photometrische

Messung mit dem NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

### **3.6.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde durch die photometrische Messung mit dem NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit ergibt sich aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ). Dieser Quotient sollte bei reiner DNA bei 1,8 und bei reiner RNA bei 2,0 liegen.

### **3.6.4 Agarosegelelektrophorese**

Die größenabhängige Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese in horizontalen Elektrophoresekammern (PEQLAB Biotechnologie GmbH). In Abhängigkeit von den spezifischen Fragmentgrößen wurden 0,8-2,5%ige (w/v) Agarosegele mithilfe von Top Vision<sup>™</sup> Agarose (Fermentas) und 1x Tris-Acetate-EDTA (TAE) - Puffer hergestellt. Während des Elektrophorese-Laufes wurde ebenfalls 1x TAE-Puffer als Laufpuffer verwendet. Danach wurden die Gele zum Visualisieren der DNA- und RNA-Fragmente für 20-30 min in 0,015%iger Ethidiumbromid-Lösung inkubiert und anschließend unter UV-Licht mit dem ImageMaster VDS System (GE Healthcare/Pharmacia, Freiburg, Deutschland) dokumentiert.

### **3.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

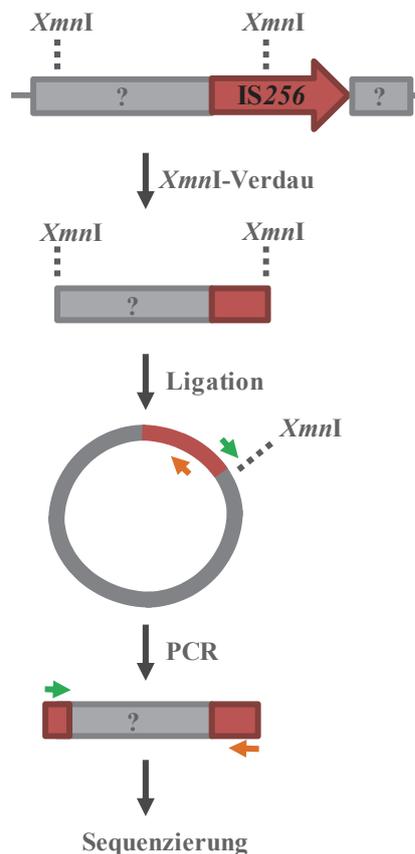
Die PCR ist ein Verfahren zur Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente. Für die Reaktion wurden die Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) oder die GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Durchführung der PCR erfolgte nach Anweisung des Herstellers und unter Verwendung von Standardprotokollen mit einem SensoQuest Labcycler (Sensoquest, Göttingen, Deutschland).

### **3.6.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Extraktion aus dem Agarosegel**

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mittels GeneJet<sup>™</sup> PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Anweisung des Herstellers. Gegebenenfalls wurden DNA-Fragmente unter UV-Licht (302 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mithilfe des GeneJet<sup>™</sup> Gel Extraction Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt.

### 3.6.7 Inverse PCR

Die inverse PCR dient der Amplifizierung von unbekanntem DNA-Regionen, die ein bekanntes DNA-Fragment flankieren. In dieser Arbeit wurden auf diese Weise einige Insertionsstellen von IS256 in *S. aureus* identifiziert. Der Ablauf der inversen PCR ist in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der inversen PCR.

Zuerst wurde die mithilfe des Presto Spin D Bug-Kits präparierte genomische DNA des betreffenden *S. aureus*-Stammes mit dem Restriktionsenzym *XmnI* (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) oder *AluI* (Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland) oder einer Kombination der beiden Enzyme verdaut. Bei der Wahl des Restriktionsenzymes ist zu beachten, dass das Enzym möglichst häufig im Genom des Bakteriums schneiden sollte und dass das bekannte DNA-Fragment eine Erkennungssequenz dieses Enzyms enthält.

Der Verdau erfolgte nach folgendem Schema:

	<i>XmnI</i> -Verdau	<i>AluI</i> -Verdau	<i>XmnI/AluI</i> -Verdau
Genomische DNA	300 ng	300 ng	300 ng
Puffer	1 $\mu$ l (NEB4)	2,5 $\mu$ l (Buffer A)	1 $\mu$ l (NEB4)
Enzym <i>XmnI</i>	1 $\mu$ l	-	1 $\mu$ l
Enzym <i>AluI</i>	-	0,5 $\mu$ l	1 $\mu$ l
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ l	ad 25 $\mu$ l	ad 10 $\mu$ l

Dieser Verdau wurde bei 37°C für 5 h inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Inkubation bei 65°C für 20 min gestoppt. Danach erfolgte nach Verdünnung der DNA-Fragmente deren Zirkularisierung durch Ligation mithilfe der T4-Ligase (Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland) nach folgendem Pipettierschema:

<b>Ligation</b>	
Verdaute DNA	70 ng
T4-Ligase-Puffer	5 $\mu$ l
T4-DNA-Ligase	2 $\mu$ l
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 19°C im Wasserbad inkubiert, bei 65°C für 10 min gestoppt und anschließend zur Aufkonzentrierung der DNA mit der SpeedVac<sup>TM</sup> auf ein Volumen von 5-10  $\mu$ l eingengt. Für die nun folgende PCR wurden Primer verwendet, die sich jeweils nach außen gerichtet, an das bekannte DNA-Fragment anlagern. Um die Anlagerung der Primer zu erleichtern, wurde DMSO verwendet.

<b>PCR-Pipettierschema</b>		<b>PCR- Programm</b>	
Zirkularisierte DNA	5-10 $\mu$ l	Initiale Denaturierung	2 min 98°C
HF-Puffer	10 $\mu$ l	Denaturierung	10 s 98°C
DMSO	1,5 $\mu$ l	Annealing	30 s 59°C
dNTP-Mix	1 $\mu$ l	Elongation	2,5 min 72°C
Primer 1	0,5 $\mu$ l	Finale Elongation	10 min 72°C
Primer 2	0,5 $\mu$ l		$\infty$ 4°C
Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 $\mu$ l		
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l		

Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem 0,8%igen Agarosegel und einem 2%igen Metaphor Agarosegel (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) analysiert, bei Bedarf aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert (Sequiserie GmbH, Vaterstetten, Deutschland).

### 3.6.8 Restriktion und Ligation von DNA

Für den Restriktionsverdau bei Klonierungen wurden Restriktionsendonukleasen verwendet, welche definierte, palindromische DNA-Sequenzen erkennen und anschließend den DNA-Doppelstrang hydrolytisch spalten. Bei Klonierungen wurden für den schnellen Verdau von PCR-Produkten FastDigest®-Enzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte mittels T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific oder Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Anweisung des jeweiligen Herstellers. T4-Ligasen katalysieren die Bildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxy- und der 5'-Phosphat-Gruppe der doppelsträngigen DNA und ligieren sowohl glatte als auch überhängende Restriktionsenden der DNA.

### 3.6.9 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 ml TYM-Medium (Tabelle 3.5) mit einer Übernachtskultur von *E. coli* JM83 oder JM109 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 inkubiert. Die Kultur wurde anschließend schnell auf Eis abgekühlt, in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und dann durch Zentrifugieren (10 min; 7000 rpm; 4°C) abgeerntet. Das Zellpellet wurde in 5 ml kaltem TFBI-Medium (4°C) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet in 2,5 ml kaltem TFBII-Medium (4°C) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde schnellstmöglich in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Gefäße zu je 50 µl aliquotiert, dann sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

### 3.6.10 Transformation von chemokompetenten *E. coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 2-5 µl des Ligationsansatzes oder der Plasmid-DNA zu 50µl der auf Eis aufgetauten chemokompetenten *E. coli*-Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch einen Hitzeschock bei 42°C für 90 s transformiert und direkt im Anschluss für 3 min auf Eis abgekühlt. Danach wurde die Zellsuspension in 0,5 ml frisches LB-Medium überführt und zur Regeneration der Zellen bei

37°C unter Schütteln für 1 h inkubiert. Dann erfolgte das Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen der Zellsuspension (Konzentrat, Unverdünt,  $10^{-1}$ ) auf selektiven LB-Agarplatten, die anschließend über Nacht bei 37°C bebrütet wurden.

**Tabelle 3.5: Medien und Puffer zur Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen.**

Medium	Komponenten	Menge	Sterilisationsverfahren
<b>TYM-Medium</b>	Bactotrypton	2 g	Autoklavieren bei 120°C für 20 min
	Hefeextrakt	0,5 g	
	NaCl	584 mg	
	MgSO <sub>4</sub>	246 mg	
	Aq. dest.	ad 100 ml	
<b>TFBI</b>	5 M KAc	0,3 ml	Sterilfiltration
	MnCl <sub>2</sub>	495 mg	
	2 M KCl	2,5 ml	
	1M CaCl <sub>2</sub>	0,5 ml	
	Glycerol	7,5 ml	
	Aq. dest.	ad 50 ml	
<b>TFBII</b>	2 M MOPS (pH 7,0)	2,5 ml	Sterilfiltration
	1 M CaCl <sub>2</sub>	3,7 ml	
	2 M KCl	250 µl	
	Glycerol	7,5 ml	
	Aq. dest.	ad 50 ml	

### 3.6.11 Herstellung elektrokompetenter *S. aureus*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *S. aureus*-Zellen wurde 500 ml BHI-Medium mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation in großen Zentrifugenbechern abgeerntet und zwei Mal mit sterilem Aq. dest. (500 ml und 250 ml) gewaschen. Die vorangegangenen Zentrifugationsschritte wurden in der Sorvall Evolution RC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; Rotor SLC-4000, 8 min, 6000 rpm, Acc. 3, Bremse 2, RT) durchgeführt. Schließlich wurden die Zellen zur Kryoprotektion in sterilem 10%igen (v/v) Glycerin resuspendiert, in sterile 50 ml-Falcons überführt und erneut abzentrifugiert (Multifuge 1 S-R, Heraeus; Rotor FA12.94, 10 min, 8000 rpm, Acc. 9, Bremse 8, RT). Dann wurde das Pellet in 0,8-1,0 ml 10%igen Glycerin resuspendiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden zu je 50 µl in Eppendorf-Gefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

### 3.6.12 Transformation von elektrokompetenten *S. aureus*-Zellen

Für die Elektroporation wurden 2 µl des Ligationsansatzes oder der Plasmid-DNA zu 50 µl der frisch aufgetauten elektrokompetenten *S. aureus*-Zellen gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde die Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenlücke, PEQLAB Biotechnologie GmbH) überführt und mit dem MicroPulser™ Electroporator (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bei 1,8 kV, 100 Ω, 25 µF elektroporiert. Für eine erfolgreiche Transformation sollte die Zeitkonstante bei 2,5 ms liegen. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen schnellstmöglich mithilfe einer Pasteurpipette in 1-2 ml vorgewärmtes BHI-Medium überführt und zur Regeneration bei 37°C unter Schütteln für 1,5-2 h inkubiert. Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen wurden verschiedene Verdünnungsstufen der Zellsuspension (Konzentrat, Unverdünnt, 10<sup>-1</sup>) auf selektiven BHI-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

### 3.6.13 Phagentransduktion

Bei der Phagentransduktion übertragen Bakteriophagen spezifische Plasmide oder Teile chromosomaler DNA von einem Donorstamm auf einen Rezipientenstamm. Der Austausch chromosomaler DNA erfolgt durch homologe Rekombination und setzt voraus, dass die DNA des Donorstammes passend zu einer homologen Region auf dem Chromosom des Rezipientenstammes ist. Die Durchführung der Phagentransduktion erfolgte wie zuvor von Berger-Bächi und Kohler (1983) beschrieben.

#### Phagenanreicherung / Infektion des Donorstammes

Die Protokolle für die Phagenanreicherung und die Infektion des Donorstammes sind identisch, mit der Ausnahme, dass der Bakterienstamm, der für die Phagenanreicherung verwendet wird, kein Plasmid enthalten darf (z.B. *S. aureus* RN4220). Vor der Phagenadsorption wird CaCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 5 mM zu einer 20 ml Übernachtkultur (LB-Medium) des Donorstammes gegeben und diese bei 52°C für 2 min inkubiert, um die Restriktionssysteme des Donorstammes zu inaktivieren. Währenddessen wurden Verdünnungen (10<sup>-1</sup> – 10<sup>-7</sup>) des Phagenlysats des transduzierenden Phagen (80α oder 85) mit vorbereitetem Phagenpuffer (LB-Medium mit 5 mM CaCl<sub>2</sub>) hergestellt und davon jeweils 100 µl mit 300 µl der Zellkultur in einem 15 ml Falcon-Röhrchen vermischt. Um die Adsorption des Phagen zu gewährleisten, wurden die Proben für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 4 ml auf 55°C erwärmtem LB-Weichagar (0,6% Agar), welcher 5 mM CaCl<sub>2</sub> enthielt, versetzt, gemischt und damit Columbia-Blutagar

(5% Schafsblut) überschichtet. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37°C (Phage 85) bzw. bei 30°C (Phage 80 $\alpha$ ) inkubiert.

### **Präparation des Phagenlysats**

Die Columbia-Agarplatten, die eine konfluente Lyse aufwiesen, wurden für die Phagenernte verwendet. Konfluente Lyse ist gekennzeichnet durch eine bräunliche Verfärbung des Columbia-Blutagars und eine durchsichtige Weichagar-Schicht. Die Agarplatten wurden nun mit 2 ml Phagenpuffer überschichtet, der Weichagar dann mithilfe einer gebogenen Pasteurpipette abgeschabt und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und gevortext. Anschließend wurden durch Zentrifugation (10 min, 9000 rpm) bakterielles Zellmaterial und Agar entfernt und der mit Phagen angereicherte Überstand durch einen 0,45  $\mu$ m Millipore Filter (Whatman Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) vorsichtig sterilfiltriert, ohne dabei die Membran des Filters zu zerstören. Die Phagenlysate können dann mehrere Jahre bei 4°C gelagert werden.

### **Infektion des Rezipientenstammes**

10 ml einer Übernachtskultur (LB-Medium) des *S. aureus*-Rezipientenstammes wurden mit CaCl<sub>2</sub> in einer Endkonzentration von 5 mM versetzt und zum Inaktivieren der Restriktionsenzyme für 2 min bei 52°C inkubiert. Die hergestellten Phagenlysate wurden mit Phagenpuffer verdünnt ( $10^{-1}$  –  $10^{-3}$ ) und jeweils 100  $\mu$ l wurden mit 300  $\mu$ l der Zellkultur in 15 ml Falcon-Röhrchen vermischt. Die folgende Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur sollte die Adsorption der Phagen ermöglichen. Um anschließend die Adsorption weiterer freier Phagen an die Bakterienzellen zu verhindern, enthielten die dazugegebenen 4 ml des auf 55°C erwärmten LB-Weichagars (0,6% Agar) 80  $\mu$ l Na<sub>3</sub>-Citrat [1 M Stammlösung], welches die vorhandenen Ca<sup>2+</sup>-Ionen chelatiert. Danach wurden damit LB-Selektionsagarplatten überschichtet und bei 37°C bzw. 30°C bebrütet bis Transduktanten erschienen (1-3 Tage).

### **3.6.14 Arbeiten mit RNA / Isolierung von Gesamt-RNA**

Um während der Präparation der RNA den Abbau durch RNasen zu verhindern, wurden der Arbeitsbereich und die verwendeten Pipetten vorher mit RNase Zap Wipes (Ambion) gereinigt und alle Glaswaren bei 200°C für 6 h sterilisiert. Zur Herstellung von RNase-freiem Wasser wurde Aq. dest. zu 0,2% (v/v) mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, gemischt und über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 121°C für 60 min autoklaviert, um sie zu sterilisieren und überschüssiges DEPC zu zerstören (Wiener et al.,

1972). Alle selbst hergestellten Lösungen, die beim Arbeiten mit RNA verwendet wurden, wurden mit DEPC-Wasser angesetzt.

Zur Isolierung der RNA wurden 10 ml TSB-Medium, gegebenenfalls mit Zugabe eines selektiven Antibiotikums, mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *S. aureus*-Stammes angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 bebrütet. Anschließend wurde die Kultur mit 10 ml RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt, um die RNA zu stabilisieren. Nach dem Abernten der Zellen (10 min, 4000 rpm) erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA mithilfe des PrestoSpin R bug Kits inklusive eines ersten DNaseI-Verdau (Molzym, Bremen, Deutschland). Das Pellet wurde vorerst in 250 µl RS-Puffer resuspendiert und zur Lyse der Zellen mit 200-400 µg/ml Lysostaphin (gelöst in DEPC-Wasser) versetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 1 h wurde mit RS-Puffer auf 720 µl aufgefüllt und die Gesamt-RNA nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die Qualität und Reinheit der Gesamt-RNA wurden anschließend mit dem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer bestimmt. Um den Abbau der RNA durch RNasen während der Präparation auszuschließen, wurde die intakte rRNA mithilfe eines 0,8%igen Agarosegels detektiert (2-3 klare Banden). Die Lagerung erfolgte anschließend bei -20°C.

### 3.6.15 DNaseI-Verdau der Gesamt-RNA

Um die restliche genomische DNA vollständig aus der Gesamt-RNA zu entfernen, wurde ein zusätzlicher DNaseI-Verdau mithilfe RNase-freier DNaseI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Der vollständige Verdau der kontaminierenden genomischen DNA konnte nur in Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup> - Ionen und einem leicht abgeänderten Versuchsprotokoll erzielt werden.

**DNaseI-Verdau**

Gesamt-RNA	7 µg
10x Reaktionspuffer mit MgCl <sub>2</sub>	5 µl
DNaseI [1 u/µl]	14 µl [2 u/µg RNA]
DEPC-Wasser	ad 70 µl

Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend direkt - ohne die Zugabe von EDTA und ohne Erhitzen - mithilfe des RNA Clean and Concentrator™-25 Kits (Zymo Research Corporation, Irvine, USA) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt und aufkonzentriert. Die Qualität und Reinheit der reinen Gesamt-RNA wurden mittels

NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer bestimmt und die Intaktheit der RNA wurde nochmals im 0,8%igen Agarosegel überprüft.

### 3.6.16 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR ist eine Kombination aus der Nutzung der Reversen Transkriptase zur cDNA-Synthese aus RNA und einer anschließenden PCR zur Amplifizierung der cDNA zum Nachweis genspezifischer RNAs (wie z.B. mRNA, asRNA).

#### cDNA-Synthese

Im ersten Schritt wurde die Gesamt-RNA mithilfe der BioScript™ Reverse Transkriptase (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) und einem genspezifischen Primer in einem SensoQuest Labcycler (Sensoquest, Göttingen, Deutschland) unter Verwendung des folgenden laborinternen Protokolls in cDNA umgeschrieben.

cDNA-Synthese	
Gesamt-RNA	0,5 – 3 µg
genspezifischer Primer	1 µl
DEPC-Wasser	ad 12 µl

Dieser Ansatz wurde 5 min bei 70°C inkubiert und wieder auf RT abgekühlt. Anschließend wurde folgender Mastermix hinzugefügt:

dNTP-Mix [je 10 mM]	1 µl
5x First Strand Puffer	4 µl
RNaseOut™ *	1 µl
DEPC-Wasser	1,75 µl

\* Life Technologies, Carlsbad, USA

Nach einer Inkubation von 10 min bei 25°C wurde die Probe für die reverse Transkription auf 42°C erhitzt. Nach 2 min wurden 0,25 µl BioScript™ Reverse Transkriptase [200 u/µl] hinzugefügt und für 60 min bei 42°C inkubiert. Um die cDNA-Synthese in diesem Schritt zu erhöhen wurden nach den ersten 30 min bei 42°C weitere 0,25 µl BioScript™ Reverse Transkriptase hinzugefügt. Die Reaktion wurde schließlich durch die Zugabe von 2,5 µl EDTA [0,5 mM, pH 8] gestoppt. Die Degradierung der verbleibenden RNA erfolgte durch die Zugabe von 5 µl NaOH [1 M] gefolgt von einer Inkubation bei 65°C für 15 min. Nach der Neutralisierung durch 12,5 µl Tris-HCl [1 M, pH 7,5] wurde die synthetisierte cDNA mithilfe

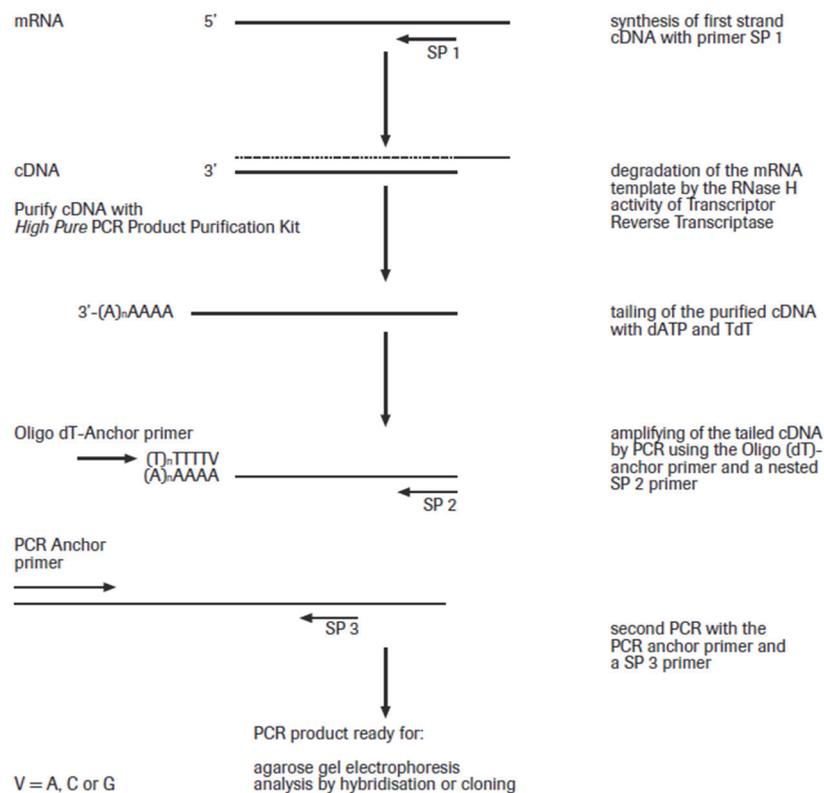
des GeneJet™ PCR Purification Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt und in 20 µl PCR-Wasser eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert. Um für die folgende Nachweis-PCR eine Negativkontrolle zu generieren, die beweist, dass keine restliche genomische DNA in der Gesamt-RNA vorhanden war, wurde von jeder untersuchten Gesamt-RNA genau nach dem oben genannten cDNA-Synthese-Protokoll eine Probe generiert, in der statt BioScript™ Reverse Transkriptase nur PCR-Wasser eingesetzt wurde.

## PCR

Zum Nachweis einer genspezifischen RNA wurde im zweiten Schritt die synthetisierte cDNA mittels PCR (siehe Kapitel 3.6.5) unter Verwendung genspezifischer Primer amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde die Probe verwendet, bei der statt BioScript™ Reverse Transkriptase nur PCR-Wasser (-RT) eingesetzt wurde. Es wurden immer 2 µl der jeweiligen cDNA als Template-DNA eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 0,8%igen Agarosegel analysiert.

### 3.6.17 5' RACE-PCR

Die RACE-PCR dient der schnellen Amplifizierung der cDNA-Enden (engl.: rapid amplification of cDNA ends) und damit der Charakterisierung des 5' – bzw. 3' Endes einer spezifischen RNA. Das Prinzip der 5' RACE-PCR ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt. Die 5' RACE-PCR besteht aus 3 wesentlichen Schritten: der cDNA-Synthese, dem Poly-A-Tailing der einzelsträngigen cDNA und der Amplifizierung der dA-getailten cDNA durch PCR. Die 5' RACE-PCR wurde mithilfe des 5' / 3' RACE Kits, 2nd Generation (Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Gesamt-RNA mittels Transcriptor Reverse Transcriptase und einem genspezifischen Primer (SP1 [12,5 µM]) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt, die vorher mittels DNaseI-Verdau behandelt und anschließend aufgereinigt wurde (siehe Kapitel 3.6.15). Außerdem wurden der Reaktion 0,5 µl RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Life Technologies, Carlsbad, USA) hinzugefügt, um den Abbau der RNA durch RNasen zu verhindern. Die Degradierung der RNA nach der cDNA-Synthese erfolgte hier durch die RNase H Aktivität der Transcriptor Reverse Transcriptase. Nach der Aufreinigung der synthetisierten cDNA mithilfe des High Pure PCR Product Purification Kits (Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland) erfolgte im zweiten Schritt das Poly(A)-Tailing am 3' Ende der synthetisierten cDNA nach Anweisung des Herstellers mittels dATP und Terminaler Transferase.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der 5' RACE-PCR (modifiziert nach Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland).**

Im dritten Schritt der PCR wurde die dA-getailte cDNA mithilfe der Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) unter Verwendung des Oligo dT-Anchor Primer und eines weiteren spezifischen Primers (SP2) nach folgendem Pipettierschema und Programm amplifiziert:

PCR-Pipettierschema		PCR- Programm	
dA-getailte cDNA	5 µl	Initiale Denaturierung	3 min 98°C
HF-Puffer	10 µl	Denaturierung	10 s 98°C
dNTP-Mix	1 µl	Annealing	30 s 55-59°C
Oligo dT-Anchor Primer	1 µl	Elongation	30 s 72°C
SP2 [12,5 µM]	1 µl	Finale Elongation	10 min 72°C
Phusion <sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl		∞ 4°C
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl		

Die PCR-Produkte wurde mithilfe eines 1-2%igen Agarosegels analysiert und bei Bedarf wurden die Banden aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 3.6.6) und anschließend in einer zweiten PCR (nested-PCR) unter Verwendung des PCR Anchor Primers und eines dritte

genspezifischen eingerückten Primers (SP3 [12,5 µM]) nochmals amplifiziert. Diese PCR-Produkte wurden aufgereinigt (siehe Kapitel 3.6.6) und dann mithilfe des zuletzt verwendeten genspezifischen Primers (SP3) sequenziert (Sequiserie, Vaterstetten, Deutschland), um das 5' Ende der untersuchten RNA zu ermitteln.

### 3.7 Arbeiten mit Insertionssequenzen

#### 3.7.1 Untersuchung der Selektion von weißen *S. aureus*-Kolonien

##### 3.7.1.1 Selektion weißer Kolonien auf Festmedien

Um das Auftreten von weißen Insertionsmutanten eines *S. aureus*-Stammes unter verschiedenen Bedingungen (Antibiotika, Temperaturen) zu untersuchen, wurde eine Übernachtskultur (TSB-Medium) mit einer gelben Kolonie einer frischen Agarplatte des entsprechenden *S. aureus*-Wildtypstammes angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden 5 ml TSB-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 bis 0,1 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 inkubiert. Beide Kulturen wurden in Abwesenheit von Antibiotika bebrütet. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen ( $10^{-2}$  –  $2 \cdot 10^{-6}$ ) der Kultur hergestellt und sowohl auf TSA (zur Bestimmung der Lebendzellzahl;  $2 \cdot 10^{-6}$ ) als auch auf TSA mit subinhibitorischen Konzentrationen verschiedener Antibiotika (1/4, 1/2 oder 3/4 MHK) ausgespatelt oder aufgetropft. Die Agarplatten wurden für 48 h bei 37°C bzw. 43°C inkubiert. In drei voneinander unabhängigen Experimenten wurde anschließend die Anzahl weißer und gelber Kolonien auf den Agarplatten, die weniger als 200 koloniebildende Einheiten enthielten, ausgezählt und der prozentuale Anteil der weißen Kolonien bestimmt. Um die weißen Kolonien auf IS256-Insertionen im *sigB*-Operon zu untersuchen, wurden sowohl das gesamte *sigB*-Operon mit dem Primerpaar SigBrev und SigBneurev (3720 bp ohne IS256), als auch *rsbU* mit dem Primerpaar SigBforII und SigBrevII (1866 bp ohne IS256) per PCR amplifiziert.

##### 3.7.1.2 Selektion / Überlebensvorteil weißer Kolonien durch Passagieren in Flüssigkultur

Mit einer gelben Kolonie des *rsbU*-positiven *S. aureus* SA137/93G wurde zunächst eine Übernachtskultur (TSB ohne Antibiotikum) angeimpft. In dem folgenden Passagierversuch enthielten alle Hauptkulturen jeweils 5 ml TSB versetzt mit 0,75 µg/ml Linezolid bzw. 3 µg/ml Chloramphenicol. Die jeweilige Hauptkultur wurde auf eine OD<sub>600</sub> von ~ 0,05 angeimpft und bei 37°C (Linezolid) bzw. 43°C (Chloramphenicol) unter Schütteln für 24 h inkubiert. Die bewachsene Kultur wurde anschließend zum Animpfen einer neuen

Hauptkultur verwendet. Außerdem wurden 100 µl einer Verdünnung der Kultur ( $2\text{-}4\cdot 10^{-6}$ ) auf Antibiotika-freien TSA ausgespatelt, der dann bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde auf den Agarplatten jeder 24h-Kultur die Anzahl weißer und gelber Kolonien bestimmt und dokumentiert.

In einem weiteren Experiment wurden Übernachtskulturen (TSB ohne Antibiotikum) der weißen *rsbU*-Insertionsmutante und des *rsbU*-positiven Wildtypstammes angeimpft und die Hauptkulturen genau unter den gleichen oben genannten Bedingungen passagiert und auf Agar ausgespatelt. Die erste Hauptkultur wurde jedoch mit einem Inokulum aus 50% weißen *S. aureus*-Zellen und 50% gelben *S. aureus*-Zellen angeimpft, sodass eine Mischkultur entstand.

### 3.7.1.3 Überlebensrate weißer Insertionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp

Mit den Übernachtskulturen einer weißen *rsbU*-negativen Insertionsmutante von *S. aureus* und des *rsbU*-positiven Wildtypstammes wurde jeweils eine Hauptkultur mit frischem TSB-Medium ohne Zusatz eines Antibiotikums angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen ( $10^{-2}$  –  $2\cdot 10^{-6}$ ) der Kulturen hergestellt und jeweils 100 µl sowohl auf TSA (zur Bestimmung der Lebendzellzahl;  $2\cdot 10^{-6}$ ) als auch auf Linezolid- und Chloramphenicol-haltigen TSA (0,5x MHK) ausgespatelt und bei 37°C (Linezolid) bzw. 43°C (Chloramphenicol) für 48 h inkubiert. Nach dem Auszählen der koloniebildenden Einheiten wurde die Überlebensrate des jeweiligen Stammes mit folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Überlebensrate in \%} &= \frac{\text{Lebendzellzahl auf TSA mit Antibiotikum/ml}}{\text{Lebendzellzahl TSA ohne Antibiotikum/ml}} * 100 \\ &= \frac{(\text{CFU}/100 \mu\text{l}) \text{ auf TSA mit Antibiotikum/Verdünnung (z. B. } 10^{-2}\text{)}}{(\text{CFU}/100 \mu\text{l}) \text{ auf TSA/Verdünnung (} 2 * 10^{-6}\text{)}} * 100 \end{aligned}$$

### 3.7.2 Testsystem pA6/pA3

Um gezielt IS256-Insertionsmutanten konstruieren zu können oder die Transposition von IS256 von einem Plasmid in das Genom detektieren zu können, wurden die Testsysteme pA3 und pA6 verwendet. Der Vektor pA3 wurde bereits von Michael Nagel in Anlehnung an Valle et al. (2007) konstruiert (Nagel et al., 2011). Nach demselben Prinzip wurde nun in dieser Arbeit der Vektor pA6 konstruiert (siehe Kapitel 4.3.1). Der Grundaufbau dieses Testsystems besteht aus einem rekombinanten IS256-Element integriert in den Shuttlevektor pBT2, welcher einen temperatursensitiven ori für Gram-positive Bakterien enthält (Brückner, 1997).

Das rekombinante IS256-Element besteht aus der intakten Transposase von IS256 fusioniert mit einer Resistenzkassette (*spc* oder *ermB*) und wird durch die DRs von IS256 flankiert, um die Transposition des gesamten rekombinanten IS256-Elementes zu gewährleisten. Dieser Aufbau ermöglicht die sichere Detektion einer erfolgreichen Transposition des rekombinanten IS256-Elementes vom Plasmid in das Genom des jeweiligen *S. aureus* Stammes, welche dann bei 45°C in Anwesenheit von Spectinomycin bzw. Erythromycin erfolgen kann.

### 3.7.3 Gezielte Selektion von *rsbU*-negativen Insertionsmutanten von *S. aureus*

Zur Selektion weißer *rsbU*::IS256-*spc* Insertionsmutanten von *S. aureus* HG001 wurde eine Übernachtskultur von *S. aureus* HG001 pA6 in 5 ml TSB-Medium mit 20 µg/ml Chloramphenicol angeimpft und bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 20 ml TSB-Medium ohne Antibiotikum mithilfe der Übernachtskultur angeimpft (1:100) und für 6 Stunden bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Stündlich wurden Aliquots der Kultur in verschiedenen Verdünnungen auf TSA mit 150 µg/ml Spectinomycin ausgespatelt. Die Agarplatten wurden für 48 h bei 45°C inkubiert. Anschließend wurden alle weißen Kolonien und eine gelbe Kolonie (Kontrolle), welche Spectinomycin-Resistenz und Chloramphenicol-Sensitivität aufwies, selektiert. Diese Resistenzmerkmale weisen auf eine Insertion des rekombinanten IS256-*spc* im Chromosom und den Verlust des temperatursensitiven Plasmids hin. Die weißen Kolonien wurden mittels PCR (siehe Kapitel 3.6.5) auf eine Insertion von IS256-*spc* im *sigB*-Operon untersucht. In einer ersten PCR wurden die Primer SigBrev und SigBneurev eingesetzt um das komplette *sigB*-Operon inklusive aller Promotoren (SA2059-SA2058-*rsbU*-*rsbV*-*rsbW*-*sigB*) auf Insertionen zu untersuchen. Lag eine Insertion von IS256-*spc* im *sigB*-Operon vor, entstand ein PCR-Produkt in einer Größe von 6017 bp. Mit einer zweiten PCR wurden die weißen IS256-*spc*-Insertionsmutanten mithilfe der Primer SigBforII und SigBrevII auf Insertionen in *rsbU* untersucht. Lag die Insertion in dieser Region, entstand ein PCR-Produkt mit einer Größe von 4163 bp. Die genauen Insertionsstellen wurden durch Sequenzierung der PCR-Produkte mit dem Primer IS91rev ermittelt. Die Lokalisierung von IS256-*spc* in der gelben Insertionsmutante von *S. aureus* HG001 G2 erfolgte mittels inverser PCR (siehe Kapitel 3.6.7 und 3.7.4).

### 3.7.4 Lokalisierung von Insertionssequenzen im Genom

Die Lokalisierung von IS256, IS256-*spc* oder IS256-*ermB* im Genom von *S. aureus* erfolgte mittels inverser PCR (siehe Kapitel 3.6.7) unter Verwendung der Primer IS91rev und

IS141for. Die genaue Insertionsstelle wurde anschließend durch Sequenzierung des entstandenen PCR-Produktes mithilfe des Primers IS91rev ermittelt.

### 3.7.5 Bestimmung der Transpositionsfrequenz

Zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz eines rekombinanten IS-Elementes in *S. aureus* wurde zunächst das entsprechende temperatursensitive Plasmid, welches sowohl das rekombinante IS-Element (IS256-*ermB* oder IS1181-*ermB*), als auch eine Chloramphenicol-Resistenz-Kassette trug, per Elektroporation in den entsprechenden *S. aureus*-Stamm transferiert. Ausgehend von einer Übernachtskultur in TSB-Medium, welche zur Aufrechterhaltung des Plasmids Erythromycin oder Chloramphenicol enthielt, wurden 20 ml TSB-Medium ohne Antibiotikum auf eine OD<sub>600</sub> von 0,0375 angeimpft und bei 30°C und 140 rpm im Wasserbad bebrütet. Nach ca. 30 min und einer OD<sub>600</sub> von ~ 0,05 wurden stündlich Proben der Kultur entnommen, mit TSB-Medium seriell verdünnt und anschließend auf TSA mit Erythromycin [50 µg/ml], TSA mit Erythromycin [50 µg/ml] und Chloramphenicol [40 µg/ml], sowie zur Bestimmung der Lebendzellzahl auf Columbia-Blutagar ausgespatelt. Nähere Angaben zur Probennahme und den verwendeten Verdünnungsstufen sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

**Tabelle 3.6: Probennahme zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz.**

Zeitpunkt t [h]	OD <sub>600</sub>	Verdünnungsstufe Selektionsagar	Verdünnungsstufe Columbia-Agar	Probe für Doppelansatz
0	~ 0,05	Unverdünnt	5*10 <sup>-5</sup>	500µl
1	~ 0,1	¼	2,5*10 <sup>-5</sup>	350µl
2	~ 0,25	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-5</sup>	250µl
3	~ 0,5	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-6</sup>	150µl
4	~ 1,0	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-6</sup>	150µl
5	~ 1,6	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-6</sup>	150µl
6	~ 3,0	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-6</sup>	150µl

Zur genaueren Bestimmung der Transpositionsfrequenz wurden pro Probennahme und Zeitpunkt zwei Verdünnungsreihen pipettiert. Anschließend wurden die Platten (6 Platten pro Zeitpunkt) für 48 h bei 45°C inkubiert - einer Temperatur, bei der die Replikation des temperatursensitiven Plasmids ausgeschlossen werden konnte. Das Ausspateln auf TSA mit Erythromycin [50 µg/ml] diente der Bestimmung der Anzahl der Kolonien, bei denen das rekombinante IS-Element oder das gesamte Plasmid in das Genom von *S. aureus* integriert

wurde. Das Ausspateln auf TSA mit Erythromycin [50 µg/ml] und Chloramphenicol [40 µg/ml] hingegen diente der Bestimmung der Anzahl der Kolonien, bei denen nur das gesamte Plasmid in das Genom von *S. aureus* integriert wurde. Die Differenz beider Koloniezahlen/ml ergab schlussendlich die Anzahl an Transpositionereignissen/ml.

Die Transpositionsfrequenz pro Zeitpunkt wurde nach dem Auszählen der Kolonien mit folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} & \text{Transpositionsfrequenz} / 10^7 \text{Zellen} \\ & = \frac{\text{Anzahl Erythromycin – resistenter und Chloramphenicol – sensitiver Zellen/ml}}{\text{Lebendzellzahl /ml}} \\ & = \frac{\text{CFU/ml [TSA EM50]} - \text{CFU/ml [TSA EM50 + CHL40]}}{\text{CFU/ml [Columbia]}} \end{aligned}$$

Die Transpositionsfrequenz eines rekombinanten IS-Elementes in *S. aureus* in Abhängigkeit von der Zeit ergab sich aus dem Mittelwert der Transpositionsfrequenzen dreier voneinander unabhängiger Versuche.

### 3.8 Shotgun-Genom-Sequenzierung

#### 3.8.1 Sequenzierungsstrategie

Zunächst wurde die genomische DNA von *S. aureus* SA137/93A, SA137/93G und SA1450/94, wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben, isoliert. Anschließend wurden 500 ng der genomischen DNA für die 454-Sequenzierung mit dem GS Junior System (Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden mit den dafür vorgesehenen Kits (GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-L), GS Junior Titanium Sequencing Kit, GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Rohdaten (~140.000 Reads) wurden anschließend mit dem GS *De Novo* Assembler (Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Deutschland) und dem Geneious-Assembler 6.0.4 (Biomatters Limited, Auckland, Neuseeland) zu Contigs (ca. 50-150 Contigs) zusammengesetzt. Die Sequenzierungen sowie die Assemblierungen wurden dankenswerterweise von Dr. rer. nat. René Kallies (Institut für Virologie, Universität Bonn, Deutschland) durchgeführt. Nachdem die Contigs mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; National Center for Biotechnology Information (NCBI)) analysiert und in eine Reihenfolge gebracht wurden, erfolgte das Schließen einiger Lücken durch PCR und

anschließende Sequenzierung nach Sanger (Seqlab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen, Deutschland). Der Vergleich der drei Stämme erfolgte mittels Referenzassemblierung der jeweiligen endgültigen Contigs. Als Referenzstamm wurde, sowohl für alle BLASTs, als auch für die Referenzassemblierung der nahesten verwandte MRSA-Stamm *S. aureus* COL (GenBank Accession Number: NC\_002951.2) verwendet.

### 3.8.2 Identifizierung von Insertionsstellen verschiedener IS-Elemente

Da die drei sequenzierten *S. aureus*-Stämme jeweils mehrere Kopien verschiedener IS-Elemente (IS256, IS1181, IS431mec, sowie IS1272) im Genom enthalten, wurden diese Sequenzen bei dem *De Novo*-Assembly als repetitive Sequenzen erkannt und jeweils als ein einzelnes Contig angegeben und nicht an den entsprechenden Insertionsstellen in die übrigen Contigs integriert. Um dieses Problem zu lösen und alle Insertionsstellen, insbesondere die von IS256, identifizieren und einfügen zu können, wurde bei dem ersten Stamm *S. aureus* SA137/93G zunächst die gesamte Nukleotidsequenz von IS256 mithilfe der Geneious-Software gegen alle Reads geblastet. Die dabei entstandenen Hits wurden anschließend *de novo* assembled, wobei ~80 Contigs entstanden, die danach mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; National Center for Biotechnology Information (NCBI)) analysiert wurden. Die Masterstudentin Annegret Zweynert konnte dann alle Insertionsstellen von IS256 in *S. aureus* SA137/93G mittels PCR und Sanger-Sequenzierung bestätigen. Danach wurde die Sequenz von IS256 an den entsprechenden Stellen zwischen den Contigs eingefügt, wodurch zahlreiche Lücken geschlossen werden konnten. Bei *S. aureus* SA137/93A und SA1450/94 wurden die Insertionsstellen bei der Auswertung durch BLAST der Contigs identifiziert, da jeweils zwei benachbarte Contigs, zwischen denen ein IS256 lokalisiert war, einen Überlappungsbereich von genau 8 Basenpaaren (bp) aufwiesen, der jeweils dem DR der Insertionsstelle entsprach. Mithilfe der beiden beschriebenen Methoden konnten anschließend mittels PCR und Sanger-Sequenzierung die Insertionsstellen aller IS-Elemente in diesen Stämmen bestimmt und eingefügt werden.

### 3.8.3 Genome Accession Number

Die Contigs der Shotgun-Genom-Sequenzierungen der drei *S. aureus*-Stämme SA137/93A, SA137/93G und SA1450/94 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. René Kallies bei NCBI hochgeladen und wurden somit in die GenBank-, EMBL- und DDBJ-Datenbank unter den in Tabelle 4.1 aufgeführten Genome Accession Numbers aufgenommen.

## 3.9 Analytische Verfahren

### 3.9.1 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) ist ein analytisches Verfahren, welches in dieser Arbeit dazu genutzt wurde, einige *S. aureus*-Stämme auf die Expression SigB-abhängiger Peptide zu untersuchen (Josten et al., 2013). Die Proben für die MALDI-TOF MS-Analyse wurden mithilfe der Schmiermethode vorbereitet. Unter Verwendung einer Pipettenspitze wurden 3-5 Kolonien des jeweiligen *S. aureus*-Stammes von einer frischen Columbia-Blutagarplatte gepickt. Das Zellmaterial wurde anschließend auf eine MALDI-TOF MS Stahltargetplatte aufgebracht, sodass eine konfluente Bakterienschicht entstand. Danach wurden zum Aufschluss der Zellen 1 µl Ameisensäure (70%) und 1 µl Acetonitril vorsichtig auf die Bakterienschicht pipettiert, vermischt und an der Luft getrocknet. Im Anschluss daran wurde die Probe mit 2 µl der Matrix (gesättigte  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in 50% Acetonitril / 2,5% Trifluoressigsäure) überschichtet und wiederum bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Proben wurden im linearen Modus mit dem MALDI-TOF MS Biflex II (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) analysiert. Die Vorbereitungen und Messungen der Proben wurden dankenswerterweise von Michael Josten durchgeführt.

### 3.9.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Um Proben verschiedener *S. aureus*-Stämme für die Transmissionselektronenmikroskopie vorzubereiten, wurden die Zellen in 10 ml TSB-Medium in An- oder Abwesenheit von Antibiotika bei 37°C oder 43°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,0 unter Schütteln inkubiert und durch Zentrifugation (8000 rpm, 10 min) abgeerntet. Das Pellet wurde in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) mit 3% Glutaraldehyd (v/v; Sigma-Aldrich) zur Fixierung der Proteinstrukturen der Zellen resuspendiert und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,4) für jeweils 10 min wurden die Zellen in 2% Phosphat-gepuffertem Osmiumtetroxid (v/v; Sigma-Aldrich) bei 4°C für 2 h auf dem Drehrad inkubiert. Osmiumtetroxid reagiert bevorzugt mit Lipiden und dient somit der Fixierung der Membranen. Danach wurden die Proben zur Dehydrierung zuerst bei 4°C für jeweils 10 min mit steigenden Konzentrationen an Ethanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100% (v/v)) und anschließend 3-mal bei RT für jeweils 5 min mit 100% Propylenoxid gewaschen. Die Zellen wurden dann über Nacht in einem Gemisch (1:1) aus Propylenoxid und Eponharz (Embed-812; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) bei

RT auf dem Drehrad inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen vorsichtig in Eponharz eingebettet. Nach dem Auspolymerisieren des Eponharzes für 48 h bei 60°C wurden mithilfe eines Ultramikrotoms und eines Diamantmessers (*ultra* 45°; Diatome AG, Biel, Schweiz) Ultradünnschnitte (60 nm) der Proben angefertigt, welche dann auf einem Grid (200 mesh copper grid; Science Services GmbH, München, Deutschland) platziert wurden. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte dann für 20 min auf einem Tropfen 3% Uranylacetat (Ultrastain 1H; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) und anschließend für 10 min auf einem Tropfen 0,3% Bleicitrat (10 ml Aq. dest., 30 mg Blei(II)-citrat Trihydrat, 0,1 ml 10 M NaOH). Diese Schwermetalle verstärken die Streuung von Elektronen und lassen somit während des Mikroskopierens Membranen dunkler erscheinen. Die Ultradünnschnitte wurden anschließend mit dem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM900 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Die Zellen wurden bei einer 30.000-fachen Vergrößerung fotografiert. Die Negative (Electron image film SO-163; Kodak; Science Services GmbH) wurden anschließend in einer Dunkelkammer entwickelt. Dafür wurden die Negative für 10 min in eine Entwicklerlösung (Kodak D-19; Science Services GmbH) getaucht, kurz mit Wasser abgespült, dann für 12 min in Fixierlösung (Agefix; Science Services GmbH) getaucht, für 20-25 min in Aq. dest. gewaschen und schließlich getrocknet. Die Zellwanddicke eines *S. aureus*-Stammes ergab sich aus dem Mittelwert der gemessenen Zellwanddicken von mindestens 7 äquatorial geschnittenen Zellen.

### 3.9.3 Statistische Tests

Zur Ermittlung der Signifikanz der Zellwanddicken der *S. aureus*-Stämme unter verschiedenen Bedingungen wurden die Werte der Zellwanddicken eines Stammes zuerst mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung der Werte getestet. War dies der Fall, so wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt, um bei einem p-Wert von  $\leq 0,05$  statistische Signifikanz zu zeigen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Shotgun-Genom-Sequenzierung von drei *S. aureus*-Stämmen des Sequenztyps 247

Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, welche genetischen Veränderungen in den Stämmen *S. aureus* SA137/93A und SA137/93G im Vergleich zum Vancomycin-sensitiven MRSA-Stamm SA1450/94 zur Ausprägung des VISA-Phänotyps geführt haben, wurden die Genome dieser drei Stämme sequenziert. Außerdem sollte der Vergleich der beiden VISA-Stämme weitere Erklärungen dafür liefern, warum SA137/93G im Vergleich zu SA137/93A (heterogener VISA-Phänotyp) einen homogenen VISA-Phänotyp mit einer gesteigerten Vancomycin-Resistenz von 8 µg/ml auf 16 µg/ml aufweist (Reipert et al., 2003). Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Anzahl und Lage der IS256-Elemente gelegt, die an den phänotypischen Veränderungen der drei Stämme maßgeblich beteiligt waren. Wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, erfolgte die Genom-Sequenzierung der drei ST247-Stämme mithilfe der 454-Sequenzierung in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. René Kallies (Institut für Virologie, Bonn). Zuerst erfolgte die Assemblierung der Contigs. Da alle drei *S. aureus* Stämme mehrere Kopien von IS256, IS1181 und zum Teil auch IS431mec im Genom enthielten, wurden diese Sequenzen bei der Assemblierung als repetitive Region erkannt und nicht mit in die Contigs eingefügt. Mithilfe zusätzlicher BLASTs, PCRs und Sequenzierungen wurden die Insertionsstellen dieser IS-Elemente detektiert. Anschließend konnten zahlreiche Lücken zwischen benachbarten Contigs erfolgreich geschlossen werden. Alle hierfür verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle A 1 aufgeführt. Wie Tabelle 4.1 zeigt, konnten die drei Genome des Norddeutschen Epidemietyps in Form von endgültigen Contigs im Vergleich zum Referenzstamm *S. aureus* COL (GenBank Accession Number: NC\_002951.2) erfolgreich sequenziert und ausgewertet werden. Die Genomsequenzen aller drei *S. aureus* Stämme wurden in der öffentlichen Datenbank EMBL/GenBank/DDBJ eingefügt und sind unter den in Tabelle 4.1 angegebenen Accession-Nummern hinterlegt. Wie Reipert et al (2003) bereits zeigten, enthielt sowohl *S. aureus* SA1450/94 als auch SA137/93A eine SCCmec des Typs I, wohingegen SA137/93G in diesem Bereich eine große Deletion von 105,767 kb aufwies. Diese Deletion umfasste sowohl die vollständige SCCmec als auch einen großen chromosomalen Bereich stromabwärts der SCCmec. Die SCCmec-Kassetten von SA137/93A und SA1450/94 unterschieden sich lediglich durch das Vorhandensein des integrierten Plasmids pUB110 in SA137/93A, welches eine Bleomycin- sowie eine

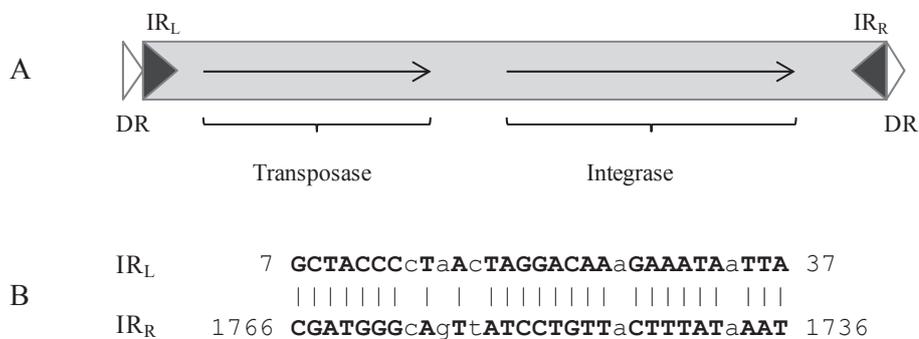
Kanamycin-Resistenzkassette trägt und durch zwei *IS431mec*-Elemente flankiert wird (Sugiyama et al., 1996).

**Tabelle 4.1: Überblick der Sequenzierungsergebnisse der drei ST247-Stämme.**

	SA1450/94	SA137/93A	SA137/93G
Anzahl der Reads (Länge)	226489 (40-648 bp)	152776 (40-937 bp)	134377 (40-978 bp)
Anzahl der Roche-Contigs	88	116	119
Anzahl der Geneious-Contigs	-	62	63
Anzahl der endgültigen Contigs	33	38	45
Kleinste Contiglänge	106 bp	136 bp	102 bp
Größte Contiglänge	873949 bp	764303 bp	546950 bp
Gesamtlänge der endgültigen Contigs	2939791 bp	2955184 bp	2843154 bp
Anzahl der auf den jeweiligen Stamm gemappten Reads	226139 (99,8%)	152412 (99,8%)	133783 (99,6%)
Abdeckung der einzelnen Basen durch Reads	2-226	0-176	1-132
GC-Gehalt in %	32,8%	32,8%	32,8%
Anzahl IS256	32	43 + 1 (Plasmid)	38
Anzahl IS1181	5	7	7
Anzahl IS431mec	1	2 + 2 (Plasmid)	1
Anzahl IS1272	1	1	-
Anzahl IS1272-ähnliche	6	6	6
Sequenzlänge des Plasmids pSA93A	-	32184 bp	-
Anzahl annotierter Gene	3068	3103	2971
Genome Accession Number	JWMI00000000	JWMH00000000	JWVG00000000

Dieses Plasmid ist häufig Teil der *SCCmec*-Kassette des Typs II (ST5: *S. aureus* N315). In SA137/93A wurde die vollständige Sequenz eines weiteren Plasmids mit einer Länge von 32184 bp aufgeklärt. Das Plasmid wurde pSA93A genannt und weist eine Ähnlichkeit von 99% zu dem Plasmid SAP101A (Accession-Number: GQ900495.1) auf. Es trägt sowohl die Gene für die  $\beta$ -Laktamase als auch Gene, die Quecksilber-Resistenz (Quecksilber-Reduktase (*merA*) und Organo-Quecksilber-Lyase (*merB*)) und Cadmium-Resistenz (Cadmiumexporter) vermitteln. Außerdem wurden zwei Kopien von *IS431mec* und eine Kopie von *IS256* detektiert. Wie Reipert et. al (2003) bereits zeigten, hat SA137/93G dieses Plasmid verloren,

was unter anderem zur gesteigerten Vancomycin-Resistenz dieses Stammes beigetragen haben könnte (Hiramatsu et al., 1997). Reipert et al. (2003) detektierten dieses Plasmid ebenfalls in SA1450/94. Bei der Genomsequenzierung von SA1450/94 wurde pSA93A jedoch nicht detektiert. Alle drei Stämme enthielten sowohl das Transposon Tn554, welches Gene für die Spectinomycin- (*ant9'*) und die induzierbare Makrolid-Lincosamid-Resistenz (*ermA*) trägt (Murphy et al., 1981), als auch das zusammengesetzte Transposon Tn4001, welches die Gene für die Aminoglykosid-Resistenz (*aacA-aphD*) enthält, die durch zwei IS256-Elemente flankiert werden (Lyon et al., 1984; Lyon et al., 1987; Rouch et al., 1987). Die genaue Lage dieses Transposons konnte leider nicht bestimmt werden. Interessanterweise konnte in allen drei Genomen ein 1773 bp großes Transposon identifiziert werden (Abbildung 4.1), das bisher nur in einem *E. faecalis*-Isolat eines gesunden norwegischen Kindes detektiert wurde und zwei Gene trägt, die einerseits für eine bisher unbekannte Transposase (684 bp) und andererseits für eine Integrase (813 bp) kodieren (Brede et al., 2011). Mithilfe des Online-Tools „einverted“ (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/einverted>) konnten flankierende imperfekte IRs einer Länge von 30 bp an den Enden des Transposons identifiziert werden. Die intergenische Insertion des Transposons in das Genom der drei ST247-Stämme verursachte die Bildung eines 4-bp DRs („AATA“).

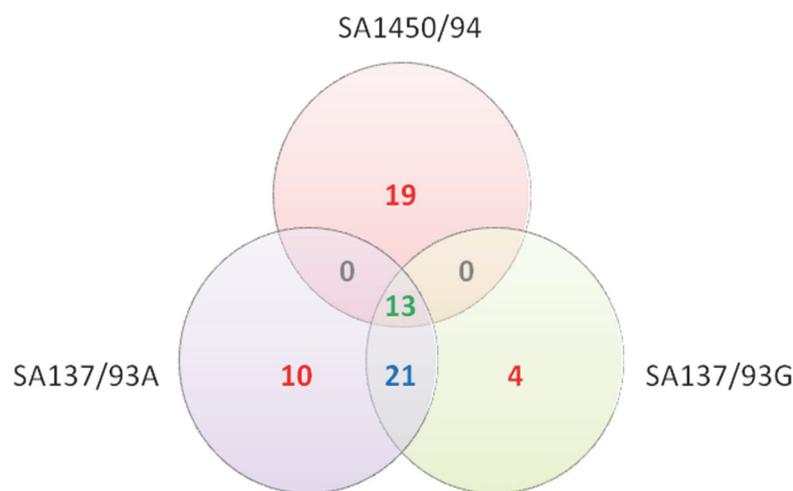


**Abbildung 4.1:** **A:** Schematischer Aufbau des detektierten Transposons, bestehend aus einem Transposase-Gen und einem Integrase-Gen, welche durch nicht-kodierende Regionen flankiert werden, die an den Enden zwei Inverted Repeats (IR<sub>L</sub> und IR<sub>R</sub>) enthalten. Durch die Insertion des Transposons entstanden 4-bp Direct Repeats (DRs). **B:** Alignment der Nukleotidsequenzen der imperfekten IRs mit einer Übereinstimmung von 83% (26 von 31 Nukleotiden).

#### 4.1.1 Insertionsstellen von IS256

In allen drei sequenzierten *S. aureus* Stämmen konnte eine Gesamtzahl von 67 verschiedenen Insertionsstellen von IS256 detektiert werden. Dabei enthielten *S. aureus* SA1450/94,

SA137/93A und SA137/93G mit jeweils 32, 44 und 38 IS256-Insertionen die bisher größte detektierte Anzahl an IS256-Kopien im Genom von *S. aureus*. Bei 54% der Insertionen handelte es sich um intergenische Insertionen. Bei 46% der IS256-Insertionen handelte es sich jedoch um intragenische Insertionen, die möglicherweise zur vollständigen Geninaktivierung führten und somit den Organismus stark beeinflussten. Der größte Teil der betroffenen Gene kodiert für hypothetische Proteine, deren Funktionen bisher unbekannt sind (58%). Die übrigen Insertionen betrafen Gene, die bei der Prozessierung der genetischen Information (23%), im Metabolismus (13%) oder bei regulatorischen Prozessen (6%) eine Rolle spielen. Abbildung 4.2 zeigt ein Schnittmengen-Diagramm der 67 detektierten IS256-Insertionsstellen und gibt die Überlappungen der Insertionsstellen in den drei *S. aureus*-Stämmen an.



**Abbildung 4.2:** Schnittmengen-Diagramm der 67 verschiedenen IS256-Insertionsstellen in den drei *S. aureus* Stämmen des Norddeutschen Epidemie-Typs ST247.

Die drei *S. aureus* Stämme wiesen 13 gemeinsame Insertionen auf (Tabelle 4.2). Neben einigen intergenischen Insertionen, bei denen keine Beeinflussungen benachbarter Promotoren durch IS256 festgestellt werden konnten, und Insertionen in zahlreichen hypothetischen Genen, enthielten in allen 3 Stämmen eine Permease (SACOL2504), eine Acetyltransferase (SACOL2012) sowie der Transkriptionsregulator SarU eine Insertion von IS256. Zu den 19 IS256-Insertionen, die nur in SA1450/94 detektiert wurden (Tabelle 4.3), gehörte unter anderem die Insertion im Gen *cap5A*, das für einen Regulator der Kapselpolysaccharid-Biosynthese kodiert (Sau et al., 1997). Jansen et al. (2013) zeigten, dass die Inaktivierung von *cap5A* in SA1450/94 eine Hemmung der Kapselbiosynthese verursachte. Diese Insertion lag in den beiden VISA-Stämmen SA137/93A und SA137/93G nicht vor, was zwar zu einer erhöhten Kapselproduktion in diesen Stämmen im Vergleich zu SA1450/94 führte, jedoch nicht zur gesteigerten Vancomycin-Resistenz beitrug

(Jansen et al., 2013). Die Inaktivierung von *mutS* durch IS256 in SA1450/94 führte außerdem zur Ausprägung eines Mutator-Phänotyps mit hohen Mutationsraten in Anwesenheit von Ciprofloxacin und Vancomycin, da *mutS* für ein wichtiges DNA-Reparaturprotein kodiert (Nagel et al., 2011). Die VISA-Stämme SA137/93A und SA137/93G wiesen 21 gemeinsame Insertionsstellen auf, unter anderem in *comGB*, das für ein Kompetenzprotein kodiert, und in *nrgA*, das für einen Ammoniumtransporter kodiert (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.2: IS256-Insertionen, die in allen drei Stämmen detektiert wurden.**

Insertionslokus bezogen auf <i>S. aureus</i> COL	Gen	Beschreibung des Insertionslokus	Lage des DRs im Insertionslokus	DR bezogen auf IR <sub>L</sub>	Orientierung im Genom	interne Nr. der Insertion
<b>Geninsertionen</b>						
<b><u>Metabolismus</u></b>						
SACOL2504		Permease	2557780-87	GAATTATG	rev	23=N28
<b><u>Prozessierung genetischer Information</u></b>						
SACOL2012		Acetyltransferase (GNAT-Familie)	2073624-31	AAAATCAC	for	28=N23
<b><u>Regulation</u></b>						
SACOL2507	<i>sarU</i>	Transkriptionsregulator (HTH-Typ)	2564338-45	AAAGAATT	for	25=N29
<b><u>Hypothetische Proteine</u></b>						
SAR1561 <sup>a</sup>		Membranprotein	1635824-31	GAATTCGT	rev	43=N7
SACOL0133		Pseudo	149050-57	ATTTTTTG	for	10 = N3
SACOL1507			1548748-55	AAAAATAT	for	35=N16
<b>Intergenische Insertionen</b>						
SACOL1309/1310			1327221-28	CATTTATA	rev	2=N13
SACOL0759/0761	<i>fruA/nagA</i>		782512-19	AACGGTAG	for	6=N11
SACOL1691/1692	<i>recJ/secF</i>		1723638-45	TAAAAATG	for	20=N17
SACOL1722/1723	<i>tig/</i>	deletiertes IS256 (Rekombination)	1754695-702	ATTATTTT	for/rev	30=N18
Tn4001 rechts		= SATW20_20720				33=N31
Tn4001 links		= SATW20_20690				34=N32
SACOL1332-1334		Deletion von SACOL1333 durch Rekombination zweier IS256-Elemente	1350352-59 1349560-67	CACAAATC TAAAAGGC	rev	27/37= N15

Legende: a) Insertionslokus bezogen auf *S. aureus* MRSA252, interne Nummer der Insertion: x bezogen auf SA137/93A bzw. SA137/93G und Nx bezogen auf SA1450/94

Außerdem konnten zahlreiche intergenische Insertionen in beiden VISA-Stämmen identifiziert werden, von denen drei möglicherweise die Expression benachbarter Gene (*fosB*, SACOL1171, *rot*) beeinflussen könnten, da die Insertionsstelle in der Promotorregion dieser Gene lokalisiert ist (Tabelle 4.7). Eine veränderte Expression des Transkriptionsregulators Rot („repressor of toxins“) durch die IS256-Insertion könnte aufgrund der Lage der Insertion

durchaus möglich sein. Die IS256-Insertionen, die die beiden VISA-Stämme voneinander unterscheiden, sind in den Tabellen 4.5 (SA137/93A) und 4.6 (SA137/93G) aufgeführt.

**Tabelle 4.3: IS256-Insertionen, die nur in SA1450/94 detektiert wurden.**

Insertionslokus bezogen auf <i>S. aureus</i> COL	Gen	Beschreibung des Insertionslokus	Lage des DRs im Insertionslokus	DR bezogen auf IR <sub>L</sub>	Orientierung im Genom	interne Nr. der Insertion
<b>Geninsertionen</b>						
<b><u>Metabolismus</u></b>						
SACOL0136	<i>cap5A</i>	Kapselbiosynthese	153448-55	GTTTTTTT	rev	N4
<b><u>Prozessierung genetischer Information</u></b>						
SACOL1315	<i>mutS</i>	DNA-Reparaturprotein	1331528-35	GTATTTCA	rev	N14
NWMN_1925 <sup>c</sup>	<i>int</i>	hIb-Phagenintegrase	2131415-22	TAATGACG	rev	N22
SACOL1859		regulatorischer DnaA-Inaktivator Hda	1910233-40	GGAAAAAG	rev	N20
SACOL2349		Transkriptionsregulator, TetR-Familie	2409142-49	TTAAACTT	for	N27
<b><u>Hypothetische Proteine</u></b>						
SACOL0045			52399-52406	CCAAAATT	rev	N2
SACOL0207			243752-59	CGGTAGAG	rev	N5
SACOL0304			338736-43	CAAATTTA	rev	N6
SACOL0644			675898-905	AGATTATC	rev	N8
SACOL0652			682208-15	CACTTTAA	for	N9
SACOL1858			1908720-27	TTTAGAAT	for	N19
SACOL2723			2795476-83	ACTAAAAA	for	N30
<b>Intergenische Insertionen</b>						
SACOL0026/0027			35929-36	TAATAAAG	for	N1
SACOL0702/0703			728388-95	AGTAAATC	for	N10
SACOL1099/1100	<i>/defI</i>	/Polypeptid-Deformylase	1110104-11	AGATAAAC	rev	N12
NWMN_1876/1877 <sup>c</sup>	<i>scn/chp</i>	Inhibitor des Komplementsystems / Chemotaxis inhibierendes Protein	2089846-53	AATAATTA	rev	N21
SACOL2202/2203		/ClpA-ähnliches Protein	2284782-89	AAAATATA	for	N24
SACOL2205/2206	<i>/rpsI</i>	/ ribosomales Protein S9	2288400-407	GTATTCTG	rev	N25
SACOL2339/2340	<i>/gltS</i>	DNA-3-methyladenine-Glycosylase /Natrium-Glutamat Symporter	2399578-85	TTGAACTT	for	N26

Legende: c) Insertionslokus bezogen auf *S. aureus* Newman, interne Nummer der Insertion: x bezogen auf SA137/93A bzw. SA137/93G und Nx bezogen auf SA1450/94

SA137/93A enthält unter anderem intragenische Insertionen in *opuD*, das für einen osmoregulierten Transporter kodiert, in SACOL1929, das für einen putativen TagH-ähnlichen ABC-Transporter kodiert, sowie zahlreiche intergenische Insertionen, von denen einige möglicherweise die Expression benachbarter Gene durch Insertion in der entsprechenden Promotorregion beeinflussen könnten (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.4: IS256-Insertionen, die nur in SA137/93A und SA137/93G detektiert wurden.

Insertionslokus bezogen auf <i>S. aureus</i> COL	Gen	Beschreibung des Insertionslokus	Lage des DRs im Insertionslokus	DR bezogen auf IR <sub>L</sub>	Orientierung im Genom	interne Nr. der Insertion
<b>Geninsertionen</b>						
<b><u>Prozessierung genetischer Information</u></b>						
SACOL1600	<i>comGB</i>	Kompetenzprotein	1632664-71	TAATATCA	rev	11
SACOL1859		regulatorischer DnaA-Inaktivator Hda, Deletion durch Rekombination zweier IS256-Elemente	1909725-32 1912134-41	CGAATATT TAATTCAA	for	17/ 42
<b><u>Metabolismus</u></b>						
SACOL2031	<i>nrgA</i>	Ammoniumtransporter	2090132-39	TCATGACG	rev	1
<b><u>Hypothetische Proteine</u></b>						
h1b-Phage <sup>d</sup>		Prophage integriert in Phospholipase C - Vorläuferprotein	2108815-22	TAAAAGTT	rev	41
SACOL0425		Membranprotein	428606-13	GAAACCGA	for	4
SACOL0648			678911-18	TCAAAAAT	for	21
SACOL2190			2271278-85	ATAATGAA	rev	36
SACOL2244			2312087-94	TCATTTGC	rev	5
<b>Intergenische Insertionen</b>						
SACOL2377/2378		/Transkriptionsregulator (AraC-Familie)	2436565-72	AGTGTGAA	for	3
SACOL0282/0283			323864-71	GACTAAAC	rev	9
SACOL0722/0723		Phosphattransporter / LysM-ähnliches Protein	747615-22	ACAATTTA	rev	12
SACOL2325/2326 *	<i>lysR/ fosB</i>	Transkriptionsregulator (LysR-Familie)/ Fosfomycin-Resistenz-Protein	2388839-46	GAATTTTT	rev	13
SACOL1171/1172 *			1178745-52	TGTTGACT	for	14
SACOL1002/1003	<i>spxA/ mecA2</i>	Transkriptionsregulator/ neg. Regulator von <i>mecA</i>	1011042-52	TAATGCTTT AA	for	15
SACOL2660/2661	<i>isaB/</i>	immundominantes Antigen B	2723394-401	ATTTTTAT	rev	16
SACOL2188/2189	<i>lacR/</i>	Lactose-Phosphotransferase-Repressor/ Transkriptionsregulator (Sir2-Familie)	2270092-99	GTAAAAAC	for	18
SACOL1169/1170		Fibronectin-Bindeprotein-Vorläuferprotein/	1177755-62	ATTTTTTG	rev	22
SACOL1282/1283	<i>proS/ polC</i>	Propyl-tRNA-Synthase/ DNA-Polymerase III	1293133-40	AAAATGAC	for	24
SACOL0485/0486		Staphylokokken-Tandem-Lipoprotein	487494-501	GTTAGTTT	for	29
SACOL1812/1813 *	<i>rot/</i>	Toxin-Repressor/	1869153-60	AAATATAT	rev	31
SACOL0441/0442		Integrase/Enterotoxin	445712-19	GTGATGCG	rev	32

Legende: c) Insertionslokus bezogen auf *S. aureus* Newman, interne Nummer der Insertion bezogen auf SA137/93A bzw. SA137/93G,\*) voraussichtliche Beeinflussung der Promotorregion benachbarter Gene durch die Insertion von IS256

**Tabelle 4.5: IS256-Insertionen, die nur in SA137/93A detektiert wurden.**

Insertionslokus bezogen auf <i>S. aureus</i> COL	Gen	Beschreibung des Insertionslokus	Lage des DRs im Insertionslokus	DR bezogen auf IR <sub>L</sub>	Orientierung im Genom	interne Nr. der Insertion
<b>Geninsertionen</b>						
<b><u>Metabolismus</u></b>						
SACOL1384	<i>opuD</i>	osmoregulierter Transporter, BCCT-Familie	1389315-22	TAAAGCTG	rev	A5
<b><u>Hypothetische Proteine</u></b>						
SACOL0131			147539-46	TCATCTAG	for	A8
SACOL1929		TagH-ähnlicher ABC-Transporter (Teichonsäure-translokation)	1994146-53	TAATTACT	for	A6
<b>Intergenische Insertionen</b>						
tRNA/ <u>SACOL0019</u> *	tRNA- Asp/ <i>yycF</i>	/Responseregulator	24894-901	ATAAAGAA	for	A1
<u>SACOL0078/0079</u> *	<i>plc/</i>	1-Phosphatidyl-inositol-Phosphodiesterase/ Staphylokokken-Tandem-Lipoprotein	89340-47	TAAATATA	for	A2
SACOL0720/ 0721	<i>vraG/</i>	ABC-Transporter (Permease)	745231-38	AAAATAAA	for	A3
SACOL0772/ 0773	<i>/pabA</i>	posttranskriptionaler Regulator (exsB) / Paraaminobenzoat-Synthase	793549-56	TAAAAAAA	for	A4
<u>SACOL2013/2014</u> *		/ Phagenterminase	2074224-31	TGATATAG	for	A7
SACOL0316/ 0317	<i>/geh</i>	/ Lipase-Vorläufer	352616-23	TTAGTATC	for	A9
SAP101A_018/ 020 <sup>e*</sup>		/ Antiseptika-Resistenz-Protein	8865-72	CAATTTCT	rev	A10

**Tabelle 4.6: IS256-Insertionen, die nur in SA137/93G detektiert wurden.**

Insertionslokus bezogen auf <i>S. aureus</i> COL	Gen	Beschreibung des Insertionslokus	Lage des DRs im Insertionslokus	DR bezogen auf IR <sub>L</sub>	Orientierung im Genom	interne Nr. der Insertion
<b>Geninsertionen</b>						
<b><u>Regulation</u></b>						
SACOL2352	<i>tcaA</i>	Teicoplanin-Resistenz assoziiertes Protein	2412311-18	ATTCACCT	rev	7
<b><u>Hypothetische Proteine</u></b>						
SACOL1071		Chitinase-ähnliches Protein	1080849-56	AAATTTAAA	rev	26
<b>Intergenische Insertionen</b>						
SACOL1278/ 1279	<i>frr/uppS</i>	ribosomales Recycling-Protein/UDP-Pyrophosphat-Synthase	1288082-89	CATTTCTG	for	8
SACOL1733/ 1734	<i>/gapA2</i>	/Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	1764961-68	ATGTTTTT	rev	19

Legende beider Tabellen: e) Insertionslokus bezogen auf Plasmid SAP101A, \*) voraussichtliche Beeinflussung der Promotorregion benachbarter Gene durch die Insertion von IS256, interne Nr. der Insertion: x bezogen auf SA137/93A bzw. SA137/93G und Ax bezogen auf Insertionen, die nur in SA137/93A vorkommen.

**Tabelle 4.7: Sequenzen der IS256-Insertionsstellen, bei denen Promotorregionen benachbarter Gene durch die Insertion beeinflusst werden könnten.**

Insertion	Sequenz mit potentiellen Promotoren des betroffenen Gens	Mögliche Auswirkung der Insertion
<i>lysR</i> / <i>fosB</i>	AAAATTAATGACGTCATTTCAAAA <b>TCGATA</b> CAAAAATAATTTA T <b>TATAAA</b> AATTCAGTCAA...<IS256>...TTTATC <b>AAAAATTC</b> TAA GAAAGAAGTGAAGCAGATG	Inaktivierung des Promotors von <i>fosB</i> in SA137/93A und SA137/93G
<u>SACOL1171</u> / <u>SACOL1172</u>	CAATTGAACATCCTTACTTTAGCTTTATATCTTTATTTCAAGTC ATGTTTCAACTATTTTAATGAATTAACA <b>TATATT</b> ATAAGGAG <b>TCAACA</b> AGTCAA...<IS256>...TTTATC <b>AGTCAACA</b> TCATG	Inaktivierung des Promotors von SACOL1171 in SA137/93A und SA137/93G
<i>rot</i> / <u>SACOL1813</u>	TAAAAATCAATGCGTATCTTTTTTGAAG <b>AAATATATGATAAA</b> ... >IS256>...TTGACT <b>AAATATAT</b> GTAGAATTG <b>TTGCAA</b> TTTAATG GTAATATTGA <b>TATATT</b> TTCTTTGTATATAAAATTATAAAATTAAT ATGTAATAGAGTGATTTGTTTTATGACTATTATCTTATTTCTA AATATTAACCTCTATTGATTATTGGTTTTTATACTTATTTAATTT TATTCAACTTTGACAATTGAATAGAAAGCAAGTTTATTTACT TGTAGTTTTATGCATAAGTTAGCACATACAAGTTTTGGGATTGT TGGGATGTTTGTAAACTTGTATAGTAGCTAAATATGTGATTA TTAATTGGGAGATGTTTAGCATG	potentielle Abschwächung des Promotors von <i>rot</i> durch Insertion an Position -53 in SA137/93A und SA137/93G (Vergleich mit Benson et al., 2014)
tRNA-Asp / <i>yycF</i>	GACATCCTGTGATTTTTTACACAAACATAAACG <b>ATAAAGAAGAT</b> <b>AAA</b> ...>IS256>...TTGACT <b>ATAAAGAA</b> CAAAAAATGA <b>TAAAA</b> TAA TATTAATGATTTAAGAAAAGAGGTTTATGCAAAATG	Bildung eines stärkeren Hybridpromotors führt zur Überexpression von <i>yycF</i> in SA137/93A (Jansen et al., 2007)
<u>SACOL0078</u> / <u>SACOL0079</u>	TGAAATTT <b>TTGATA</b> ATATTAAAGTGAAAAAGTGT <b>TATAAA</b> TTGA <b>TAAATATA</b> GATAAA...>IS256>...TTGACT <b>TAAATATAT</b> GTAAAT AACAAAAACAATCATTTTAAAAAGAAGAGAGTTGTAAGATG	Inaktivierung des Promotors von SACOL0079 in SA137/93A
<u>SACOL2013</u> / <u>SACOL2014</u>	TATAATAAAATGATTTAAGAAAAGGGAGAAAAATGGATAATAT AAATAAAAAATGAAAAATTTTCGTGTT <b>TTGTAA</b> ACAATTGCTATTA <b>CTATATCA</b> AGTCAA...<IS256>...TTTATC <b>CTATATCAT</b> TTATTT TAAATTTTGGGTTG	Inaktivierung des Promotors von SACOL2013 in SA137/93A
<u>SAP101A_018</u> / <u>SAP101A_020</u>	ATTAATTTTAAATGGTTCTACTTTTTTATTATTAAGTAAATTA TAAAAG <b>CAATTTCTGATAAA</b> ...>IS256>...TTGACT <b>CAATTTCT</b> TAAATTAATA <b>TATGAT</b> ATACCTATATCTAATAATTTATTAGTA TTAATAAACCTTGAAAGGATGATTAAGTATGATG	Verstärkung des Promotors von SAP101A_018 in SA137/93A

Legende: Startkodon, **Direct Repeat**, **potentielle -10-Region**, **potentielle -35-Region**, betroffenes Gen, **IS256**, TSP

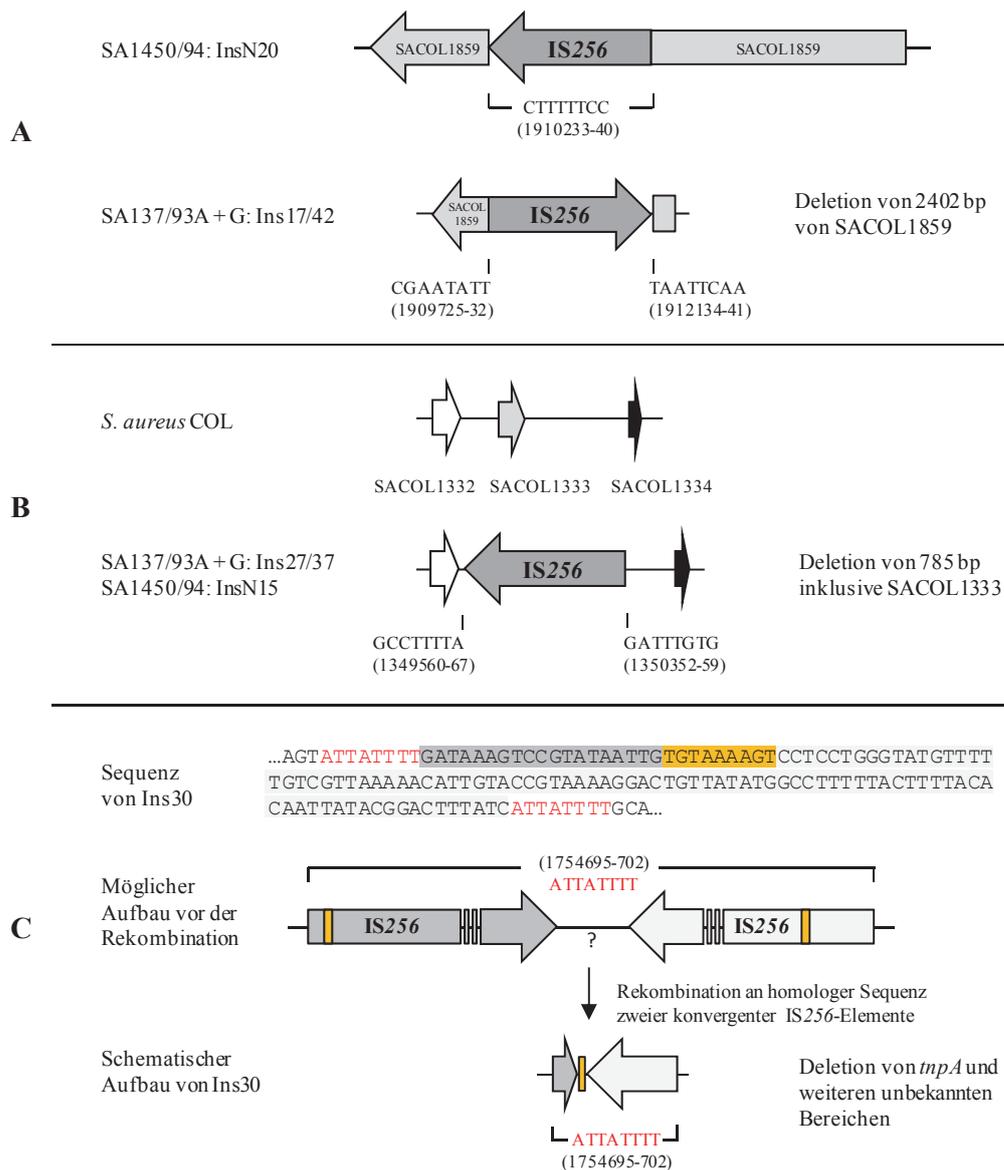
Wie bereits in vorangegangenen Studien von Jansen et al. (2007) gezeigt wurde, führte die IS256-Insertion in der Promotorregion von *yycF* in SA137/93A zur Bildung eines

Hybridpromotors. Die Überexpression des essentiellen Zwei-Komponentenregulations-systems YycFG (WalKR) trug folglich zur erhöhten Vancomycin-Resistenz von SA137/93A bei (Jansen et al., 2007). Außerdem wurden in SA137/93A IS256-Insertionen in den Promotorregionen von SACOL0079, SACOL2013 und SAP101A\_018 detektiert. Die Insertion von IS256 vor dem Gen SAP101A\_018, das für ein hypothetisches Protein kodiert, könnte zur Bildung eines Hybridpromotors führen und die Expression dieses Gens steigern. Die Untersuchung der Insertionen vor *fosB*, SACOL1171, SACOL0079 und SACOL2013 zeigte, dass die Insertionen möglicherweise zur Zerstörung bzw. Abschwächung des jeweiligen Promotors geführt haben könnten (Tabelle 4.7). Die Abschwächung des Promotors von *rot* konnte nur aufgrund des Vergleiches der IS256-Insertion mit der Insertion in *S. aureus* USA500 (Benson et al., 2014) angenommen werden.

In SA137/93G lag keine Insertion in der Promotorregion von *yycF* vor. In diesem Stamm führte die Inaktivierung von *tcaA* durch IS256 zur erhöhten Vancomycin-Resistenz (Maki et al., 2004; Jansen et al., 2007). Eine weitere IS256-Insertion war in SACOL1071 lokalisiert, das für ein Chitinase-ähnliches Protein kodiert, welches als hydrolytisches Enzym fungieren könnte. Die beiden zusätzlichen intergenischen Insertionsstellen in SA137/93G dürften keinen Einfluss auf die Expression von *uppS* beziehungsweise von SACOL1733 haben, da die Insertionen zu weit von den Promotorregionen des jeweiligen Gens lokalisiert sind.

In den drei Genomen von *S. aureus* ST247 führte die Anwesenheit multipler Kopien von IS256 zu mehreren genomischen Rearrangements, was die gesteigerte Variabilität bzw. Instabilität des Genoms durch die Anwesenheit von IS256 verdeutlicht. Die Abbildung 4.3 zeigt alle detektierten genomischen Rearrangements. Alle drei Stämme enthalten die Insertion Ins27/37 (InsN15). Diese Insertion ist gekennzeichnet durch zwei verschiedene DRs an den Enden von IS256, was darauf hinweist, dass diese Insertion wahrscheinlich durch eine Rekombination zweier benachbarter IS256-Insertionen entstanden ist, die gleichzeitig die Deletion von SACOL1333 und den angrenzenden Bereichen (785 bp) verursachte (Abbildung 4.3B). Ein weiteres Beispiel für ein genomisches Rearrangement zeigt Abbildung 4.3A. In SA1450/94 lag eine Insertion von IS256 in SACOL1859 an Position 1910233-40 mit reverser Orientierung vor. In SA137/93A und SA137/93G hingegen wurde eine Insertion mit zwei verschiedenen DRs von Position 1909725-32 bis 1912134-41 (Ins17/42) mit einer „forward“ Orientierung detektiert. In diesem Fall führte die Rekombination zweier IS256-Elemente zur Deletion eines 2402 bp-Fragments von SACOL1859, das für ein hypothetisches Protein kodiert, welches höchstwahrscheinlich als regulatorischer DnaA-Inaktivator Hda fungiert. Die Insertion Ins30 spiegelt ein weiteres genomisches Rearrangement in allen 3 *S. aureus* Stämmen wieder (Abbildung 4.3C). Diese Insertion setzt sich aus zwei verschiedenen langen

Fragmenten der linken IRs zweier gegenläufiger IS256-Elemente zusammen, wobei *tnpA* deletiert wurde. Interessanterweise wurde dabei weder genomische DNA außerhalb des IS256 deletiert, noch lagen an den Enden der Insertion verschiedene DRs vor. Hier könnte vorher eine Insertion eines Transposons vorgelegen haben, welches eventuell durch eine homologe Rekombination an der homologen Sequenz von 9 bp (orange in Abbildung 4.3C dargestellt) deletiert wurde.



**Abbildung 4.3: Genomische Rearrangements verursacht durch IS256.** **A)** Schematische Darstellung der Insertionen Ins17/42 im Vergleich zu InsN20. **B)** Schematische Darstellung der Insertion Ins27/37 bzw. InsN15 im Vergleich zu *S. aureus* COL. **C)** Sequenz und schematische Darstellung der Insertion Ins30 (oben und unten), sowie die schematische Darstellung des möglichen Aufbaus vor der Rekombination (mitte) an der homologen Region (orange). Die 8-bp Direct Repeats sind in schwarz (A+B) bzw. rot (C) dargestellt und die Zahlen geben die Insertionsstelle von IS256 bezogen auf *S. aureus* COL an.

Die Untersuchung der DRs aller 67 Insertionen zeigte, dass IS256 vorrangig in AT-reichen Regionen inserierte. Alle DRs wiesen einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 23,5% auf. Ein spezifisches Motiv innerhalb der sogenannten Target Site konnte nicht identifiziert werden. Das Alignment aller 67 DRs mit dem Online-Tool GLAM2 (<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/glam2.cgi>) ergab die folgende Weight Matrix (Abbildung 4.4).

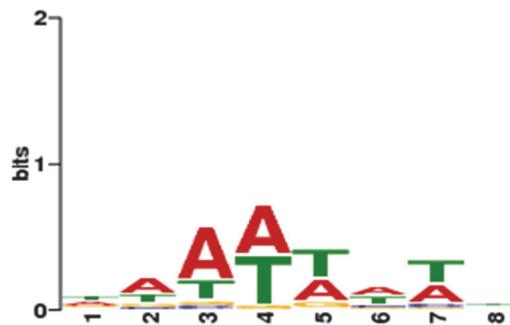


Abbildung 4.4: Weight Matrix aller 67 Direct Repeats.

#### 4.1.2 Insertionen weiterer IS-Elemente

Die Analyse der Insertionsstellen von IS1181, IS431mec, IS1272 und IS1272-Verwandten im Vergleich zu IS256 zeigte, dass es sich um weniger aktive IS-Elemente handelte, da die Insertionsstellen sich in allen drei ST247-Stämmen nur geringfügig unterschieden. Außerdem fiel auf, dass es sich bei allen genannten IS-Elementen ausschließlich um intergenische Insertionsstellen handelte, die keinen oder eventuell nur einen sehr geringen Einfluss auf die Genexpression benachbarter Gene hatten, da diese Gene in über 90% der Fälle konvergent zum IS-Element ( $\rightarrow\leftarrow$ ) ausgerichtet waren. Alle detektierten Insertionen sind in Tabelle 4.8 aufgeführt. IS1181 kam mit 5 Kopien in SA1450/94 und mit 7 Kopien in SA137/93A und SA137/93G vor. Die Insertionsstellen von IS1272 und IS1272-Verwandten waren in allen drei Stämmen identisch und entsprachen den Insertionen in *S. aureus* COL. Wie bereits von Archer et al. (1996) gezeigt wurde, wiesen die IS1272-Insertionen keine flankierenden DRs auf. Außerdem wurden verschiedene Insertionsstellen von IS431mec (ähnlich IS257) detektiert. Dieses IS-Element wurde bisher sehr häufig mit Antibiotikaresistenzen gegenüber  $\beta$ -Laktamen, Trimethoprim, Bleomycin, Tetracyclin, Mupirocin, Quecksilber oder auch Cadmium in Verbindung gebracht (Rouch und Skurray, 1989; Morton et al., 1995; Oger et al., 2003) und ist häufig die Ursache für die Integration vollständiger Plasmide in andere Chromosomen oder für den Transfer Plasmid-kodierter Gencluster (Byrne et al., 1991; Stewart et al., 1994). SA1450/94 enthält eine Kopie von IS431mec am Anfang der SCCmec. SA137/93A enthält an dieser Stelle ein Insertion des Plasmids pUB110, das durch zwei

IS431*mec*-Elemente flankiert wird und, wie es bereits von Sugiyama et al. (1996) beschrieben wurde, ein 8-bp DR (GATTAGAT) an den Enden des integrierten Plasmids aufweist. In SA137/93G verursachte IS431*mec* die große Deletion, die die gesamte SCC*mec* und chromosomale Bereiche umfasste (Reipert et al., 2003). Außerdem wurden in SA137/93A zwei Kopien von IS431*mec* auf dem Plasmid detektiert, die die Quecksilber-Resistenzgene flankieren.

**Tabelle 4.8: Intergenische Insertionsstellen weiterer IS-Elemente in den drei ST247-Stämmen.**

Nr.	Lage des DRs im Insertionsloкус bezogen auf <i>S. aureus</i> COL	DR bez. auf IR <sub>L</sub>	Orientierung im Genom	Info
<b>IS1181</b>				
1	553224-31	TATTA AAA	rev	<i>rply-pth</i>
2	711879-86	AAAATAAA	rev	SACOL0687-SACOL0688
3*	1263174-81	GTTTTTAA	rev	<i>ffh-rpsP</i>
4	1972872-1974435	GTAAACA / AAAAGAAA	for	wie SACOL1918, keine DRs
5	2226431-2227943	TAAAAAAA	for	wie SACOL2155; truncated <i>tnpA</i>
6	2564814-21	TAAATTAA	for	<i>sarU/galU</i>
7*	2680737-46	GATTTTTT	rev	<i>fdaB/mqo2</i>
<b>IS1272 und IS1272-related</b>				
1	1452885-1453277		rev	IS1272-related, truncated, 393 bp
2	1779634-1781285		rev	IS1272-related, 1652 bp
3	1887817-1889426		for	IS1272-related, 1610 bp
4	2253786-2255410		for	IS1272-related, 1625 bp
5	42958-44481		rev	IS1272, SCC <i>mec</i> , 1524 bp
6	1436659-1436955		for	IS1272-related, truncated, 297 bp
7	2414971-2415327		for	IS1272-related, truncated, 357 bp
<b>IS431<i>mec</i> in SA1450/94</b>				
1ND	36286-93 bis 37084-91	GAAAATAA / CATAATAC	rev	SCC <i>mec</i> , Deletion von 792 bp (HMG-CoA-Synthase + Hypoth. Protein)
<b>IS431<i>mec</i> in SA137/93A</b>				
1A	36286-93	GAAAATAA / GATTAGAT	rev	SCC <i>mec</i> , integriertes pUB110
2	38121-28	GATTAGAT / AGTTTTTC	rev	SCC <i>mec</i> , integriertes pUB110
3	22251-58/ 21455-62 °	AAAATTCT / AGAATTAA	rev	Plasmid
4	29346-53/ 28548-55 °	CTATAAAA / CCTAAAAT	rev	Plasmid
<b>IS431<i>mec</i> in SA137/93G</b>				
1G	36286-93 bis 137832-39	GAAAATAA / ATAAATTT	rev	große Deletion von 100748 bp

Legende: e) Insertionsloкус bezogen auf Plasmid SAP101A, \* in *S. aureus* SA1450/94 nicht vorhanden.

## 4.2 *rsbU* – ein Hotspot für spontane Insertionen von IS256 in *S. aureus*

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass, während des Versuchs ein temperatursensitives Plasmid (pMGS100-Derivate, Cm<sup>R</sup> (Fujimoto und Ike, 2001)) bei 45°C in Anwesenheit von 20 µg/ml Chloramphenicol in das Genom des SigB-positiven Stammes *S. aureus* SA137/93G zu integrieren, vermehrt weiße Kolonien auf dem Agar (TSA) selektiert wurden (Abbildung 4.5A), die einem SigB-negativen Phänotyp ähnelten. Nach einer Langzeit-Inkubation (bis zu 6 Tagen) von SA137/93G pMGS100 bei 45°C auf TSA mit 40 µg/ml Chloramphenicol entstanden an einigen *rsbU*-positiven gelben Kolonien weiße Papillen (Abbildung 4.5B). Untersuchungen ergaben, dass einige dieser weißen Mutanten Punktmutationen im Gen *rsbU*, welches für den positiven Regulator des Sigmafaktors SigB kodiert (Palma und Cheung, 2001), aufwiesen. Der Großteil der weißen Mutanten enthielt jedoch eine Insertion von IS256 in *rsbU*, die durch 8-bp DRs flankiert wurde. Die Abbildung 4.7 zeigt unter anderem die Insertionsstellen von IS256 in *rsbU*, die in den Vorarbeiten in den weißen Mutanten SA137/93G wG1, wG2, wG3, wG4 und wG5 detektiert wurden.

### 4.2.1 Selektion weißer Kolonien bei verschiedenen *S. aureus*-Stämmen

Um mögliche Ursachen für die Selektion dieser *rsbU*::IS256 Insertionsmutanten von *S. aureus* SA137/93G aufzuklären, wurden in dieser Arbeit weitere *S. aureus*-Stämme in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Antibiotika nahezu aller Antibiotikaklassen, bei verschiedenen Temperaturen und in Abwesenheit Resistenz-vermittelnder Plasmide auf das Auftreten weißer Kolonien untersucht. Hierfür wurden sechs SigB-positive *S. aureus*-Stämme ausgewählt. Drei *S. aureus*-Stämme des Norddeutschen Epidemiotyps (ST247: *S. aureus* SA1450/94, SA137/93A, SA137/93G), sowie der MRSA-Stamm des Sequenztyps 239 (Reipert et al., 2003; Coombs et al., 2004; Cookson et al., 2007) sind gekennzeichnet durch eine Vielzahl an IS256-Insertionen im Genom. Die VISA-Stämme SA137/93A, SA137/93G und Mu50 weisen eine für den VISA-Phänotyp charakteristische Verdickung der Zellwand auf (Cui et al., 2000; Cui et al., 2003; Reipert et al., 2003). *S. aureus* HG001 wurde als Kontrollstamm verwendet, da dieser Stamm weder eine verdickte Zellwand aufweist, noch IS256 im Genom enthält.

Zunächst wurden, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, die MHK-Werte der verwendeten Antibiotika für die in diesem Versuch zu untersuchenden *S. aureus*-Stämme bestimmt (Tabelle 4.9).

**Tabelle 4.9: MHK-Bestimmung verschiedener *S. aureus*-Stämme nach 24 h (48 h).**

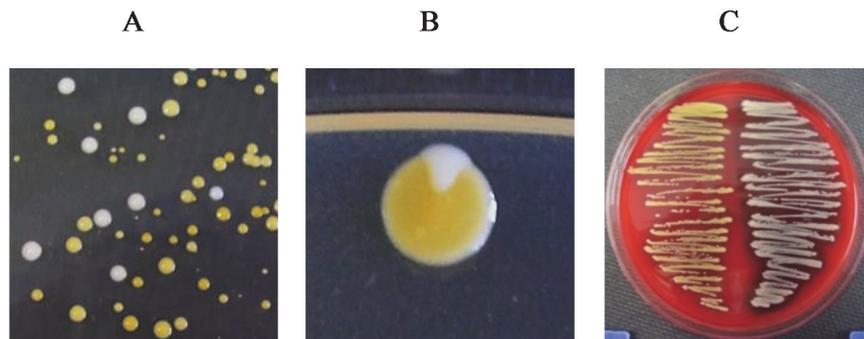
Antibiotikum	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
	SA137/93G	SA137/93A	SA1450/94	ST239-BW	HG001
Chloramphenicol	6	12	6 (12)	12	6
Linezolid	1,5	1,5	1,5	1,5-3	1,5
Spectinomycin	> 32768	> 32768	8192	> 16384	64
Tigecyclin	0,3 (0,6)	nd	0,075	nd	nd
Erythromycin	8192	nd	8192	nd	nd
Amikacin	4	nd	nd	nd	nd
Gentamicin	32-64	nd	nd	nd	nd
Vancomycin <sup>a)</sup>	4-8	nd	2	nd	nd
Oxacillin	0,5	nd	nd	nd	nd
Ciprofloxacin	16	nd	16	nd	nd
Rifampicin	512	nd	nd	nd	nd

a) MHK-Bestimmung wurde in halbkonzentriertem Müller-Hinton-Bouillon durchgeführt, mit der Ausnahme von Vancomycin (BHI-Medium). nd – nicht detektiert

Wie aus Tabelle 4.9 hervorgeht, wiesen sowohl die drei ST247-Stämme als auch der ST239-Stamm eine Resistenz gegenüber Spectinomycin auf, die auf die Expression einer O-Adenylyltransferase (kodiert durch *spc* auf Tn554 (Murphy, 1985)) zurückzuführen ist, die das Antibiotikum durch Adenylierung inaktiviert. Die Erythromycin-Resistenz von SA137/93G und SA1450/94 konnte ebenfalls durch die Integration des Transposons Tn554 (Murphy et al., 1985) begründet werden, da es das Gen *ermA* trägt, das für eine Erythromycin-Methyltransferase kodiert (Murphy, 1985). Bei diesen beiden Antibiotika mussten sehr hohe Mengen an Festsubstanz direkt in den autoklavierten Agar gegeben werden, um eine subinhibitorische Konzentration  $\leq 0,5 \times$  MHK zu erreichen. Die weitere Versuchsdurchführung verlief so wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben.

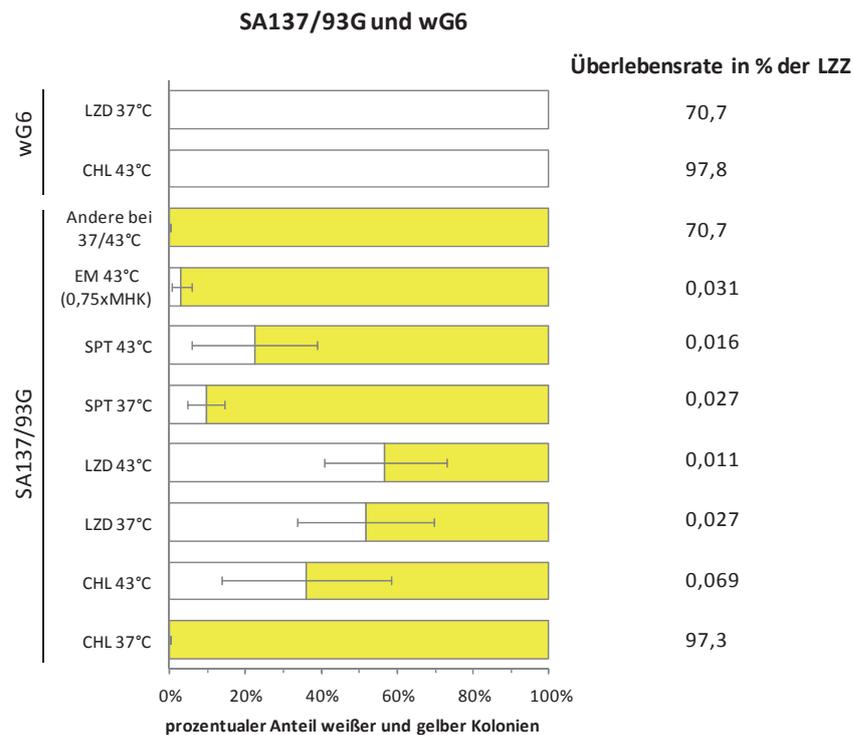
#### 4.2.1.1 Untersuchungen von *S. aureus* SA137/93G

In drei voneinander unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von *S. aureus* SA137/93G mit 3  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol (0,5  $\times$  MHK) bei 43°C zur Selektion weißer Kolonien mit einem prozentualen Anteil von 36% auf Agarplatten führte (Abbildung 4.5A, Abbildung 4.6). Dieses Phänomen konnte jedoch bei 37°C in Anwesenheit von 3  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol nicht detektiert werden. In Anwesenheit der Proteinbiosynthese-Inhibitoren Spectinomycin und Linezolid ( $\leq 0,5 \times$  MHK) wurden sowohl bei 37°C als auch bei 43°C weiße Kolonien von SA137/93G selektiert.



**Abbildung 4.5:** A) Entstehung von weißen Mutanten von *S. aureus* SA137/93G auf TSA in Anwesenheit von 3 µg/ml Chloramphenicol bei 43°C. B) Weiße Papille an einer *rsbU*-positiven Zelle von *S. aureus* SA137/93G. C) Pigmentierung und Hämolyse der *rsbU*-positiven Insertionsmutante *S. aureus* HG001 G2 (links) im Vergleich zur weißen *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 W5 (rechts) auf Blutagar.

Abbildung 4.6 zeigt, dass in Anwesenheit von 0,75 µg/ml Linezolid (0,5 x MHK) bei beiden Temperaturen mehr als 50% der Kolonien eine weiße Farbe aufwiesen. In Anwesenheit von 16,4 mg/ml Spectinomycin ( $\leq 0,25$  x MHK) traten die weißen Kolonien bei 37°C mit einem prozentualen Anteil von 10% und bei 43°C mit einem prozentualen Anteil von 22% auf. Interessanterweise führte weder die Behandlung von SA137/93G mit entsprechenden Konzentrationen anderer Inhibitoren der Proteinbiosynthese (Tigecyclin, Erythromycin, Amikacin, Gentamicin), noch die Behandlung mit Inhibitoren der Zellwand-Biosynthese (Vancomycin, Oxacillin), mit Inhibitoren der RNA Polymerase (Rifampicin) oder mit Inhibitoren der DNA-Replikation (Ciprofloxacin) zur Selektion weißer Kolonien. Der vergleichsweise geringe Anteil weißer Kolonien nach Spectinomycin-Behandlung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass hier nur eine Spectinomycin-Konzentration von  $\leq 0,25$  x MHK verwendet werden konnte, da höhere Konzentrationen zur Präzipitation des Antibiotikums im Agar geführt hätten. Weitere Experimente zeigten, dass die Selektion weißer Kolonien in *S. aureus* SA137/93G ein konzentrationsabhängiges Phänomen darstellt, da in Anwesenheit von 0,25 x MHK von Chloramphenicol (43°C) und Linezolid (37°C) bzw. 0,125 x MHK von Spectinomycin (37°C) keine weißen Kolonien auf den entsprechenden Agarplatten detektiert werden konnten. Erhöhte Antibiotika-Konzentrationen von 0,75 x MHK (Tigecyclin, Erythromycin, Amikacin, Gentamicin, Vancomycin oder Ciprofloxacin (Tabelle 4.9)) führten nur in Anwesenheit von Erythromycin (6,1 mg/ml) bei 43°C zur Selektion weißer Kolonien (3,1%).



**Abbildung 4.6: Prozentualer Anteil weißer (weiße Balken) und gelber (gelbe Balken) Kolonien von *S. aureus* SA137/93G und SA137/93G wG6 nach der Behandlung mit 3 µg/ml Chloramphenicol (CHL), 0,75 µg/ml Linezolid (LZD), 16,4 mg/ml Spectinomycin (SPT), 6,1 mg/ml Erythromycin sowie mit anderen Antibiotika (Tigecyclin, Vancomycin, Oxacillin, Ciprofloxacin und Rifampicin (0,5 bzw. 0,75 x MHK)).** Jeder Balken stellt das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente dar, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen. Die Zahlen rechts neben den Balken geben den prozentualen Anteil der überlebenden Kolonien auf Antibiotika-haltigem Agar im Vergleich zur Lebendzellzahl (LZZ auf Antibiotika-freiem Agar entsprach 100%) an.

In einem weiteren Experiment (siehe Kapitel 3.7.1.2) wurde festgestellt, dass auch in Flüssigkulturen in Anwesenheit von Linezolid bzw. Chloramphenicol (0,5 x MHK) weiße Insertionsmutanten selektiert wurden. Bereits nach der ersten Passage (nach 48 h) der Antibiotika-haltigen Flüssigkultur, die anschließend auf Antibiotika-freien TSA ausgespatelt wurde, konnten weiße Kolonien von SA137/93G detektiert werden.

Die weißen Kolonien dieser Experimente wurden per PCR, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, auf IS256-Insertionen im *sigB*-Operon bzw. in *rsbU* untersucht. In 94% (17 von 18 weißen Kolonien) der weißen Kolonien von *S. aureus* SA137/93G lag eine Insertion von IS256 im *sigB*-Operon vor. Von diesen Insertionsmutanten enthielten 93% (16) eine IS256-Insertion am 3' Ende von *rsbU* und nur 1 Kolonie (7%) eine Insertion in *sigB* (SA137/93G wG12, DR: TTTGAAGC). Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass das 3' Ende von *rsbU* einen

Hotspot für spontane Insertionen von IS256 ist (Schreiber et al., 2013). Abbildung 4.7 zeigt die genauen Insertionsstellen von IS256 am 3' Ende von *rsbU* in den weißen Mutanten, die mit Chloramphenicol bei 43°C (wG6), sowie mit Linezolid (wG7, wG9) oder Spectinomycin (wG8, wG10, wG11) selektiert wurden. Bei den Untersuchungen zweier weißer Mutanten, die mithilfe von Erythromycin selektiert wurden, konnten vorerst keine Insertionen im *sigB*-Operon festgestellt werden.

```

start      ↵w7
1  GTGGAAGAAAT TTAAGCAACA TTATAAGGGT TTAAATGATG AAAGTTTAAAC GTGCCAAGAT AAAGTAGAAT TGATAAAAAA 80
81  GTGTGAGAAA TACTACTGACG AAGTGATTTCG TAAGGACGTC TTGCCTGAAG ACATTGTTCGA TATTCACAAA AACTATATAT 160
161 TGACGTTAAA CTTAACCGCT GAAGATGTGT TCAAGACATT AGATGTCTTA CAAGAAATCG TTAAGGCCTT TGGTTATAGT 240
241 TATCGAGATT ATCAAAGATT GGTAGATAAA CTTCAAGTTC ACGATAAAGA GATAGACTTA GCTTCTAGCT TACAACAAAC 320
321 AATGCTTAAA ACAGATATTC CACAATTTGA TAGTATTCAA ATTGGCGTTA TTTCAGTGGC GGCACAAAAA GTAAGTGAG 400
401 ATTATTTTAA TTTAATTGAC CATAACGATG GCACAATGAG CTTTGCTGTT GCAGATGTCA TTGGAAAAGG TATACCAGCT 480
481 GCTTTAGCAA TGAGTATGAT AAAGTTTGGC ATGGATTCCT ATGGACACTC ACAATTACCG AGTGATGGTT TAAAACGTTT 560
561 AAATCGTGTG GTTGAAAAGA ATATTAATCA AAATATGTTC GTCACAATGT TTTATGGTTT ATATGAAGAA ATGAACCATT 640
641 TATTGTATTG TAGTTCAGCT GGCATGAGC CTGGATATAT TTATCGCGCT GAAAAAGAAG AATTTGAAGA AATTCAGTT 720
721 AGAGGTAGAG TGTTAGGAAT CAGTTCACAA ACACGATATC AACACAAGA AATTCCAATA TACCTTGATG ATTTAATTAT 800
801 CATTTTAAAC GATGGTGTGA CTGAAGCTAG AAATAGTGAA GGTACCTTTA TAGATAAACA AAAACTTTTA GAATATATTA 880
881 AAAAAATAAA ACATATGCAC CCACAAGATA TTGTTCAAAT TATCTATGAA GCAATTTTAA AGCTTCAAAA CCCAAATAAA 96
      ↵w1      ↵w4      ↵w5
      ↵w9/      ↵w6↔      ↵w11      ↵w2↔
      ↵w7↔ ↵w8↔ ↵w10/wS1 ↵w2/wN1 stop
961 AAAGATGATA TGACTATTTT GATTATAAAA AGAGTAAATT AA

```

**Abbildung 4.7: Lokalisierung aller IS256 - und IS256-*spc* (rekombinant) - Insertionen in das *rsbU* Gen in *S. aureus* SA137/93G (wG1 – wG11), *S. aureus* HG001 (W1, W5, W7), *S. aureus* SA1450/94 (wN1, wN2) und *S. aureus* ST239-BW (wS1).** Die 8-bp DRs, die während der Transposition generiert werden, sind durch Unterstreichungen markiert. Die Pfeile vor den Stammnamen geben die Richtung der Transposase nach der Insertion an.

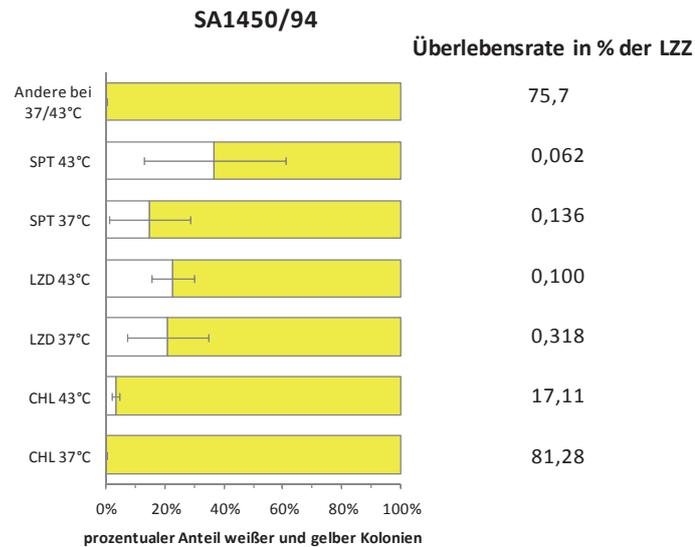
Auffällig war, dass die Überlebensrate der SA137/93G-Zellen unter den Bedingungen, bei denen weiße Kolonien selektiert werden konnten, im Vergleich zu den Bedingungen, bei denen keine weißen Kolonien selektiert wurden, sichtlich reduziert war (Abbildung 4.6). Hier musste ein wesentlich größeres Inokulum (z.B. 100 µl einer 10<sup>-2</sup>-Verdünnung, anstatt 100 µl einer 2\*10<sup>-6</sup>-Verdünnung) eingesetzt werden, um ≤ 200 koloniebildende Einheiten auf den entsprechenden Agarplatten zu erhalten. Die durchschnittliche Überlebensrate der SA137/93G-Zellen unter den Bedingungen, bei denen keine weißen Zellen selektiert wurden, betrug 70,7%, wobei 100% der Lebendzellzahl auf Antibiotika-freiem Agar entsprach. Die Überlebensrate bei selektiven Bedingungen hingegen lag bei < 0,1% (siehe Kapitel 3.7.1.3), was auf eine deutlich geringere Fitness der *rsbU*-positiven Wildtyp-Zellen unter diesen Bedingungen hinwies.

Um zu zeigen, dass der Auslöser für die Selektion weißer *rsbU*::IS256 Insertionsmutanten eine höhere Fitness der *rsbU*-negativen Zellen unter den beschriebenen Bedingungen war, wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Im ersten Versuch wurde die Überlebensrate der *rsbU*-negativen Insertionsmutante *S. aureus* SA137/93G wG6 nach der Behandlung mit Chloramphenicol bei 43°C bzw. Linezolid bei 37°C in Bezug zur Lebendzellzahl auf Antibiotika-freiem Agar (100%) bestimmt (siehe Kapitel 3.7.1.3). Wie erwartet, waren in drei voneinander unabhängigen Versuchen 71% der *rsbU*-negativen Zellen von *S. aureus* SA137/93G wG6 in der Lage auf Linezolid-haltigem Agar Kolonien zu bilden. Im Vergleich dazu, überlebten nur 0,03% der Wildtypzellen von *S. aureus* SA137/93G auf Linezolid-haltigem Agar bei 37°C. Auf Chloramphenicol-haltigem Agar bildeten 98% der *rsbU*-negativen Zellen von *S. aureus* SA137/93G wG6 Kolonien, während nur 0,07% der Zellen von SA137/93G Kolonien bildeten (Abbildung 4.6). In einem weiteren Experiment wurde eine Mischkultur mit einem Inokulum aus 50% weißen wG6-Zellen und 50% gelben Wildtyp-Zellen in TSB-Medium mit 3 µg/ml Chloramphenicol angeimpft, bei 43°C inkubiert und nach 24 h passagiert (siehe Kapitel 3.7.1.2). Bereits nach zwei Passagen konnten auf Antibiotika-freiem TSA nur noch weiße Kolonien detektiert werden, was zeigte, dass die Population des SigB-negativen Phänotyps die *rsbU*-positiven Zellen des Wildtyps verdrängt hatten. Die detektierten weißen Kolonien setzten sich dabei aus den wG6-Zellen und aus den neu entstandenen SigB-negativen Mutanten des Wildtyps zusammen.

Diese Daten zeigen, dass bei *S. aureus* SA137/93G nur Hitzestress in Kombination mit Chloramphenicol, Erythromycin sowie Linezolid und Spectinomycin bereits bei physiologischen Temperaturen eine konzentrationsabhängige Selektion SigB-negativer Mutanten verursachten. Der Auslöser dieser Selektion war der deutliche Überlebensvorteil der SigB-negativen Insertionsmutanten im Vergleich zum *rsbU*-positiven Wildtyp.

#### 4.2.1.2 Untersuchungen von *S. aureus* SA1450/94

Um zu untersuchen, ob die Selektion weißer Kolonien unter den oben genannten Bedingungen auf den VISA-Phänotyp von SA137/93G zurückzuführen war, wurden die Experimente unter den gleichen Bedingungen mit dem Vancomycin-sensitiven MRSA-Stamm SA1450/94 (ST247) durchgeführt (Cookson et al., 2007), der ebenfalls zahlreiche Insertionen von IS256 im Genom enthält. Interessanterweise konnten, sowohl bei Hitzestress in Kombination mit Chloramphenicol, Linezolid oder Spectinomycin (jeweils 0,5 x MHK), als auch bei 37°C in Anwesenheit von Linezolid oder Spectinomycin weiße Mutanten von *S. aureus* SA1450/94 selektiert werden (Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8: Prozentualer Anteil weißer (weiße Balken) und gelber (gelbe Balken) Kolonien von *S. aureus* SA1450/94 nach der Behandlung mit 3 µg/ml Chloramphenicol (CHL), 0,75 µg/ml Linezolid (LZD), 16,4 mg/ml Spectinomycin (SPT), sowie mit anderen Antibiotika (Tigecyclin, Vancomycin, Oxacillin, Ciprofloxacin und Rifampicin (0,5 x MHK)).** Jeder Balken stellt das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente dar, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen. Die Zahlen rechts neben den Balken geben den prozentualen Anteil der überlebenden Kolonien auf Antibiotika-haltigem Agar im Vergleich zur Lebendzellzahl (LZZ auf Antibiotika-freiem Agar entsprach 100%) an.

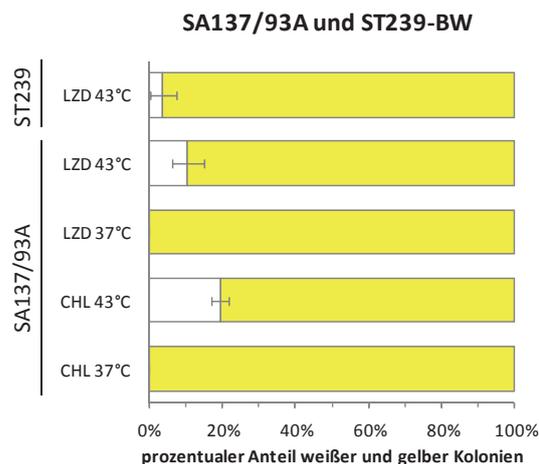
Wie Abbildung 4.8 zeigt, traten nach Inkubation in Anwesenheit von 3 µg/ml Chloramphenicol bei 43°C weiße Kolonien mit einer Frequenz von 3% auf. Diese Frequenz war um das 10-fache geringer als bei SA137/93G. In Anwesenheit von 0,75 µg/ml Linezolid (0,5 x MHK) traten die weißen Kolonien bei 37°C mit einem prozentualen Anteil von 21% und bei 43°C von 23% auf. Diese Frequenz war ungefähr um das 2-fache geringer als bei dem Stamm SA137/93G. Nach der Behandlung mit 4,1 mg/ml Spectinomycin (0,5 x MHK) wiesen bei physiologischen Temperaturen 15% und bei Hitzestress 37% der Kolonien von SA1450/94 eine weiße Farbe auf. Das vermehrte Auftreten weißer Kolonien in Anwesenheit von Spectinomycin bei SA1450/94 verglichen mit SA137/93G, lässt sich möglicherweise damit begründen, dass bei SA137/93G nur eine Spectinomycin-Konzentrationen von  $\leq 0,25$  x MHK verwendet werden konnte, was einen geringeren Selektionsstress für weiße Kolonien auslöste. Die Überlebensrate von SA1450/94 war unter den Bedingungen, bei denen weiße Kolonien selektiert wurden, ebenfalls deutlich geringer als unter den Bedingungen, bei denen keine weißen Kolonien selektiert wurden. Bei diesen Experimenten wurden zwei *rsbU*::IS256 Insertionsmutanten von *S. aureus* SA1450/94 nach der Behandlung mit Spectinomycin (wN1)

und Linezolid (wN2) selektiert (Abbildung 4.7). Demzufolge ist auch in *S. aureus* SA1450/94 das 3' Ende von *rsbU* ein Hotspot für IS256-Insertionen. Bei den Untersuchungen zweier weißer Mutanten, die mithilfe von Chloramphenicol selektiert wurden, konnten keine Insertionen im *sigB*-Operon festgestellt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Selektion weißer Kolonien nicht vom VISA-Phänotyp von SA137/93G abhängig war. VISA-Stämme waren jedoch sensitiver gegenüber dieser Art von Selektionsstress.

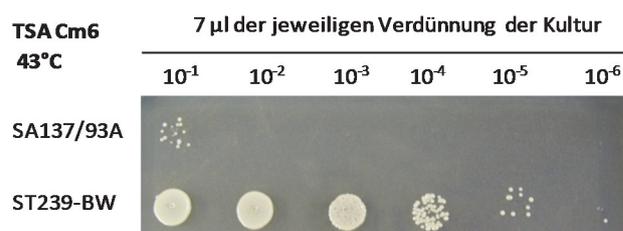
#### 4.2.1.3 Untersuchungen weiterer *S. aureus*-Stämme

Die Untersuchungen von *S. aureus* SA137/93A, dem Elternstamm von SA137/93G (Reipert et al., 2003), bestätigten die Ergebnisse von SA137/93G. Interessanterweise wies SA137/93A eine etwas höhere Resistenz gegenüber Chloramphenicol (MHK = 12 µg/ml) im Vergleich zu SA137/93G auf. Bei 43°C waren in Anwesenheit von 6 µg/ml Chloramphenicol (0,5 x MHK) 20% der überlebenden Kolonien durch eine weiße Koloniefarbe charakterisiert (Abbildung 4.9). Bei 37°C wurden keine weißen Kolonien selektiert. Bei 43°C in Anwesenheit von 0,75 µg/ml Linezolid wiesen 11% der Kolonie eine weiße Farbe auf. Entgegen den Erwartungen traten bei 37°C in Anwesenheit von Linezolid keine weißen Kolonien auf. Die Gründe dafür sind bisher unbekannt. Die Überlebensraten der SA137/93A-Zellen waren unter den selektiven Bedingungen ebenfalls vergleichbar mit denen von SA137/93G (< 0,1%, Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.9: Prozentualer Anteil weißer (weiße Balken) und gelber (gelbe Balken) Kolonien von *S. aureus* SA137/93A und ST239-BW nach der Behandlung mit jeweils 0,5 x MHK von Chloramphenicol (CHL) und Linezolid (LZD). Jeder Balken stellt das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente dar, wobei die Fehlerbalken der Standardabweichung entsprechen.**

Die Untersuchungen des MRSA-Isolates *S. aureus* ST239-BW, der ebenfalls zahlreiche IS256-Kopien im Genom enthält und Vancomycin-Sensitivität aufweist, zeigten, dass nur bei 43°C in Anwesenheit von 1,5 µg/ml Linezolid (0,5 x MHK) weiße Mutanten mit einer Frequenz von 3,8% selektiert wurden (Abbildung 4.9). Die Überlebensrate der ST239-BW-Zellen unter selektiven Bedingungen war mit < 5% geringer als unter nicht-selektiven Bedingungen. Bei diesen Experimenten konnte die weiße *rsbU*::IS256 Insertionsmutante *S. aureus* ST239-BW wS1 identifiziert werden, die die gleiche Insertionsstelle wie SA137/93G wG9 und wG10 enthält. Das 3' Ende von *rsbU* ist somit auch in diesem Stamm ein Hotspot für IS256-Insertionen. Im Gegensatz zu den drei *S. aureus*-Stämmen des Norddeutschen Epidemietyps war das Wachstum der *rsbU*-positiven Zellen von *S. aureus* ST239-BW in Anwesenheit von 6 µg/ml Chloramphenicol bei 43°C nicht gehemmt und entsprach der Kontrolle (ohne Antibiotikum), sodass hier keine weißen Kolonien selektiert wurden. Abbildung 4.10 zeigt den Wachstumsvergleich von *S. aureus* SA137/93A und ST239-BW in Anwesenheit von 6 µg/ml Chloramphenicol bei 43°C.



**Abbildung 4.10: Vergleich des Wachstums von *S. aureus* SA137/93A und ST239-BW auf TSA mit 6 µg/ml Chloramphenicol bei 43°C.**

Sowohl bei dem VISA-Stamm *S. aureus* Mu50 als auch bei dem MSSA-Stamm *S. aureus* HG001 konnten in Anwesenheit von Chloramphenicol bzw. Linezolid bei 37°C und 43°C keine weißen Kolonien detektiert werden. Die Überlebensraten der Zellen unter diesen Bedingungen waren vergleichbar mit den jeweiligen Lebendzellzahlen (ohne Antibiotikum). Die Untersuchungen von *S. aureus* Mu50, der eine verdickte Zellwand aufweist (Cui et al., 2000), wurden von der Masterstudentin Sarah van Alen durchgeführt. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass - unabhängig von der Dicke der Zellwand - in Abwesenheit von IS256 keine weißen Kolonien selektiert wurden. Bei der IS256-*spc* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 G2, die nur eine Kopie des rekombinanten IS256 im Genom enthielt, wurden ebenfalls keine weißen Kolonien selektiert.

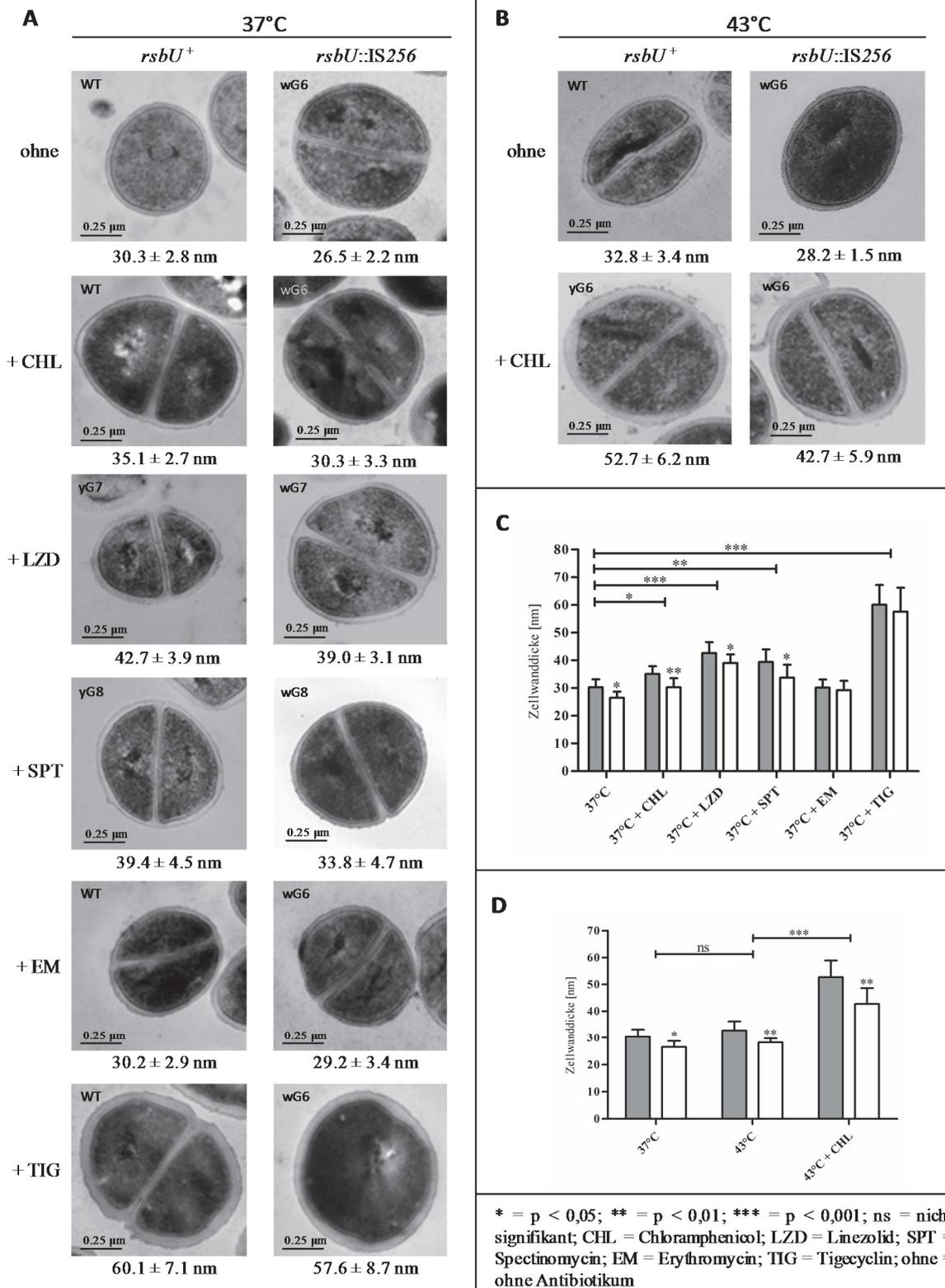
Abschließend gibt Tabelle 4.10 einen Überblick über die Charakteristika der getesteten *S. aureus*-Stämme und deren Fähigkeit unter bestimmten Bedingungen weiße Kolonien zu bilden.

**Tabelle 4.10: Übersichtstabelle der Charakteristika der getesteten *S. aureus*-Stämme.**

Stamm	Charakteristika					Selektion weißer Kolonien		
	klonaler Komplex (CC)	MRSA	VISA-Phänotyp	SigB-Aktivität	IS256-Vorhandensein	in Anwesenheit von Chloramphenicol bei 43°C	in Anwesenheit von Linezolid bei 37°C bzw. 43°C	
SA1450/94	8	+	-	+	+	+	+	+
SA137/93A	8	+	+	+	+	+	-	+
SA137/93G	8	-	+	+	+	+	+	+
ST239-BW	8	+	-	+	+	-	-	+
Mu50	5	+	+	+	-	-	-	-
HG001	8	-	-	+	-	-	-	-

#### 4.2.2 Untersuchung der Zellwanddicke einiger *S. aureus*-Stämme unter verschiedenen Bedingungen

Aus der Literatur geht hervor, dass die Proteinbiosynthese-Inhibitoren Chloramphenicol und Florfenicol in *S. aureus* eine Verdickung der Zellwand verursachen (Giesbrecht und Ruska, 1968; Blickwede et al., 2004), durch die der Protoplast - im Extremfall - so stark komprimiert werden kann, dass die Zelle stirbt. Weiterhin ist bekannt, dass sowohl Hitze, als auch die Anwesenheit von Linezolid zu einer erhöhten Expression von SigB führen (Kullik und Giachino, 1997; Senn et al., 2005). Da SigB die Expression von Proteinen, die in die Zellwandbiosynthese involviert sind (Bischoff et al., 2004; Meier et al., 2007), reguliert, könnte die erhöhte Expression von SigB eine zusätzliche Verdickung der Zellwand verursachen. Der Überlebensvorteil der weißen *rsbU::IS256* Insertionsmutanten in Anwesenheit von Chloramphenicol und Hitzestress, sowie in Anwesenheit von Linezolid bzw. Spectinomycin bei 37°C könnte möglicherweise durch das Vorhandensein einer dünneren Zellwand im Vergleich zum Wildtyp begründet sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (siehe Kapitel 3.9.2) sowohl die Zellmorphologie als auch die Zellwanddicken der weißen Insertionsmutanten *S. aureus* SA137/93G wG6, wG7, wG8 im Vergleich zu den dazugehörigen *rsbU*-positiven Stämmen yG6, yG7 und yG8, die jeweils der gleichen Antibiotika-Behandlung unterzogen wurden, charakterisiert (Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11: A/B: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *rsbU*-positiven SA137/93G-Zellen im Vergleich zu den entsprechenden *rsbU::IS256* Insertionsmutanten. Die Zellwanddicken sind unter den Bildern mit der Standardabweichung angegeben. C/D: Zellwanddicken der *rsbU::IS256* Insertionsmutanten (weiß) und der *rsbU*-positiven Zellen (grau). Die Sternchen geben die  $p$ -Werte an (zweiteiligen, ungepaarten t-Tests). Die Sternchen auf den Spitzen der weißen Balken geben die Signifikanz jedes Paares an. Die Sternchen auf den horizontalen Linien repräsentieren die Signifikanz unter verschiedenen Bedingungen.**

Zur Kontrolle wurden der *rsbU*-positive Wildtyp SA137/93G (WT) und die *rsbU*::IS256 Insertionsmutante SA137/93G wG6 sowohl bei 37°C und 43°C in Abwesenheit von Antibiotika, als auch bei 37°C in Anwesenheit der Proteinbiosynthese-Inhibitoren Chloramphenicol, Erythromycin und Tigecyclin (jeweils 0,5 x MHK) untersucht (Abbildung 4.11A). In Übereinstimmung mit Reipert et. al (2003) wurde bei dem unbehandelten VISA-Stamm SA137/93G (WT) bei 37°C eine Zellwanddicke von 30,3 nm detektiert. Die leichte Zellwandverdickung ist ein typisches Merkmal von *S. aureus*-Stämmen, die eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin aufweisen (Cui et al., 2000; Cui et al., 2003). Nach einer Inkubation bei 43°C in Abwesenheit von Antibiotika stieg die Zellwanddicke des *rsbU*-positiven Wildtyps auf 32,8 nm an, was auf einen leichten, jedoch nicht signifikanten Effekt der Temperatur auf die Zellwanddicke hinweisen könnte (Abbildung 4.11D). Das gleiche Phänomen konnte bei den Zellen der *rsbU*::IS256 Insertionsmutante wG6 festgestellt werden. Wichtig zu erwähnen ist, dass bei nahezu allen untersuchten Bedingungen die Zellwände der *rsbU*::IS256 Insertionsmutanten signifikant dünner waren als die der *rsbU*-positiven Kontrollen (Abbildung 4.11A-D). Nach der Behandlung mit Erythromycin und Tigecyclin konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede der Zellwanddicken zwischen *rsbU*-positiver und *rsbU*-negativer Zellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis verdeutlicht den Einfluss von SigB auf die Verdickung der Zellwand von *S. aureus*.

Nach der Inkubation mit Chloramphenicol bei 43°C wurde im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ein signifikanter Anstieg der Zellwanddicke ( $p < 0,001$ ) auf 52,7 nm bei dem *rsbU*-positiven Stamm yG6 und auf 42,7 nm bei der Insertionsmutante wG6 detektiert (Abbildung 4.11D). Die Behandlung mit Linezolid und Spectinomycin bei 37°C führte ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Zellwanddicken im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, der jedoch ein geringeres Ausmaß als bei Chloramphenicol hatte (Abbildung 4.11C). Die Zellen der *rsbU*::IS256 Insertionsmutanten wG7 (Linezolid-behandelt) wiesen mit 39,0 nm signifikant dünnere Zellwände auf als die gleichbehandelten *rsbU*-positiven Kontrollstämme yG7 (42,7 nm). Die Zellwanddicke der *rsbU*::IS256 Insertionsmutante wG8 (Spectinomycin-behandelt) war mit 33,8 nm ebenfalls signifikant geringer als die des *rsbU*-positiven Kontrollstammes yG8 ( $p < 0,05$ ).

Bei der Behandlung von SA137/93G mit Erythromycin, Chloramphenicol bzw. Tigecyclin bei 37°C konnten keine weißen Insertionsmutanten selektiert. Diese Zellen wurden demzufolge hier als Kontrollen eingesetzt. Nach der Behandlung mit Tigecyclin wurde interessanterweise eine starke Zellwandverdickung auf 60,1 nm (WT) und 57,6 nm (*rsbU*::IS256 Insertionsmutante wG6) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen detektiert. Der Unterschied der Zellwanddicken zwischen *rsbU*-positiven und *rsbU*-negativen Zellen war

hier jedoch nicht signifikant. Vergleichbare Zellwanddicken konnten zuletzt bei dem VISA-Stamm *S. aureus* VC40 detektiert werden (Berscheid et al., 2014). Nach der Inkubation mit Erythromycin bei 37°C konnte hingegen kein Anstieg der Zellwanddicke im Vergleich zu den unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die Behandlung mit Chloramphenicol führte bei 37°C nur zu einer sehr geringen Verdickung der Zellwand auf 35,1 nm bei dem *rsbU*-positiven Wildtyp und auf 30,3 nm bei der *rsbU::IS256* Insertionsmutanten wG6.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass bei *S. aureus* SA137/93G sowohl Chloramphenicol in Zusammenhang mit Hitzestress, als auch Linezolid und Spectinomycin bei physiologischen Temperaturen eine zusätzliche Verdickung der Zellwand verursachten. Die Inaktivierung von *rsbU* in den Insertionsmutanten führte zur Reduktion der Zellwanddicke und könnte den Überlebensvorteil der weißen Insertionsmutanten unter diesen Bedingungen erklären.

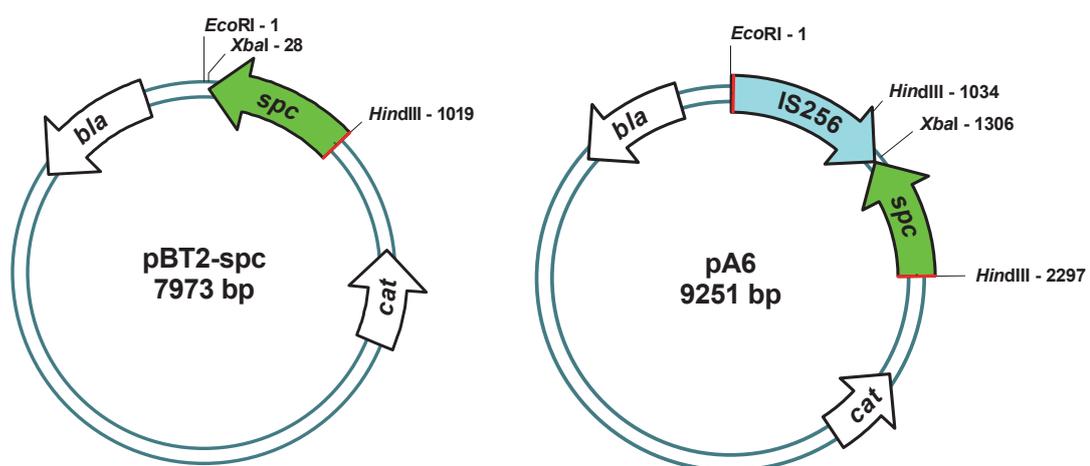
### 4.3 Autoaktivierung der Transposition von IS256

Anschließend wurde untersucht, ob die Inaktivierung von *rsbU* durch die spontane Insertion von IS256 zu einer Autoaktivierung der Transpositionsfrequenz von IS256 führt (siehe Kapitel 3.7.2 - 3.7.5). Da die Transpositionsfrequenz von IS256 in klinischen *S. aureus*-Isolaten nicht quantifizierbar ist, wurden in dieser Arbeit verschiedene rekombinante IS256-Elemente verwendet, die Resistenzkassetten als Selektionsmarker enthielten. Zunächst wurden – mithilfe von IS256-*spc* - eine *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutante sowie eine *rsbU*-positive IS256-*spc* Insertionsmutante von *S. aureus* HG001 generiert. Danach wurden in diesen Insertionsmutanten die Transpositionsfrequenzen eines anderen rekombinanten IS256-Elements (IS256-*ermB*) gemessen. Für diese Experimente wurde der *rsbU*-positive MSSA-Stamm *S. aureus* HG001 verwendet, da dieser keine IS256-Kopien im Genom enthält (Iandolo et al., 2002; Herbert et al., 2010).

#### 4.3.1 Konstruktion von pA6

Das Plasmid pA6 wurde konstruiert, um eine weiße *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutante und eine gelbe *rsbU*-positive IS256-*spc* Insertionsmutante (Kontrolle), bei der IS256-*spc* an einer anderen Stelle im Genom inserierte, von *S. aureus* HG001 zu selektieren. Wie bereits von Valle et al. (2007) und Nagel et al. (2011) beschrieben, erfolgte die Klonierung in zwei Schritten. Zuerst wurde das Resistenzgen *spc* von dem Plasmid pBPsy1Prom, welches von der AG Piel zur Verfügung gestellt wurde, mithilfe der Primer Spc\_HindIII\_for und Spc\_XbaI\_rev durch eine PCR amplifiziert. Der Primer Spc\_HindIII\_for hatte dabei eine

Länge von 52 bp, da er neben der Amplifikation von *spc* dazu diente, das IR<sub>R</sub> von IS256 an die Resistenzkassette anzufügen. Nach erfolgreichem Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III wurde das PCR-Produkt per Ligation in den linearisierten *E. coli* - *S. aureus* Shuttlevektor pBT2 eingefügt. Nach erfolgreicher Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* JM83 wurden auf LB-Agar mit 40 µg/ml Ampicillin potentiell richtige Klone gepickt. Die Plasmid-DNA der Klone wurde durch *Eco*RI-Verdau und anschließende Gelelektrophorese auf die erfolgreiche Insertion des PCR-Produktes untersucht. Zur Verifizierung der Nukleotidsequenz des Inserts von pBT2-*spc* (Abbildung 4.12) wurde das gesamte Insert mithilfe des Primer pBT2\_for sequenziert. Im nächsten Schritt wurde das chromosomale IS256-Element von *S. aureus* SA137/93G (ohne IR<sub>R</sub>) mithilfe einer PCR unter Verwendung der Primer ISIRLfor und ISIRRrev amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde dann über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Xba*I in das Plasmid pBT2-*spc* integriert. Nach erfolgreicher Transformation von *E. coli* JM83 in Anwesenheit des Ligationsansatzes wurden auf LB-Agar mit 40 µg/ml Ampicillin potentiell richtige Klone gepickt, deren Plasmid-DNA wiederum durch *Eco*RI-Verdau und Gelelektrophorese auf das Vorhandensein des Plasmids pA6 (Abbildung 4.12) untersucht wurde. Die Nukleotidsequenz des Inserts von pA6 wurde anschließend durch Sequenzierung mit den Primer pBT2\_for und pBT2\_rev überprüft. Das konstruierte Plasmid pA6 wurde danach per Elektroporation zuerst in den restriktionsnegativen Stamm *S. aureus* RN4220 und anschließend in *S. aureus* HG001 überführt. Die Selektion der Klone erfolgte dabei bei 30°C in Anwesenheit von 20 µg/ml Chloramphenicol.

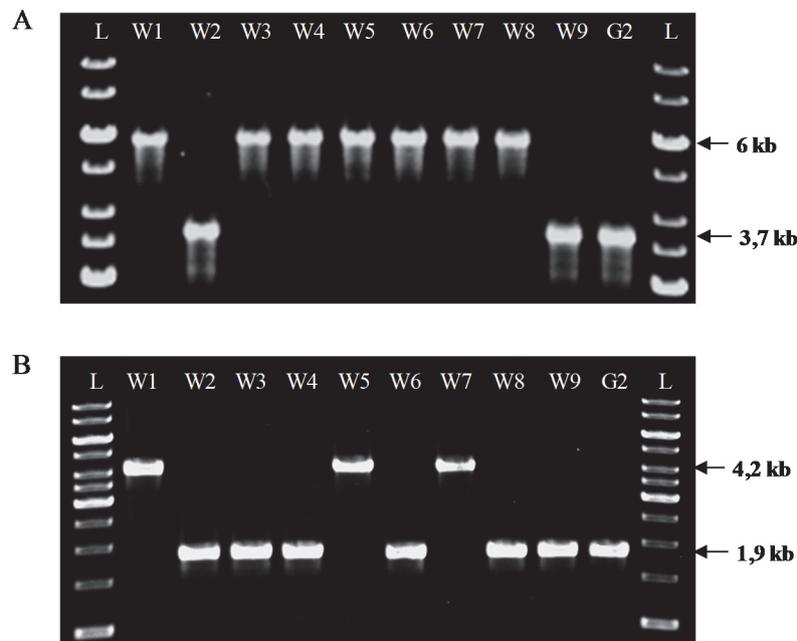


**Abbildung 4.12: Plasmidkarten von pBT2-*spc* und pA6.** Die Plasmidkarten wurden mithilfe von pDRAW32 (<http://www.acaclone.com>) generiert. Die IRs, die das rekombinante IS-Element flankieren, sind in rot dargestellt.

### 4.3.2 Selektion von *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutanten von *S. aureus* HG001 in Anwesenheit von pA6

Die Versuchsdurchführung zur Selektion weißer *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutanten erfolgte wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben. Nach der Kultivierung von *S. aureus* HG001 pA6 in Abwesenheit von Antibiotika bei 30°C konnten auf den TSA-Agarplatten mit Spectinomycin [150 µg/ml], welche bei 45°C für 36 – 48 h inkubiert wurden, 11 weiße *IS256-spc* Insertionsmutanten selektiert werden. Zwei dieser weißen Insertionsmutanten wiesen sowohl Spectinomycin- Resistenz als auch Chloramphenicol-Resistenz auf und enthielten somit das gesamte Plasmid im Genom. Die restlichen neun Klone wiesen Spectinomycin-Resistenz und Chloramphenicol-Sensitivität auf, was auf den Verlust des Plasmids und eine Insertion von *IS256-spc* hinweist. Diese neun weißen *IS256-spc* Insertionsmutanten wurden schließlich für die weiteren Untersuchungen verwendet. Im gesamten Versuchsverlauf von 6 Stunden traten die weißen *IS256-spc* Insertionsmutanten mit einer Häufigkeit von ca. 0,3% (9 von 3113 Kolonien) auf und wurden auf den Agarplatten selektiert, die direkt nach dem Animpfen der Hauptkultur (Kolonie W1), sowie nach einer Stunde (Kolonien W2 und W3), nach vier Stunden (Kolonien W4-W6) und nach sechs Stunden (Kolonien W7-W9) Inkubation ausgespatelt wurden. Als Kontrollstamm wurde eine gelbe *IS256-spc* Insertionsmutante (Kolonie G2) selektiert, die ebenfalls Spectinomycin-Resistenz und Chloramphenicol-Sensitivität aufwies. Im Anschluss daran wurden die Insertionsmutanten mit zwei PCRs auf *IS256-spc* Insertionen im *sigB*-Operon bzw. in *rsbU* untersucht (Kapitel 3.7.3). Die Auswertung der PCR über das gesamte *sigB*-Operon in Abbildung 4.13A zeigt, dass bei 78% (7 von 9) der weißen Insertionsmutanten eine *IS256-spc* Insertion im *sigB*-Operon vorlag (PCR-Produkt von 6 kb). Die genauere Untersuchung der Insertionsmutanten mittels PCR-Amplifizierung des *rsbU*-Gens zeigte, dass nur die Insertionsmutanten W1, W5 und W7 eine *IS256-spc*-Insertion im *rsbU*-Gen enthielten (3 von 7, 43%), da hier ein PCR-Produkt von ca. 4200 bp entstand (Abbildung 4.13B). Die genauen Insertionsstellen von *IS256-spc* in den Insertionsmutanten W1, W5 und W7, sowie die jeweilige Richtung der Transposase sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Bei den Insertionsmutanten W1 und W5 wurde *IS256-spc* in der Nähe des 3' Endes von *rsbU* integriert. Die *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutante W7 hingegen war durch eine Insertion am 5' Ende von *rsbU* charakterisiert. Die Sequenzierung der 6-kb PCR-Produkte von W3, W4, W6 und W8 mit dem Primer IS91rev zeigte, dass bei 57% (4 von 7) dieser Insertionsmutanten das rekombinante *IS256-spc* direkt in das *sigB*-Gen integriert wurde. Die genauen Insertionsstellen der Insertionsmutanten W3, W4 und W8 sind im Anhang dieser Arbeit in Tabelle A 2 aufgeführt. Die Insertionsstelle der Insertionsmutante

W6 wurde bisher nicht exakt bestimmt. Die genomische DNA der gelben Insertionsmutanten *S. aureus* HG001 G2 wurde in beiden PCRs als Kontrolle eingesetzt. Die Größen der PCR-Produkte von 3,7 kb (Abbildung 4.13A) und 1,9 kb (Abbildung 4.13B) entsprachen denen des Wildtyps, da keine Insertion von *IS256-spc* im *sigB*-Operon vorlag.

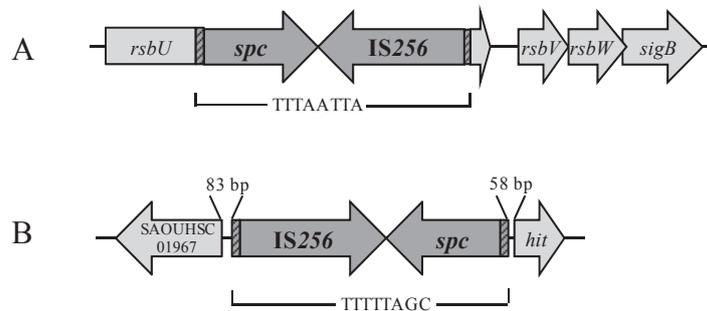


**Abbildung 4.13: Untersuchung der Insertionsmutanten von *S. aureus* HG001 auf *IS256-spc* Insertion im *sigB*-Operon (A) und in *rsbU* (B).** Gelelektrophorese der jeweiligen PCR-Produkte der weißen Insertionsmutanten *S. aureus* HG001 W1 – W9 im Vergleich zur Kontrolle *S. aureus* G2. **A:** Das 6 kb-Fragment weist auf die Insertion von *IS256-spc* im *sigB*-Operon im Vergleich zur Kontrolle (3,7 kb-Fragment) hin. **B:** Das 4,2 kb-Fragment weist auf eine Insertion von *IS256-spc* in *rsbU* im Vergleich zur Kontrolle (1,9 kb-Fragment) hin.

Die Insertionsstelle von *IS256-spc* im Genom von *S. aureus* HG001 G2, welcher später als Kontrolle dienen sollte, wurde mittels inverser PCR bestimmt (siehe Kapitel 3.6.7). Die weiße *rsbU::IS256* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 W5 wurde für die weiterführenden Experimente verwendet. Um zu zeigen, dass in dieser Mutante das rekombinante *IS256-spc* nur einmal ins Genom integriert wurde, wurde auch bei dieser Insertionsmutante eine inverse PCR durchgeführt. Für den Verdau der genomischen DNA wurde das Restriktionsenzym *AluI* verwendet, welches mehrfach in *IS256* schneidet.

Die Auswertung der inversen PCRs beider Stämme zeigte, dass jeweils nur eine Insertion im Genom vorlag. Die Sequenzierung des 289 bp PCR-Produktes von *S. aureus* HG001 W5 bestätigte die Insertionsstelle von *IS256-spc* am 3' Ende von *rsbU*. Die Sequenzierung des 358 bp PCR-Produktes von *S. aureus* HG001 G2 zeigte eine Insertion von *IS256-spc*

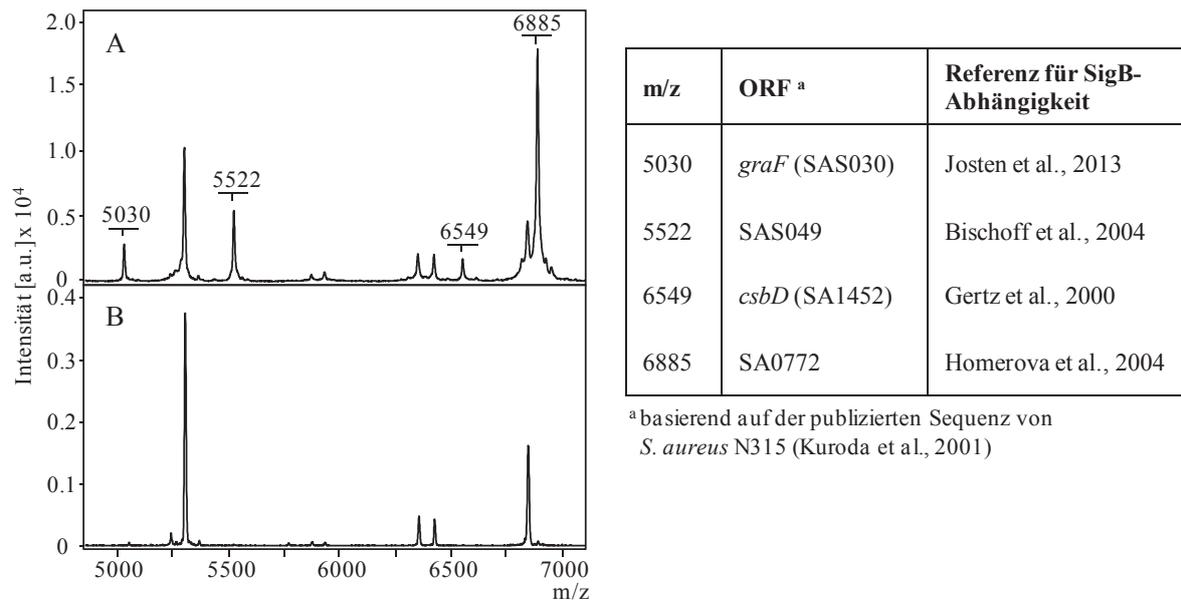
zwischen dem putativen ABC-Transporter SAOUHSC\_01967 und SAOUHSC\_01968 (*hit*). Die Insertionsstellen der *S. aureus* Stämme W5 und G2 sind in Abbildung 4.14 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4.14: Lokalisierung von IS256-*spc* in *S. aureus* HG001 W5 (A) und HG001 G2 (B).** Das rekombinante IS256-*spc* ist in dunkelgrau dargestellt. Die schraffierten Bereiche deuten die IRs von IS256-*spc* an. Die DRs der jeweiligen Insertion sind unter den Graphen dargestellt.

### 4.3.3 MALDI-TOF MS Analyse der IS256-*spc* Insertionsmutanten von *S. aureus* HG001

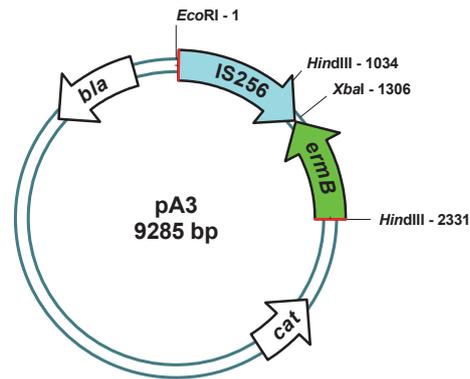
Um zu zeigen, dass die Expression SigB-abhängiger Gene in der *rsbU*::IS256-*spc* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 W5 im Vergleich zur *rsbU*-positiven IS256-*spc* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 G2 gehemmt war, wurde eine MALDI-TOF MS Analyse mit beiden Stämmen durchgeführt, wie es in Kapitel 3.9.1 beschrieben wurde. In einer Studie von Josten et. al (2013) konnten mithilfe dieser Methode einige Massenpeaks im MALDI-Spektrum bestimmten SigB-abhängigen Proteinen von *S. aureus* zugeordnet werden. Die Auswertung der MALDI-Spektren beider Stämme zeigte, dass die Massenpeaks vier SigB-abhängiger Proteine im Massenspektrum von *S. aureus* HG001 W5 im Vergleich zu HG001 G2 fehlten bzw. nur sehr schwach ausgeprägt waren (Abbildung 4.15). Vorangegangene Studien zeigten bereits die SigB-abhängige Transkription der Gene *graF* (SAS030; Josten et al., 2013), SAS049 (Bischoff et al., 2004), *csbD* (SA1452; Gertz et al., 2000) sowie SA0772 (Homerova et al., 2004), die hier den entsprechenden Massenpeaks 5030, 5522, 6549 und 6885 (m/z) zugeordnet wurden. Diese Ergebnisse bestätigten die Hemmung der SigB-Expression in der *rsbU*::IS256-*spc* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 W5 im Vergleich zur Kontrolle HG001 G2.



**Abbildung 4.15: Massenspektren von *S. aureus* HG001 G2 (A) und HG001 W5 (B). Die Tabelle gibt die Beschreibung der zu den Massenpeaks gehörenden SigB-abhängigen Proteine in *S. aureus* N315 (Kuroda et al., 2001) an.**

#### 4.3.4 Aktivierung der Transpositionsfrequenz von *IS256-ermB* in der *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutante von *S. aureus* HG001

Im nächsten Experiment sollte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *rsbU* - durch die spontane chromosomale Insertion des rekombinanten *IS256-spc* - in *S. aureus* HG001 W5 zur Autoaktivierung der Transposition eines weiteren rekombinanten *IS256-ermB* Elementes (*ermB*: Erythromycin-Resistenzgen) vom Plasmid pA3 (Nagel et al., 2011) in das Genom führt. Das Plasmid pA3 wurde bereits von Michael Nagel konstruiert (siehe Kapitel 4.3.1). Das rekombinante *IS256*-Element enthielt statt einer Spectinomycin-Resistenzkassette eine Erythromycin-Resistenzkassette (Abbildung 4.16), die es ermöglichte, die Transpositionsfrequenz von *IS256-ermB* in den *IS256-spc* Insertionsmutanten W5 und G2 zu messen. Zunächst wurde das Plasmid pA3 per Elektroporation in beide Stämme überführt. Die entstandenen Klone wurden auf TSA mit 150  $\mu\text{g/ml}$  Spectinomycin und 25  $\mu\text{g/ml}$  Erythromycin selektiert. Anschließend wurde die Transpositionsfrequenz von *IS256-ermB* in *S. aureus* HG001 W5 pA3 sowie in *S. aureus* HG001 G2 pA3 über einen Zeitraum von 6 h gemessen, wie es in Kapitel 3.7.5 beschrieben wurde.



**Abbildung 4.16:** Plasmidkarte des temperatursensitiven *E. coli* - *S. aureus* Shuttle Vektors pA3 mit dem rekombinanten IS256-*ermB* – Element, welches von den IRs (rot) von IS256 flankiert wird, um die Transposition zu ermöglichen (modifizierte Grafik nach Nagel et al., 2011).

Die folgenden Tabellen zeigen die ermittelten Transpositionsfrequenzen dreier voneinander unabhängiger Experimente zu den verschiedenen Zeitpunkten, deren Mittelwerte und Standardabweichungen (Tabelle 4.11, Tabelle 4.12).

**Tabelle 4.11:** Transpositionsfrequenzen von IS256-*ermB* in *S. aureus* HG001 G2.

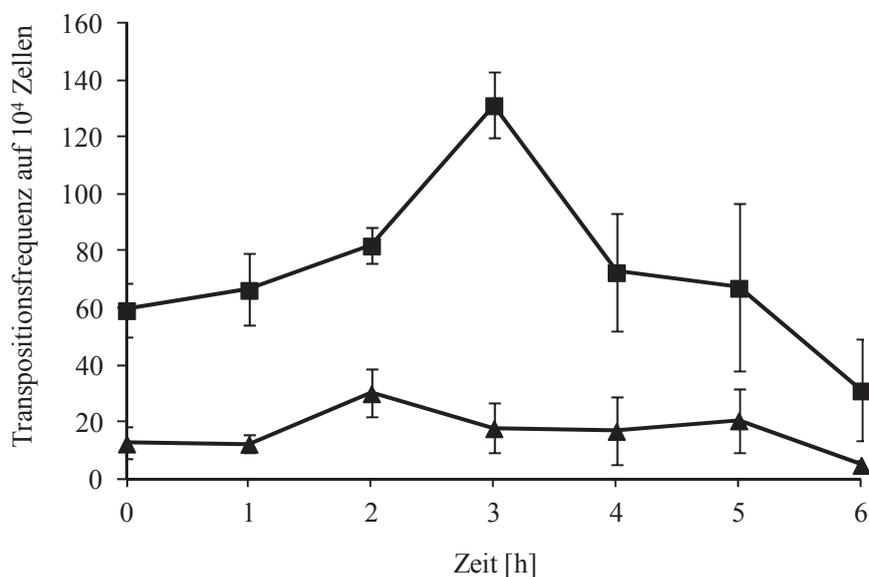
Zeitpunkt t [h]	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Standard- abweichung
t0	10,8	8,0	18,8	12,5	5,6
t1	11,6	15,6	10,1	12,4	2,8
t2	23,5	39,7	27,4	30,2	8,5
t3	9,1	18,6	26,1	17,9	8,5
t4	13,3	7,1	30,4	16,9	12,0
t5	14,4	33,8	13,8	20,6	11,4
t6	4,4	4,2	6,5	5,0	1,3

**Tabelle 4.12:** Transpositionsfrequenzen von IS256-*ermB* in *S. aureus* HG001 W5.

Zeitpunkt t [h]	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Standard- abweichung
t0	70,6	53,7	53,9	59,4	9,7
t1	69,9	52,6	77,0	66,5	12,6
t2	77,5	79,2	89,5	82,1	6,5
t3	143,6	129,7	120,8	131,4	11,5
t4	63,0	58,7	96,6	72,7	20,7
t5	52,8	47,7	101,1	67,2	29,5
t6	23,8	18,2	51,5	31,2	17,8

Aus Abbildung 4.17 geht hervor, dass die Transpositionsaktivität von IS256-*ermB* in der *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutante W5 im Vergleich zur *rsbU*-positiven Insertionsmutante

G2 im Durchschnitt 4-fach erhöht war. Die Transpositionsfrequenzen von *S. aureus* HG001 G2 waren dabei über einen Zeitraum von 6 h relativ stabil und lagen zwischen  $5,0$  und  $30,2 \times 10^{-4}$  Zellen. Die Transpositionsfrequenz von *S. aureus* HG001 W5 hingegen begann zum Zeitpunkt  $t_0$  mit einem Wert von  $59,4 \times 10^{-4}$ , erreichte zum Zeitpunkt  $t_3$  ( $\sim OD_{600} 0,5$ ) den Maximalwert von  $131,4 \times 10^{-4}$  und sank anschließend auf den Minimalwert von  $31,2 \times 10^{-4}$  zum Zeitpunkt  $t_6$  ( $\sim OD_{600} 3,0$ ). Auffällig war, dass in der späten exponentiellen Wachstumsphase ab Zeitpunkt  $t_5$ , wo gewöhnlich die Aktivität von SigB deutlich steigt (Giachino et al., 2001), die Transpositionsfrequenzen beider Stämme auf einen Minimalwert sanken.



**Abbildung 4.17:** Transpositionsfrequenzen von IS256-ermB in *S. aureus* HG001 W5 (*rsbU::IS256-spc*) (■) und *S. aureus* HG001 G2 (*rsbU*-positive IS256-spc - Insertionsmutante) (▲). Jeder Graph repräsentiert die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen an.

Die gemessenen Transpositionsfrequenzen spiegeln die Transposition von IS256-ermB wider und sind auf die enzymatische Aktivität der Transposase zurückzuführen, da bereits Nagel et al. (2011) mithilfe desselben Testsystems demonstrierten, dass die Transpositionsfrequenz des IS256-ermB-Elementes, das eine inaktivierte Transposase enthielt, in diesem Experiment nicht detektierbar war.

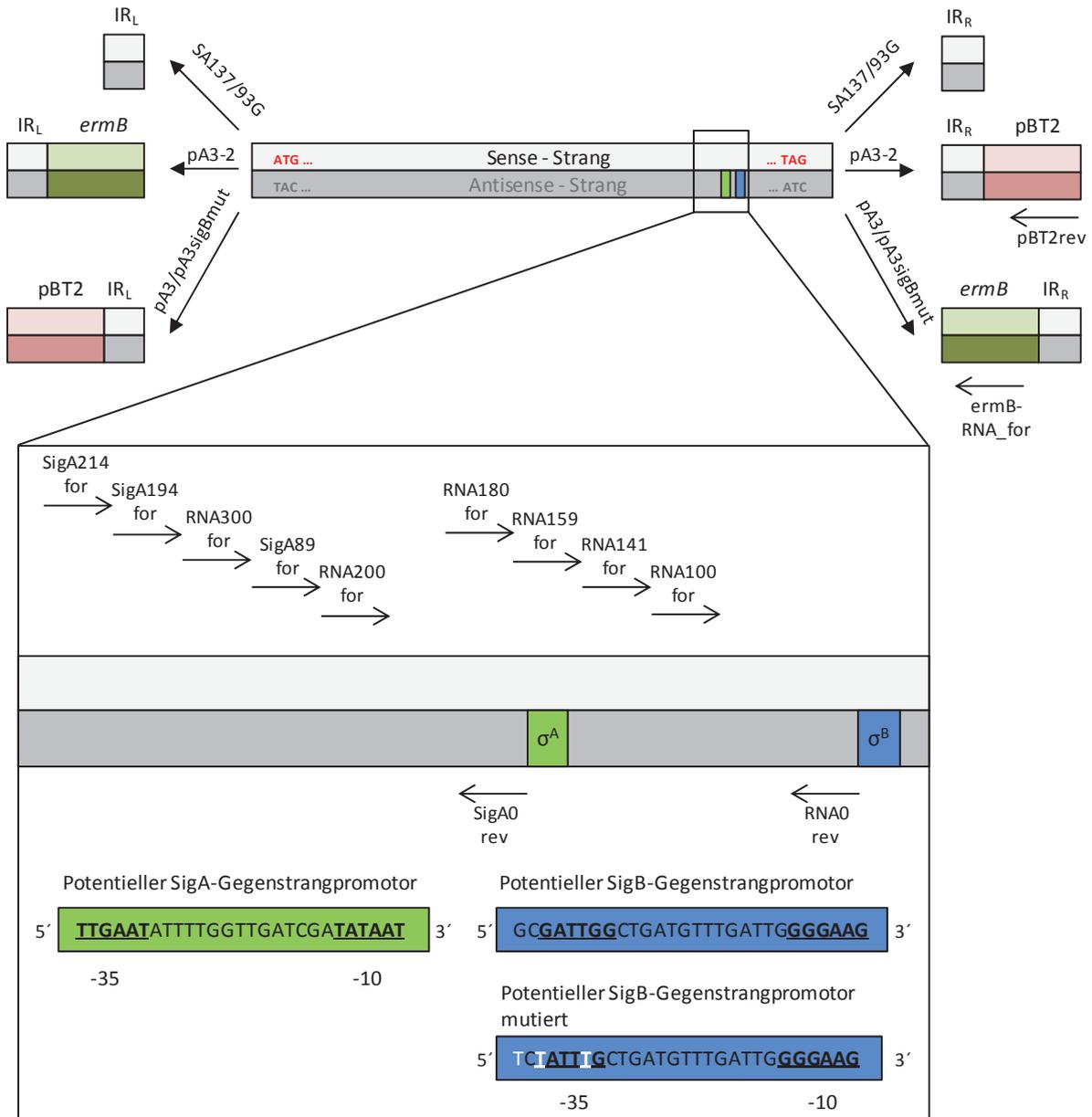
Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die Inaktivierung von *rsbU* durch die Insertion von IS256-spc zur Autoaktivierung der Transposition von IS256-ermB in *S. aureus* HG001 W5 pA3 führt.

#### 4.4 Charakterisierung der Antisense-RNA von IS256

In Vorarbeiten konnten mittels Reverse-Transkriptase PCR Hinweise auf das Vorhandensein einer SigB-abhängigen Antisense-RNA von IS256 gewonnen werden, die in der Kontrolle, die ein IS256-*ermB*-Element mit einem inaktivierten SigB-Promotor (pA3sigBmut) enthielt, nicht detektiert werden konnten (Nagel et al., 2011). Selbiges wurde für die SigA-abhängige Antisense-RNA von IS256 gezeigt (Dissertation Michael Nagel (Juli 2011)).

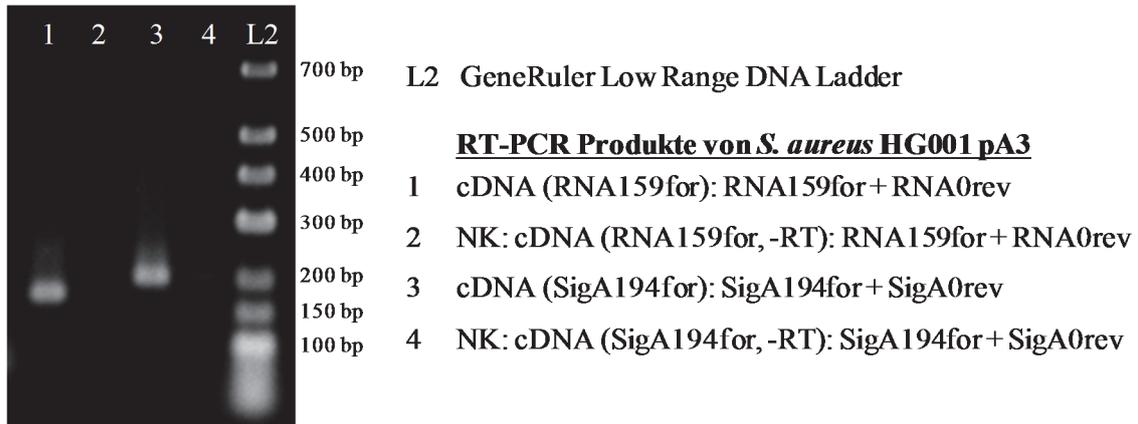
##### 4.4.1 Untersuchungen zum Nachweis der Antisense-RNAs von IS256 mithilfe verschiedener Plasmide und RT-PCR

Zum besseren Verständnis ist die Lage der oben genannten potentiellen Antisense-RNAs als auch die Lage aller verwendeten Primer in Abbildung 4.18 schematisch dargestellt. In den ersten Versuchen sollte die Größe beider Antisense-RNAs mittels RT-PCR näher charakterisiert werden. Die Vorbereitung und Durchführung der RT-PCR erfolgte wie in Kapitel 3.6.14 - 3.6.16 beschrieben. Die Gesamt-RNAs von *S. aureus* HG001 pA3 und *S. aureus* HG001 pA3sigBmut wurden präpariert und anschließend einem zusätzlichen DNaseI-Verdau unterzogen, um genomische DNA vollständig zu entfernen. Dieser DNaseI-Verdau wurde im Laufe der Untersuchungen optimiert (Protokoll siehe Kapitel 3.6.15). Die cDNA wurde jeweils mithilfe eines spezifischen Primers generiert, der ausschließlich die cDNA-Synthese der Antisense-RNA von IS256 ermöglichte, da er laut BLAST-Analyse nur an diese RNA binden konnte. Die mRNA der Transposase von IS256 wurde somit nicht in cDNA umgeschrieben. Zur Ermittlung der Größe beider Antisense-RNAs wurden zunächst verschiedene Forward-Primer gelegt, die anschließend bei der cDNA-Synthese eingesetzt wurden (Abbildung 4.18). Dann erfolgte der Nachweis der Antisense-RNA mithilfe einer PCR unter Verwendung des jeweiligen Forward-Primers mit dem Revers-Primer RNA0rev für die SigB-abhängige Antisense-RNA bzw. mit SigA0rev für die SigA-abhängige Antisense-RNA.



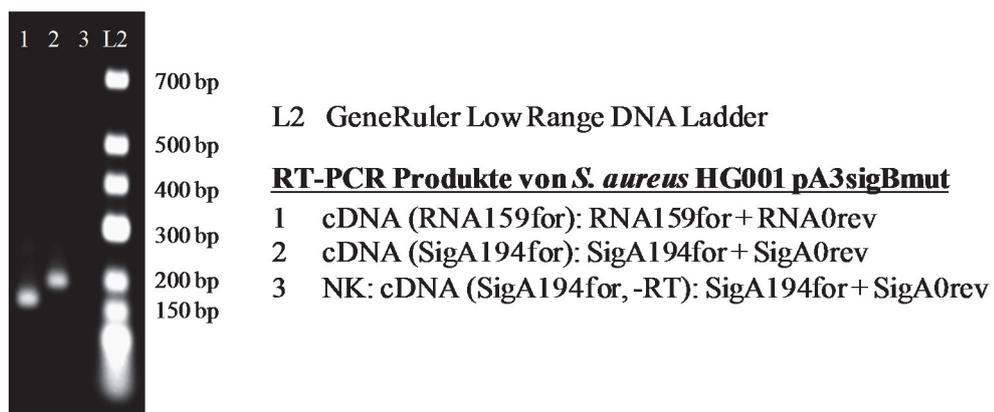
**Abbildung 4.18: Schematischer Aufbau von IS256 aus SA137/93G und von IS256-ermB aus pA3 bzw. pA3-2 inklusive der Lage der potentiellen Gegenstrangpromotoren (Nagel et al., 2011) und aller verwendeter Primer.**

Bei diesen ersten Untersuchungen wurde zunächst festgestellt, dass die SigB-abhängige Antisense-RNA eine Mindestlänge von 159 bp haben müsste, da die PCR mit dem Primerpaar RNA159for und RNA0rev ein PCR-Produkt ergab (Abbildung 4.19, Spur 1). Für die SigA-abhängige Antisense-RNA wurde mithilfe der Primer SigA194for und SigA0rev eine Mindestlänge von 194 bp ermittelt (Spur 3). Eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA wurde ausgeschlossen, da in beiden Negativkontrollen (ohne Zugabe von Reverser Transkriptase) keine PCR-Produkte entstanden (Spuren 2 und 4).



**Abbildung 4.19: RT-PCR zur Charakterisierung der Größe der SigB- bzw. SigA-abhängigen Antisense-RNA von IS256 in *S. aureus* HG001 pA3.** Erläuterung der Legende: cDNA (genspezifischer Primer bei der cDNA-Synthese): PCR-Primerpaar, NK – Negativkontrolle.

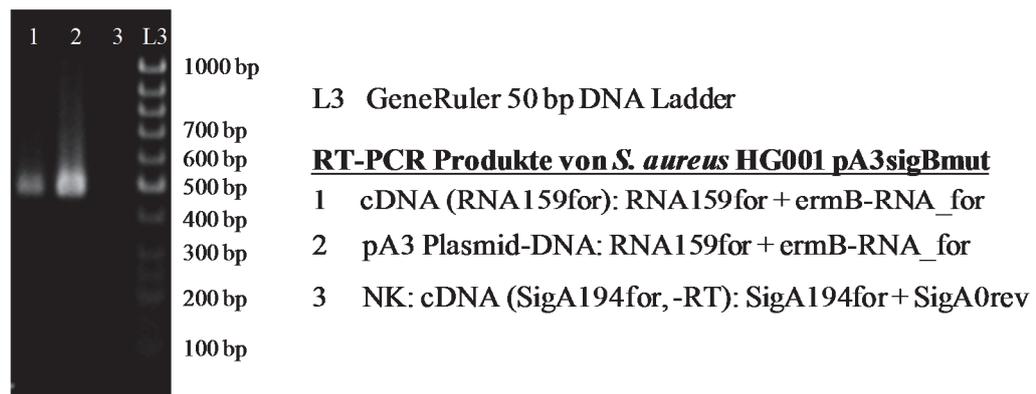
Um die SigB-Abhängigkeit der 159 bp Antisense-RNA zu überprüfen, wurde die Gesamt-RNA von *S. aureus* HG001 pA3sigBmut im folgenden Experiment als Negativkontrolle verwendet. Im Vergleich zu pA3 enthielt pA3sigBmut eine stille Mutation (bestehend aus drei Punktmutationen) in der -35-Region des potentiellen SigB-abhängigen Gegenstrangpromotors von IS256 (Nagel et al., 2011, Abbildung 4.18). Die Ergebnisse der Vorarbeiten hatten gezeigt, dass diese stille Mutation die Bildung der SigB-abhängigen Antisense-RNA verhinderte.



**Abbildung 4.20: RT-PCR von *S. aureus* HG001 pA3sigBmut.** Erläuterung der Legende: cDNA (genspezifischer Primer bei der cDNA-Synthese): PCR-Primerpaar, NK – Negativkontrolle.

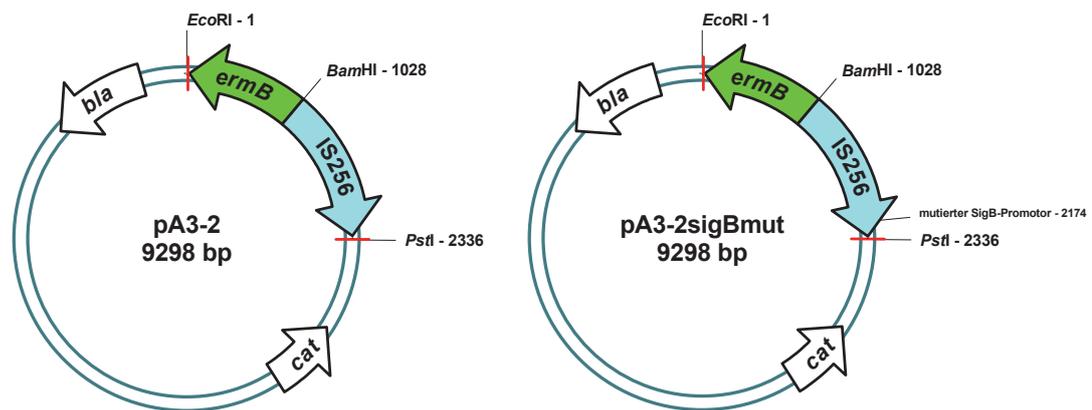
Entgegen den Erwartungen entstand jedoch bei der RT-PCR mit dem Primerpaar RNA159for und RNA0rev ein PCR-Produkt von 159 bp (Abbildung 4.20, Spur 1). Als Positivkontrolle diente die RT-PCR mit dem Primerpaar SigA194for und SigA0rev, welches die Amplifizierung der potentiellen SigA-abhängigen Antisense-RNA ermöglichte (Spur 2). Die Negativkontrolle zeigt, dass die RNA von *S. aureus* HG001 pA3sigBmut keine restliche genomische DNA enthielt, da kein PCR-Produkt generiert wurde (Spur 3). Dieses Ergebnis zeigt, dass die stille Mutation in der -35-Region des potentiellen SigB-abhängigen Gegenstrangpromotors in *S. aureus* HG001 pA3sigBmut nicht die Bildung der Antisense-RNA verhinderte.

Da ausgeschlossen werden konnte, dass die Reverse Transkriptase mit DNA verunreinigt war, wurde anschließend getestet, ob es sich aufgrund des Aufbaus von pA3 und pA3sigBmut (siehe Abbildung 4.16) um eine verlängerte mRNA von *ermB* handeln könnte. Wie Abbildung 4.21 zeigt, konnte diese Hypothese mithilfe der RT-PCR von *S. aureus* HG001 pA3sigBmut unter Verwendung des Primerpaares *ermB*-RNA\_for und RNA159for bestätigt werden (Spur 3, Produkt = 472 bp). In der Positivkontrolle wurde die Plasmid-DNA von pA3 als Template eingesetzt (Spur 2 = 472 bp). Die Negativkontrolle zeigte kein PCR-Produkt. In einem weiteren Versuch konnte mithilfe einer 5' RACE-PCR bei *S. aureus* HG001 pA3 eine verlängerte *ermB*-mRNA per Sequenzierung des PCR-Produktes detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass es sich bei allen bisher detektierten RT-PCR-Produkten anstelle der Antisense-RNAs von IS256 auch nur um die verlängerte *ermB*-mRNAs handeln könnte.



**Abbildung 4.21: RT-PCR von *S. aureus* HG001 pA3sigBmut zum Nachweis der verlängerten mRNA von *ermB*.** Erläuterung der Legende: cDNA (genspezifischer Primer bei der cDNA-Synthese): PCR-Primerpaar, NK – Negativkontrolle.

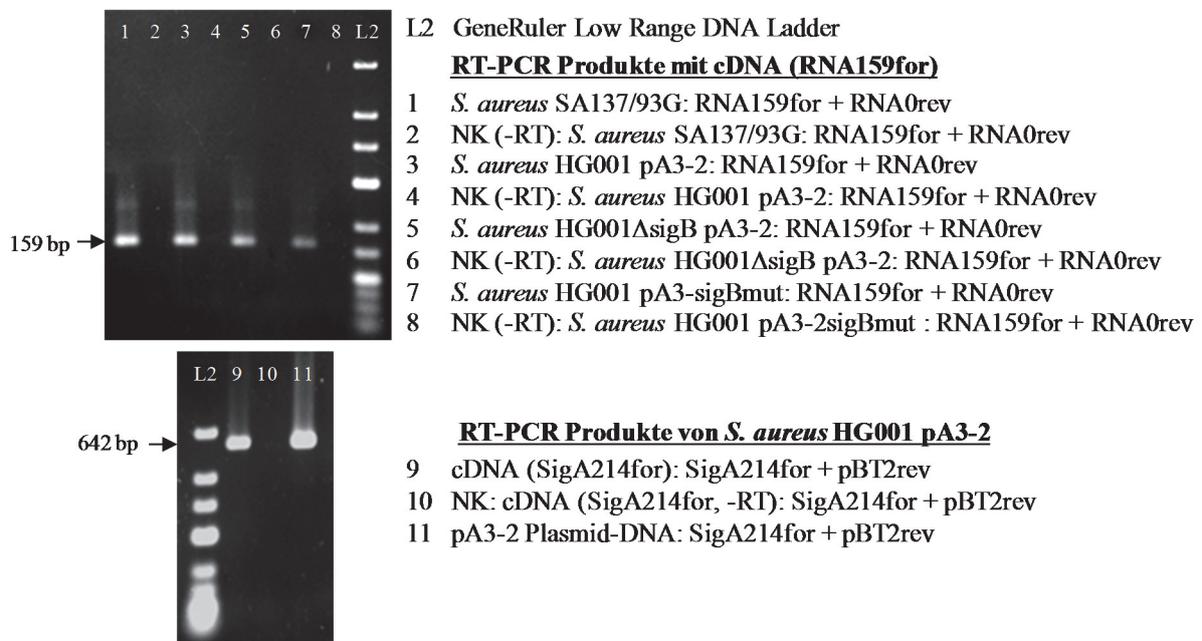
Um nun endgültig die Bildung der Antisense-RNA von IS256 beweisen zu können, klonierte die Masterstudentin Christine Lämmer die Vektoren pA3-2 und pA3-2sigBmut (Masterarbeit Christine Lämmer, 2014). Beide Plasmide bestanden aus dem *E. coli* – *S. aureus* – Shuttle Vektor pBT2 mit einem integrierten rekombinanten IS256-*ermB*, das durch die IRs von IS256 flankiert wurde. Im Unterschied zu pA3 wurden die Orientierungen von *tnpA* und *ermB* so gewählt, dass keine verlängerte *ermB*-mRNA zur Detektion eines PCR-Produktes bei der RT-PCR führen konnte (Abbildung 4.22). Das Plasmid pA3-2sigBmut enthielt analog zu pA3sigBmut die gleiche stille Mutation in der -35-Region des potentiellen SigB-abhängigen Gegenstrangpromotors und wurde als Kontrolle verwendet. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde pA3-2 in die Mutante *S. aureus* HG001 $\Delta$ *sigB* (Depke et al., 2012) elektroporiert. Durch die Inaktivierung von SigB wurde in diesem Stamm keine Transkription der Antisense-RNA erwartet. Als Positivkontrolle diente *S. aureus* SA137/93G, da dieser Stamm 38 IS256-Kopien im Genom enthält.



**Abbildung 4.22: Plasmidkarten von pA3-2 und pA3-2sigBmut (Masterarbeit Christine Lämmer, 2014).** Die IRs, die jeweils das rekombinante IS-Element flankieren, sind in rot dargestellt.

Wie Abbildung 4.23 (oben) zeigt, konnte auch mithilfe von pA3-2 das Vorhandensein der SigB-abhängigen Antisense-RNA nicht bewiesen werden, da sowohl bei *S. aureus* HG001 $\Delta$ *sigB* pA3-2 als auch bei *S. aureus* HG001 pA3-2sigBmut ein PCR-Produkt von 159 bp entstand (Spur 5 und 7). Die Negativkontrollen zeigten keine PCR-Produkte und schlossen somit eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA bzw. Plasmid-DNA aus. Abbildung 4.23 (unten) beweist, dass es sich bei der detektierten Antisense-RNA um eine Antisense-RNA von IS256 handelte, deren Transkriptionsstartpunkt (TSP) auf dem Gegenstrang des Plasmids stromabwärts von IS256 lag, da bei der PCR mithilfe der Primer SigA214for und pBT2rev ein Produkt von 642 bp entstand (Spur 9).

Zusammenfassend konnte durch die Untersuchungen mit den Testsystemen pA3 und pA3-2 nicht ermittelt werden, ob von den potentiellen SigB- bzw. SigA-abhängigen Gegenstrangpromotoren Antisense-RNAs von IS256 generiert wurden, da immer wieder Plasmid-spezifische Antisense-RNAs die Bestimmung störten.



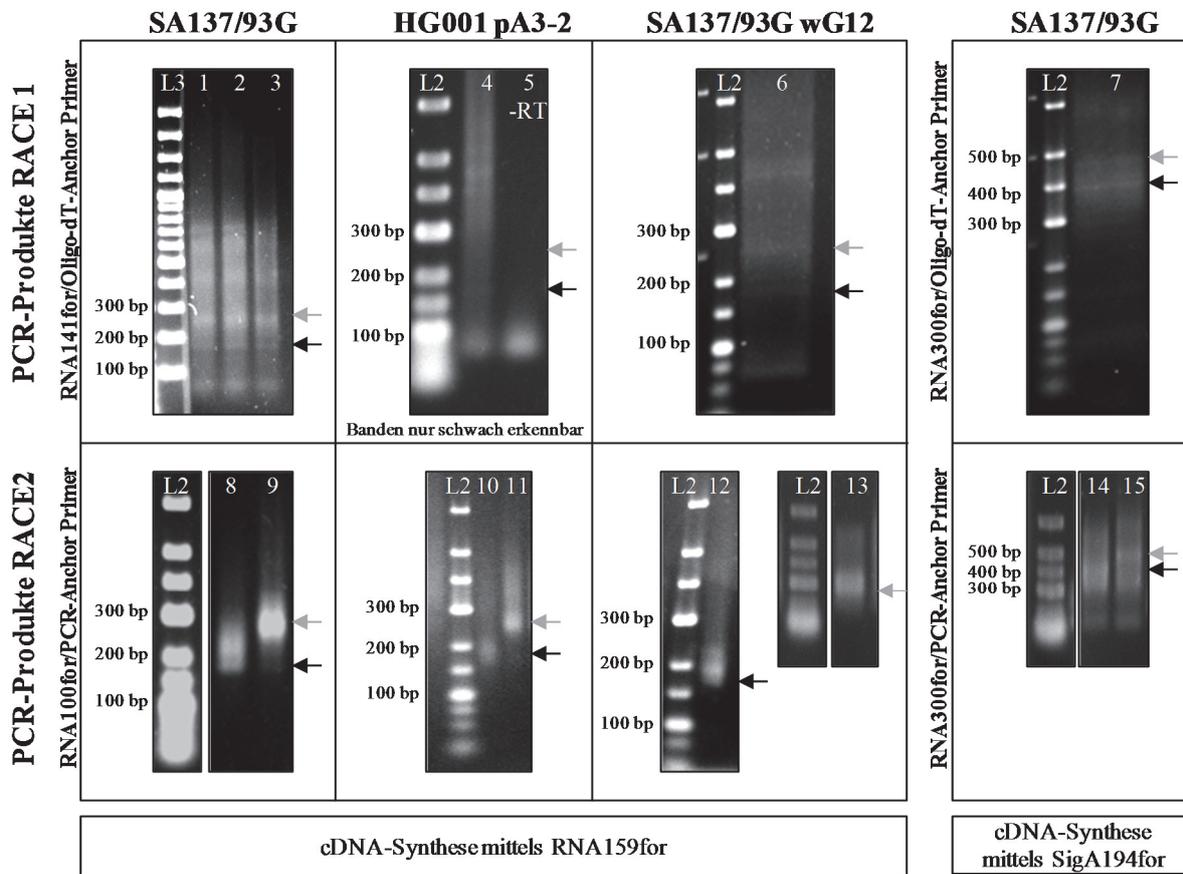
**Abbildung 4.23: RT-PCR verschiedener *S. aureus* Stämme.** Erläuterung der Legende: cDNA (genspezifischer Primer bei der cDNA-Synthese): PCR-Primerpaar, NK – Negativkontrolle.

#### 4.4.2 Nachweis und Charakterisierung des 5' Endes der Antisense-RNAs von IS256 mittels 5' RACE-PCR

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Transposition von IS256 durch die Aktivität von SigB deutlich gehemmt wird (Valle et al., 2007; Nagel et al., 2011). Die Bildung einer SigB-abhängigen Antisense-RNA von IS256 wäre eine plausible Erklärung für dieses Phänomen. Aus diesem Grund sollte in einem letzten Versuch mittels 5' RACE-PCR (siehe Kapitel 3.6.17) das 5' Ende der Antisense-RNA von IS256 in *S. aureus* SA137/93G und *S. aureus* HG001 pA3-2 detektiert werden. Als Kontrolle diente die weiße *sigB::IS256* Insertionsmutante *S. aureus* SA137/93G wG12, die während der in Kapitel 4.2.1.1 beschriebenen Versuche selektiert worden war.

Zunächst sollte das 5' Ende der potentiellen SigB-abhängigen Antisense-RNA detektiert werden. Dafür wurde die Gesamt-RNA der Stämme SA137/93G, HG001 pA3-2 und SA137/93G wG12 mithilfe des genspezifischen Primers RNA159for (SP1) (siehe Abbildung 4.18) in cDNA umgeschrieben. Nach dem Poly(A)-Tailing der cDNA erfolgte die erste

RACE-PCR mit dem genspezifischen Primer RNA141for (SP2) und dem Oligo-dT-Anchor Primer. Anschließend wurde jeweils die gesamte Menge (50 µl) des entstandenen PCR-Produktes im Agarosegel analysiert (Abbildung 4.24, Spur 1-6).

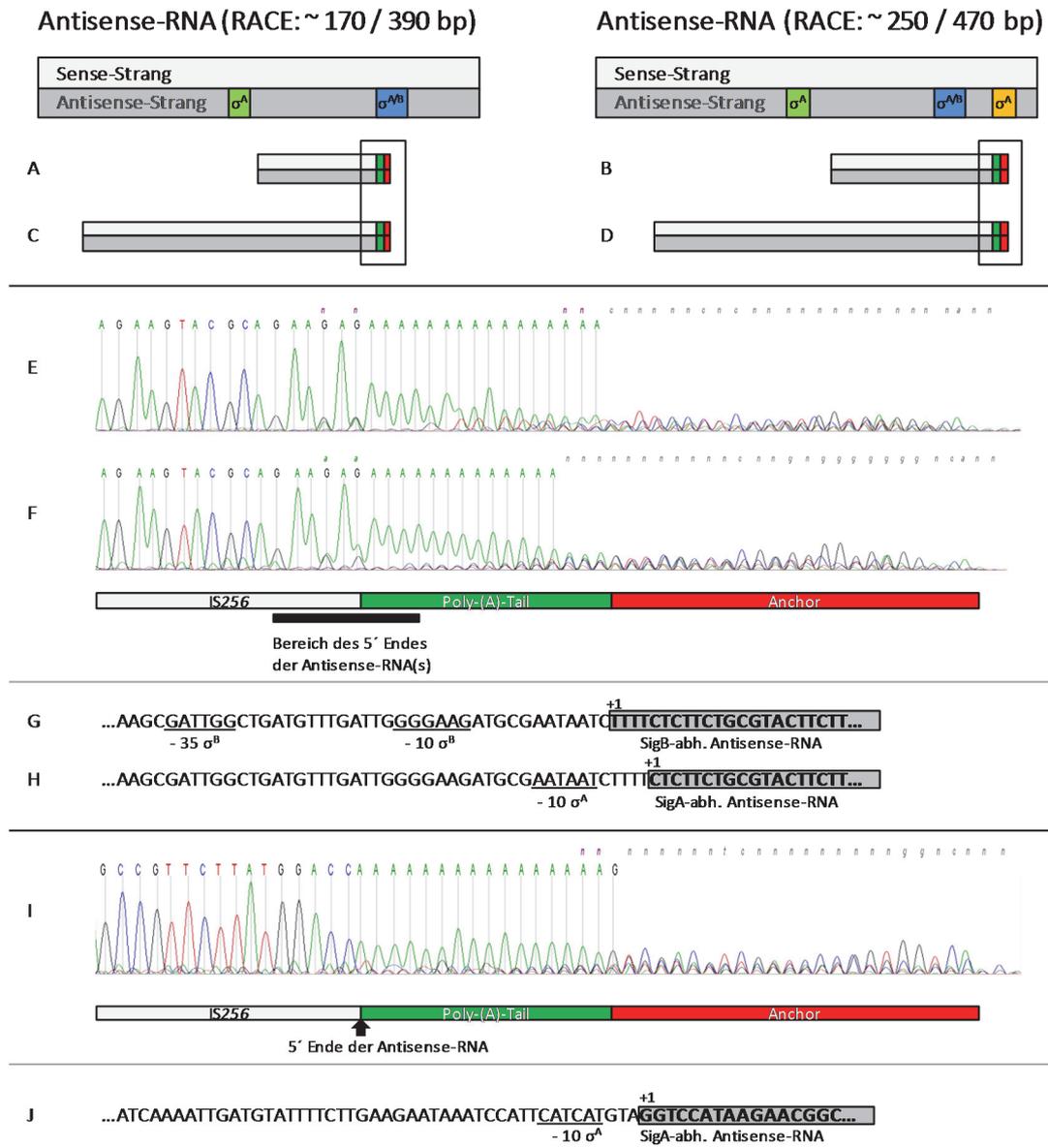


**Abbildung 4.24: Übersicht der 5' RACE-PCR Produkte verschiedener *S. aureus*-Stämme zum Nachweis der 5' Enden der Antisense-RNAs von IS256.** In der oberen Reihe sind die Agarosegele mit den PCR-Produkten der 1. RACE-PCR der jeweiligen Stämme dargestellt. Die Agarosegele in der unteren Reihe zeigen die PCR-Produkte der 2. RACE-PCR. Die schwarzen Pfeile markieren die PCR-Produkte mit einer Länge von ~ 170 bp (linker Kasten) bzw. ~ 390 bp (rechter Kasten). Die grauen Pfeile markieren die PCR-Produkte mit einer Länge von ~ 250 bp (linker Kasten) bzw. ~ 470 bp (rechter Kasten). Die für die PCRs verwendeten Primerpaare stehen jeweils am linken Rand des jeweiligen Kastens.

Wie Abbildung 4.24 (obere Reihe) zeigt, entstanden pro Stamm mehrere PCR-Produkte, was zu einer Schmierbildung im Agarosegel führte. Trotz der Schmierbildung waren einzelne Banden erkennbar. Bei allen 5' RACE-PCRs konnte eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden, da weder eine Schmierbildung noch einzelne Banden in den Kontrollen der 5' RACE-PCR (ohne Reverse Transkriptase) auftraten. Lediglich eine Bande entstand bei ~ 70 bp bei allen 5' RACE-PCRs (Spuren 1-4, 6,7), sowie in der

Negativkontrolle (Spur 5, -RT). Bei der Sequenzierung dieser eluierten Bande wurde festgestellt, dass es sich um ein Primer-Dimer des Oligo-dT-Anchor Primers handelte. Da sich der Forward-Primer RNA141for (SP2) 309 bp entfernt vom IR<sub>R</sub> von IS256 an die cDNA anlagerte und die Länge des angehängten Poly-(A)-Schwanzes inklusive des Anchors 38 bp (16 bp + 22 bp) betrug, konnte es sich bei allen detektierten PCR-Produkten, die kleiner als 347 bp (309 bp + 16 bp + 22 bp) waren, um die Antisense-RNAs von IS256 handeln, deren Promotoren auf dem Gegenstrang von IS256 lokalisiert waren. Sowohl bei *S. aureus* SA137/93G als auch bei *S. aureus* HG001 pA3-2 konnten Banden einer Größe von ~ 170 bp und ~ 250 bp detektiert werden (Spuren 1-4). Die Banden von *S. aureus* HG001 pA3-2 waren so schwach, dass sie nur am Bildschirm des ImageMaster VDS Systems richtig erfasst werden konnten. Diese Banden wurden aus dem Gel eluiert und in einer zweiten RACE-PCR mit dem Primerpaar RNA100for (SP3) und PCR Anchor Primer amplifiziert (Spuren 8-11). Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden dann mithilfe des Primers RNA100for sequenziert, um das genaue 5' Ende der jeweiligen Antisense-RNA zu detektieren. Mithilfe der 5' RACE-PCR konnten somit die 5' Enden und damit das Vorhandensein von mindestens zwei Antisense-RNAs von IS256 nachgewiesen werden (Abbildung 4.25). Die Abbildungen 4.25A und B zeigen die Lage der sequenzierten PCR-Produkte bezogen auf IS256 und die Lage der potentiellen Gegenstrangpromotoren.

Mithilfe der Sequenzierung der 170 bp-PCR-Produkte von SA137/93G (Abbildung 4.25E) und HG001 pA3-2 konnte das 5' Ende (+1) dieser Antisense-RNA auf einen Bereich von 10 bp genau eingegrenzt werden (Abbildung 4.25F, schwarze Markierung). Eine genaue Bestimmung des 5' Endes war nicht möglich, da sich nach dem Poly(A)-Tailing in der ersten RACE-PCR die 16 Thymin-Reste des Oligo-dT-Anchor Primer komplementär an die getailte cDNA anlagerte, ungeachtet dessen, ob einige dieser Adenin-Reste noch zum Ende der ursprünglichen cDNA gehörten. Außerdem konnte im Bereich dieser 10 bp die Sequenz aufgrund einer eventuellen Mischsequenz nicht 100%ig editiert werden. Um eine bessere Sequenzierung des 5' Endes zu erzielen, wurde das 170 bp – PCR-Produkte (glatte Enden) von SA137/93G in den mit *EcoRV* linearisierten Suizidvektor pJet1.2/blunt kloniert. Das Insert von pJet-170G wurde anschließend mithilfe des Primers pJet1forward sequenziert. Eine Plasmidkarte dieses Vektors ist im Anhang aufgeführt (Abbildung A 2). Dadurch konnte das 5' Ende der Antisense-RNA auf 5 bp genau sequenziert werden. Der Abstand des detektierten 5' Endes zur -10-Region des potentiellen SigB-Gegenstrangpromotors betrug 12-16 bp. Obwohl in der Literatur eher Abstände von 7-10 bp zwischen der -10-Region und dem TSP detektiert wurden (Homerova et al., 2004), könnte es sich hierbei um die SigB-abhängige Antisense-RNA handeln (Abbildung 4.25G).



**Abbildung 4.25: Detektierte Antisense-RNAs von IS256.** **A-D:** Die Lage der bei der 5' RACE-PCR entstandenen PCR-Produkte von 170 bp (**A**), 250 bp (**B**), 390 bp (**C**) und 470 bp (**D**) in Bezug auf IS256 und die von Nagel et al. (2011) sowie in dieser Arbeit detektierten Gegenstrangpromotoren ( $\sigma^A$ ,  $\sigma^B$ ). Der Poly-(A)-Schwanz ist in dunkelgrün und der Anchor ist in rot dargestellt. **E:** Elektropherogramm der Sequenzierung des 170 bp –PCR-Produktes von SA137/93G mit RNA100for. **F:** Elektropherogramm der Sequenzierung des 170 bp –PCR-Produktes der SigB-Mutante SA137/93G wG12 mit RNA100for. **G+H:** Sequenzausschnitt der Promotorregionen sowie der TSPs der detektierten Antisense-RNAs (dunkelgrau) von IS256. **I:** Elektropherogramm der Sequenzierung des 470 bp –PCR-Produktes der SigB-Mutante SA137/93G mit RNA300for. **J:** Sequenzausschnitt der Promotorregion sowie des TSPs der detektierten Antisense-RNAs (dunkelgrau) von IS256.

Möglicherweise könnten auch beide Antisense-RNAs, eine SigA- und eine SigB-abhängige, existieren. Um das abschließend zu untersuchen, wurde die 5' RACE-PCR mit der

*sigB::IS256* Insertionsmutante SA137/93G wG12 durchgeführt. Wie Abbildung 4.24 zeigt (Spuren 6 und 12), entstand bei der 5' RACE-PCR von SA137/93G wG12 eine Bande auf einer Höhe von ~170 bp. Die Sequenzierung dieser Bande war vergleichbar mit den Sequenzierungen von SA137/93G und HG001 pA3-2 (Abbildung 4.25F). Da dieser Stamm nicht in der Lage war SigB zu produzieren, kann die hier detektierte Antisense-RNA nicht SigB-abhängig gewesen sein. Abschließend konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei den 170 bp PCR-Produkten von SA137/93G und HG001 pA3-2 nur um eine SigA-abhängige Antisense-RNA handelte oder ob eventuell eine SigA- und eine SigB-abhängige Antisense-RNA vorhanden waren. Die Promotorregionen und mögliche TSPs beider Antisense-RNAs sind in den Abbildungen 4.25G und H dargestellt.

Die Sequenzierungen der 250 bp – PCR-Produkte von SA137/92G und HG001 pA3-2 bestätigten das Vorhandensein einer weiteren Antisense-RNA von IS256, deren 5' Ende (+1) genau detektiert werden konnte (Abbildung 4.25 I und J). Der TSP (+1) dieser Antisense-RNA lag 3 bp von einer potentiellen -10-Region eines SigA-Promotors entfernt, was darauf hindeutet, dass es sich hier um eine SigA-abhängige Antisense-RNA von IS256 handeln könnte. Die SigB-Abhängigkeit dieser Antisense-RNA wurde ausgeschlossen, da diese Antisense-RNA in der SigB-Mutante SA137/93G wG12 detektiert und sequenziert wurde (Abbildung 4.24, Spur 6 und 13). Außerdem wurde vor dem TSP dieser Antisense-RNA keine Konsensus-Sequenz eines SigB-Promotors identifiziert (Münch et al., 2003: [http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp\\_promoter.php](http://prodoric.tu-bs.de/vfp/vfp_promoter.php)).

Bei den detektierten Banden, die nach der ersten RACE-PCR größer als 347 bp waren (Abbildung 4.24, Spuren 1-4, 6), handelte es sich höchstwahrscheinlich um unspezifische Banden oder um Antisense-RNAs, deren TSPs außerhalb von IS256 lagen. Bei dem 400 bp RACE-PCR-Produkt von SA137/93G (Abbildung 4.24, Spur 1-3) handelte es sich beispielsweise um eine Antisense-RNA, deren TSP stromabwärts der IS256-Insertion Ins3 (siehe Tabelle 4.4) lag.

Um das 5' Ende der potentiellen SigA-abhängige Antisense-RNA (Dissertation Michael Nagel, 2011) nachzuweisen, deren Promotor weiter in Richtung 5' Ende von IS256 auf dem Gegenstrang gefunden wurde (Abbildung 4.18), wurde die Gesamt-RNA von SA137/93G mithilfe des Primers SigA194for (SP1) in cDNA umgeschrieben. Nach dem Poly(A)-Tailing der cDNA erfolgte die erste RACE-PCR mit dem genspezifischen Primer RNA300for (SP2) und dem Oligo-dT-Anchor Primer. Die gesamte Menge (50 µl) der entstandenen PCR-Produkte wurde im Agarosegel analysiert.

Wie Abbildung 4.24 (Spur 7) zeigt, wurden zwei Banden in einer Größe ~ 390 bp und ~ 470 bp detektiert. Die eluierten Banden wurden mithilfe einer zweiten RACE-PCR mit den

Primer RNA300for (SP2) und PCR-Anchor Primer amplifiziert. Die Größe der PCR-Produkte wies bereits darauf hin, dass es sich bei den beiden detektierten Antisense-RNAs um die zuvor detektierten Antisense-RNAs von IS256 handeln könnte, da sich der Primer RNA300for genau mit einem Abstand von 219 bp von dem Primer RNA100for entfernt anlagerte und die PCR-Produkte nun im Vergleich zu ~ 170 bp und ~ 250 bp um diesen Betrag größer waren. Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte schlussendlich diese Vermutung (Abbildung 4.25C und D).

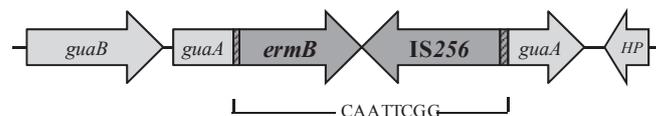
Zusammenfassend konnten mithilfe der 5' RACE-PCR mindestens zwei verschiedene Antisense-RNAs von IS256 in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen reproduzierbar detektiert werden. Die größte Antisense-RNA wies eine Mindestlänge von 435 bp auf und könnte aufgrund des vorhandenen Promotors SigA-abhängig sein (Abbildung 4.25D und J). Die Mindestlänge der kleineren Antisense-RNA(s) betrug 361 - 370 bp. Ob es sich hierbei nur um eine SigA-abhängige Antisense-RNA handelte oder ob zusätzlich eine zweite SigB-abhängige Antisense-RNA vorhanden war, konnte nicht vollständig geklärt werden (Abbildung 4.25C, G und H).

## **4.5 Charakterisierung einer *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante von *S. aureus* HG001**

### **4.5.1 Passagierversuche**

Ob das Vorhandensein von IS256 in *S. aureus* die Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin begünstigt, sollte durch Passagieren verschiedener *S. aureus*-Stämme, die IS256 entweder auf einem Plasmid (HG001 pA3 und pA3sigBmut) oder im Genom (HG001 G7 und W5) enthielten, in Anwesenheit steigender Vancomycin-Konzentrationen untersucht werden. Als Kontrollen dienten *S. aureus*-Stämme, die keine IS256-Kopien enthielten (HG001, HG001 pBT2 und HG001 pBT2ermB). Alle *S. aureus*-Stämme wurden in Anwesenheit von täglich steigenden Vancomycin-Konzentrationen in 5 ml BHI-Medium bei 34°C und 170 rpm passagiert (24 h pro Passage). Täglich wurden mit jeder Vorkultur drei BHI-Röhrchen mit mindestens drei verschiedenen Vancomycin-Konzentrationen angeimpft (Vancomycin-Konzentration der Vorkultur, Vorkultur + 0,5 µg/ml, Vorkultur + 1 µg/ml, Vorkultur + 2µg/ml). Am nächsten Tag wurde die bewachsene Kultur, die die höchste Vancomycin-Konzentration enthielt, überimpft. Es wurden drei verschiedene Passagierversuche durchgeführt, bei denen für die Aufrechterhaltung der jeweiligen Plasmide verschiedene selektive Antibiotika verwendet wurden und die Inokula variiert wurden. Mit diesen

Passagierversuchen konnte nicht reproduzierbar gezeigt werden, dass die Anwesenheit von IS256 eine beschleunigte Resistenzentwicklung in *S. aureus* hervorruft, da nahezu alle Stämme - inklusive der Kontrollen ohne IS256 – nach 10 Tagen der Passage in der Lage waren, in Anwesenheit von Vancomycin-Konzentration über 10 µg/ml zu wachsen. Nach der Passage von *S. aureus* HG001 pA3 konnten jedoch einige Insertionsmutanten, bei denen IS256-*ermB* in das Genom integriert wurde, aus den Glycerinkulturen von Tag 7 und Tag 24 selektiert werden. Bei den Kolonien, die bei 45°C Erythromycin-resistent und Chloramphenicol-sensitiv waren, handelte es sich um IS256-*ermB* Insertionsmutanten. Die Insertionsstellen dieser Mutanten wurden schließlich mittels inverser PCR (siehe Kapitel 3.6.7) ermittelt. Bei zwei Insertionsmutanten von *S. aureus* HG001 von Tag 7 und von Tag 24 entstanden PCR-Produkte von ca. 3500 bp. Die Sequenzierungen beider PCR-Produkte zeigten, dass beide Insertionsmutanten eine Insertion von IS256-*ermB* in dem Gen *guaA* enthielten (Abbildung 4.26). Bei *guaA* handelt es sich um ein Housekeeping-Gen, das für eine Guanosinmonophosphat (GMP) - Synthetase kodiert. Die Insertion durch IS256-*ermB* führte höchstwahrscheinlich zu einem Funktionsverlust der GMP-Synthetase in *S. aureus* HG001. Diese *guaA*::IS256-*ermB* Insertionsmutanten von *S. aureus* HG001 (Tag 7 bzw. Tag 24) konnten in der Mischkultur des Passagierversuches von Tag 7 bis Tag 24 in Anwesenheit von Vancomycin-Konzentrationen bis zu 15,5 µg/ml (Tag 24) überleben und wurden deshalb anschließend im Hinblick auf ihre Vancomycin-Resistenz untersucht. Die Vancomycin-MHKs der selektierten *guaA*::IS256-*ermB* Insertionsmutanten von Tag 7 und Tag 24 betrugen 4-8 µg/ml und waren damit teilweise genauso resistent und teilweise etwas resistenter als andere passagierte Zellen aus derselben Kultur oder der Kultur mit *S. aureus* HG001 pBT2 (ohne IS256).



**Abbildung 4.26: Lokalisierung von IS256-*ermB* in *guaA*.** Die IRs von IS256 sind schraffiert dargestellt und das 8-bp DR ist unter der Grafik aufgeführt.

#### 4.5.2 Rekonstitution der *guaA*::IS256-*ermB* Insertion im Wildtyp – Hintergrund von *S. aureus* HG001 über Phagentransduktion

Anschließend wurde der Einfluss der *guaA*::IS256-*ermB* Insertion auf die Vancomycin-Resistenz untersucht. Da höchstwahrscheinlich beide *guaA*::IS256-*ermB* Insertionsmutanten von *S. aureus* HG001 (Tag 7 bzw. Tag 24) nach dem Passagieren mit steigenden Vancomycin-Konzentrationen weitere Hintergrundmutationen aufwiesen, die das Überleben

in Anwesenheit höherer Vancomycin-Konzentrationen ermöglichten, wurde die *guaA*::IS256-*ermB* Insertion von *S. aureus* HG001 Tag 24 per Phagentransduktion auf den Wildtyp-Stamm *S. aureus* HG001 übertragen. Die Phagentransduktion wurde, wie in Kapitel 3.6.13 beschrieben, unter Verwendung des Phagen 85 durchgeführt. Die Transduktanten wurden auf LB-Agar in Anwesenheit von 25 µg/ml Erythromycin selektiert. Die chromosomale Insertion von IS256-*ermB* in das *guaA*-Gen von *S. aureus* HG001 wurde anschließend durch PCR mithilfe der Primer *guaA*for und *guaA*rev überprüft. Die Sequenzierung des entstandenen PCR-Produktes von 2482 bp bestätigte die erfolgreiche Konstruktion von *S. aureus* HG001 *guaA*::IS256-*ermB*. Da bei dieser Mutante auf eine vollständige Genomsequenzierung verzichtet wurde, konnte eine Übertragung weiterer Hintergrundmutationen nicht ausgeschlossen werden.

### 4.5.3 Charakterisierung von *S. aureus* HG001 *guaA*::IS256-*ermB*

#### 4.5.3.1 Wachstumskinetiken

Zur Charakterisierung von *S. aureus* HG001 *guaA*::IS256-*ermB* wurden Wachstumskurven im Vergleich zum Elternstamm *S. aureus* HG001 aufgenommen (Abbildung 4.27).

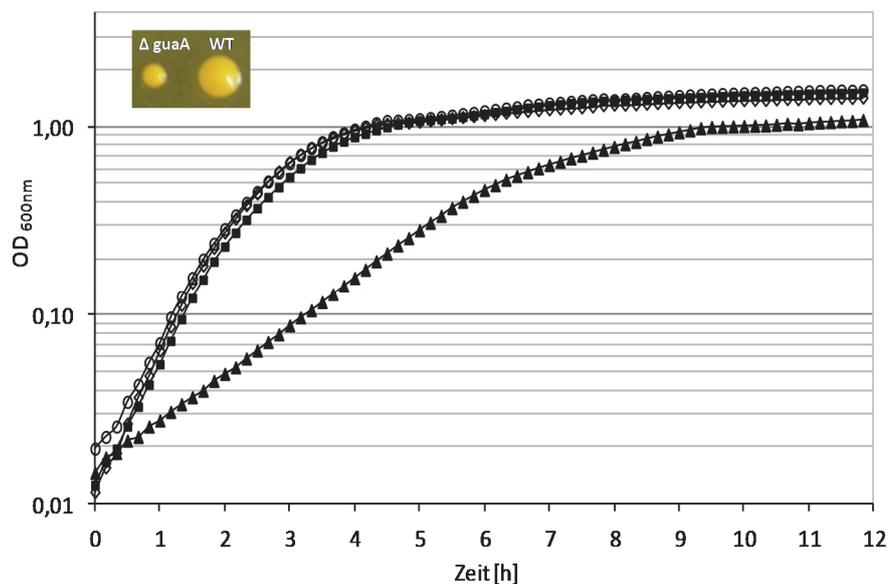
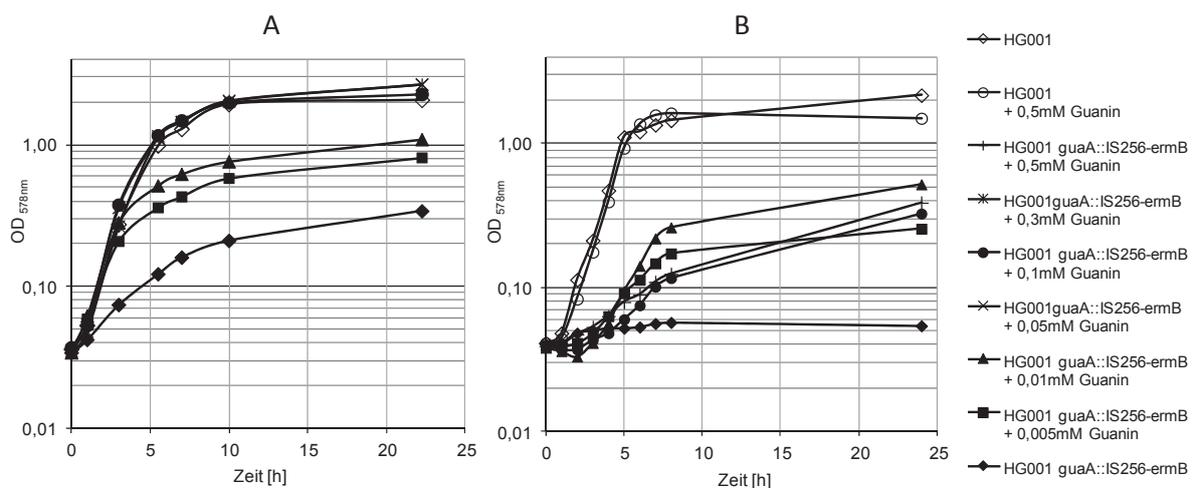


Abbildung 4.27: Wachstumskinetiken von *S. aureus* HG001 *guaA*::IS256-*ermB* in An- (■) & Abwesenheit von 0,9 mM Guanin (▲) sowie von *S. aureus* HG001 in An- (○) und Abwesenheit von 0,9 mM Guanin (◇) in BHI-Medium bei 37°C. Diese Wachstumskinetiken wurden mithilfe des Mikroplatten-Reader aufgenommen (siehe Kapitel 3.4). Die kleine Grafik oben links zeigt den Unterschied der Koloniegroße von *S. aureus* HG001 *guaA*::IS256-*ermB* im Vergleich zu *S. aureus* HG001 nach einer Inkubation von 24 h auf BHI-Medium bei 37°C.

Die *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante wies im Vergleich zum Elternstamm eine deutlich reduzierte Wachstumsrate in BHI-, TSB- sowie MH-Medium auf. Die Wachstumskinetiken der Insertionsmutante wurden sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von 2 µg/ml Erythromycin (zur Aufrechterhaltung der Insertion) ermittelt. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Wachstumsrate festgestellt werden. Die Kolonien der *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante waren um ein Vielfaches kleiner als die des Wildtyps und waren vergleichbar mit SCVs (Abbildung 4.27).

#### 4.5.3.2 Guanin – Auxotrophie

Einige Studien geben Hinweise darauf, dass die Inaktivierung von *guaA*, sowohl in *E. coli* als auch in *S. aureus* zur Guanin-Auxotrophie führte (Shimaoka et al., 2006; Mulhbacher et al., 2010). Aufgrund geringer Mengen an Guanin in BHI-, TSB- und MH-Medium, war das Wachstum in diesen Medien möglich. Die Guanin-Auxotrophie von *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* konnte jedoch mithilfe von Wachstumsversuchen in modifiziertem RPMI-Medium (Moore et al., 1967), das kein Guanin enthielt, gezeigt werden (Abbildung 4.28).



**Abbildung 4.28: Guanin-Auxotrophie der *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* im Vergleich zu *S. aureus* HG001.** Wachstumskurven der beiden Stämme in modifiziertem RPMI-Medium in An – und Abwesenheit von Guanin (0,005 – 0,5 mM). **A:** Zum Animpfen der Hauptkultur wurde eine Vorkultur der Stämme in BHI-Medium verwendet. **B:** Zum Animpfen der Hauptkultur wurden Zellsuspensionen verwendet, die durch das Resuspendieren von Kolonien einer frischen Agarplatte in RPMI-Medium hergestellt wurden.

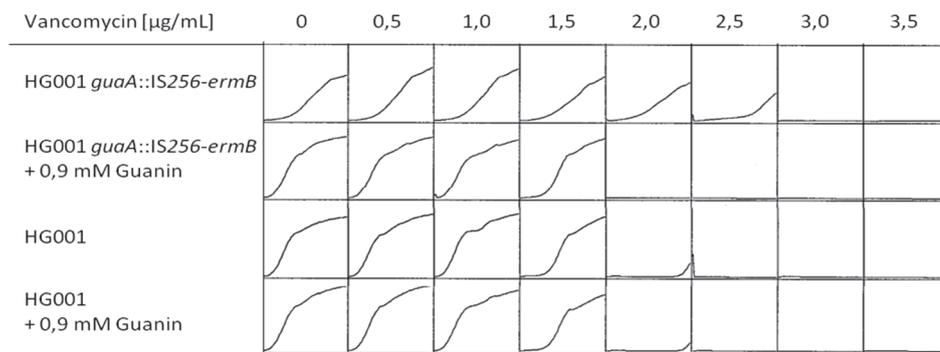
Abbildung 4.28A zeigt, dass die Wachstumsrate der Insertionsmutante in RPMI-Medium, welches mithilfe einer Vorkultur in BHI-Medium angeimpft wurde, mit steigenden Guanin-Konzentrationen stieg und eine Zugabe von 0,05 mM Guanin ausreichte, um die Wachstumsrate der Kontrolle *S. aureus* HG001 zu erreichen. Auch ohne die Zugabe von

Guanin konnte die Insertionsmutante langsam wachsen, da aus der Vorkultur (BHI) geringe Guanin-Konzentrationen in die Hauptkultur gelangten. In einem zweiten Versuch wurden die Hauptkulturen deshalb mit in RPMI-Medium resuspendierten Kolonien angeimpft. Abbildung 4.28B zeigt, dass die *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante unter diesen Bedingungen nicht in der Lage war zu wachsen. Die Zugabe von Guanin (0,005 – 0,1 mM) ermöglichte hier ein Wachstum der Insertionsmutante. Die Wachstumsrate der Kontrolle *S. aureus* HG001 konnte jedoch nicht erreicht werden. Der Grund dafür war höchstwahrscheinlich die schlechte Löslichkeit von Guanin-Hydrochlorid in RPMI-Medium bei Endkonzentrationen größer 0,01 mM, da Guanin-Hydrochlorid nur in 1N NaOH löslich war (Stammlösung: 50 mg/ml Guanin gelöst in 1N NaOH). Alle Kulturen von *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* enthielten 4 µg/ml Erythromycin, um die Insertion aufrechtzuerhalten. Am Ende des Wachstumsversuches wurden alle Kulturen auf TSA mit 25 µg/ml Erythromycin ausgestrichen. Bei allen Kulturen lagen nach 24 Stunden Reinkulturen vor, die, beurteilt nach der Koloniegröße, keine Revertanten der *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante enthielten. Interessanterweise waren auch die Zellen der *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante, die in RPMI-Medium ohne Zugabe von Guanin kultiviert wurden, in der Lage auf TSA mit Erythromycin [25µg/ml] Kolonien zu bilden, was darauf hindeutet, dass die Zellen persistierten.

#### 4.5.3.3 Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin

Anschließend wurde die antimikrobielle Empfindlichkeit der *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante gegenüber Vancomycin in BHI-Medium ermittelt. Der Elternstamm *S. aureus* HG001 wurde als Kontrollstamm verwendet. Die *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante zeigte eine etwas geringere Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin im Vergleich zum Elternstamm (MHK-Anstieg von 1-2 µg/ml auf 2 µg/ml). Um diese Ergebnisse genauer zu untersuchen, wurden die Empfindlichkeiten gegenüber Vancomycin durch Wachstumsexperimente analysiert (Abbildung 4.29). Diese Ergebnisse stimmten mit dem MHK-Bestimmungen überein. Wie Abbildung 4.29 zeigt, konnte die *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante innerhalb von 12 Stunden noch bei einer Vancomycin-Konzentration von 2,5 µg/ml wachsen, wobei der Elternstamm nur bis zu einer Konzentration von 1,5 µg/ml Vancomycin wachsen konnte. Die Zugabe von 0,9 mM Guanin zum Medium der *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante setzte deren Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin auf das Level des Elternstammes zurück (Wachstum bis 1,5 µg/ml Vancomycin). Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Insertion von *IS256-ermB* in *guaA* zu einer leichten Erhöhung der Vancomycin-Resistenz von *S. aureus* HG001 führte, die durch die Substitution von Guanin kompensiert werden konnte. Die *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante konnte jedoch

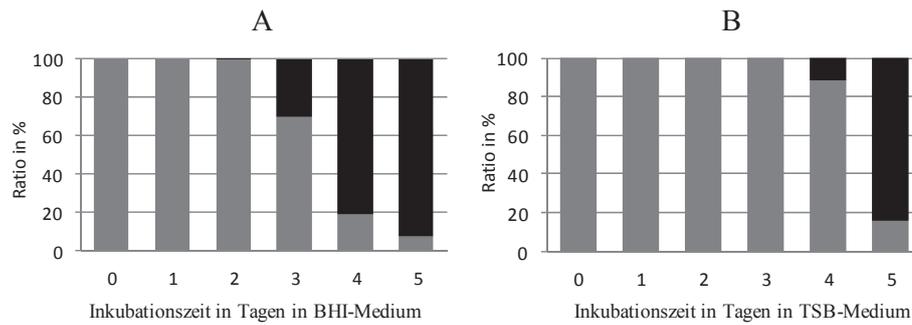
nicht dem VISA-Phänotyp zugeordnet werden, da das Level einer Vancomycin-MHK von 4 µg/ml nicht überschritten wurde.



**Abbildung 4.29: Wachstumsexperimente von *S. aureus* *guaA::IS256-ermB* und *S. aureus* HG001 in Anwesenheit verschiedener Vancomycin-Konzentrationen in BHI-Medium versetzt mit und ohne 0,9 mM Guanin.**

#### 4.5.3.4 Entstehung von Revertanten

In der Literatur wurde gezeigt, dass IS256 in der Lage ist, sich durch eine illegitime Rekombination vollständig von einer Insertionsstelle auszuschneiden (Hennig und Ziebuhr, 2008) und dadurch Phasenvariationen zu verursachen (Ziebuhr et al., 1999). Außerdem wurde beschrieben, dass SCVs häufig geringe Stabilitäten aufweisen und schnell zum Wildtyp revertieren können (Kahl, 2014). In einem weiteren Experiment wurde demzufolge getestet, ob nach dem Passagieren der Insertionsmutante *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* Revertanten auftraten, die dem Wildtyp von *S. aureus* HG001 ähnelten. Dazu wurde der Stamm über 5 Tage in 5 ml BHI- bzw. TSB-Medium in Anwesenheit von 4 µg/ml Erythromycin bei 37°C passagiert. Die Passage erfolgte jeweils nach 24 Stunden, wobei jeweils frisches Medium auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 angeimpft wurde. Täglich wurde ein Aliquot der Kultur auf BHI-Agar bzw. TSA mit 25 µg/ml Erythromycin ausgespatelt, der anschließend bei 37°C für 24 h (TSB) bzw. 48 h (BHI) inkubiert wurde. Die Kolonien auf den Agarplatten wurden danach anhand ihrer Größe analysiert. Wie Abbildung 4.30 zeigt, traten nach 3 Tagen in BHI-Medium neben den SCVs der *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante die ersten Revertanten auf (30%), deren Koloniegrößen mit denen des Wildtyps *S. aureus* HG001 vergleichbar waren. Der prozentuale Anteil dieser phänotypischen Revertanten stieg nach 4 bzw. 5 Tagen schnell auf 81 bzw. 92%, was den deutlichen Wachstumsvorteil der Revertanten gegenüber der *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante zeigte. In TSB-Medium konnten nach 4 Tagen die ersten phänotypischen Revertanten (11%) detektiert werden, deren prozentualer Anteil nach 5 Passagen auf 84% stieg.



**Abbildung 4.30: Entstehung von Revertanten der *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante nach der Passage in BHI- (A) bzw. TSB-Medium in Anwesenheit von 4 µg/ml Erythromycin (B).** Die grauen Balken stellen den prozentualen Anteil der SCVs von *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* dar. Die schwarzen Balken zeigen den prozentualen Anteil der potentiellen Revertanten.

Anschließend wurden einige Revertanten mittels PCR (Primer *guaA\_for* und *guaA\_rev*) auf den Verlust von *IS256-ermB* in *guaA* untersucht. Bei den meisten phänotypischen Revertanten konnte kein *IS256-ermB* in *guaA* detektiert werden, was auch eine genotypische Wiederherstellung des Wildtyps zeigte. Interessanterweise enthielten einige phänotypische Revertanten weiterhin die *guaA::IS256-ermB*-Insertion, was darauf hinweisen könnte, dass hier eine entstandene Hintergrundmutation (Punktmutation oder replikativ transponiertes *IS256-ermB*) die Inaktivierung von *guaA* kompensierte.

#### 4.6 Charakterisierung einer *hemY::IS256-spc* Insertionsmutante von *S. aureus* HG001

Die Insertionsmutante *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* war, während des Versuches mithilfe von pA6 eine *rsbU::IS256*-Insertionsmutante zu selektieren, auf TSA mit 150 µg/ml Spectinomycin bei 45°C isoliert worden. Die Insertionsstelle von *IS256-spc* wurde anschließend mittels inverser PCR unter Verwendung der Restriktionsenzyme *XmnI* und *AluI* ermittelt (siehe Kapitel 3.6.7). Die Sequenzierung des aufgereinigten PCR-Produktes (ca. 700 bp) zeigte, dass *IS256-spc* in der Nähe des 5' Endes von *hemY* lokalisiert war (Abbildung 4.31). Das Gen *hemY* kodiert für die Protoporphyrinogen-IX-Oxidase, ein Enzym, das einen der letzten Schritte in der Hämin-Biosynthese katalysiert (Hansson und Hederstedt, 1994). Hämin-abhängige SCVs von *S. aureus* wurden häufig in Anwesenheit von Aminoglykosiden selektiert. Aminoglykoside benötigen ein hohes Membranpotential, um in die Zelle aufgenommen zu werden. Die Inaktivierung der Hämin-Biosynthese führt zu einer Hemmung der Elektronentransportkette und verändert das Membranpotential, was folglich zur erhöhten

Resistenz gegenüber Aminoglykosiden führt (von Eiff et al., 1997). Außerdem sind diese Stämme häufig Hämin-auxotroph (Acar et al., 1978; Balwit et al., 1994). Interessanterweise wurde *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* in Anwesenheit von 150 µg/ml Spectinomycin, einem Aminoglykosid-ähnlichen Antibiotikum, selektiert.

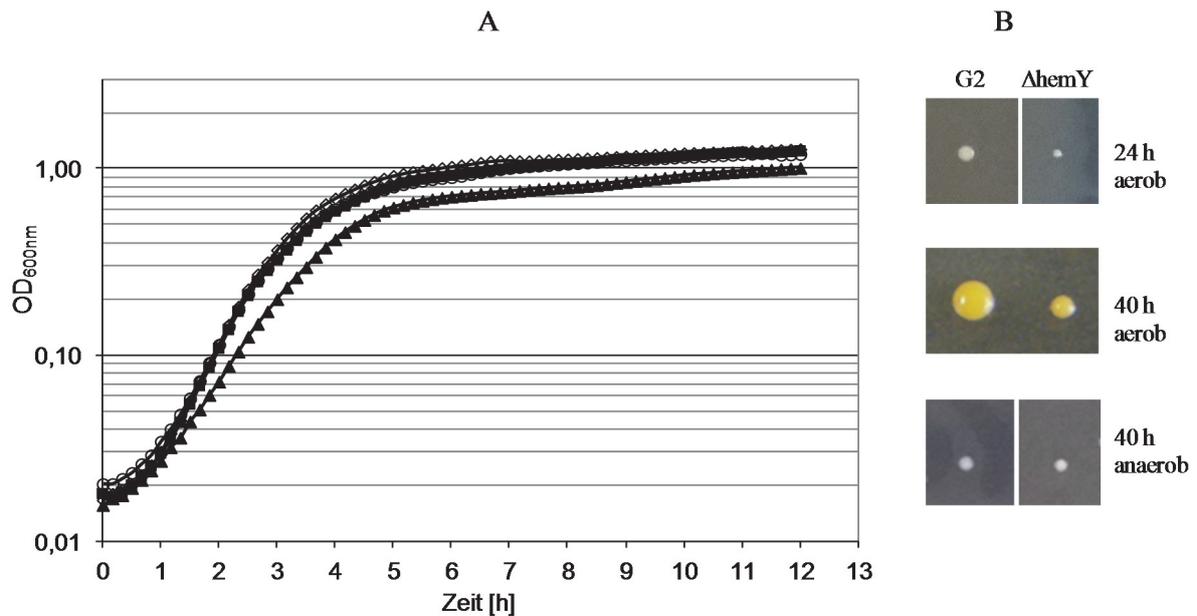


**Abbildung 4.31: Lokalisierung von IS256-spc in *hemY*.** Die IRs von IS256 sind schraffiert und das 8-bp DR ist unter der Grafik aufgeführt.

#### 4.6.1 Wachstumseigenschaften und Hämin-Auxotrophie

In den ersten Untersuchungen zur Charakterisierung von *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* wurde das Wachstum auf TSA mit 150 µg/ml Spectinomycin untersucht. Als Kontrollstamm diente die *IS256-spc* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 G2, die eine intergenetische Insertion zwischen SAOUHSC\_0967 und SAOUHSC\_0968 aufwies, die das Wachstum dieses Stammes im Vergleich zum Elternstamm *S. aureus* HG001 nicht beeinflusste.

Wie Abbildung 4.32B zeigt, war die selektierte *hemY::IS256-spc* Insertionsmutante im Vergleich zum Kontrollstamm nach einer aeroben Inkubation von 24 h bei 37°C durch sehr kleine hellgelbe Kolonien (SCVs), die auf ein verlangsamtes Wachstum hindeuteten, gekennzeichnet. Eine leicht reduzierte Staphyloxanthin-Synthese, die ebenfalls ein typisches Merkmal für SCVs darstellt (Proctor et al., 1994), konnte ebenfalls festgestellt werden. Unter anaeroben Bedingungen war das Wachstum beider Stämme gehemmt und somit waren die Koloniegrößen nach 40 h Inkubation identisch. Es ist ebenfalls deutlich zu erkennen, dass unter anaeroben Wachstumsbedingungen kein Staphyloxanthin gebildet wurde, weil hier SigB nicht exprimiert wird (Fuchs et al., 2007). Wachstumskinetiken mithilfe des Mikroplatten-Readers in TSB-Medium mit 64 µg/ml Spectinomycin bei 37°C bestätigten die reduzierte Wachstumsrate von *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* im Vergleich zum Kontrollstamm (Abbildung 4.32A). Diese Wachstumshemmung konnte durch die Zugabe von 2 µg/ml Hämin vollständig kompensiert werden, sodass sich eine mit dem Kontrollstamm vergleichbare Wachstumsrate einstellte. Wachstumskinetiken in BHI-, MH- und RPMI-Medium ergaben vergleichbare Ergebnisse und bestätigten die Hemmung der Hämin-Biosynthese und somit die Hemmung der Elektronentransportkette in *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc*.



**Abbildung 4.32: Wachstumseigenschaften von *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* im Vergleich zu *S. aureus* HG001 G2. A) Wachstumskinetiken von *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* in An- (■) & Abwesenheit von 2 µg/ml Hämin (▲) sowie von *S. aureus* HG001 G2 in An- (○) und Abwesenheit von 2 µg/ml Hämin (◇) in TSB-Medium mit 64 µg/ml Spectinomycin bei 37°C. Diese Wachstumskinetiken wurden mithilfe des Mikroplatten-Reader aufgenommen. B) Koloniegrößen von *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* im Vergleich zu *S. aureus* HG001 G2 auf TSA mit 150 µg/ml Spectinomycin nach einer Inkubation bei 37°C.**

#### 4.6.2 Untersuchung der Antibiotikaresistenz

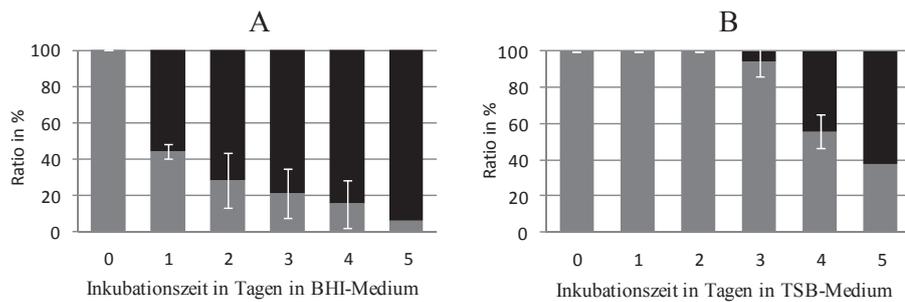
Um die Empfindlichkeit von *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* gegenüber Aminoglykosiden zu untersuchen, wurde die MHK gegenüber Kanamycin in halbkonzentriertem MH-Medium und in BHI-Medium bestimmt. Die Resistenz gegenüber dem Proteinbiosynthese-Inhibitor Fusidinsäure wurde ebenfalls ermittelt, da einige Hämin-auxotrophe SCVs von *S. aureus*, die mit Aminoglykosiden selektiert wurden, auch gegen dieses Antibiotikum resistent waren (Norström et al., 2007). Die folgende Tabelle 4.13 zeigt die MHK-Werte. Sowohl in halbkonzentrierten MH-Medium als auch in BHI- und TSB-Medium wurde bei der *hemY::IS256-spc* Insertionsmutante eine 16-32-fach erhöhte MHK gegenüber Kanamycin im Vergleich zum Kontrollstamm *S. aureus* HG001 G2 detektiert. Die MHK gegenüber Gentamicin stieg bei der *hemY::IS256-spc* Insertionsmutante ebenfalls um das 32-fache im Vergleich zum Kontrollstamm. Eine gesteigerte Resistenz der *hemY::IS256-spc* Insertionsmutante gegenüber Fusidinsäure wurde nicht detektiert.

**Tabelle 4.13: MHK-Bestimmung von *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc*.**

Antibiotikum	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]				
	Kanamycin MH1/2	Kanamycin TSB (BHI)	Gentamicin TSB	Fusidinsäure MH1/2	Fusidinsäure BHI
<i>S. aureus</i> HG001 G2	0,5	8 (4)	0,5	0,125 - 0,25	0,0625
<i>S. aureus</i> HG001 <i>hemY::IS256-spc</i>	8-16	128 (128)	16	0,125 - 0,25	0,125

### 4.6.3 Entstehung von Revertanten

Da der SCV-Phänotyp häufig instabil ist und schnell zum Phänotyp des Wildtyps revertieren kann (Kahl, 2014), wurde mithilfe eines Passagierversuches die Entstehung von Revertanten von *S. aureus hemY::IS256-spc* untersucht. Dazu wurde der Stamm über 5 Tage in 5 ml BHI- bzw. TSB-Medium in Anwesenheit von 150  $\mu\text{g/ml}$  Spectinomycin bei 37°C passagiert. Die Passage erfolgte jeweils nach 24 Stunden, wobei jeweils frisches Medium auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 angeimpft wurde. Täglich wurde ein Aliquot der Kultur auf BHI-Agar bzw. TSA mit 150  $\mu\text{g/ml}$  Spectinomycin ausgespatelt. Die Agarplatten wurden anschließend bei 37°C für 24 - 48 h inkubiert. Danach wurden die Kolonien auf den Agarplatten anhand ihrer Größe analysiert und die Anzahl der SCVs und der phänotypischen Revertanten (größere Kolonien) bestimmt. Wie Abbildung 4.33 zeigt, wurden direkt nach dem Animpfen der Kulturen (Tag 0) sowohl in BHI- als auch in TSB-Medium keine phänotypischen Revertanten detektiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden in BHI-Medium bereits 56% der Kolonien als phänotypische Revertanten identifiziert, da sie eine dem Wildtyp vergleichbare Koloniegröße aufwiesen. Innerhalb von 5 Tagen verdrängten die Revertanten (94%) die *hemY::IS256-spc* Insertionsmutante (6%) fast vollständig aus der Kultur (BHI-Medium). In TSB-Medium traten erst nach 3 Tagen phänotypische Revertanten auf (6%). Anschließend wurden einige phänotypische Revertanten selektiert und mittels PCR (Primer *hemY\_for* und *hemY\_rev*) auf *IS256-spc* Insertionen in *hemY* untersucht. Die phänotypischen Revertanten wiesen keine Insertion von *IS256-spc* in *hemY* auf. Demzufolge lag eine phänotypische und genotypische Wiederherstellung des Wildtyps vor.

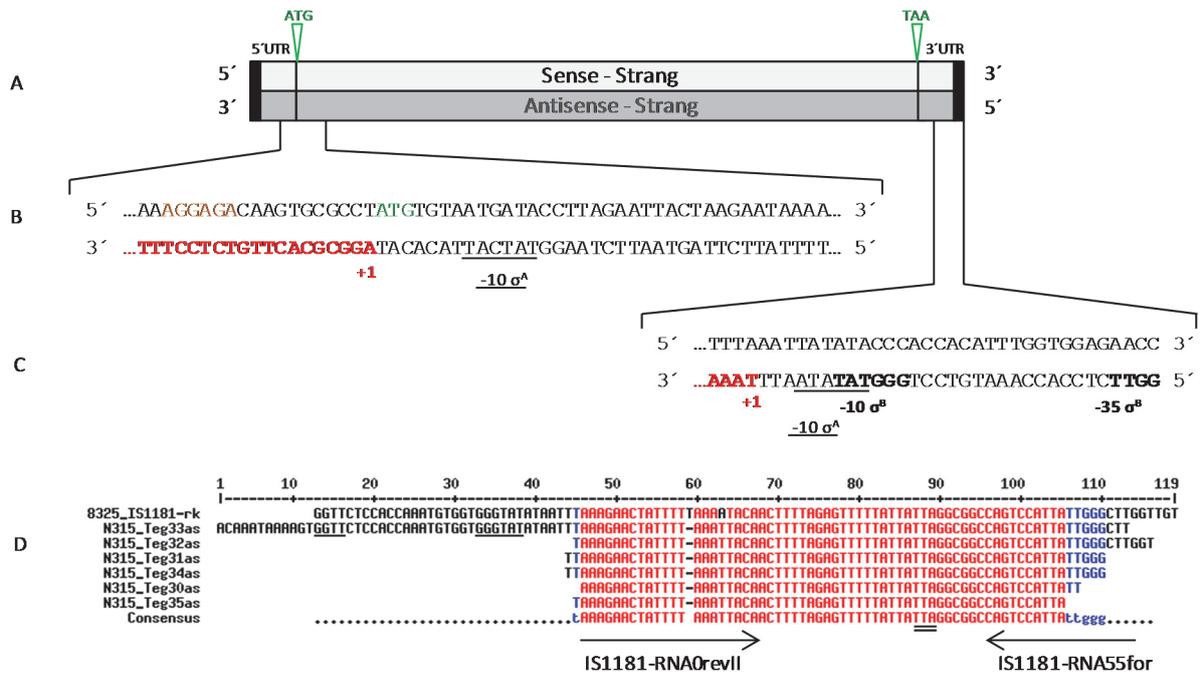


**Abbildung 4.33: Entstehung von Revertanten der *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* Insertionsmutante nach der Passage in BHI- (A) bzw. TSB-Medium in Anwesenheit von 150 µg/ml Spectinomycin (B).** Die grauen Balken stellen den prozentualen Anteil der SCVs von *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* dar. Die schwarzen Balken zeigen den prozentualen Anteil der phänotypischen Revertanten. Die weißen Fehlerbalken geben die Standardabweichung zweier voneinander unabhängiger Passagerversuche an.

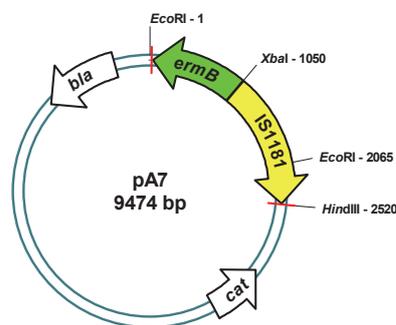
## 4.7 Charakterisierung der Antisense-RNA von *IS1181*

### 4.7.1 Fakten und erste Untersuchungen

Beaume et al. (2010) konnten bereits zwei Antisense-RNAs von *IS1181* per Illumina RNA-Seq in *S. aureus* N315 nachweisen, die jeweils in der 5'- bzw. 3' untranslatierten Region (UTR) der *IS1181*-Transposase lokalisiert waren (Abbildung 4.34B und C). In den Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit wurde mithilfe einer *in silico* Analyse unter Verwendung des Programmes Prodic (Münch et al., 2003) ein potentieller SigB-abhängiger Gegenstrangpromotor im Bereich des IR<sub>R</sub> von *IS1181* identifiziert (Abbildung 4.34C), der durchaus der Promotor der bereits detektierten Antisense-RNA am 3' Ende von *IS1181* sein könnte. Allerdings wurde in dieser Region auch eine -10-Region eines SigA-abhängigen Promotors identifiziert (Abbildung 4.34C). Um nun zu untersuchen, ob die Transposition von *IS1181*, das in nahezu allen *S. aureus*-Stämmen vorhanden ist, von SigB beeinflusst wird, wurde in Zusammenarbeit mit der Masterstudentin Christine Lämmer das Plasmid pA7 generiert (Abbildung 4.35). Dieses Plasmid besteht aus dem Shuttlevektor pBT2 (Brückner, 1997) und enthält ein rekombinantes *IS1181-ermB*-Element, bei dem das *IS1181*-Element an eine Erythromycin-Resistenzkassette gekoppelt ist. *IS1181-ermB* wird durch die IRs von *IS1181* flankiert, um die Transposition des gesamten rekombinanten Elementes zu ermöglichen. Mithilfe des Testsystems pA7 wurde gezeigt, dass die Transpositionsfrequenz von *IS1181-ermB* im *rsbU*-negativen Stamm *S. aureus* NCTC8325 Tübingen im Durchschnitt 3-fach höher war, als im *rsbU*-positiven Stamm *S. aureus* HG001 (Masterarbeit Christine Lämmer, 2014).



**Abbildung 4.34: Antisense-RNAs von IS1181.** **A:** Aufbau von IS1181 mit den beiden Untranslatierten Regionen (UTR) und den IRs (dicke schwarze Markierung). **B:** Lage der von Beume et al. (2010) detektierten Antisense-RNA Tnp142 am 5' Ende von *tnp* (rote Sequenz) inklusive potentiellm SigA-Promotor (unterstrichen). Die ribosomale Bindestelle der *tnp*-mRNA ist in orange markiert. Das Startkodon von *tnp* ist in grün dargestellt. **C:** Lage der von Beume et al. (2010) detektierten Antisense-RNA Tnp24as am 3' Ende von IS1181 inklusive der potentiellen Promotoren. Der SigA-Promotor (Beume et al., 2010) ist unterstrichen und der SigB-Promotor ist fett gekennzeichnet. **D:** Alignment aller von Beume et al. (2010) in *S. aureus* N315 detektierten Antisense-RNAs am 3' Ende von IS1181 (N315\_Teg...) mit dem Ende der IS1181-Sequenz aus *S. aureus* NCTC8325 (IS1181-8325-rk). Die bei der RT-PCR verwendeten Primer sind durch Pfeile markiert. Der potentielle SigB-Promotor ist unterstrichen. Das Stoppkodon der Transposase-mRNA von IS1181 ist doppelt unterstrichen.



**Abbildung 4.35: Plasmidkarte von pA7 (nach Masterarbeit von Christine Lämmer).**

Vergleichbare Ergebnisse wurden für IS256-*ermB* gezeigt (Nagel et al., 2011; Schreiber et al., 2013), was auf eine ähnliche Regulation hinweisen könnte. Die Hemmung der

Transpositionsfrequenz im *rsbU*-positiven Stamm *S. aureus* HG001 könnte also auch bei *IS1181* durch die Bildung einer SigB-abhängigen Antisense-RNA begründet sein. Der Nachweis der SigB-Abhängigkeit dieser Antisense-RNA sollte anschließend per RT-PCR oder 5' RACE-PCR in *S. aureus* SG511 pA7 erfolgen, wie in Kapitel 3.6.16 und 3.6.17 beschrieben. *S. aureus* SG511 enthielt nachweislich keine *IS1181*-Kopien im Genom. Nach zahlreichen Versuchen musste dieser Nachweis jedoch aus den unten beschriebenen Gründen aufgegeben werden.

Wie bereits in Kapitel 4.4.1 für den Nachweis der Antisense-RNA von *IS256* beschrieben wurde, konnte der Nachweis der Antisense-RNA mittels RT-PCR unter Verwendung des Testsystems pA7 in *S. aureus* SG511 nicht zum Ergebnis führen, da die Transkription der bei der RT-PCR detektierten Antisense-RNA bereits auf dem Plasmid pBT2 stromabwärts von *IS1181* startete. Daraufhin wurde versucht, unabhängig vom Testsystem pA7 mithilfe der Stämme *S. aureus* HG001 (*rsbU*<sup>+</sup>) und *S. aureus* HG001 $\Delta$ *sigB* (Kontrolle), die bereits zwei Kopien von *IS1181* im Genom enthielten, die SigB-Abhängigkeit der Antisense-RNA nachzuweisen. Trotz des Einsatzes großer Mengen Gesamt-RNA (3  $\mu$ g) für die cDNA-Synthese, konnte bei der RT-PCR unter Verwendung der Primer RNA55for und RNA0revII in keinem der beiden Stämme eine Antisense-RNA detektiert werden. Ein vorausgegangener Abbau der RNA durch eine Kontamination mit RNasen, sowie fehlerhaftes Pipettieren des Mastermixes für die cDNA-Synthese oder die PCR konnten ausgeschlossen werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss von IS256 auf die Genomvariabilität und die Resistenzentwicklung des Norddeutschen Epidemiotyps von *S. aureus*

Die Rolle von Transposons oder IS-Elementen bei der Evolution der Genome verschiedener Spezies ist bisher nur wenig verstanden. Interessanterweise tragen einige Bakterien eine sehr hohe Anzahl von IS-Elementen, während sehr nah verwandte Stämme häufig keine IS-Elemente in ihrem Genom enthalten. Hierfür gibt es zahlreiche Beispiele unter verschiedenen *Bordetella*-, *Yersinia*-, *Bacillus*- (Nagy und Chandler, 2004), aber auch *Staphylococcus*-Spezies. Während die drei *S. aureus*-Stämme des Norddeutschen Epidemiotyps (ST247) *S. aureus* SA1450/94, SA137/93A und SA137/93G zahlreiche IS256-Kopien im Genom tragen, wurden im Genom des nahen Verwandten *S. aureus* COL keine Kopien dieses IS-Elementes detektiert (Gill et al., 2005). Alle vier Stämme gehören dem klonalen Komplex 8 (CC8) an. Der Referenzstamm *S. aureus* COL war eines der ersten klinischen MRSA-Isolate und wurde 1960 bei einem Patienten in Colindale, Großbritannien isoliert (Jevons, 1961). Heute gehört *S. aureus* COL, der der klonalen Linie des MLST-Typs ST250 (Archaischer Klon) angehört, zu den am meisten untersuchtesten MRSA-Stämmen. Da der ST247-MRSA (Iberischer Klon) ein Nachkomme des ST250-MRSA ist (Chambers und Deleo, 2009), wurde *S. aureus* COL - als der naheste Verwandte, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Gill et al., 2005) – in dieser Arbeit als Referenzstamm verwendet. Die Genome der drei ST247-Stämme konnten mit einer guten Abdeckung sequenziert und ausgewertet werden. Außerdem wurden alle Insertionsstellen der IS-Elemente IS256, IS1181, IS257/IS431*mec* und IS1272 (und Derivate) identifiziert. Die Lage der jeweiligen Insertion ist ausschlaggebend dafür, ob die Insertion einen schädigenden oder vorteilhaften Einfluss auf den Organismus hat. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass eine Vielzahl von Insertionen aller IS-Elemente im intergenischen Bereichen lokalisiert ist, wo sie wenig schädlich für den Organismus sind. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass Ineffektivität die evolutionäre Strategie der IS-Elemente ist, wobei die Transposition auf einem niedrigen Level gehalten wird und nicht schädigende neutrale Insertionen in der Evolution selektiert werden (Reznikoff, 2003; Nagy und Chandler, 2004; Plague, 2010). Die IS-Elemente IS1181, IS1272 oder IS257/IS431*mec*, die häufig eine geringe Kopienzahl in den Genomen aufweisen, kommen sowohl in den drei ST247-Stämmen als auch in *S. aureus* COL vor und sind auch in anderen klonalen Linien von *S. aureus* weit verbreitet. Diese IS-Elemente wurden deutlich weniger mit Phasenvariationen oder erhöhter Genomvariabilität von *S. aureus* in Verbindung

gebracht als IS256, was auf eine geringere Transpositionsaktivität dieser IS-Elemente im Vergleich zu IS256 hinweist. Die geringen Transpositionsaktivitäten von IS1181, IS1272 und IS431mec konnten auch dadurch gezeigt werden, dass die Insertionsstellen dieser IS-Elemente in den drei ST247-Stämmen nahezu identisch sind. Erste Untersuchungen der Transpositionsaktivität von IS431mec mithilfe des in dieser Arbeit verwendeten Testsystems zur Messung der Transpositionsfrequenz, bestätigten dies. Die Transpositionsfrequenz von IS431mec von pA5 in das Genom von *S. aureus* HG001 war so gering, dass die Kultur nahezu unverdünnt auf die Selektionsplatten ausgespatelt werden musste. Dies führte zu fehlerhaften Werten, da Kolonien, die auf toten Zellen wachsen konnten, als falsch positiv gezählt wurden. Einige Studien zeigen jedoch den Einfluss von IS431mec, IS1181 und IS1272 auf die Genomvariabilität von *S. aureus*, die jedoch vorrangig durch Rekombinationsereignisse verursacht wurde, bei denen diese IS-Elemente als Rekombinationsplattform dienten (Kobayashi et al., 1999; Shukla et al., 2009). IS431mec verursachte sowohl in SA137/93G als auch in Subkulturen von *S. aureus* MR108 und MR6 durch Rekombinationsereignisse große genomische Deletionen, die beispielsweise zum Verlust von *mecA* führten (Wada et al., 1991; Reipert et al., 2003). In den drei ST247-Stämmen wurden mit 32, 38 und 44 IS256-Elementen die bisher höchsten Kopienzahlen von IS256 im Genom eines Bakteriums detektiert. Es wurden 67 verschiedene Insertionsstellen von IS256 identifiziert, von denen nur 13 Insertionen in allen drei Stämmen identisch waren. Dieses Ergebnis verdeutlicht die hohe Transpositionsaktivität von IS256 und deren Einfluss auf die erhöhte Genomplastizität von *S. aureus* von einer Generation zur nächsten. Es wurden jedoch auch einige genomische Rearrangements detektiert, die auf Rekombinationsereignisse zwischen zwei IS256-Elementen zurückgeführt werden konnten. Frühere Studien zeigten, dass IS256 keine spezifische Target-Sequenz für die Insertion vorsieht (Ziebuhr et al., 1999). Dies konnte durch den Vergleich aller Insertionsstellen von IS256, die in den *S. aureus* Stämmen des Norddeutschen Epidemietyps detektiert wurden, bestätigt werden. Das Alignment aller DRs weist jedoch darauf hin, dass IS256 vorrangig in AT-reiche Regionen inseriert. Die Genomsequenzierungen wurden vorrangig durchgeführt, um weitere Gründe für die Ausbildung des VISA-Phänotyps von SA137/93A und SA137/93G im Vergleich zu SA1450/94 zu detektieren. Da zum jetzigen Zeitpunkt keine genaue SNP-Liste vorliegt, die Mutationen in SA137/93A und SA137/93G im Vergleich zum Referenzstamm SA1450/94 zeigt, konnten vorerst nur die IS256-Insertionsstellen auf einen Bezug zur Vancomycin-Resistenz hin diskutiert werden. Die Einflüsse der einzelnen Insertionsstellen auf die Ausprägung der Vancomycin-Resistenz sind teilweise eher spekulativ und nur schwer einzuschätzen, da die Ausprägung des VISA-Phänotyps von einer Vielzahl von Faktoren

abhängt. Die einzelnen Insertionen können sowohl vorteilhafte, neutrale, als auch nachteilige Auswirkungen auf die Vancomycin-Resistenz haben oder eventuell andere Überlebensvorteile ermöglichen, die nicht mit Vancomycin-Resistenz in Verbindung stehen. Aufgrund der hohen Transpositionsrate von IS256 trugen sicher einige Insertionen zur gesteigerten Vancomycin-Resistenz bei. Die Rolle weiterer Hintergrundmutationen sollte jedoch zukünftig nicht außer Acht gelassen werden, da bekanntlich durch Passagieren von *S. aureus* in Anwesenheit von Vancomycin auch ohne Anwesenheit von IS256 VISA bzw. VRSA-Stämme selektiert wurden (Schaaff et al., 2002). Die 13 IS256-Insertionen, die in allen drei ST247-Stämmen detektiert wurden, haben höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die Entwicklung der Vancomycin-Resistenz der Stämme SA137/93A und SA137/93G. Es ist jedoch möglich, dass beispielsweise die *sarU*::IS256-Insertion die Virulenz der drei ST247-Stämme negativ beeinflusst. Manna und Cheung (2003) zeigten diesbezüglich, dass die Inaktivierung des Transkriptionsregulators SarU über eine Inhibierung der Expression von RNAPII und RNAPIII die Virulenz von *S. aureus* hemmt. Während Berscheid et al. (2014) eine erhöhte Genexpression von *sarU* in VRSA-Stamm VC40 feststellten, detektierten McAleese et al. (2006) in VISA-Stamm JH9 eine reduzierte Expression von *sarU*. Interessanterweise identifizierten auch Benson et al. (2014) eine IS256-Insertion in *sarU*, was auf einen Hotspot für IS256-Insertionen in *sarU* hinweisen könnte. Ob die *sarU*::IS256-Insertion SA137/93A und SA137/93G einen Vorteil für die Ausbildung des VISA-Phänotyps gebracht hat, wie beispielsweise einen Fitnessvorteil, kann derzeit nicht beurteilt werden. Diesbezüglich ist es wichtig anzumerken, dass SA1450/94 und die beiden VISA-Stämme nicht von demselben Patienten isoliert wurden, sodass keine Chronologie, wie beispielsweise bei *S. aureus* JH1 und VISA-Stamm JH9 (Sieradzki et al., 2003) festgestellt werden konnte. Im Vergleich zu SA1450/94 wurden in den beiden VISA-Stämmen 21 gemeinsame IS256-Insertionen detektiert. Interessanterweise inaktivierte IS256 in beiden Stämmen drei Membranproteine: das Kompetenzprotein ComGB, den Ammoniumtransporter NrgA und das hypothetische Protein SACOL0425. In *B. subtilis* wurde ComGB als ein integrales Membranprotein identifiziert, das bei der Bindung und Aufnahme von extrazellulärer DNA eine Rolle spielt (Chung und Dubnau, 1998). Da in *S. aureus* jedoch nicht alle sieben Kompetenzproteine aus *B. subtilis* detektiert wurden, könnten in *S. aureus* die vorhandenen Proteine des Com-Systems möglicherweise in andere Transportprozesse involviert sein (Sibbald et al., 2006). Interessant ist, dass – im Gegensatz zu den analysierten VISA-Stämmen dieser Arbeit - die Expression aller drei Membranproteine im VRSA-Stamm *S. aureus* VC40 im Vergleich zur Kontrolle erhöht war (Berscheid, 2013). Ob die Inaktivierung eines der genannten Membranproteine möglicherweise sogar einen negativen Einfluss auf die Vancomycin-

Resistenz der beiden VISA-Stämme SA137/93A und SA137/93G hatte, ist bisher unbekannt. Interessant war auch die Insertion von IS256 vor dem Transkriptionsregulator Rot, die in beiden VISA-Stämmen detektiert wurde. Die Promotorregion von Rot stellt einen Hotspot für die Insertion von IS256 dar, da in diesem Bereich bereits in *S. aureus* TW20 sowie in *S. aureus* USA500 IS256-Insertionen identifiziert wurden (Holden et al., 2010; Benson et al., 2014). Während die IS256-Insertion in *S. aureus* TW20 264 bp vor dem Startkodon von *rot* lokalisiert ist, wurden die IS256-Elemente in *S. aureus* USA500 und SA137/93A bzw. SA137/93G 315 und 314 bp vor dem Startkodon von *rot* inseriert. Benson et al. (2014) stellten infolge dieser Insertion in *S. aureus* USA500 eine deutliche Deregulation von *rot* fest, die zur Hypervirulenz des Stammes führte. Der Toxin-Repressor Rot ist ein SarA-Homologon, das durch RNAIII inhibiert wird (Geisinger et al., 2006) und die Expression zahlreicher Gene, einschließlich *spa*, *prsA*, *lytS* und *dltD* reguliert (Said-Salim et al., 2003). PrsA ist ein membrangebundenes Lipoprotein, das als Chaperon an der äußeren Oberfläche der Zytoplasmamembran dient. In zahlreichen klinischen Glykopeptid-intermediär-resistenten *S. aureus* (GISA)-Stämmen wurde bereits eine Induktion von *prsA* detektiert, die häufig auf die Induktion des VraRS-Regulons zurückzuführen war (Jousselin et al., 2012). Die Mikroarray-Analysen von SA137/93A und SA137/93G zeigten jedoch keine veränderte Expression von *prsA* in An- und Abwesenheit von Vancomycin, sowie keine einheitlich veränderte Expression weiterer Rot-abhängiger Gene (Jansen et al., 2007). Die Expression von *rot* wurde in dieser Analyse nicht erfasst (Jansen et al., 2013). Um den Einfluss der IS256-Insertion vor *rot* weniger spekulativ beurteilen zu können, müssten weitere Experimente erfolgen. Des Weiteren wurden IS256-Insertionen detektiert, die jeweils nur in SA137/93A und SA137/93G detektiert wurden. Dass sich die beiden VISA-Stämme in so vielen Insertionen unterscheiden, wurde vorher nicht erwartet, da SA137/93G als Tochterstamm von SA137/93A in einer Glycerinkultur in Anwesenheit von Vancomycin entstanden ist. Dies zeigt jedoch die hohe Transpositionsaktivität von IS256. Den größten Anteil an der Ausprägung der Vancomycin-Resistenz hatte dabei wahrscheinlich die Insertion vor *yycF* in SA137/93A, die zur Überexpression von YycF führte (Jansen et al., 2007), obwohl diese Hypothese in der Literatur bisher sehr kontrovers diskutiert wurde (Howden et al., 2011; McEvoy et al., 2013). Der Verlust dieser Insertion vor *yycF* in SA137/93G wurde in diesem Stamm höchstwahrscheinlich durch die Insertion in *tcaA* kompensiert, was in diesem Stamm sogar noch zu der Erhöhung der Vancomycin-Resistenz beigetragen haben könnte (Maki et al., 2004; Jansen et al., 2007). In SA137/93G führte auch der Verlust der SCC*mec* im Zusammenhang mit dem Verlust des  $\beta$ -Laktamase-Plasmids zur erhöhten Vancomycin-Resistenz im Vergleich zu SA137/93A (Reipert et al., 2003). In SA137/93A könnten ebenfalls

die Insertionen in *opuD* und SACOL1929 von Bedeutung sein. Das Gen *opuD* kodiert für einen osmoregulierten Transporter, der hauptsächlich die Aufnahme von extrazellulärem Prolin reguliert und dadurch das Überleben von *S. aureus* in verschiedenen Körperregionen ermöglicht (Wetzel et al., 2011). Die Inaktivierung von *opuD* wurde bisher nie direkt mit Vancomycin-Resistenz in Verbindung gebracht. Kuroda et al. (2003) zeigten jedoch, dass *opuD* durch das *VraSR*-System reguliert wird, was durchaus auf einen Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von *opuD* und der Entstehung der Vancomycin-Resistenz hinweisen könnte. Das Gen SACOL1929 kodiert für einen *tagH*-ähnlichen ABC-Transporter. Zahlreiche Transkriptionsanalysen zeigten veränderte Expressionslevel verschiedener ABC-Transporter im Zusammenhang mit Vancomycin-Behandlung bzw. der Ausprägung des VISA-Phänotyps (Kuroda et al., 2003; McAleese et al., 2006; Meehl et al., 2007). Wenn SACOL1929 neben *tagH* (SACOL0694) ebenfalls für den Export von Teichonsäuren verantwortlich ist, dann könnte dessen Inaktivierung durch IS256 durchaus die Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin beeinflusst haben. Grundsätzlich verleihen Teichonsäuren durch ihre Phosphatgruppen der Zelloberfläche eine negative Ladung, die jedoch durch D-Alanylierung der Phosphatgruppen (vermittelt durch *dlt*-Operon) kompensiert werden kann. Eine positive Oberflächenladung vermittelt Resistenz gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden sowie kationischen Antibiotika, wie Vancomycin (Peschel et al., 2000). Da frühere Untersuchungen vorerst keinen verringerten Phosphatgehalt in der Zellwand von SA137/93A detektierten, müssten weitere Experimente erfolgen, um den Einfluss von SACOL1929::IS256 auf die Vancomycin-Resistenz zu bestätigen. Eine IS256-Insertion, die mit der erhöhten Vancomycin-Resistenz von SA137/93G im Vergleich zu SA137/93A in Verbindung gebracht werden kann, ist die Insertion in SACOL1071, das für ein Chitinase-ähnliches Protein kodiert. Bereits Wadström (1971) detektierte Chitinase-Aktivität in *S. aureus* M18 und charakterisierte eine bakteriolytische Endo- $\beta$ -N-Acetyl-D-Glucosaminidase von *S. aureus*. Eine erhöhte Expression von SACOL1071 (SA0914) wurde in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen nach der Behandlung mit Vancomycin detektiert (Gardete et al., 2006). Auch in VRSA-Stamm *S. aureus* VC40 wurde eine stark erhöhte Expression dieses Proteins festgestellt (Berscheid, 2013). Schließlich zeigten Kuroda et al. (2003) die *VraRS*-abhängige Expressionssteigerung von SA0914 in *S. aureus* N315 nach der Behandlung mit Vancomycin. Im Gegensatz zu diesen Studien, führte die IS256-Insertion in SACOL1071 wahrscheinlich eher zur Inaktivierung des Chitinase-ähnlichen Proteins. Wenn dieses Protein als hydrolytisches Enzym der Zellwand fungiert, könnte es wie die Autolysine diverse biologische Prozesse beeinflussen, wie die Peptidoglykansynthese, sowie die Separierung der Tochterzellen bei der Zellteilung. In verschiedenen *S. aureus*-Stämmen

wurden sowohl erhöhte als auch reduzierte Expressionslevel verschiedener Autolysine im Zusammenhang mit Vancomycin-Resistenz diskutiert (Kuroda et al., 2003; Berscheid et al., 2014). Möglicherweise wurde auch die Vancomycin-Resistenz in SA137/93G durch diese Insertion negativ beeinflusst und SA137/93A hatte im Vergleich dazu einen Vorteil, da das Chitinase-ähnlichen Protein vorhanden war. Anzumerken sind ebenfalls die Insertionen in den intergenischen Bereichen in der Nähe von SACOL0723 (LysM-ähnliches Protein durch WalKR reguliert), *upps* sowie *vraG*, die aufgrund der Lage der jeweiligen IS256-Insertion zu den Promotorregionen der genannten Gene, keinen Einfluss auf deren Expressionslevel haben dürften. Ein Bezug dieser Insertionen zur Ausprägung der Vancomycin-Resistenz bestand folglich eher nicht. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse sehr deutlich, dass IS256 in den drei ST247-Stämmen die Genomvariabilität erhöht und durch die ein oder andere Insertion im Zusammenspiel mit eventuellen weiteren Hintergrundmutationen die Vancomycin-Resistenz positiv bzw. negativ beeinflussen kann.

## **5.2 Einfluss von IS256 auf die Bildung von SCVs mit erhöhtem Resistenzlevel in *S. aureus***

Die Selektion und Charakterisierung der IS256-Insertionsmutanten *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* und *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* verdeutlichen einmal mehr das Potenzial von IS256, die Genomflexibilität von *S. aureus* zu erhöhen und die Bildung phänotypischer Variationen zu verursachen. Beide genannten IS256-Insertionsmutanten sind charakterisiert durch die Bildung von SCVs, die innerhalb des regulären Wachstumszyklus auftreten können (Swingle, 1935) und unter verschiedenen Bedingungen, wie Antibiotikatherapie, Kältestress, Anwesenheit von Desinfektionsmitteln oder intrazellulärer Lokalisation in eukaryotischen Zellen (Kahl, 2014), selektiert werden können. SCVs werden häufig mit persistierenden und immer wiederkehrenden *S. aureus*-Infektionen in Verbindung gebracht, die nur schwer behandelbar sind, wie z.B. die Behandlung der Lunge bei Patienten mit zystischer Fibrose (Proctor et al., 1994; Kahl et al., 1998). SCVs spielen jedoch nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in der Tiermedizin (Mastitis bei Kühen) sowie in der Lebensmittelmikrobiologie (piezo- und thermotolerante *S. aureus*-Stämme) eine wichtige Rolle (Karatzas et al., 2007; Atalla et al., 2008). In den letzten Jahren konnten einige zugrundeliegende genetische Mechanismen, die bei klinischen *S. aureus*-Isolaten zur Ausbildung von SCVs führten, aufgeklärt werden. Dazu gehören beispielsweise SCVs, die definierte Auxotrophien aufweisen, wie CO<sub>2</sub>-abhängige SCVs, Thymidin-abhängige SCVs oder Hämin- und Menadion-abhängige SCVs (Proctor et al., 1995; Kahl et al., 1998).

Auch die in dieser Arbeit selektierte Insertionsmutante *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* konnte als Hämin-abhängige SCV identifiziert werden. Die Hämin-abhängigen SCVs weisen häufig Mutationen im *hem*-Operon auf, welches für die Hämin-Biosynthese verantwortlich ist. Hämin ist eine wichtige Komponente des Cytochroms, das den Elektronentransport in der Atmungskette ermöglicht. Klinische- und im Labor generierte Hämin-abhängige SCVs weisen demzufolge Defekte in der Elektronentransportkette auf, die schließlich zu einem niedrigen Membranpotenzial führen (Lewis et al., 1990). Da das niedrige Membranpotenzial die Aufnahme von Aminoglykosiden hemmt, werden Hämin-abhängige SCVs sehr häufig in Anwesenheit von Aminoglykosiden selektiert und weisen schließlich Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden auf (Miller et al., 1978; Balwit et al., 1994). In diesem Zusammenhang wurden auch Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Peptiden, wie Lactoferricin B, festgestellt (Samuelson et al., 2005). Interessanterweise wurde *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* in Anwesenheit von Spectinomycin, einem Aminoglykosid-ähnlichen Antibiotikum, selektiert, obwohl bereits eine Resistenz gegenüber Spectinomycin (*spc*-Kassette) vorlag. Der zugrundeliegende Resistenzmechanismus beruht auf der enzymatischen Modifikation des Aminoglykosids, wobei die Aufnahme von Spectinomycin in die Zelle in Anwesenheit von *spc* weiterhin möglich war. Da nicht bekannt ist, welche weiteren physiologischen Prozesse durch die Aufnahme von Spectinomycin in der Zelle ausgelöst werden, ist es durchaus denkbar, dass *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* in Anwesenheit von *spc* und Spectinomycin einen zusätzlichen Überlebensvorteil hatte. Die Insertionsmutante könnte folglich eine verringerte Aufnahme von Spectinomycin sowie anderer Aminoglykoside aufweisen. Ein direkter Selektionsdruck für die Entstehung Spectinomycin-resistenter SCVs dürfte jedoch nicht vorgelegen haben. Bereits Massey et al. (2001) zeigten, dass neben Gentamicin und Streptomycin auch Spectinomycin die Bildung von SCVs in *S. aureus* induzieren kann. Auf der anderen Seite wurden auch in Abwesenheit von Gentamicin bereits Gentamicin-resistente SCVs selektiert (Edwards, 2012). *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* wurde hier bei 45°C in Anwesenheit von Spectinomycin vorrangig aus dem Grund selektiert, weil dieser Stamm das rekombinante IS256-*spc* im Genom integriert hatte und nur aus diesem Grund bei 45°C auf Spectinomycin-haltigem Agar wachsen konnte. In *B. subtilis* kodiert *hemY* für die Membran-assoziierte Protoporphyrinogen-IX-oxidase, die einen der letzten Schritte der Hämin-Biosynthese katalysiert (Hansson und Hederstedt, 1994). Die Funktion von *hemY* in *S. aureus* wurde bisher in der Literatur kaum erwähnt. In *S. lentus* wurde bereits eine Insertion von zwei IS256-Elementen, die ein *cfr*-Gen flankieren, im intergenischen Bereich zwischen *hemY* und *hemE* detektiert (He et al., 2014). Das könnte darauf hinweisen, dass in diesem genomischen Bereich ein Hotspot für IS256-

Insertionen liegt, was den Einfluss von IS256 auf die Selektion von Hämin-abhängigen SCVs verdeutlichen würde. *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* ist gekennzeichnet durch eine verringerte Wachstumsrate in Abwesenheit von Hämin, eine verringerte Pigmentierung, sowie eine 16- bis 32-fach erhöhte Resistenz gegenüber Gentamicin und Kanamycin. Diese Eigenschaften sind vergleichbar mit den Charakterisierungen anderer Hämin-abhängige SCVs von *S. aureus*, wie beispielsweise *S. aureus*  $\Delta$ *hemB* (von Eiff et al., 1997; Kahl et al., 1998; Garcia et al., 2012). Vergleichbare MHK-Anstiege wurden auch gegenüber Tobramycin für den Hämin-auxotrophen Stamm *S. aureus* SA113 $\Delta$ *hemB* im Vergleich zum Elternstamm gezeigt (Lechner et al., 2012). Des Weiteren beschrieben Schaaff et al. (2003) eine Gentamicin-induzierte Hämin-abhängige SCV von *S. aureus*, die sowohl eine Deletion in *hemH* als auch eine Punktmutation in *hemA* aufwies.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Insertionsmutante *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* selektiert. Das Housekeeping-Gen *guaA* kodiert für die Guanodinmonophosphat (GMP)-Synthetase, die in die *de novo* Purinbiosynthese von Guanodin-Nukleotiden involviert ist und aus Xanthosin-5'-monophosphat (XMP) in Anwesenheit von Adenosintriphosphat (ATP) und L-Glutamin GMP synthetisiert. Das 3' Ende von *guaA* wurde bisher in verschiedenen bakteriellen Genomen als Hotspot für die Integration genomischer Inseln identifiziert (Song et al., 2012). Die Funktion der GMP-Synthetase blieb nach der Integration stets erhalten, da lediglich die letzten 12 Nukleotide des *guaA*-Gens als Erkennungssequenz für die spezifische Integrase dienen und das DR der integrierten genomischen Insel in verschiedenen bakteriellen Spezies, wie beispielsweise *Salmonella enterica* (Kropinski et al., 2007), *Clostridium perfringens* (Zimmer et al., 2002) oder *S. aureus* (Fitzgerald et al., 2001; Ubeda et al., 2003) darstellten. Die in dieser Arbeit charakterisierte *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante weist eine Insertion von IS256 inmitten von *guaA* auf, die zur Inaktivierung der GMP-Synthetase führte. Wachstumsexperimente mit der *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante zeigten eine deutlich geringere Wachstumsrate im Vergleich zum Kontrollstamm in verschiedenen Medien, die jedoch durch die Substitution von Guanin kompensiert werden konnte. Dass die Inaktivierung von *guaA* zur Guanin-Auxotrophie führt, wurde bereits in *E. coli* gezeigt (Keller und Simon, 1987; Shimaoka et al., 2006). Interessanterweise überlebte die *guaA::IS256-ermB* Insertionsmutante auch in RPMI-Medium in Abwesenheit von Guanin über einen Zeitraum von 24 Stunden (kein Wachstum detektiert) und konnte anschließend in Anwesenheit von Guanin wieder wachsen, was die persistierenden Eigenschaften dieser Mutante verdeutlicht und zeigt, dass die Inaktivierung von *guaA* auch in Abwesenheit von Guanin nicht zwingend zum Zelltod führt. Diese Erkenntnisse bestätigen die Studien von Ji et al. (2001), die zeigten, dass *guaA* in TSB-

Medium nicht essentiell für das Wachstum von *S. aureus* ist. Im Gegensatz dazu zeigten jedoch Mulhbacher et al. (2010), dass die Blockierung der *guaA*-Expression in *S. aureus* eine bakterizide Wirkung in MH-Medium hat. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Expression von *guaA* durch einen Guanin-Riboswitch kontrolliert wird. Der Guanin-Riboswitch ist eine Sekundärstruktur in der 5' untranslatierten Region einer *guaA*-mRNA, die in Anwesenheit von Guanin dieses bindet und dadurch die Transkription der *guaA*-mRNA inhibiert. In Abwesenheit von Guanin geht die Sekundärstruktur eine Konformationsänderung ein und ermöglicht die Transkription von *guaA* (Mulhbacher und Lafontaine, 2007). Mulhbacher et al. (2010) identifizierten nun einen neuen Riboswitch-Liganden namens PC1 (Guanin-Analogon), der anstelle von Guanin den Guanin-Riboswitch bindet und so in Abwesenheit von Guanin eine bakterizide antimikrobielle Wirkung auf *S. aureus* ausübt (Mulhbacher et al., 2010). Eine neuere Studie zeigte jedoch, dass mit PC1 behandelte Kühe, die eine durch *S. aureus* verursachte Mastitis aufwiesen, nur während der Behandlungsperiode eine Reduktion der bakteriellen Konzentration in der Milch aufwiesen, die nach Beendigung der Therapie nicht erhalten werden konnte (Ster et al., 2013). Diese Daten weisen auf eine Persistenz der *S. aureus*-Zellen durch die Inaktivierung von *guaA* hin, schließen jedoch den vollständigen Zelltod durch die Inaktivierung von *guaA* durch PC1 aus. Die *S. aureus* HG001 *guaA*::IS256-*ermB* Insertionsmutante wurde durch Passagieren in Anwesenheit von steigenden Vancomycin-Konzentrationen selektiert und überlebte in der Mischkultur in Anwesenheit von 15,5 µg/ml Vancomycin. Die nach dem Passagerversuch aus der Mischkultur selektierten *guaA*::IS256-*ermB* Insertionsmutanten von Tag 7 und Tag 24 wiesen einen VISA-Phänotyp mit Vancomycin-MHKs von 4-8 µg/ml auf. Die Untersuchungen der durch Phagentransduktion rekonstruierten Insertionsmutante *S. aureus* HG001 *guaA*::IS256-*ermB*, die wahrscheinlich wesentlich weniger Hintergrundmutationen als der passagierte Stamm enthielt, zeigten, dass die Inaktivierung von *guaA* zur gesteigerten Vancomycin-Resistenz beitrug, jedoch nur ein Wachstum bis zu einer Vancomycin-Konzentration von 2,5 µg/ml ermöglichte. Das Gen *guaA* wurde bisher nie direkt mit erhöhter Vancomycin-Resistenz von *S. aureus* in Verbindung gebracht. Dordel et al. (2014) zeigten jedoch, dass die Inaktivierung von *guaA* in hochresistenten Subpopulationen von MRSA-Isolaten die (p)ppGpp-vermittelte „stringent response“ auslöste, was schließlich zur Induktion der PBP2a-Expression führte und die Ausprägung hoher Resistenzlevel ermöglichte. Außerdem wurde die Aktivierung der „stringent response“ sowohl in *S. aureus* (beispielsweise vermittelt durch Mutationen in *relA*, *relP* oder *relQ*) als auch in *E. faecalis* mit reduzierten Wachstumsraten und erhöhter Vancomycin-Toleranz in Verbindung gebracht (Abranches et al., 2009; Gao et al., 2010; Berscheid et al., 2014; Geiger et al., 2014). Dementsprechend könnte auch in *S. aureus*

HG001 *guaA::IS256-ermB* die Inaktivierung von *guaA* durch IS256 die „stringent response“ aktiviert haben und somit die reduzierte Wachstumsrate der SCVs und eine leicht erhöhte Vancomycin-Toleranz induziert haben.

Die persistierenden Eigenschaften von SCVs machen es diesem Phänotyp möglich, weitere Mutationen zu erlangen, die möglicherweise eine zusätzliche Resistenzentwicklung fördern können (Andersson und Hughes, 2014). Außerdem zeigten Schaaff et al. (2003), dass klinische *S. aureus* SCV-Isolate Mutator-Phänotypen aufweisen können, die durch Aminoglykoside selektiert werden und einen Einfluss auf die Genomvariabilität der SCVs haben können. Auch bei der Entstehung von Revertanten können Mutationen eine wichtige Rolle spielen (Proctor et al., 1994). Zahlreiche Studien zeigten, dass klinische SCV-Isolate einen sehr dynamischen und unstabilen Phänotyp aufweisen und schnell zum Wildtyp konvertieren können (Moisan et al., 2006; Tuchscher et al., 2011). Auch die beiden in dieser Arbeit charakterisierten SCVs waren in der Lage, zum schneller wachsenden Wildtyp-Phänotyp zu revertieren. Bei *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* traten in BHI-Medium in Anwesenheit von Spectinomycin bereits nach 24 h die ersten phänotypischen Revertanten auf, während bei *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* drei Passagen à 24 h in BHI-Medium mit Erythromycin notwendig waren, um die ersten phänotypischen Revertanten zu selektieren. In TSB-Medium traten die Revertanten jeweils zu einem späteren Zeitpunkt auf, was vermutlich auf die höhere Wachstumsrate der SCVs in diesem Medium zurückzuführen war. Genauere regulatorische Ursachen konnten hierfür bisher nicht geklärt werden. Die ersten Untersuchungen der phänotypischen Revertanten zeigten, dass alle Revertanten von *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* die Insertion von IS256-*spc* in *hemY* verloren hatten. Während die meisten phänotypischen Revertanten von *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* ebenfalls durch den Verlust von IS256-*ermB* in *guaA* gekennzeichnet waren, enthielten einige phänotypische Revertanten weiterhin die *guaA::IS256-ermB*-Insertion. Die Charakterisierungen dieser SCVs und deren Revertanten zeigen erstmals, dass IS256 möglicherweise in der Lage ist, Persistenz von *S. aureus* zu beeinflussen und chronische Infektionen zu induzieren. IS256 wurde in *S. aureus* und in *S. epidermidis* bereits mit Phasenvariationen der Biofilmbildung in Verbindung gebracht (Ziebuhr et al., 1999; Conlon et al., 2004; Kiem et al., 2004; Valle et al., 2007). Diese Phasenvariationen wurden jedoch auf einen Insertions- und Exzisionsmechanismus zurückgeführt, der durch eine von der Transposase unabhängige illegitime Rekombination ermöglicht wurde (Hennig und Ziebuhr, 2008). In dieser Arbeit entstanden die phänotypischen Revertanten jedoch in Anwesenheit von Spectinomycin (*S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc*) bzw. Erythromycin (*S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB*), was darauf hinweisen könnte, dass IS256-*spc* bzw. IS256-*ermB*

durch einen Transposase-abhängigen „cut-and-paste“-Mechanismus an der einen Stelle der DNA ausgeschnitten wurden (*guaA* bzw. *hemY*) und an einer anderen Stelle wieder inseriert wurden. Dieser Mechanismus wurde bisher nie für IS256 gezeigt. Auch die Untersuchungen von *S. aureus* SA137/93A und SA137/93G könnten auf eine Transposition von IS256 durch einen „cut-and-paste“-Mechanismus hinweisen, da zahlreiche IS256-Insertionen von SA137/93A im Tochterstamm SA137/93G nicht mehr vorhanden waren und dafür neue IS256-Insertionen entstanden.

### 5.3 Regulation der Transposition von IS-Elementen

Die Transposition von IS-Elementen unterliegt grundsätzlich einer strengen Regulation, da, wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, die erhöhte Genomvariabilität durch Transpositionsereignisse zwar in ausgewählten Fällen Überlebensvorteile bringen kann, jedoch grundsätzlich eher die Genomintegrität gefährdet, was letale Folgen für den Organismus haben kann. Aus diesem Grund gibt es zahlreiche Regulationsmechanismen, die die Transpositionsaktivität von IS-Elementen auf einem niedrigen Level halten. Diesbezüglich postulierte Reznikoff (2003), dass „Ineffektivität“ die evolutionäre Strategie der transponierbaren Elemente darstellt, die das Überleben des Wirtsorganismus und letztendlich die Existenz des transponierbaren Elementes selbst sichert. Die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen diese Strategie auch für IS256 in *S. aureus*, da die Transpositionsfrequenz durch die Bildung verschiedener Antisense-RNAs grundsätzlich auf einem niedrigen Level gehalten wird und diese intrinsische Regulation über SigB sogar an Umwelteinflüsse gekoppelt ist.

Durch zahlreiche intrinsische Kontrollmechanismen, die durch das transponierbare Element selbst vermittelt werden, kann die Transposition sowohl auf transkriptionaler Ebene, auf translationaler Ebene sowie auf posttranslationaler Ebene reguliert werden. Auf transkriptionaler Ebene halten beispielsweise sehr schwache endogene Promotoren die Expression der jeweiligen Transposase auf einem geringen Level, wie es in *E. coli* für IS21 beschrieben wurde (Reimann et al., 1989). Bei einigen IS-Elementen wurden -35-Regionen von Promotoren im IR<sub>R</sub> detektiert, die während des Transpositionsprozesses bei den zirkulären Intermediaten stärkere transiente Promotoren mit einer passenden -10-Region im IR<sub>L</sub> bilden können. Dies wurde beispielsweise für IS911 gezeigt und förderte die Integration des IS-Elementes (Duval-Valentin et al., 2001). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für IS256 denkbar, wurde jedoch bisher nicht gezeigt. Auf translationaler Ebene ist sicher die Bildung stabiler kurzer Antisense-RNAs der IS-Elemente das prominenteste Beispiel und

wird im Kapitel 5.3.2 ausführlich diskutiert. Eine weitere Strategie ist der Schutz vor durchlaufender Transkription stromaufwärts lokalisierter Gene durch kleine IRs, die die ribosomale Bindestelle oder das Startkodon der Translation des *tnp*-Gens flankieren. Sekundärstrukturen der mRNA an dieser Stelle inhibieren schließlich die Translation der mRNA. Dieser Mechanismus wurde für IS50 in *E. coli* gezeigt (Krebs und Reznikoff, 1986). Auf posttranslationaler Ebene wird die Transposition beispielsweise durch die *cis*-Aktivität der Transposase (IS903: Derbyshire und Grindley, 1996) oder durch die Target-Spezifität der Transposase (Tn7: Craig, 1991) beeinflusst. Einige Regulationsmechanismen werden jedoch auch durch den Wirtsorganismus oder durch Umwelteinflüsse vermittelt. Zu den Wirtsfaktoren zählen beispielsweise DNA-Bindeproteine, wie IHF (integration host factor) oder Fis (factor for inversion stimulation), die durch Bindung an das IS-Element die Transposition, beispielsweise von IS10, IS50 oder Tn4652, aktivieren oder hemmen können (Weinreich und Reznikoff, 1992; Signon und Kleckner, 1995; Teras et al., 2009). Auch für das RNA-Bindeprotein Hfq, das in vielen Bakterien regulatorische RNAs und mRNAs stabilisiert, wurde gezeigt, dass es essentiell für die Hemmung der IS10-Transposition in *E. coli* ist. Einer der zugrundeliegenden Mechanismen beruht auf der Begünstigung der Bindung von Sense- und Antisense-RNA durch Hfq (Ross et al., 2010; Ross et al., 2013). Ob Hfq auch eine wichtige regulatorische Rolle in *S. aureus* einnimmt, wird kontrovers diskutiert (Bohn et al., 2007; Liu et al., 2010). Außerdem ist auch die Desoxyadenosin-Methylase (Dam) in Lage die Transposition zu beeinflussen, indem sie beispielsweise die Region um den endogenen Promotor von IS10 in *E. coli* methyliert und somit die Transkription negativ beeinflusst (Roberts et al., 1985). Zudem können Umwelteinflüsse, die beispielsweise Stressantworten, wie die SOS-Antwort, aktivieren, die Transposition von IS-Elementen beeinflussen, wie es Nagel et al. (2011) und die Ergebnisse dieser Arbeit für IS256 in *S. aureus* zeigten.

### **5.3.1 Rolle von SigB bei der Antibiotika-induzierten Autoaktivierung von IS256 in *S. aureus***

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass IS256, durch die Inaktivierung von *rsbU* infolge einer spontanen Insertion, in der Lage ist, seine eigene Transpositionsfrequenz zu aktivieren. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass subinhibitorische Konzentrationen einiger Antibiotika aus der Klasse der Proteinbiosynthese-Inhibitoren (Chloramphenicol, Linezolid, Spectinomycin oder Erythromycin) unter bestimmten Bedingungen diese Autoaktivierung durch Selektion SigB-negativer *S. aureus*-Stämme fördern können. Die Autoaktivierung von IS256 kann schließlich zur erhöhten

Genomflexibilität und möglicherweise zu einer beschleunigten Resistenzentwicklung von *S. aureus* beitragen (Schreiber et al., 2013).

In den letzten Jahren zeigten zahlreiche Studien, dass subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen die Resistenzentwicklung in Bakterien begünstigen. Die Studien von Gullberg et al. (2011) zeigten, dass sogar subinhibitorische Konzentrationen sehr weit unter der jeweiligen MHK des Antibiotikums (1/230 der MHK bei Ciprofloxacin (pg/ml)) im Boden bzw. im Wasser die Selektion resistenter Bakterien fördern können. In *Klebsiella pneumoniae* bzw. in *Enterobacter sp.* förderten subletale Dosen von Tigecyclin sogar die Expression der KPC- $\beta$ -Laktamase-RNA (Roth et al., 2013). Auch subletale Konzentrationen von Ciprofloxacin förderten die Expression der Methicillin-Resistenz in heteroresistenten MRSA-Stämmen und ermöglichten somit die Selektion Oxacillin-resistenter Kolonien (Venezia et al., 2001; Tattevin et al., 2009).

In Bakterien wurden bisher verschiedene Mechanismen beschrieben, durch die subinhibitorische Konzentrationen die genotypische und phänotypische Variabilität erhöhen und somit die Resistenzentwicklung fördern. In den meisten Fällen ist die Aktivierung der SOS-Antwort durch subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen der Induktor von Mutagenese, Rekombinationsereignissen und horizontalem Gentransfer. Bereits zahlreiche Studien demonstrierten, dass beispielsweise Fluorochinolone, Trimethoprim und  $\beta$ -Laktame in subinhibitorischen Konzentrationen die Induktion der SOS-Antwort in *S. aureus* verursachen (Mesak et al., 2008). Die Fluorochinolone verursachen durch eine Hemmung der Gyrase Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche der DNA. Einzelsträngige DNA regt die Rekombinase RecA dazu an, zu polymerisieren, was die proteolytische Spaltung des LexA-Repressors bewirkt und die Transkription sämtlicher LexA-abhängiger Gene ermöglicht. Auf diese Weise führt die Expression der fehlerhaften Polymerasen II, IV und V (kodiert durch *polB*, *dinB* und *umuDC*) zwar zur Reparatur der DNA, jedoch auch zur Steigerung der Mutagenese (Radman, 1975; Michel, 2005; Kelley, 2006). Neben der Aktivierung der SOS-Gene induziert die Aktivierung von RecA auch die homologe Rekombination und die Phagenreplikation (Witkin, 1991). In *S. aureus* wurde eine Phageninduktion in Anwesenheit subinhibitorischer Konzentrationen von Ciprofloxacin und Trimethoprim gezeigt (Goerke et al., 2006). Auch die SOS-abhängige Aktivierung des horizontalen Gentransfers wurde mehrfach mit subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen in einen Zusammenhang gebracht. So förderten subinhibitorische Konzentrationen von Fluorochinolonen und  $\beta$ -Laktamantibiotika in *S. aureus* über eine Induktion der SOS-Antwort den horizontalen Gentransfer von Pathogenitätsinseln (Ubeda et al., 2005; Maiques et al., 2006). In *Vibrio cholerae* führte die Fluorochinolon-induzierte SOS-Antwort zur Aktivierung eines

integrativen konjugativen Elementes (ICE), das durch horizontalen Gentransfer die Verbreitung zahlreicher Resistenzgene ermöglicht (Beaber et al., 2004).

Die Stimulation der Transposition mobiler genetischer Elemente durch subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen wurde bereits in verschiedenen Organismen gezeigt, der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch häufig nicht geklärt. Beispielsweise induzierten subinhibitorische Konzentrationen von Erythromycin in *E. faecalis* die Transposition von Tn917 (Tomich et al., 1980). Außerdem wurde gezeigt, dass subinhibitorische Konzentrationen von Tetracyclin in *Bacteroides* die Mobilisierung des Transposons NBU1 (Song et al., 2009) und in *E. faecalis* den konjugativen Transfer von Tn5381 (Rice et al., 1992) und Tn1545 (Doucet-Populaire et al., 1991) induzierten. In Bezug auf IS256 zeigten bereits Nagel et al. (2011), dass subinhibitorische Konzentrationen von Ciprofloxacin und Vancomycin die Transposition dieses IS-Elementes in *S. aureus* erhöhten. Hier wurde postuliert, dass in Folge der Aktivierung der SOS-Antwort durch Ciprofloxacin möglicherweise die SigB-Aktivität in *S. aureus* gehemmt wurde, was schließlich die Transposition von IS256 erhöhte (Nagel et al., 2011). Einige Studien zeigten jedoch auch von der SOS-Antwort unabhängige Mechanismen, die die Genomflexibilität in Bakterien steigerten. Subletale Konzentrationen der Fluorochinolone stimulieren in *E. coli* intrachromosomale Rekombinationen via RecBCD bzw. RecFOR und interchromosomale Rekombination (Lopez et al., 2007). Außerdem zeigten Gutierrez et al. (2013) einen Mechanismus, durch den  $\beta$ -Laktamantibiotika in subletalen Dosen die Mutagenese in *E. coli* über die Induktion des alternativen Sigma-Faktors RpoS steigerten. Genauer gesagt, führte die Induktion von RpoS zur Aktivierung der kleinen regulatorischen RNA (small RNA) SdsR, die die Translation der *mutS* mRNA des Mismatch-Reparatursystems durch Bindung reprimierte, was die Ausprägung eines Mutatorphänotyps zur Folge hatte. In dieser Arbeit wurde mit der Antibiotika-induzierten Autoaktivierung von IS256 ein weiterer SOS-unabhängiger Mechanismus beschrieben, durch den subinhibitorische Antibiotika-Konzentrationen die Genomvariabilität von *S. aureus* steigern können.

### **5.3.1.1 Einfluss subinhibitorischer Antibiotikakonzentrationen auf die Selektion SigB-negativer *S. aureus*-Mutanten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen einiger Proteinbiosynthese-Inhibitoren in einem Konzentrationsbereich  $\geq 0,5 \times$  MHK in einigen *S. aureus*-Stämmen der klonalen Linie CC8 die Selektion weißer Kolonien, die einem SigB-negativen Phänotyp ähnelten, fördern. Die standardisierte Erfassung der Frequenzen,

mit denen in den verschiedenen *S. aureus*-Stämmen weiße Kolonien selektiert wurden, verdeutlichte den Einfluss von IS256 auf diese Phasenvariation.

Bei *S. aureus* USA300 (Masterarbeit Sarah van Alen, 2014) und bei *S. aureus* HG001, die keine IS256-Kopien im Genom enthalten, wurden weiße SigB-negative Kolonien in Anwesenheit von subinhibitorischen Antibiotika-Konzentrationen nur im Rahmen der natürlichen Mutationsrate mit einer Frequenz von  $< 0,5\%$  selektiert. Diese SigB-negativen Kolonien waren meist durch Punktmutationen oder Deletionen im *sigB*-Operon gekennzeichnet. Im Vergleich dazu wurden bei den *S. aureus*-Stämmen der Sequenztypen ST247 und ST239, die eine Vielzahl von IS256-Insertionen im Genom enthalten, weiße Kolonien mit einem Anteil von bis zu 50% der überlebenden Zellen detektiert. Bei SA137/93G handelte es sich bei über 90% der weißen Kolonien um *rsbU*::IS256 Insertionsmutanten, vereinzelt traten auch IS256-Insertionen in *sigB* auf. Dieses Ergebnis unterstreicht das Potenzial von IS256, die Genomvariabilität von *S. aureus* zu beeinflussen und durch Geninsertionen phänotypische Variationen zu verursachen. Im Hinblick auf die PIA (intrazelluläres Polysaccharid-Adhäsion)-abhängige Biofilmbildung wurde IS256 bereits mehrfach mit phänotypischen Variationen durch Insertionen in *icaADBC* oder *sarA* sowohl in *S. epidermidis* als auch in *S. aureus* in einen Zusammenhang gebracht (Ziebuhr et al., 1999; Conlon et al., 2004; Kiem et al., 2004). Da die PIA-abhängige Biofilmbildung in *S. epidermidis*, im Gegensatz zu *S. aureus* (Valle et al., 2003), direkt von der Aktivität von SigB abhängig ist (Knobloch et al., 2001), identifizierten Conlon et al. (2004) bei der Charakterisierung Biofilm-negativer Varianten von *S. epidermidis* das 5' Ende von *rsbU* als chromosomalen Hotspot für spontane IS256-Insertionen. In dieser Arbeit wurde nun, mithilfe der Selektion weißer *rsbU*::IS256 Insertionsmutanten durch subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen, das 3' Ende von *rsbU* als Hotspot für IS256-Insertionen in *S. aureus* beschrieben. Recherchen zeigten, dass das *sigB*-Operon, insbesondere *rsbU*, in *S. aureus*, aufgrund seiner globalen Rolle häufig von Insertionen oder Mutationen betroffen war. In klinischen *S. aureus*-Isolaten wurden neben Punktmutationen auch Insertionen von ISSA1 in *rsbU* detektiert (Karlsson-Kanth et al., 2006), was zeigt, dass auch weniger virulente SigB-negative Isolate in der Lage sind Infektionen zu verursachen. Auch Wu et al. (1996) detektierten in Derivaten von *S. aureus* COL Insertionen von Tn551 am 3' Ende von *rsbU*.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass die Selektion der *rsbU*::IS256 Insertionsmutanten sowohl bei den drei ST247-Stämmen als auch bei dem ST239-Stamm, unter allen getesteten Antibiotikaklassen, nur nach der Behandlung mit bestimmten Proteinbiosynthese-Inhibitoren im Konzentrationsbereich größer der 0,5 x MHK auftrat, was die Konzentrationsabhängigkeit dieses Phänomens deutlich macht. In den drei ST247-

Stämmen selektierten sowohl Chloramphenicol in Kombination mit Hitzestress (43°C) als auch Linezolid und Spectinomycin bei physiologischen Temperaturen oder bei Hitzestress *rsbU::IS256*-Insertionsmutanten. Bei SA137/93G konnten auch in Anwesenheit von 0,75 x MHK Erythromycin weiße Kolonien selektiert werden. Interessanterweise, wurden bei dem ST239-Stamm nur in Anwesenheit von Linezolid in Kombination mit Hitzestress *rsbU::IS256* Insertionsmutanten detektiert, während in Anwesenheit von Chloramphenicol bei 43°C alle Kolonien gelb erschienen. Dieses Ergebnis könnte auf verschiedene Selektionsmechanismen in Anwesenheit von Chloramphenicol und Linezolid hinweisen.

Die Hauptursache für die Selektion der weißen Insertionsmutanten unter den genannten Bedingungen war jedoch der deutliche Überlebensvorteil der SigB-negativen Insertionsmutanten im Vergleich zum SigB-positiven Wildtyp. Während die Überlebensrate von SigB-positiven Wildtypzellen bei SA137/93G unter selektiven Bedingungen bei < 0,1% der Lebendzellzahl lag, überlebten über 70% der SigB-negativen Zellen unter diesen Bedingungen. Demzufolge führte die Inaktivierung von SigB in den jeweiligen *rsbU::IS256* Insertionsmutanten zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Chloramphenicol, Linezolid oder Spectinomycin. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Proteinbiosynthese-Inhibitoren, wie Chloramphenicol, die Transkription SigB-abhängiger Gene nicht beeinflussen (Chen et al., 2011), was ebenfalls darauf hinweist, dass die SigB-abhängige Stressantwort nach der Behandlung mit Proteinbiosynthese-Inhibitoren sich eher nachteilig auf das Überleben von *S. aureus* auswirken könnte. Im Vergleich dazu zeigten Studien, dass sowohl  $\beta$ -Laktamantibiotika als auch Vancomycin, Mupirocin oder Hitzestress die SigB-abhängige Stressantwort in *S. aureus* induzieren (Chen et al., 2011; Reiss et al., 2012; Hessling et al., 2013), was auf eine bessere Überlebensfähigkeit in Anwesenheit von SigB hinweist. Im Falle von Teicoplanin zeigten Bischoff et al. (2001), dass die Aktivierung von SigB-kontrollierten Genen durch Punktmutationen in RsbW in natürlichen *rsbU*-Mutanten von *S. aureus* Teicoplanin-Resistenz verursachten. Außerdem zeigten Singh et al. (2003) erhöhte Sensitivitäten gegenüber Oxacillin und Vancomycin in einer  $\Delta sigB$ -Mutante von *S. aureus*. Auch Insertionen von Tn551 in *sigB* oder am 3' Ende von *rsbU* wurden mit einer verminderten Methicillin-Resistenz von *S. aureus* COL in Verbindung gebracht (Wu et al., 1996). Die ausbleibende Selektion weißer Kolonien von SA137/93G und SA1450/94 in Anwesenheit von Oxacillin und Vancomycin könnte demzufolge mit einer höheren Toleranz gegenüber diesen Antibiotika in Anwesenheit von SigB begründet werden.

Die genauen Gründe für die besseren Überlebenschancen der SigB-negativen *rsbU::IS256* Insertionsmutanten in Anwesenheit einiger Proteinbiosynthese-Inhibitoren sind höchstwahrscheinlich multifaktoriell und zudem sehr schwer einzugrenzen, da SigB in

*S. aureus* die Expression von über 250 Genen reguliert, die in nahezu alle zellulären Prozesse, wie beispielsweise die Zellwandbiosynthese, den intermediären Metabolismus oder die Signaltransduktion involviert sind (Bischoff et al., 2004; Pané-Farré et al., 2006).

Die Transmissionselektronenmikroskopie von SA137/93G-Zellen zeigte, dass die Behandlung mit subinhibitorischen Konzentrationen (0,5 x MHK) von Chloramphenicol (43°C), Linezolid (37°C), Spectinomycin (37°C) und Tigecyclin (37°C), sowohl bei den *rsbU*-positiven Zellen als auch bei den *rsbU::IS256*-Insertionsmutanten, zu einer signifikanten Verdickung der Zellwand im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte. Nach Hitzestress bzw. in Anwesenheit von Erythromycin (0,5 x MHK) wurden hingegen keine Zellwandverdickungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei 37°C festgestellt. In der Literatur wurde die Zellwandverdickung von *S. aureus* nach der Behandlung mit Proteinbiosynthese-Inhibitoren bereits mehrfach beschrieben. In Anwesenheit von Antibiotika-Konzentrationen im Bereich der MHK führten Spiramycin, Lincomycin, Clindamycin, Erythromycin (Nakao et al., 1972), sowie Tetracyclin (Hash und Davies, 1962) und Amikacin (Yuan et al., 2013) zu Zellwandverdickungen bei *S. aureus*. Im Bereich subinhibitorischer Konzentrationen konnte dies nur für Chloramphenicol (Giesbrecht und Ruska, 1968) und Florfenicol (Blickwede et al., 2004), sowie für Arbekacin (Watanabe et al., 1997) gezeigt werden. Im Extremfall führte die Chloramphenicol- bzw. Florfenicol-induzierte Zellwandverdickung durch eine vollständige Kompression des bakteriellen Protoplasten zum Zelltod (Giesbrecht und Ruska, 1968). Als Ursache für die Zellwandverdickung wurde, in Bezug auf Chloramphenicol, Spiramycin, Clindamycin und Tetracyclin, die Weiterführung der Zellwandbiosynthese von *S. aureus* detektiert, während die Biosynthese cytoplasmatischer Proteine deutlich gehemmt war (Hancock und Park, 1958; Mandelstam und Rogers, 1958; Hash et al., 1964; Nakao et al., 1972). In Bezug auf Linezolid, Spectinomycin und Tigecyclin zeigten die Untersuchungen dieser Arbeit erstmals eine Verdickung der Zellwand von *S. aureus*.

Weiterhin zeigte die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie, dass die Zellwände der *rsbU::IS256* Insertionsmutanten signifikant dünner waren als die Zellwände der *rsbU*-positiven Kontrollen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die *rsbU::IS256* Insertionsmutanten die Fitness einbüßen, die möglicherweise durch eine Verdickung der Zellwand in Anwesenheit von Chloramphenicol, Linezolid und Spectinomycin zustande kamen, durch eine Reduktion der Zellwanddicke kompensieren können. Folglich konnten in Anwesenheit von Chloramphenicol, Linezolid und Spectinomycin weiße *rsbU::IS256* Insertionsmutanten besser wachsen als *rsbU*-positive Zellen, was die Selektion erklären würde. Zahlreiche Studien bringen Erklärungen für diese Beobachtungen hervor. Sowohl in *B. subtilis* als auch in *S. aureus* wurde gezeigt, dass Hitzestress SigB aktiviert (Benson und

Haldenwang, 1993; Kullik und Giachino, 1997). Außerdem detektierten Senn et al. (2005) in Anwesenheit von Linezolid eine erhöhte Transkription von *mazEF*, das für ein Toxin-Antitoxin-System kodiert (Fu et al., 2007), das direkt vor dem *sigB*-Operon lokalisiert ist (Kullik et al., 1998) und über den Promotor  $P_{mazE}$  unter Stressbedingungen mit dem *sigB*-Operon kotranskribiert wird (Senn et al., 2005). Auf diese Weise müsste in Anwesenheit von Linezolid eine Aktivierung von SigB erfolgen.

Dass die Überexpression von SigB zu einer Verdickung der Zellwand von *S. aureus* führt, zeigten bereits Morikawa et al. (2001). Außerdem detektierten Meier et al. (2007) und Bischoff et al. (2004), infolge einer SigB-Aktivierung in *S. aureus* COL und GP268, eine erhöhte Expression der in die Zellwandbiosynthese und -degradierung involvierten Proteine MurA und ArlRS. MurA ermöglicht den ersten Schritt der Peptidoglykan-Biosynthese im Zytoplasma, in dem es die Bildung der löslichen Zellwandvorstufe UDP-MurNAc aus UDP-GlcNAc und Phosphoenolpyruvat katalysiert. ArlRS ist ein Zwei-Komponenten-Regulationssystem, das sowohl die Adhäsion als auch die Autolyse und die extrazelluläre proteolytische Aktivität von *S. aureus* beeinflusst (Fournier und Hooper, 2000). In verschiedenen *S. aureus*-Stämmen wurden jedoch unterschiedliche Regulationen der extrazellulären Proteasen und Autolysin-Aktivität beobachtet. Die Aktivierung von ArlRS verursachte in verschiedenen MSSA-Stämmen eine erhöhte extrazelluläre proteolytische Aktivität, die folglich zu einer Hemmung der Autolysin-Aktivität führte (Fournier und Hooper, 2000; Memmi et al., 2012). Auf der anderen Seite wurde in Derivaten von *S. aureus* SH1000 gezeigt, dass der Verlust der SigB-Aktivität zu einem erhöhten Level an extrazellulären Proteasen führte (über RNAIII-Aktivierung), die anschließend das Profil der Mureinhydrolasen derart veränderten, dass die Aktivität der Mureinhydrolasen mit geringerem Molekulargewicht in der  $\Delta sigB$  Mutante deutlich erhöht war (Lauderdale et al., 2009). Auch die Triton X-100-induzierte Autolyse war in einer  $\Delta sigB$  Mutante von *S. aureus* Newman im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Donegan und Cheung, 2009). Zusammenfassend könnte eine erhöhte Autolysin-Aktivität, reguliert durch RNAIII oder ArlRS, in den *rsbU::IS256* Insertionsmutanten von SA137/93G der Zellwandverdickung in Anwesenheit von Chloramphenicol bei 43°C und Linezolid bei 37°C entgegengewirkt haben. Die dünnere Zellwand könnte den *rsbU::IS256* Insertionsmutanten folglich einen Überlebensvorteil ermöglicht haben. Die extreme Zellwandverdickung von *S. aureus* auf bis zu 60 nm in Folge der Tigecyclin-Behandlung wurde in dieser Arbeit am Beispiel von SA137/93G erstmals beschrieben. Diese Beobachtungen bestätigen die Untersuchungen von Smith et al. (2010), bei denen Tigecyclin die Expression des Penicillin-Bindeproteins PBP2, das in die Peptidoglykan-Synthese involviert ist, deutlich erhöhte. Außerdem zeigte diese Studie, dass

Tigecyclin die Expression des alkalischen Schockproteins *asp23*, das ausschließlich von SigB reguliert wird (Gertz et al., 1999), stark reprimierte. Da also vermutlich nach der Behandlung von SA137/93G mit Tigecyclin (bis zu 0,75 x MHK) keine Aktivierung von SigB vorlag - wie es bei Linezolid möglicherweise der Fall war - sondern eher eine Inhibierung von SigB, wurden keine *rsbU::IS256* Insertionsmutanten selektiert. Während Amikacin und Gentamicin auch im Konzentrationsbereich der 0,75 x MHK keine weißen Kolonien von SA137/93G selektierten, wurden nach 0,75 x MHK Erythromycin einzelne weiße Kolonien detektiert. Die Selektion weißer Kolonien war folglich stark von der Konzentration des jeweiligen Proteinbiosynthese-Inhibitors abhängig.

Sowohl die Selektionsraten weißer Kolonien als auch der Anteil von *rsbU::IS256* Insertionsmutanten unter diesen weißen Kolonien waren in den VSSA-Stämmen SA1450/94 und ST239-BW um mehr als das Doppelte geringer als bei SA137/93G, was auf eine erhöhte Sensitivität des VISA-Phänotyps gegenüber dieser Art Selektionsstress hinweist. Auch dieses Ergebnis verdeutlicht den Einfluss der Zellwanddicke auf die Selektion weißer Kolonien, der in Anwesenheit von Chloramphenicol in Kombination mit Hitzestress in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von SA137/93G wesentlich auffälliger war, als bei Linezolid und Spectinomycin. Höchstwahrscheinlich verursachten in Anwesenheit von Linezolid und Spectinomycin weitere Faktoren die Selektion der weißen Kolonien, die bisher nicht aufgeklärt werden konnten. Die Tatsache, dass bei *S. aureus* ST239-BW nur Linezolid bei 43°C, und nicht Chloramphenicol (43°C), die weißen Kolonien selektierte, sowie die Tatsache, dass bei SA1450/94 nach der Behandlung mit Chloramphenicol (43°C) kein *rsbU::IS256* Insertionsmutanten unter den weißen Kolonien detektiert wurden, unterstützen diese Hypothese. Der geringere Anteil von *rsbU::IS256* Insertionsmutanten unter diesen weißen Kolonien in ST239-BW (33%) könnte durch eine geringere Aktivität von IS256, aufgrund einer geringeren Kopienzahl von IS256 im Genom dieses Stammes im Vergleich zu den ST247-Stämmen, begründet sein. Der Mutatorstamm *S. aureus* SA1450/94 ist durch eine *mutS::IS256*-Insertion gekennzeichnet und wies höchstwahrscheinlich eine erhöhte Mutationsrate in Anwesenheit der selektierenden Antibiotika auf (Nagel et al., 2011). Weitere Hintergrundmutationen könnten hier die erhöhte Überlebensrate aller Zellen ermöglicht haben. Diesbezüglich zeigten Schaaff et al. (2002) bereits, dass erhöhte Mutationsfrequenzen die Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin in *S. aureus* steigerten.

Die Beobachtung, dass erhöhte Temperaturen nicht nur die Zellwanddicke der *rsbU*-positiven, sondern auch die der *rsbU::IS256* Insertionsmutanten leicht, aber nicht signifikant erhöhten, zeigt, dass bei der Selektion weißer SigB-negativer Kolonien neben dem Einfluss von SigB noch weitere Faktoren einen Einfluss auf die Zellwandverdickung nahmen.

Hitzestress kann beispielsweise eine Induktion des Zwei-Komponenten-Systems VraSR, das die Transkription der Gene des Zellwand-Stress-Regulons aktiviert, verursachen (Kuroda et al., 2003; Fleury et al., 2009). Eine erhöhte Aktivität von VraSR wurde bisher bei verschiedenen *S. aureus*-Stämmen mit einer Verdickung der Zellwand in einen Zusammenhang gebracht (Camargo et al., 2008; Mehta et al., 2012; Berscheid et al., 2014).

Weiterhin identifizierten aktuelle Studien Asp23 als Membran-assoziiertes Protein, das in nicht-wachsenden *S. aureus*-Zellen (stationäre Phase) die Homöostase der Zellhülle förderte (Müller et al., 2014). In Abwesenheit von Asp23 wurde sogar eine Aktivierung des Zellwand-Stress-Regulons über VraSR festgestellt. In den selektierten *rsbU::IS256* Insertionsmutanten, die aufgrund der Inaktivierung von SigB keine Expression von Asp23 aufweisen dürften (Gertz et al., 1999), kann möglicherweise auch die Aktivierung des Zellwand-Stress-Regulons einen Überlebensvorteil in Anwesenheit von Chloramphenicol (43°C) bzw. Linezolid und Spectinomycin (37°C) gebracht haben.

Auch die geringere Pigmentierung der Kolonien könnte den *rsbU::IS256* Insertionsmutanten einen Überlebensvorteil unter den genannten selektiven Bedingungen ermöglicht haben. Das Triterpenoid Staphyloxanthin ist das Hauptpigment von *S. aureus* (Marshall und Wilmoth, 1981) und wird durch die fünf Enzyme des *crtOPQMN*-Operons, das von einem SigB-abhängigen Promotor kontrolliert wird, synthetisiert (Pelz et al., 2005). Studien zeigten, dass Staphyloxanthin als Virulenzfaktor von *S. aureus* agiert und die Überlebensfähigkeit von *S. aureus* unter Stressbedingungen, wie beispielsweise bei oxidativem Stress, fördert (Clauditz et al., 2006). Verantwortlich dafür ist die antioxidative Wirkung des in der Zellmembran lokalisierten Staphyloxanthins, das beispielsweise auch das intrazelluläre Wachstum von *S. aureus* in Makrophagen fördert (Olivier et al., 2009). Möglicherweise könnte auch die Eigenschaft des Staphyloxanthins, die Stabilität bzw. Fluidität der Zellmembran zu beeinflussen (Popov Iu et al., 1976; Mishra et al., 2011), eine Rolle gespielt haben.

Sarah van Alen konnte im Rahmen ihrer Masterarbeit bei *S. aureus* Mu50, der der klonalen Linie CC5 angehört und einen VISA-Phänotyp mit einer typischen Zellwandverdickung aufweist (Cui et al., 2000), keine signifikante Selektion weißer Kolonien in Anwesenheit von Chloramphenicol (43°C) bzw. Linezolid (37°C) detektieren. Die Überlebensraten der *rsbU*-positiven Kolonien unter diesen Bedingungen entsprachen ungefähr den Lebendzellzahlen, was ebenfalls auf einen geringen Selektionsdruck für die Entstehung SigB-negativer Mutanten hinweist. Auffällig war jedoch, dass die Kolonien dieses Stammes unter allen Wachstumsbedingungen eine geringere gelbe Pigmentierung im Vergleich zu den getesteten CC8-Stämmen aufwiesen, was auf eine von vornherein geringere Expression SigB-abhängiger Proteine, wie dem Staphyloxanthin, hinweisen könnte. Das könnte zu einer hohen

Überlebensrate der *rsbU*-positiv Kolonien, trotz Vorhandensein einer stark verdickten Zellwand, beigetragen haben. Außerdem wurde die Wahrscheinlichkeit weiße Kolonien zu selektieren dadurch minimiert, dass *S. aureus* Mu50 keine Kopien von IS256 im Genom enthält (Kuroda et al., 2001). Denn auch Mutationen oder IS256-Insertionen im genomischen Hintergrund des Norddeutschen Epidemietyps können die Selektion SigB-negativer Kolonien in Anwesenheit von Chloramphenicol bei 43°C beeinflusst haben. Da *S. aureus* Mu50 unter allen getesteten *S. aureus*-Stämmen, der einzige Stamm des klonalen Komplexes CC5 war, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob aufgrund des genomischen Hintergrundes nur CC8-Stämme die Selektion weißer Mutanten zuließen.

Zusammenfassend verdeutlichte das Auftreten weißer *rsbU::IS256* Insertionsmutanten bei ST247- und ST239-Stämmen, dass die Behandlung mit subinhibitorischen Antibiotika-Konzentrationen die Genomvariabilität von *S. aureus*-Stämmen, die eine hohe Anzahl von IS256-Kopien im Genom enthalten, steigern kann und das Überleben in Stresssituationen ermöglicht.

### 5.3.1.2 SigB als negativer Regulator der Transposition von IS256

Die Aktivierung der Transpositionsfrequenz infolge einer Inaktivierung von SigB wurde bereits in früheren Studien gezeigt. Bereits 1987 beschrieben Lyon et al., dass der SigB-negative Laborstamm *S. aureus* RN450 im Vergleich zu klinischen *S. aureus*-Isolaten, die in den meisten Fällen eine SigB-Aktivität aufweisen, nicht in der Lage war, die Transpositionsaktivität von IS256 zu kontrollieren (Lyon et al., 1987). Viele Jahre später beobachteten Valle et al. (2007) eine schnellere Entstehung von Biofilm-negativen Varianten in Abwesenheit von SigB, was auf eine gesteigerte Transpositionsfrequenz von IS256 hinwies. In weiteren Untersuchungen detektierten sie, unter der Verwendung eines rekombinanten IS256-Elementes, das an eine Erythromycin-Resistenzkassette gekoppelt war, eine dreifach erhöhte Transpositionsfrequenz von IS256 in *S. aureus* 15981 $\Delta$ *sigB* im Vergleich zum Wildtyp. Unter Verwendung des gleichen Testsystems detektierten Nagel et al. (2011) ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Transpositionsfrequenz von IS256 im *rsbU*-negativen *S. aureus* NCTC8325 im Vergleich zu *S. aureus* HG001, bei dem die 11-bp Deletion in *rsbU* repariert wurde (Herbert et al., 2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten schließlich auch eine vierfache Erhöhung der Transpositionsfrequenz in der *rsbU::IS256-spc* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 W5, im Vergleich zur *rsbU*-positiven Insertionsmutante *S. aureus* HG001 G2. Hier konnte jedoch erstmals gezeigt werden, dass *rsbU* in *S. aureus* einen Hotspot für IS256-Insertionen darstellt und die Selektion von *rsbU::IS256* Insertionsmutanten zu einer Autoaktivierung der Transposition führte. Die

Transpositionsfrequenz von IS256-*ermB* vom Plasmid pA3 ins Genom von *S. aureus* HG001 W5 war, während des gesamten Messungszeitraumes von 6 h, signifikant höher als bei *S. aureus* HG001 G2, was den hemmenden Einfluss von SigB auf die Transpositionsfrequenz von IS256 in *S. aureus* HG001 G2 verdeutlicht. Die Transpositionsfrequenz von IS256-*ermB* im *rsbU*-positiven *S. aureus* HG001 G2 war annähernd konstant und sank zum Zeitpunkt t6 (~ OD 3,0) auf ein Minimum. Dieser Kurvenverlauf zeigt, dass der Anteil der IS256-*ermB*-Insertionsmutanten in der Kultur bis zum Zeitpunkt t5 (~ OD<sub>600</sub> 1,6) ungefähr gleich war, da die entstandenen Insertionsmutanten sich in der Kultur genauso vermehrten wie der Wildtyp und kontinuierlich neue Insertionsmutanten entstanden. Die Expression von SigB steigt bei *S. aureus* in der exponentiellen Phase kontinuierlich an, erreicht beim Übergang in die stationäre Phase den Maximalwert und sinkt dann langsam wieder (Giachino et al., 2001). Durch die hemmende Wirkung von SigB wurde folglich die Transpositionsfrequenz von IS256-*ermB* in *S. aureus* HG001 G2 in der exponentiellen Wachstumsphase kontinuierlich auf einem geringen Level gehalten. Dass beim Eintritt in die stationäre Phase zum Zeitpunkt t6 die Transpositionsfrequenz von IS256-*ermB* leicht sank, kann also auf die maximale Expression des hemmenden SigB zurückzuführen sein. Möglicherweise wurde in der Kultur zu diesem Zeitpunkt die Neuentstehung von chromosomalen IS256-*ermB*-Insertionsmutanten durch SigB-abhängige Faktoren stärker gehemmt, während bestehende Insertionsmutanten sich weiter vermehrten. Damit sank der prozentuale Anteil der IS256-*ermB*-Insertionsmutanten in der Kultur von *S. aureus* HG001 G2. In der *rsbU*::IS256 Insertionsmutante *S. aureus* HG001 W5 stieg hingegen die Transpositionsfrequenz von IS256-*ermB* in der exponentiellen Phase (bis zum Zeitpunkt t3, OD<sub>600</sub> ~ 0,5) kontinuierlich an und erreichte dann ihren Maximalwert, was die Deregulation der Transposition von IS256-*ermB* in der exponentiellen Phase zeigt. In der Kultur stieg folglich der Anteil der neu entstandenen Insertionsmutanten kontinuierlich. Senn et al. (2005) beschrieben, dass die Transkription von SigB durch drei verschiedene Promotoren ermöglicht wird. Während der SigA-abhängige Promotor P<sub>mazE</sub> eher in der exponentiellen Wachstumsphase aktiv ist, produzieren der SigA-abhängige Promotor P<sub>A</sub> und der SigB-abhängige Promotor P<sub>B</sub>, der direkt vor *rsbV* lokalisiert ist, eher in der späten exponentiellen Phase *sigB*-Transkripte (Senn et al., 2005; Donegan und Cheung, 2009). Aufgrund des polaren Effektes der Insertion von IS256-*spc* am 3' Ende von *rsbU*, müsste folglich die SigA-abhängige Bildung der *sigB*-Transkripte von P<sub>mazE</sub> und P<sub>A</sub> in *S. aureus* HG001 W5 nahezu vollständig gehemmt gewesen sein. Dies verursachte höchstwahrscheinlich die überschießende Transpositionsaktivität von IS256-*ermB* in der exponentiellen Phase. Die steigende Transkription von *sigB* (über Promotor P<sub>B</sub>) in der transienten Wachstumsphase führte möglicherweise auch in der *rsbU*::IS256

Insertionsmutante *S. aureus* HG001 W5 zur Hemmung der Transpositionsfrequenz ab dem Zeitpunkt t3. Der Anteil der neu entstandenen IS256-*ermB* Insertionsmutanten in der Kultur sank. Bereits in früheren Studien wurde eine geringe SigB-Aktivität in Abwesenheit von RsbU detektiert (Giachino et al., 2001). Palma und Cheung (2001) zeigten, dass in *S. aureus* das Level des SigB-abhängigen Transkripts im Vergleich zum Wildtyp in einer *rsbU*-Mutante um 50% und in der *rsbV*-Mutante um 90% sank, was ebenfalls eine Restaktivität von SigB in der *rsbU*-Mutante zeigte. RsbU ist jedoch notwendig für die vollständige Expression von SigB, insbesondere für die SigB-abhängige Aktivierung der Staphyloxanthin- und Asp23-Synthese. Auch für die Induktion SigB-abhängiger Gene infolge von Hitzestress, für die Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und UV-Toleranz sowie für die Hemmung der  $\alpha$ -Hämolyisin-Aktivität war RsbU essentiell (Giachino et al., 2001). Die starke Hämolyse auf Blutagar, sowie die weiße Koloniefarbe der *rsbU::IS256* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 W5 bestätigten dies. Auch die Expression der vier SigB-abhängigen Proteine, die bei der MALDI-TOF-Analyse der *rsbU::IS256* Insertionsmutante *S. aureus* HG001 W5 nicht mehr detektierbar waren (*graF*, *csbD*, SAS049, SA0772), war demzufolge von der Aktivität von RsbU abhängig. Zahlreiche Studien zeigten, dass die Aktivierung von SigB in *S. aureus* sowohl über einen RsbU-abhängigen als auch über einen RsbU-unabhängigen Weg vonstattengehen kann (Giachino et al., 2001; Palma und Cheung, 2001; Senn et al., 2005; Pané-Farré et al., 2009). In *B. subtilis* wird die Aktivität der RsbU-Phosphatase durch die regulatorischen Proteine des sogenannten Stressosoms aktiviert (RsbR-RsbS-RsbT). Infolge von Umweltstress bindet die Kinase RsbT an den N-Terminus von RsbU und aktiviert somit die Dephosphorylierung von RsbV (Kang et al., 1998; Hardwick et al., 2007). In *S. aureus* wurden weder die Komponenten des Stressosoms, noch RsbX und RsbP/RsbQ detektiert (Pané-Farré et al., 2006). Durch welche Komponenten RsbU in *S. aureus* aktiviert wird oder durch welche es möglicherweise reprimiert wird, konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Serin/Threonin-Kinase PknB ein positiver Regulator von SigB ist, da in einer *pknB*-Mutante neben reduzierter SigB-Aktivität auch eine vermehrte Expression von RNAII und RNAIII sowie von  $\alpha$ -Hämolyisin detektiert wurde (Tamber et al., 2010). Ob PknB die Aktivierung von SigB über einen indirekten oder über einen direkten Mechanismus, beispielsweise durch Phosphorylierung von RsbU, induziert, ist bisher unbekannt. Auch die RsbU-unabhängige Dephosphorylierung von RsbV konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Die negative Regulation der Transposition durch den alternativen Sigma-Faktor SigB konnte, wie bereits beschrieben, nur bei IS256 von *S. aureus* gezeigt werden. Die Aktivierung der IS256-Transposition im Zusammenhang mit einer geringeren oder fehlenden Expression von

SigB, könnte den *sigB*- bzw. *rsbU*-negativen *S. aureus*-Isolaten in Stresssituationen eine höhere Genomvariabilität verleihen und damit eine schnellere Anpassungsfähigkeit gewährleisten, die schließlich den Bakterien einen Überlebensvorteil bringen kann. Valle et al. (2007) zeigten jedoch auch, dass durch zusätzlichen osmotischen Stress (NaCl-Zugabe), die Transpositionsfrequenz von IS256 in der *sigB*-Mutante durch einen bisher unbekanntem Mechanismus wieder gehemmt wurde. In *sigB*- bzw. *rsbU*-positiven *S. aureus*-Isolaten kann in Stresssituationen die SigB-abhängige Stressantwort aktiviert werden und das Überleben unter diesen Bedingungen ermöglichen. Bei diesem Überlebenskampf wäre eine zusätzliche Genomvariabilität, durch erhöhte Transpositionsfrequenzen von IS256, vermutlich eher von Nachteil und könnte ein zusätzliches Überlebensrisiko darstellen, was den Sinn des hemmenden Effekts von SigB auf die Transposition von IS256 verdeutlichen würde. Diese Studien weisen darauf hin, dass es einen Regulationsmechanismus gibt, der in Folge einer Aktivierung einer allgemeinen Stressantwort in *S. aureus* die Transpositionsaktivität von IS256 reprimiert.

Im Gegensatz dazu wurde bereits für mehrere MGEs in verschiedenen Spezies gezeigt, dass die Transposition in Stresssituationen, wo üblicherweise alternative Sigma-Faktoren aktiviert werden, erhöht wird. Beispielsweise wurden sowohl subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen (IS256 in *S. aureus* (Nagel et al., 2011)) als auch hohe Level an Metallionen (IS1 in *E. coli* (Brocklehurst und Morby, 2000)), hohe Glucosekonzentrationen (IS1 in *E. coli* (Kharat et al., 2006)), UV-Strahlung (IS10 in *E. coli* oder ISDra2 in *Deinococcus radiodurans* (Eichenbaum und Livneh, 1998; Pasternak et al., 2010)), oxidativer Stress (ISBcen20 in *Burkholderia cenocepacia* (Drevinek et al., 2010)), hohe Temperaturen (IS401 in *Burkholderia multivorans* (Ohtsubo et al., 2005)) oder Langzeitlagerung (Naas et al., 1994) mit erhöhten Transpositionsfrequenzen von IS-Elementen oder Transposons in Verbindung gebracht. Diese Studien könnten zu der Hypothese führen, dass in Stresssituationen die alternativen Sigma-Faktoren die Transpositionsfrequenzen dieser IS-Elemente erhöhen, um die Überlebenschancen zu erhöhen. Da die alternativen Sigma-Faktoren jedoch eine sehr globale Rolle einnehmen und eine Vielzahl von Genen im Zuge der Stressantwort regulieren, ist es sehr schwierig die genauen Regulationsmechanismen detailliert aufzuklären. Außerdem gibt es nur sehr wenige Studien, die den direkten Einfluss von Sigma-Faktoren auf die Transposition von mobilen Elementen beschreiben. Die positive Regulation der Transposition konnte bisher nur in *Pseudomonas putida* gezeigt werden, wo die Aktivierung des alternativen Sigma-Faktors RpoS in der stationären Phase für die Aktivierung der Transposition von Tn4652 notwendig war (Ilves et al., 2001).

Die Relevanz der Autoaktivierung von IS256 wird jedoch erst dann deutlich, wenn man bedenkt, dass subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika (Linezolid, Chloramphenicol, Spectinomycin oder Erythromycin), die sehr relevant in der Human- und Tiermedizin sind, diese Kaskade der Autoaktivierung triggern können, indem sie unter bestimmten Bedingungen *rsbU*::IS256 Insertionsmutanten selektieren. Besonders alarmierend ist die Autoaktivierung von IS256 durch Linezolid bei physiologischen Temperaturen, die hier nur bei ST247-Stämmen detektiert wurde. Der Einsatz von Linezolid als Reserveantibiotikum bei schweren Haut- und Weichgewebeeinfektionen, könnte somit bei *S. aureus*-Isolaten, die eine Vielzahl von IS256 im Genom enthalten, durchaus die Genomflexibilität und folglich die Resistenzentwicklung fördern. Dieses Risiko ist in Deutschland noch eingeschränkt, da laut RKI die epidemischen MRSA-Stämme, die viele IS256-Kopien enthalten, nur wenig in Krankenhäusern verbreitet sind. Im Jahr 2011 wurden in 154 Krankenhäusern keine Norddeutschen Epidemiestämme (ST247) isoliert (Layer et al., 2012). Die hochresistenten MRSA-Stämme des Wiener Epidemietyps ST239 werden jedoch immer häufiger in deutschen Kliniken isoliert. Während im Jahr 2011 in nur 3% der ausgewählten Krankenhäuser ST239-MRSA isoliert wurden, stieg dieser Wert im Jahr 2012 auf 16% (RKI: Epidemiologisches Bulletin 2013). Global gesehen gehören ST239-MRSA jedoch zu den weltweit am meisten verbreiteten MRSA-Stämmen (Enright et al., 2002; Harris et al., 2010). Besorgniserregend ist auch die Detektion von 16 IS256-Kopien in *S. aureus* USA500, der dem Sequenztyp 8 zugeordnet wird (Benson et al., 2014). ST8-MRSA treten in Deutschland mit steigenden Prävalenzen in Krankenhäusern auf (26% im Jahr 2011; Layer et al., 2012). In Bezug auf Linezolid wurden IS256 und IS256-ähnliche Elemente auch als flankierende Sequenzen des *cfi* Gens, das Resistenz des PhLOPS<sub>A</sub>-Phänotyps vermittelt, in verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien identifiziert (Shen et al., 2013). IS256 wurde in Verbindung mit *cfi* bisher nur auf Plasmiden von *E. coli*, *Bacillus sp.* und *S. sciuri* detektiert (Zhang et al., 2011; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2014). Außerdem flankierten zwei IS256-Elemente ein chromosomal lokalisiertes *cfi* Gen in verschiedenen *Staphylococcus lentus*-Isolaten, die von Hühnern, Enten und Schweinen in China isoliert wurden, und ermöglichten somit die Verbreitung von *cfi* (He et al., 2014). Bisher wurden jedoch keine *S. aureus*-Stämme identifiziert, die sowohl IS256 enthielten, als auch *cfi*-positiv waren. In *cfi*-positiven *S. aureus*-Stämmen wurde die Mobilität von *cfi* bisher nur mit IS21-558 in Verbindung gebracht (Kehrenberg et al., 2007; Toh et al., 2007). Shore et al. (2010) detektierten *cfi* in Kombination mit einer Kopie von IS21-558 auf einem konjugativen Plasmid (pSCFS7) eines PVL-positiven ST8-MRSA-IVa/USA300. Die Identifizierung dieses Plasmides ist sehr alarmierend, da die rasche Verbreitung dieses Stammes in den USA derzeit

große Probleme verursacht und dies ebenfalls die stetige Verbreitung von *cfr* mit sich zieht. Da bereits in den ersten ST8-MRSA auch IS256-Kopien im Genom detektiert wurden, ist es womöglich nur eine Frage der Zeit, bis die Mobilisierung von *cfr* auch in MRSA-Stämmen durch IS256 vermittelt wird. Die Autoaktivierung von IS256 in *S. aureus* infolge subinhibitorischer Antibiotika-Konzentrationen könnte folglich in *cfr*-positiven Stämmen auch die Verbreitung dieses Resistenzgen begünstigen. IS256-ähnliche Elemente, wie *ISEnfa4*, wurden in *Enterococcus sp.* mit der Mobilisierung von *cfr* in Verbindung gebracht (Diaz et al., 2012; Liu et al., 2013). Die Nukleotidsequenzen von *ISEnfa4* und IS256 weisen eine Ähnlichkeit von 89% auf. Ob die Regulation der Transposition beider IS-Elemente ähnlich ist, wurde bisher nicht untersucht.

Diese Beispiele verdeutlichen, wie wichtig es ist, die Transpositionsmechanismen der IS-Elemente und deren Regulation aufzuklären, um die erhöhte Mobilität der IS-Elemente, die häufig die Resistenzentwicklung fördert, eventuell zukünftig durch entsprechende Medikamente hemmen zu können. Über welchen Regulationsmechanismus SigB die Transpositionsfrequenz von IS256 möglicherweise reguliert, wird im folgenden Kapitel ausführlich diskutiert.

### 5.3.2 Regulation der Transposition von IS256 durch Antisense-RNAs

Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten 30 Jahre zeigen, dass regulatorische nicht-kodierende Antisense-Transkripte sowohl in Eukaryoten als auch in Bakterien eine fundamentale Komponente der Genregulation darstellen (Wagner und Simons, 1994; He et al., 2008). Die erste bakterielle regulatorische Antisense-RNAs wurde bereits 1981 im Zusammenhang mit dem Plasmid *ColE1* detektiert. Durch Hybridisierung mit der Ziel-RNA können Antisense-RNAs sowohl die Transkription, die Translation als auch die Stabilität der Ziel-mRNA beeinflussen (Brantl, 2007) und somit zahlreiche physiologische Prozesse in Bakterien kontrollieren. Das wirkliche Ausmaß der Antisense-Transkription des bakteriellen Chromosoms, wurde erst in den letzten Jahren durch neue RNA-Analysetechniken, wie beispielsweise RNA-Sequenzierungen (RNA-Seq) bekannt (Georg und Hess, 2011). So zeigten Lasa et al. (2011), dass 49% der annotierten Gene in *S. aureus* mit mindestens einem Antisense-Transkript assoziiert werden. Diese Antisense-Transkripte sind je nach Lage des Promotors über eine gewisse Länge vollständig komplementär zur überlappenden Ziel-RNA und können sowohl nicht-kodierende *cis*-Antisense-RNAs als auch kodierende mRNAs sein, deren 5' oder 3' untranslatierte Region mit der Ziel-mRNA überlappt (Lasa et al., 2012). Die Länge der Antisense-Transkripte ist sehr unterschiedlich und variiert von ~ 50 bis 500

Nukleotiden (*cis*-kodierte kleine regulatorische RNAs) bis hin zu 700 – 3500 Nukleotiden (Antisense-RNAs) (Georg und Hess, 2011; Lasa et al., 2011). Die *cis*-kodierten kleinen RNAs bilden meist sehr stabile Sekundärstrukturen (1-4 Stem-Loops) aus und weisen demzufolge häufig längere Halbwertszeiten (2 und > 30 Minuten) als die Ziel-mRNA auf (Brantl, 2007). Einige Studien wiesen in verschiedenen *S. aureus*-Stämmen jeweils bis zu 400 kleine regulatorische RNAs nach, die sowohl *cis*-kodierte als auch *trans*-kodierte Antisense-RNAs einschlossen (Beaume et al., 2010; Howden et al., 2013). In *S. aureus* beeinflussen diese kleinen regulatorischen RNAs eine Vielzahl physiologischer Prozesse, sowie die Persistenz, die Virulenz und auch die Stressantwort beispielsweise in Anwesenheit von Antibiotika (Abu-Qatouseh et al., 2010; Chabelskaya et al., 2010; Gottesman und Storz, 2011; Howden et al., 2013; Romilly et al., 2014). In Bezug auf MGEs wurde auch gezeigt, dass *cis*-kodierte kleine RNAs die Transposition von IS10 und IS30 in *E. coli* kontrollieren (Brantl, 2007). Außerdem wiesen bereits die Studien von Nagel et al. (2011) darauf hin, dass auch die Transposition von IS256 durch die Bildung von Antisense-RNAs in *S. aureus* gehemmt wird.

In dieser Arbeit wurden nun erstmals die 5' Enden von mindestens zwei verschiedenen *cis*-kodierten Antisense-RNAs von IS256 in *S. aureus* SA137/93G durch 5' RACE-PCR und RT-PCR charakterisiert. Die Transkriptionsstartpunkte (TSPs) dieser Antisense-RNAs wurden in der Nähe des 3' Endes der Transposase detektiert. Das 5' Ende der größeren Antisense-RNA, die eine Mindestlänge von 435 bp aufwies, wurde 53 bp stromaufwärts des Stoppkodons der *tnpA*-mRNA detektiert. Das 5' Ende der kleineren Antisense-RNA, die eine Mindestlänge von 370 bp aufwies, wurde ~ 120 bp stromaufwärts des Stoppkodons der *tnpA*-mRNA detektiert. Die Längen beider Antisense-RNAs sind zwar vergleichbar mit den Längen anderer detektierter Antisense-RNAs in *S. aureus* (Beaume et al., 2010), sind jedoch deutlich länger als die bisher in *E. coli* detektierten Antisense-RNAs RNA-OUT von IS10 (70 nt) und RNA-C von IS30 (150 nt) (Case et al., 1988; Arini et al., 1997). Aufgrund der Lokalisation der 5' Enden der Antisense-RNAs von IS256 und der großen Entfernung vom TSP der *tnpA*-mRNA müsste in beiden Fällen eine Duplexbildung von Sense- und Antisense-RNA eher die Elongation der Translation als die Initiation der Translation der *tnpA*-mRNA hemmen. Auch bei IS30 aus der IS30-Familie wurde ein Gegenstrangpromotor (P30C) innerhalb des Transposase-Gens detektiert (Arini et al., 1997; Mahillon und Chandler, 1998). Arini et al. (1997) zeigten, dass die Bildung der Antisense-RNA RNA-C durch Hybridisierung mit der mRNA der Transposase nicht die Initiation der Translation, sondern eher die Elongation der Translation der Transposase-mRNA hemmte, was schließlich die Menge der vollständig translatierten Transposase-Moleküle verringerte. Ein vergleichbarer Mechanismus wäre auch für IS256 denkbar. Die am besten untersuchte Antisense-RNA unter den IS-Elementen ist

jedoch RNA-OUT von *IS10* der *IS4*-Familie (Chandler et al., 1979). Bereits 1983 beschrieben Simons und Kleckner, dass *IS10* die Expression der Transposase auf translationaler Ebene inhibiert. Die Transposition einer chromosomalen Kopie von *Tn10*, das durch zwei *IS10*-Elemente flankiert wurde, war in Anwesenheit eines Plasmides, das ebenfalls mehrere Kopien von *IS10* enthielt, stark inhibiert. Dieses Phänomen wurde „multicopy inhibition“ genannt (Simons und Kleckner, 1983). *IS10* produziert eine sehr stabile, stark strukturierte kleine Antisense-RNA (RNA-OUT, 70 nt) von dem Gegenstrangpromotor pOUT, der im IRL von *IS10* lokalisiert ist und stärker ist als der Promotor der Transposase pIN (Case et al., 1988). Die außergewöhnliche Stabilität von RNA-OUT wird durch die Sekundärstruktur (Haarnadelform, „Stem-Loop“) ermöglicht und führt dazu, dass RNA-OUT mit 60 Minuten eine wesentlich längere Halbwertszeit hat als die mRNA der Transposase (RNA-IN) mit 30 Sekunden (Case et al., 1989). RNA-OUT ist über 35 bp komplementär zum 5' Ende der mRNA der Transposase (RNA-IN), sodass die Basenpaarung in diesem Bereich die ribosomale Bindestelle von RNA-IN blockiert, was schließlich zur Hemmung der Initiation der Translation der Transposase führt (Case et al., 1989; Ma und Simons, 1990). Der gebildete Doppelstrang aus RNA-IN und RNA-OUT wird anschließend durch die RNaseIII abgebaut, während die einzelsträngigen RNAs gegenüber der RNaseIII stabil sind (Case et al., 1989). Die außergewöhnliche Stabilität von RNA-OUT und ihre Fähigkeit in *trans* zu agieren, verdeutlichen ihre Rolle bei der „multicopy inhibition“ von *IS10* (Simons und Kleckner, 1983).

Durch RNA-Seq wurden auch in *S. aureus* einige Antisense-RNAs von Transposasen detektiert, was die Rolle von Antisense-RNAs bei der Regulation der Transposition verdeutlicht. Howden et al. (2013) analysierten die kleinen regulatorischen RNAs des multiresistenten *S. aureus*-Stammes JKD6008 (ST239), der 17 *IS256*-Kopien im Genom enthält. In dieser Studie wurde lediglich eine Antisense-RNA von *IS256* detektiert, die durch Hybridisierung mit dem 5' Ende der *tnpA*-mRNA im Bereich der ribosomalen Bindestelle möglicherweise die Initiation der Translation der Transposase beeinflussen kann. Die Bildung dieser Antisense-RNA war unabhängig von der Behandlung mit verschiedenen Antibiotika, wie Tigecyclin, Linezolid, Vancomycin oder Ceftobiprol, was auf eine konstitutive Expression dieser Antisense-RNA hindeuten könnte. Auch die *in silico* Promotoranalyse identifizierte einen SigA-abhängigen Promotor stromaufwärts dieser Antisense-RNA, wobei die SigB-Abhängigkeit ausgeschlossen werden konnte. Die in dieser Arbeit detektierten Antisense-RNAs von *IS256* wurden von Howden et al. (2013) nicht detektiert, was möglicherweise auf Stamm-spezifische Unterschiede oder methodische Vorgehensweisen zurückzuführen ist. Die hier verwendeten *S. aureus*-Stämme SA137/93G und SA137/93G

wG12 enthielten schließlich mehr als die doppelte Anzahl an IS256-Kopien im Genom (38 x IS256) im Vergleich zu *S. aureus* JKD6008 (17 x IS256), was auf höhere Expressionslevel der Antisense-RNAs in SA137/93G hinweisen könnte. Auch die Stabilitäten der Antisense-RNAs (Halbwertszeit, Abbau durch RNaseIII), sowie die Expressionslevel von SigB können in beiden klonalen Linien voneinander abweichen. Vorangegangene Studien von Nagel et al. (2011) und Valle et al. (2007) sowie die in dieser Arbeit detektierte Autoaktivierung von IS256 zeigen eine deutliche Steigerung der Transpositionsfrequenz von IS256 in Abwesenheit von SigB, was möglicherweise auf die Bildung der SigB-abhängigen Antisense-RNA hindeuten könnte. Die Untersuchungen der Promotorregionen der detektierten Antisense-RNAs wiesen zwar eine SigB-Konsensus-Sequenz stromaufwärts des TSP der kleineren detektierten Antisense-RNA nach, der Abstand der -10-Region des Promotors zum TSP war jedoch mit 12 bp etwas zu groß. Frühere Untersuchungen verschiedener SigB-abhängiger Promotoren in *S. aureus* beschrieben bisher Abstände von 7-10 bp zwischen der -10-Region und dem TSP der RNA (Homerova et al., 2004). Zusätzlich wurden vor beiden detektierten Antisense-RNAs Konsensus-Sequenzen für SigA-abhängige Promotoren identifiziert, was auf eine konstitutive Hemmung der Transposition von IS256 hindeuten könnte. Der TSP der kleineren Antisense-RNA konnte nur auf einen Bereich von 10 bp eingegrenzt werden konnte, deutet jedoch auf die Bildung beider Antisense-RNAs, einer SigB-abhängigen- und einer SigA-abhängigen Antisense-RNA, in dieser DNA-Region hin. Außerdem zeigten die Untersuchungen von Nagel et al. (2011), dass eine stille Mutation in der -35-Region dieses SigB-abhängigen Promotors die Transpositionsfrequenz von IS256 steigerte.

Beaume et al. (2010) identifizierten in *S. aureus* N315 zahlreiche Antisense-Transkripte, die komplementär zu den 3' bzw. 5' Enden von Transposase-Genen waren. Diese Antisense-RNAs konnten beispielsweise den Transposasen von Tn554, IS232 und IS1181 zugeordnet werden. Für IS1181 wurden pro Insertionsstelle im Genom jeweils zwei Antisense-RNAs detektiert (siehe Abbildung 4.34). Am 5' Ende des Transposase-Gens reguliert vermutlich eine Antisense-RNA in Abhängigkeit von SigA die Translation der Transposase-mRNA durch komplementäre Bindung im Bereich der ribosomalen Bindestelle der *tnp*-mRNA, wie es oben bereits für IS10 beschrieben wurde. Am 3' Ende des Transposase-Gens von IS1181, im Bereich des IR<sub>R</sub>, wurde ebenfalls eine Antisense-RNA mit einer Länge von ~ 62 bp detektiert (Beaume et al., 2010), die laut Promotoranalyse sehr wahrscheinlich in Abhängigkeit von SigB produziert wird. Diese Antisense-RNA könnte durch Hybridisierung mit der Transposase-mRNA die Translation im Bereich des Stoppkodons der mRNA hemmen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit konnten das Vorhandensein dieser Antisense-RNA mithilfe der RT-PCR bzw. der 5' RACE-PCR in *S. aureus* HG001 leider nicht

bestätigen. Die Ursache hierfür, könnte auf eine zu geringe Menge an Antisense-RNA in *S. aureus* HG001 zurückzuführen gewesen sein, da dieser Stamm nur zwei Kopien von *IS1181* im Genom enthält. Auch Instabilitäten der Antisense-RNA könnte die ausbleibende Detektierbarkeit erklären. Die Untersuchungen der Masterstudentin Christine Lämmer zeigten jedoch, dass die Transpositionsfrequenz von *IS1181* in Abwesenheit von SigB in *S. aureus* 8325 signifikant erhöht war. Diese Ergebnisse könnten auf das Vorhandensein einer SigB-abhängigen Antisense-RNA bei *IS1181* hinweisen. Die SigA-Abhängigkeit dieser Antisense-RNA kann jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig ausgeschlossen werden, da ebenfalls eine Konsensus-Sequenz eines SigA-abhängigen Promotors stromaufwärts der detektierten Antisense-RNA gefunden wurde (Beaume et al., 2010). Da die Konsensus-Sequenz des SigB-Promotors im IR<sub>R</sub> von *IS1181* lokalisiert ist, würde man davon ausgehen, dass die Konsensus-Sequenz ebenfalls im IR<sub>L</sub> vorhanden ist. Da die IRs von *IS1181* jedoch nicht vollständig identisch sind, liegt kein SigB-abhängiger Promotor im IR<sub>L</sub> vor. Außerdem wurde von Beaume et al. (2010) keine Antisense-RNA in diesem Bereich detektiert, sodass eine SigB-abhängige Transkription der Transposase-mRNA nahezu ausgeschlossen werden kann.

In der Literatur wurde bereits vielfach gezeigt, dass die Bildung *cis*-kodierter Antisense-RNAs häufig von bestimmten Umweltbedingungen abhängig ist. In *E. coli* wird beispielsweise die kleine RNA GadY in Abhängigkeit von SigS nur in der stationären Wachstumsphase generiert, um die Antwort auf Säurestress zu regulieren (Opdyke et al., 2004). Außerdem identifizierten Lasa et al. (2011) in *S. aureus* 15981 durch RNA-Seq zahlreiche lange SigB-abhängige Antisense-Transkripte. Diese Studie zeigt ebenfalls, dass die RNaseIII (kodiert durch *rnc*) in *S. aureus* eine Vielzahl von doppelsträngigen Sense/Antisense-RNA-Duplexen zu kurzen RNA-Fragmenten (19-22 nt) abbaut, was teilweise die Detektion langer Antisense-Transkripte erschwert. Dieser posttranskriptionale Mechanismus ist jedoch weit verbreitet in Gram-positiven Bakterien und dient der Anpassung der benötigten mRNA-Mengen unter verschiedenen Umweltbedingungen (Lasa et al., 2011; Lasa et al., 2012). Dass SigB-abhängige Antisense-Transkripte in *S. aureus* eine wichtige Rolle spielen, zeigten auch Romilly et al. (2014) mit der Charakterisierung der kleinen nicht-kodierenden SigB-abhängigen RNA RsaA. Diese RNA bildet einen imperfekten Duplex mit der mRNA des Transkriptionsregulators MgrA und hemmt dessen Translation, was schließlich die Biofilmbildung erhöht und die Kapselbildung in *S. aureus* inhibiert. Im Mausmodell hemmte RsaA somit die Virulenz von *S. aureus* bei akuten Infektionen und führte zur Persistenz von *S. aureus*, was chronische Infektionen förderte (Romilly et al., 2014). All diese Beispiele zeigen die Wichtigkeit der Charakterisierung kleiner RNAs und

Antisense-RNAs in *S. aureus*, die zukünftig die Entwicklung RNA-basierter Therapien ermöglichen könnten.

#### **5.4 Ausblick**

In dieser Arbeit konnte mithilfe der Charakterisierung verschiedener IS256-Insertionsmutanten von *S. aureus* gezeigt werden, dass IS256 ein sehr aktives IS-Element ist, das in *S. aureus* eine erhöhte Genomflexibilität hervorrufen kann und somit sowohl die Resistenzentwicklung als auch auf die Ausbildung verschiedener Phasenvariationen fördern kann. Weiterhin wurden einige Regulationsmechanismen, die die Transpositionsfrequenz von IS256 beeinflussen, genauer erörtert. Da in den letzten Jahren eine zunehmende Verbreitung von IS256 unter verschiedenen Bakterien-Spezies beobachtet wurde, ist es sehr wichtig die Regulation der Transposition von IS256 auch in Zukunft weiter zu untersuchen. Im Folgenden werden einige weiterführenden Fragestellungen erläutert, die im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit in Zukunft gestellt werden könnten.

##### **Genomsequenzierung der drei ST247-Stämme**

Nachdem die Contigs der drei Genome von *S. aureus* SA1450/94, SA137/93A und SA137/93G in den GenBank-, EMBL- und DDBJ-Datenbanken hinterlegt wurden und in allen drei Stämmen die Insertionsstellen der IS-Elemente IS256, IS1181, IS257/IS431*mec* und IS1272-Derivate detektiert wurden, sollte nun im nächsten Schritt der Vergleich der drei Stämme untereinander hinsichtlich weiterer Mutationen erfolgen. Dazu sollte eine SNP-Liste erstellt werden, die Mutationen in den beiden VISA-Stämmen im Vergleich zum Referenzstamm SA1450/94 darstellt. Diese SNP-Liste könnte weitere Ursachen für die Entstehung des VISA-Phänotyps von SA137/93A und SA137/93G aufdecken. Interessant wären diesbezüglich Mutationen in den Genen *vraS*, *vraR*, *vraT* (auch: *yvqF*), *vraG*, *graS*, *graR*, *yycH*, *yycF*, *yycG*, *rpoB*, *agrA*, *prsA*, *mraZ*, *clpP*, *stpI*, *pknB*. Vorläufige Alignments der drei ST247-Stämme zeigten nur wenige Mutationen in einigen dieser Gene, die jedoch auch auf Sequenzierfehler zurückzuführen sein können. Um Sequenzierfehler auszuschließen, sollten nach Vorlage der SNP-Liste interessante Mutationen per PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung der PCR-Produkte überprüft werden.

##### **Selektion SigB-negativer IS256-Insertionsmutanten von *S. aureus***

Es wäre weiterhin interessant zu erfahren, welche weiteren Faktoren den Überlebensvorteil der weißen *rsbU::IS256* Insertionsmutanten von *S. aureus* SA137/93G im Vergleich zu den *rsbU*-positiven Insertionsmutanten dieses Stammes beeinflusst haben könnten. Diesbezüglich

wäre eine Untersuchung der gelben *rsbU*-positiven Insertionsmutanten von SA137/93G von Vorteil, die beispielsweise in Anwesenheit von 0,5 x MHK Chloramphenicol bei 43°C neben den weißen *rsbU::IS256* Insertionsmutanten überleben konnten. Die Aufklärung der IS256-Insertionsstellen beispielsweise durch rPCR, PCRs von SigB-abhängigen Genen wie *asp23* oder *crtN* bzw. eine weitere Genomsequenzierung wären hier hilfreich. Auch die Überlebensfähigkeit einer *rsbU*-positiven  $\Delta$ *asp23* bzw.  $\Delta$ *crtN* Mutante von SA137/93G in Anwesenheit von Chloramphenicol bei 43°C wäre interessant.

### **Beeinflussung der Persistenz von *S. aureus* durch IS256**

Auch die weitere Charakterisierung der SCVs von *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB* und *S. aureus* HG001 *hemY::IS256-spc* wäre zukünftig ein interessantes Thema. Sowohl die Überlebensfähigkeit beider Stämme in eukaryotischen Zellen als auch deren Potenzial persistierende *S. aureus*-Infektionen im Mausmodell auszulösen, könnten die Rolle von IS256 bei der Evolution der Antibiotikaresistenz von *S. aureus* weiter verdeutlichen. In diesem Zusammenhang könnte auch die Detektion der Mutationsraten beider Insertionsmutanten im Vergleich zu den jeweiligen phänotypischen Revertanten untersucht werden. Um den „cut-and-paste“ Transpositionsmechanismus von IS256 weiter zu untersuchen, sollten in den nächsten Experimenten die Insertionsstellen der rekombinanten IS256-Elemente in den selektierten Revertanten detektiert werden. Besonders interessant wäre die Charakterisierung der phänotypischen Revertanten von *S. aureus* HG001 *guaA::IS256-ermB*, die weiterhin die Insertion in *guaA* trugen. Welche Hintergrundmutationen waren in der Lage die Inaktivierung von *guaA* zu kompensieren und die Revertierung zum Wildtyp-Phänotyp auszulösen?

### **Regulation der Transposition durch Antisense-RNA**

In dieser Arbeit wurden mehrere Antisense-RNAs detektiert, die durch Hybridisierung mit dem 3' Ende der *tnpA*-mRNA von IS256 interagieren können und somit die Transpositionsfrequenz von IS256 inhibieren können. Zusätzlich detektierten Howden et al. (2013) eine Antisense-RNA von IS256, die zum 5' Ende der *tnpA*-mRNA komplementär ist. Beaume et al. (2010) detektierten zwei vergleichbare Antisense-RNAs für IS1181. Die letzteren Antisense-RNAs wurden mithilfe neuer RNA-Analyseverfahren (RNA-Seq) detektiert. Mithilfe von RNA-Seq könnte möglicherweise die SigB-Abhängigkeit der beiden Antisense-RNAs von IS256 und IS1181 bestätigt werden, wenn die Gesamtheit der RNAs von SA137/93G und SA137/93G wG12 verglichen werden würde. RNA-Seq würde ebenfalls die Längen der Antisense-RNAs ermitteln, die Rückschlüsse auf Sekundärstrukturen der Antisense-RNAs zulassen würden. Das Konstruieren einer *rnc*-Mutation in beiden Stämmen könnte durch Hemmung der RNaseIII-Aktivität die Detektion der Antisense-RNAs

vereinfachen. Ob die Anwesenheit der Antisense-RNAs zur Degradierung der *tnpA*-mRNA führt, kann mithilfe von qRT-PCR gezeigt werden. Hierfür müssten neben pA3-2sigBmut weitere pA3-2-Derivate konstruiert werden, die stille Mutationen in den Promotorregionen der einzelnen Antisense-RNAs von IS256 aufweisen. *S. aureus* HG001 pA3-2 würde folglich als Wildtyp-Stamm fungieren. Neben qRT-PCR könnten auch die Transpositionsfrequenzen in den Stämmen Aufschlüsse über den Einfluss der jeweiligen Antisense-RNA geben. Schlussendlich könnte mithilfe von *in vitro* Testsystemen gezeigt werden, inwiefern die Translation der jeweiligen Transposase von der Anwesenheit der verschiedenen Antisense-RNAs beeinflusst wird.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abranches, J., Martinez, A. R., Kajfasz, J. K., Chavez, V., Garsin, D. A. and Lemos, J. A., 2009. The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 191, 2248-56.
- Abu-Qatouseh, L. F., Chinni, S. V., Seggewiss, J., Proctor, R. A., Brosius, J., Rozhdestvensky, T. S., Peters, G., von Eiff, C. and Becker, K., 2010. Identification of differentially expressed small non-protein-coding RNAs in *Staphylococcus aureus* displaying both the normal and the small-colony variant phenotype. *J Mol Med (Berl)* 88, 565-75.
- Acar, J. F., Goldstein, F. W. and Lagrange, P., 1978. Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 8, 142-7.
- Aguado, J. M., San-Juan, R., Lalueza, A., Sanz, F., Rodriguez-Otero, J., Gomez-Gonzalez, C. and Chaves, F., 2011. High vancomycin MIC and complicated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerg Infect Dis* 17, 1099-102.
- Alper, S., Dufour, A., Garsin, D. A., Duncan, L. and Losick, R., 1996. Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 260, 165-77.
- Alper, S., Duncan, L. and Losick, R., 1994. An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *B. subtilis*. *Cell* 77, 195-205.
- Andersson, D. I. and Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8, 260-71.
- Andersson, D. I. and Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 12, 465-78.
- Andersson, D. I. and Levin, B. R., 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2, 489-93.
- Archer, G. L., Thanassi, J. A., Niemeyer, D. M. and Pucci, M. J., 1996. Characterization of IS1272, an insertion sequence-like element from *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 924-9.
- Arhin, F. F., Sarmiento, I. and Moeck, G., 2014. In vitro activities of oritavancin and comparators against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates harbouring the novel mecC gene. *Int J Antimicrob Agents* 44, 65-8.
- Arini, A., Keller, M. P. and Arber, W., 1997. An antisense RNA in IS30 regulates the translational expression of the transposase. *Biol Chem* 378, 1421-31.
- Atalla, H., Gyles, C., Jacob, C. L., Moisan, H., Malouin, F. and Mallard, B., 2008. Characterization of a *Staphylococcus aureus* small colony variant (SCV) associated with persistent bovine mastitis. *Foodborne Pathog Dis* 5, 785-99.
- Balwit, J. M., van Langevelde, P., Vann, J. M. and Proctor, R. A., 1994. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. *J Infect Dis* 170, 1033-7.
- Bayer, A. S., Schneider, T. and Sahl, H. G., 2013. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann N Y Acad Sci* 1277, 139-58.

- Beaber, J. W., Hochhut, B. and Waldor, M. K., 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427, 72-4.
- Beaume, M., Hernandez, D., Farinelli, L., Deluen, C., Linder, P., Gaspin, C., Romby, P., Schrenzel, J. and Francois, P., 2010. Cartography of methicillin-resistant *S. aureus* transcripts: detection, orientation and temporal expression during growth phase and stress conditions. *PLoS One* 5, e10725.
- Benson, A. K. and Haldenwang, W. G., 1993. The sigma B-dependent promoter of the *Bacillus subtilis sigB* operon is induced by heat shock. *J. Bacteriol.* 175, 1929-35.
- Benson, M. A., Ohneck, E. A., Ryan, C., Alonzo, F., 3rd, Smith, H., Narechania, A., Kolokotronis, S. O., Satola, S. W., Uhlemann, A. C., Sebra, R., Deikus, G., Shopsis, B., Planet, P. J. and Torres, V. J., 2014. Evolution of hypervirulence by a MRSA clone through acquisition of a transposable element. *Mol Microbiol* 93, 664-81.
- Berger-Bächi, B. and Kohler, M. L., 1983. A novel site on the chromosome of *Staphylococcus aureus* influencing the level of methicillin resistance: Genetic mapping. *FEMS Microbiology Letters.* 20, 305-309.
- Berger, B. and Haas, D., 2001. Transposase and cointegrase: specialized transposition proteins of the bacterial insertion sequence IS21 and related elements. *Cell Mol Life Sci* 58, 403-19.
- Berscheid, A., 2013. Characterization of *Staphylococcus aureus* VC40 reveals a major role of the VraS and WlkK histidine kinases in the development of vancomycin and daptomycin resistance.
- Berscheid, A., Francois, P., Strittmatter, A., Gottschalk, G., Schrenzel, J., Sass, P. and Bierbaum, G., 2014. Generation of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) strain by two amino acid exchanges in VraS. *J Antimicrob Chemother.*
- Bertani, G., 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293-300.
- Bertani, G., 2004. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* 186, 595-600.
- Besier, S., Ludwig, A., Zander, J., Brade, V. and Wichelhaus, T. A., 2008. Linezolid resistance in *Staphylococcus aureus*: gene dosage effect, stability, fitness costs, and cross-resistances. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1570-2.
- Bierbaum, G., Fuchs, K., Lenz, W., Szekat, C. and Sahl, H. G., 1999. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18, 691-6.
- Bischoff, M. and Berger-Bächi, B., 2001. Teicoplanin stress-selected mutations increasing sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1714-20.
- Bischoff, M., Dunman, P., Kormanec, J., Macapagal, D., Murphy, E., Mounts, W., Berger-Bächi, B. and Projan, S., 2004. Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* sigmaB regulon. *J. Bacteriol.* 186, 4085-99.
- Blickwede, M., Goethe, R., Wolz, C., Valentin-Weigand, P. and Schwarz, S., 2005. Molecular basis of florfenicol-induced increase in adherence of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *J Antimicrob Chemother* 56, 315-23.

- Blickwede, M., Valentin-Weigand, P., Rohde, M. and Schwarz, S., 2004. Effects of subinhibitory concentrations of florfenicol on morphology, growth, and viability of *Staphylococcus aureus*. J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health 51, 293-6.
- Bohn, C., Rigoulay, C. and Bouloc, P., 2007. No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol 7, 10.
- Borukhov, S. and Severinov, K., 2002. Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. Res Microbiol 153, 557-62.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B. and Bartlett, J., 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 48, 1-12.
- Boyle-Vavra, S., Challapalli, M. and Daum, R. S., 2003. Resistance to autolysis in vancomycin-selected *Staphylococcus aureus* isolates precedes vancomycin-intermediate resistance. Antimicrob Agents Chemother 47, 2036-9.
- Brandenberger, M., Tschierske, M., Giachino, P., Wada, A. and Berger-Bächi, B., 2000. Inactivation of a novel three-cistronic operon *tcaR-tcaA-tcaB* increases teicoplanin resistance in *Staphylococcus aureus*. Biochim Biophys Acta 1523, 135-9.
- Brantl, S., 2007. Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. Curr Opin Microbiol 10, 102-9.
- Brede, D. A., Snipen, L. G., Ussery, D. W., Nederbragt, A. J. and Nes, I. F., 2011. Complete genome sequence of the commensal *Enterococcus faecalis* 62, isolated from a healthy Norwegian infant. J Bacteriol 193, 2377-8.
- Brocklehurst, K. R. and Morby, A. P., 2000. Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology. Microbiology 146 ( Pt 9), 2277-82.
- Brückner, R., 1997. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. FEMS Microbiol. Lett. 151, 1-8.
- Brunet, F., Vedel, G., Dreyfus, F., Vaxelaire, J. F., Giraud, T., Schremmer, B. and Monsallier, J. F., 1990. Failure of teicoplanin therapy in two neutropenic patients with staphylococcal septicemia who recovered after administration of vancomycin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 9, 145-7.
- Byrne, M. E., Gillespie, M. T. and Skurray, R. A., 1991. 4',4" adenylyltransferase activity on conjugative plasmids isolated from *Staphylococcus aureus* is encoded on an integrated copy of pUB110. Plasmid 25, 70-5.
- Byrne, M. E., Rouch, D. A. and Skurray, R. A., 1989. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. Gene 81, 361-7.
- Camargo, I. L., Neoh, H. M., Cui, L. and Hiramatsu, K., 2008. Serial daptomycin selection generates daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* strains with a heterogeneous vancomycin-intermediate phenotype. Antimicrob Agents Chemother 52, 4289-99.
- Carlet, J., Jarlier, V., Harbarth, S., Voss, A., Goossens, H., Pittet, D. and Participants of the 3rd World Healthcare-Associated Infections, F., 2012. Ready for a world without antibiotics? The Pensieres Antibiotic Resistance Call to Action. Antimicrob Resist Infect Control 1, 11.

- Case, C. C., Roels, S. M., Gonzalez, J. E., Simons, E. L. and Simons, R. W., 1988. Analysis of the promoters and transcripts involved in IS10 anti-sense RNA control. *Gene* 72, 219-36.
- Case, C. C., Roels, S. M., Jensen, P. D., Lee, J., Kleckner, N. and 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, 4297-305.
- Centers for Disease, C. and Prevention, 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51, 565-7.
- Chabelskaya, S., Gaillot, O. and Felden, B., 2010. A *Staphylococcus aureus* small RNA is required for bacterial virulence and regulates the expression of an immune-evasion molecule. *PLoS Pathog* 6, e1000927.
- Chambers, H. F. and Deleo, F. R., 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7, 629-41.
- Chan, P. F., Foster, S. J., Ingham, E. and 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, 6082-9.
- Chandler, M., Roulet, E., Silver, L., Boy de la Tour, E. and Caro, L., 1979. Tn10 mediated integration of the plasmid R100.1 into the bacterial chromosome: inverse transposition. *Mol Gen Genet* 173, 23-30.
- Chen, F. J., Lauderdale, T. L., Wang, L. S. and Huang, I. W., 2013. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Z172, a Vancomycin-Intermediate and Daptomycin-Nonsusceptible Methicillin-Resistant Strain Isolated in Taiwan. *Genome Announc* 1.
- Chen, H. Y., Chen, C. C., Fang, C. S., Hsieh, Y. T., Lin, M. H. and Shu, J. C., 2011. Vancomycin activates sigma(B) in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* resulting in the enhancement of cytotoxicity. *PLoS One* 6, e24472.
- Cheung, A. L., Koomey, J. M., Butler, C. A., Projan, S. J. and Fischetti, V. A., 1992. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from agr. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6462-6.
- Chung, Y. S. and Dubnau, D., 1998. All seven comG open reading frames are required for DNA binding during transformation of competent *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180, 41-5.
- Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K. P., Peschel, A. and Götz, F., 2006. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun* 74, 4950-3.
- Cohen, S. N., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature* 263, 731-8.
- Conlon, K. M., Humphreys, H. and 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, 6208-19.
- Cookson, B. D., Robinson, D. A., Monk, A. B., Murchan, S., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M. J., Scheel, C., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P. T., Legakis, N. J., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Garaizar, J., Haeggman, S., Olsson-Liljequist, B., Ransjö, U., Müller-Premru, M., Hryniewicz, W., Rossney, A., O'Connell, B., Short, B. D., Thomas, J.,

- O'Hanlon, S. and Enright, M. C., 2007. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol* 45, 1830-7.
- Coombs, G. W., Nimmo, G. R., Bell, J. M., Huygens, F., O'Brien, F. G., Malkowski, M. J., Pearson, J. C., Stephens, A. J., Giffard, P. M. and Australian Group for Antimicrobial, R., 2004. Genetic diversity among community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing outpatient infections in Australia. *J Clin Microbiol* 42, 4735-43.
- Corrigan, R. M., Miajlovic, H. and Foster, T. J., 2009. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol* 9, 22.
- Couto, I., de Lencastre, H., Severina, E., Kloos, W., Webster, J. A., Hubner, R. J., Sanches, I. S. and Tomasz, A., 1996. Ubiquitous presence of a *mecA* homologue in natural isolates of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist* 2, 377-91.
- Couto, I., Wu, S. W., Tomasz, A. and de Lencastre, H., 2003. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to s. *J Bacteriol* 185, 645-53.
- Craig, N. L., 1991. Tn7: a target site-specific transposon. *Mol Microbiol* 5, 2569-73.
- Cui, L., Ma, X., Sato, K., Okuma, K., Tenover, F. C., Mamizuka, E. M., Gemmell, C. G., Kim, M. N., Ploy, M. C., El-Solh, N., Ferraz, V. and Hiramatsu, K., 2003. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 41, 5-14.
- Cui, L., Murakami, H., Kuwahara-Arai, K., Hanaki, H. and 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, 2276-85.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N. and Wright, G. D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457-61.
- Darmon, E. and Leach, D. R., 2014. Bacterial genome instability. *Microbiol Mol Biol Rev* 78, 1-39.
- DeLeo, F. R., Kennedy, A. D., Chen, L., Bubeck Wardenburg, J., Kobayashi, S. D., Mathema, B., Braughton, K. R., Whitney, A. R., Villaruz, A. E., Martens, C. A., Porcella, S. F., McGavin, M. J., Otto, M., Musser, J. M. and Kreiswirth, B. N., 2011. Molecular differentiation of historic phage-type 80/81 and contemporary epidemic *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 18091-6.
- DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N. and Chambers, H. F., 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 375, 1557-68.
- Deora, R. and Misra, T. K., 1996. Characterization of the primary sigma factor of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 271, 21828-34.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E. and Courvalin, P., 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* 20, 79-114.
- Depke, M., Burian, M., Schafer, T., Broker, B. M., Ohlsen, K. and Volker, U., 2012. The alternative sigma factor B modulates virulence gene expression in a murine *Staphylococcus aureus* infection model but does not influence kidney gene expression pattern of the host. *Int J Med Microbiol* 302, 33-9.

- Derbyshire, K. M. and Grindley, N. D., 1996. Cis preference of the IS903 transposase is mediated by a combination of transposase instability and inefficient translation. *Mol Microbiol* 21, 1261-72.
- Diaz, L., Kiratisin, P., Mendes, R. E., Panesso, D., Singh, K. V. and Arias, C. A., 2012. Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfr* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3917-22.
- Donegan, N. P. and Cheung, A. L., 2009. Regulation of the *mazEF* toxin-antitoxin module in *Staphylococcus aureus* and its impact on *sigB* expression. *J. Bacteriol.* 191, 2795-805.
- Dordel, J., Kim, C., Chung, M., Pardos de la Gandara, M., Holden, M. T., Parkhill, J., de Lencastre, H., Bentley, S. D. and Tomasz, A., 2014. Novel determinants of antibiotic resistance: identification of mutated loci in highly methicillin-resistant subpopulations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *MBio* 5, e01000.
- Doss, S. A., Tillotson, G. S. and Amyes, S. G., 1993. Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on the virulence of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol* 75, 123-8.
- Doucet-Populaire, F., Trieu-Cuot, P., Dosbaa, I., Andremont, A. and Courvalin, P., 1991. Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 185-7.
- Drevinek, P., Baldwin, A., Lindenburg, L., Joshi, L. T., Marchbank, A., Vosahlikova, S., Dowson, C. G. and Mahenthiralingam, E., 2010. Oxidative stress of *Burkholderia cenocepacia* induces insertion sequence-mediated genomic rearrangements that interfere with macrorestriction-based genotyping. *J Clin Microbiol* 48, 34-40.
- Drew, R. H., Perfect, J. R., Srinath, L., Kurkimilis, E., Dowzicky, M. and Talbot, G. H., 2000. Treatment of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* infections with quinupristin-dalfopristin in patients intolerant of or failing prior therapy. For the Synercid Emergency-Use Study Group. *J Antimicrob Chemother* 46, 775-84.
- Duval-Valentin, G., Marty-Cointin, B. and Chandler, M., 2004. Requirement of IS911 replication before integration defines a new bacterial transposition pathway. *EMBO J* 23, 3897-906.
- Duval-Valentin, G., Normand, C., Khemici, V., Marty, B. and Chandler, M., 2001. Transient promoter formation: a new feedback mechanism for regulation of IS911 transposition. *EMBO J* 20, 5802-11.
- Dyke, K. G., Aubert, S. and el Solh, N., 1992. Multiple copies of IS256 in staphylococci. *Plasmid* 28, 235-46.
- Edwards, A. M., 2012. Phenotype switching is a natural consequence of *Staphylococcus aureus* replication. *J Bacteriol* 194, 5404-12.
- Eichenbaum, Z. and Livneh, Z., 1998. UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. *Genetics* 149, 1173-81.
- Eisen, J. A., Benito, M. I. and 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, 2634-6.
- EMA, E., 2009. Joint Technical Report. The bacterial challenge: time to react. .
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. and Spratt, B. G., 2002. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7687-92.

- Felden, B., Vandenesch, F., Boulloc, P. and Romby, P., 2011. The *Staphylococcus aureus* RNome and its commitment to virulence. *PLoS Pathog* 7, e1002006.
- Fischer, A., Yang, S. J., Bayer, A. S., Vaezzadeh, A. R., Herzig, S., Stenz, L., Girard, M., Sakoulas, G., Scherl, A., Yeaman, M. R., Proctor, R. A., Schrenzel, J. and Francois, P., 2011. Daptomycin resistance mechanisms in clinically derived *Staphylococcus aureus* strains assessed by a combined transcriptomics and proteomics approach. *J Antimicrob Chemother* 66, 1696-711.
- Fitzgerald, J. R., Monday, S. R., Foster, T. J., Bohach, G. A., Hartigan, P. J., Meaney, W. J. and Smyth, C. J., 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol* 183, 63-70.
- Fleury, B., Kelley, W. L., Lew, D., Götz, F., Proctor, R. A. and Vaudaux, P., 2009. Transcriptomic and metabolic responses of *Staphylococcus aureus* exposed to supra-physiological temperatures. *BMC Microbiol.* 9, 76.
- Fluit, A. C., 2012. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 18, 735-44.
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K. and Hook, M., 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol* 12, 49-62.
- Fournier, B. and Hooper, D. C., 2000. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182, 3955-64.
- Fu, Z., Donegan, N. P., Memmi, G. and Cheung, A. L., 2007. Characterization of MazFSa, an endoribonuclease from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 189, 8871-9.
- Fuchs, S., Pané-Farré, J., Kohler, C., Hecker, M. and Engelmann, S., 2007. Anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189, 4275-89.
- Fujimoto, S. and Ike, Y., 2001. pAM401-based shuttle vectors that enable overexpression of promoterless genes and one-step purification of tag fusion proteins directly from *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1262-7.
- Galas, D. J., Calos, M. P. and Miller, J. H., 1980. Sequence analysis of Tn9 insertions in the lacZ gene. *J Mol Biol* 144, 19-41.
- Gao, W., Chua, K., Davies, J. K., Newton, H. J., Seemann, T., Harrison, P. F., Holmes, N. E., Rhee, H. W., Hong, J. I., Hartland, E. L., Stinear, T. P. and Howden, B. P., 2010. Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS Pathog* 6, e1000944.
- Garcia, L. G., Lemaire, S., Kahl, B. C., Becker, K., Proctor, R. A., Denis, O., Tulkens, P. M. and Van Bambeke, F., 2012. Pharmacodynamic evaluation of the activity of antibiotics against hemin- and menadione-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in models of extracellular (broth) and intracellular (THP-1 monocytes) infections. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 3700-11.
- Gardete, S., Wu, S. W., Gill, S. and Tomasz, A., 2006. Role of VraSR in antibiotic resistance and antibiotic-induced stress response in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3424-34.

- Geiger, T., Kastle, B., Gratani, F. L., Goerke, C. and Wolz, C., 2014. Two small (p)ppGpp synthases in *Staphylococcus aureus* mediate tolerance against cell envelope stress conditions. *J Bacteriol* 196, 894-902.
- Geisinger, E., Adhikari, R. P., Jin, R., Ross, H. F. and Novick, R. P., 2006. Inhibition of rot translation by RNAIII, a key feature of agr function. *Mol Microbiol* 61, 1038-48.
- Georg, J. and Hess, W. R., 2011. cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 286-300.
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ohlsen, K., Hacker, J. and Hecker, M., 1999. Regulation of sigmaB-dependent transcription of *sigB* and *asp23* in two different *Staphylococcus aureus* strains. *Mol Gen Genet* 261, 558-66.
- Gertz, S., Engelmann, S., Schmid, R., Ziebandt, A. K., Tischer, K., Scharf, C., Hacker, J. and Hecker, M., 2000. Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182, 6983-91.
- Giachino, P., Engelmann, S. and Bischoff, M., 2001. Sigma(B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 183, 1843-52.
- Giesbrecht, P. and Ruska, H., 1968. Chloramphenicol induces changes in the ultrastructure of bacteria. *Klin. Wochenschr.* 46, 575-82.
- Gill, S. R., Fouts, D. E., Archer, G. L., Mongodin, E. F., Deboy, R. T., Ravel, J., Paulsen, I. T., Kolonay, J. F., Brinkac, L., Beanan, M., Dodson, R. J., Daugherty, S. C., Madupu, R., Angiuoli, S. V., Durkin, A. S., Haft, D. H., Vamathevan, J., Khouri, H., Utterback, T., Lee, C., Dimitrov, G., Jiang, L., Qin, H., Weidman, J., Tran, K., Kang, K., Hance, I. R., Nelson, K. E. and Fraser, C. M., 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 187, 2426-38.
- Gillespie, M. T., Lyon, B. R., Messerotti, L. J. and Skurray, R. A., 1987. Chromosome- and plasmid-mediated gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus* encoded by Tn4001. *J Med Microbiol* 24, 139-44.
- Goerke, C., Koller, J. and Wolz, C., 2006. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 171-7.
- Gordon, R. J. and Lowy, F. D., 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 46 Suppl 5, S350-9.
- Gottesman, S. and Storz, G., 2011. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Gould, I. M., David, M. Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T. and Peters, G., 2012. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 39, 96-104.
- Gu, B., Kelesidis, T., Tsiodras, S., Hindler, J. and Humphries, R. M., 2013. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother* 68, 4-11.
- Gu, J., Li, H., Li, M., Vuong, C., Otto, M., Wen, Y. and 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, 342-8.

- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilback, C., Sandegren, L., Hughes, D. and Andersson, D. I., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog* 7, e1002158.
- Gutierrez, A., Laureti, L., Crussard, S., Abida, H., Rodriguez-Rojas, A., Blazquez, J., Baharoglu, Z., Mazel, D., Darfeuille, F., Vogel, J. and Matic, I., 2013. beta-lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nat Commun* 4, 1610.
- Hancock, R. and Park, J. T., 1958. Cell-wall synthesis by *Staphylococcus aureus* in the presence of chloramphenicol. *Nature* 181, 1050-2.
- Hansson, M. and Hederstedt, L., 1994. *Bacillus subtilis* HemY is a peripheral membrane protein essential for protoheme IX synthesis which can oxidize coproporphyrinogen III and protoporphyrinogen IX. *J Bacteriol* 176, 5962-70.
- Hardwick, S. W., Pané-Farré, J., Delumeau, O., Marles-Wright, J., Murray, J. W., Hecker, M. and Lewis, R. J., 2007. Structural and functional characterization of partner switching regulating the environmental stress response in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 282, 11562-72.
- Haren, L., Ton-Hoang, B. and Chandler, M., 1999. Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. *Annu Rev Microbiol* 53, 245-81.
- Harris, S. R., Feil, E. J., Holden, M. T., Quail, M. A., Nickerson, E. K., Chantratita, N., Gardete, S., Tavares, A., Day, N., Lindsay, J. A., Edgeworth, J. D., de Lencastre, H., Parkhill, J., Peacock, S. J. and Bentley, S. D., 2010. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* 327, 469-74.
- Hash, J. H. and Davies, M. C., 1962. Electron Microscopy of *Staphylococcus aureus* Treated with Tetracycline. *Science* 138, 828-9.
- Hash, J. H., Wishnick, M. and Miller, P. A., 1964. On the Mode of Action of the Tetracycline Antibiotics in *Staphylococcus Aureus*. *J Biol Chem* 239, 2070-8.
- He, T., Wang, Y., Schwarz, S., Zhao, Q., Shen, J. and Wu, C., 2014. Genetic environment of the multi-resistance gene *cftr* in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens, ducks, and pigs in China. *Int J Med Microbiol* 304, 257-61.
- He, Y., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., Papadopoulos, N. and Kinzler, K. W., 2008. The antisense transcriptomes of human cells. *Science* 322, 1855-7.
- Hecker, M. and Völker, U., 2001. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* 44, 35-91.
- Hennig, S. and Ziebuhr, W., 2008. A transposase-independent mechanism gives rise to precise excision of IS256 from insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 190, 1488-90.
- Hennig, S. and Ziebuhr, W., 2010. Characterization of the transposase encoded by IS256, the prototype of a major family of bacterial insertion sequence elements. *J. Bacteriol.* 192, 4153-63.
- Herbert, S., Ziebandt, A. K., Ohlsen, K., Schäfer, T., Hecker, M., Albrecht, D., Novick, R. and Götz, F., 2010. Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect. Immun.* 78, 2877-89.
- Hessling, B., Bonn, F., Otto, A., Herbst, F. A., Rappen, G. M., Bernhardt, J., Hecker, M. and Becher, D., 2013. Global proteome analysis of vancomycin stress in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 303, 624-34.

- Higgins, D. L., Chang, R., Debabov, D. V., Leung, J., Wu, T., Krause, K. M., Sandvik, E., Hubbard, J. M., Kaniga, K., Schmidt, D. E., Jr., Gao, Q., Cass, R. T., Karr, D. E., Benton, B. M. and Humphrey, P. P., 2005. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 1127-34.
- Hiramatsu, K., 2001. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 1, 147-55.
- Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y. and Kobayashi, I., 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350, 1670-3.
- Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y. and Kobayashi, I., 1997a. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350, 1670-3.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T. and Tenover, F. C., 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40, 135-6.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T. and Tenover, F. C., 1997b. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40, 135-6.
- Holden, M. T., Lindsay, J. A., Corton, C., Quail, M. A., Cockfield, J. D., Pathak, S., Batra, R., Parkhill, J., Bentley, S. D. and Edgeworth, J. D., 2010. Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic- and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, sequence type 239 (TW). *J. Bacteriol.* 192, 888-92.
- Holmes, N. E., Turnidge, J. D., Munckhof, W. J., Robinson, J. O., Korman, T. M., O'Sullivan, M. V., Anderson, T. L., Roberts, S. A., Gao, W., Christiansen, K. J., Coombs, G. W., Johnson, P. D. and Howden, B. P., 2011. Antibiotic choice may not explain poorer outcomes in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and high vancomycin minimum inhibitory concentrations. *J Infect Dis* 204, 340-7.
- Homerova, D., Bischoff, M., Dumolin, A. and Kormanec, J., 2004. Optimization of a two-plasmid system for the identification of promoters recognized by RNA polymerase containing *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor sigmaB. *FEMS Microbiol. Lett.* 232, 173-9.
- Horsburgh, M. J., Aish, J. L., White, I. J., Shaw, L., Lithgow, J. K. and Foster, S. J., 2002. sigmaB modulates virulence determinant expression and stress resistance: characterization of a functional rsbU strain derived from *Staphylococcus aureus* 8325-4. *J Bacteriol* 184, 5457-67.
- Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M. and O'Gara, J. P., 2011. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun* 79, 1153-65.
- Howden, B. P., Beaume, M., Harrison, P. F., Hernandez, D., Schrenzel, J., Seemann, T., Francois, P. and Stinear, T. P., 2013. Analysis of the small RNA transcriptional response in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* after antimicrobial exposure. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 3864-74.

- Howden, B. P., McEvoy, C. R., Allen, D. L., Chua, K., Gao, W., Harrison, P. F., Bell, J., Coombs, G., Bennett-Wood, V., Porter, J. L., Robins-Browne, R., Davies, J. K., Seemann, T. and Stinear, T. P., 2011. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR. PLoS Pathog 7, e1002359.
- Howden, B. P., Seemann, T., Harrison, P. F., McEvoy, C. R., Stanton, J. A., Rand, C. J., Mason, C. W., Jensen, S. O., Firth, N., Davies, J. K., Johnson, P. D. and Stinear, T. P., 2010. Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain JKD6008, an ST239 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate-level vancomycin resistance. J. Bacteriol. 192, 5848-9.
- Huang, C. Z., Feng, P., Li, Y. F. and Tan, K. J., 2005. Pharmacokinetic detection of penicillin excreted in urine using a totally internally reflected resonance light scattering technique with cetyltrimethylammonium bromide. Anal Bioanal Chem 382, 85-90.
- Iandolo, J. J., Worrell, V., Groicher, K. H., Qian, Y., Tian, R., Kenton, S., Dorman, A., Ji, H., Lin, S., Loh, P., Qi, S., Zhu, H. and Roe, B. A., 2002. Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. Gene 289, 109-18.
- Ilves, H., Horak, R. and Kivisaar, M., 2001. Involvement of sigma(S) in starvation-induced transposition of *Pseudomonas putida* transposon Tn4652. J Bacteriol 183, 5445-8.
- Jansen, A., Szekat, C., Schroder, W., Wolz, C., Goerke, C., Lee, J. C., Turck, M. and Bierbaum, G., 2013. Production of capsular polysaccharide does not influence *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility. BMC Microbiol 13, 65.
- Jansen, A., Türck, M., Szekat, C., Nagel, M., Clever, I. and 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, 205-15.
- Jevons, M., 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J 1, 124-5.
- Jevons, M. P., 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J 1, 124-125.
- Ji, Y., Zhang, B., Van, S. F., Horn, Warren, P., Woodnutt, G., Burnham, M. K. and Rosenberg, M., 2001. Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. Science 293, 2266-9.
- Johnson, P. J. and Levin, B. R., 2013. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus*. PLoS Genet 9, e1003123.
- Jonsson, I. M., Arvidson, S., Foster, S. and Tarkowski, A., 2004. Sigma factor B and RsbU are required for virulence in *Staphylococcus aureus*-induced arthritis and sepsis. Infect Immun 72, 6106-11.
- Josten, M., Reif, M., Szekat, C., Al-Sabti, N., Roemer, T., Sparbier, K., Kostrzewa, M., Rohde, H., Sahl, H. G. and Bierbaum, G., 2013. Analysis of the MALDI-TOF mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations which allow differentiation of the main clonal lineages. J. Clin. Microbiol.
- Josten, M., Reif, M., Szekat, C., Al-Sabti, N., Roemer, T., Sparbier, K., Kostrzewa, M., Rohde, H., Sahl, H. G. and Bierbaum, G., 2013. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. J Clin Microbiol 51, 1809-17.

- Jousselin, A., Renzoni, A., Andrey, D. O., Monod, A., Lew, D. P. and Kelley, W. L., 2012. The posttranslocational chaperone lipoprotein PrsA is involved in both glycopeptide and oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 3629-40.
- Junecko, J. Z., AK; Mrak, LN; Ryan, DC; Graham, JW; Smeltzer, MS; Lee, CY, 2012. Transcribing virulence in *Staphylococcus aureus*. *World J Clin Infect Dis* 2, 63-76.
- Kaatz, G. W., Seo, S. M., Dorman, N. J. and Lerner, S. A., 1990. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis. *J Infect Dis* 162, 103-8.
- Kahl, B., Herrmann, M., Everding, A. S., Koch, H. G., Becker, K., Harms, E., Proctor, R. A. and Peters, G., 1998. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 177, 1023-9.
- Kahl, B. C., 2014. Small colony variants (SCVs) of *Staphylococcus aureus*--a bacterial survival strategy. *Infect Genet Evol* 21, 515-22.
- Kang, C. M., Vijay, K. and Price, C. W., 1998. Serine kinase activity of a *Bacillus subtilis* switch protein is required to transduce environmental stress signals but not to activate its target PP2C phosphatase. *Mol Microbiol* 30, 189-96.
- Karatzas, K. A., Zervos, A., Tassou, C. C., Mallidis, C. G. and Humphrey, T. J., 2007. Piezotolerant small-colony variants with increased thermotolerance, antibiotic susceptibility, and low invasiveness in a clonal *Staphylococcus aureus* population. *Appl Environ Microbiol* 73, 1873-81.
- Karlsson-Kanth, A., Tegmark-Wisell, K., Arvidson, S. and Oscarsson, J., 2006. Natural human isolates of *Staphylococcus aureus* selected for high production of proteases and alpha-hemolysin are sigmaB deficient. *Int J Med Microbiol* 296, 229-36.
- Kehrenberg, C., Aarestrup, F. M. and Schwarz, S., 2007. IS21-558 insertion sequences are involved in the mobility of the multiresistance gene cfr. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 483-7.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., Jacobsen, L., Hansen, L. H. and Vester, B., 2005. A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Mol Microbiol* 57, 1064-73.
- Keller, J. A. and Simon, L. D., 1987. Isolation and analysis of *Escherichia coli* mutants that allow increased replication of bacteriophage lambda. *J Bacteriol* 169, 1585-92.
- Kelley, W. L., 2006. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Mol Microbiol* 62, 1228-38.
- Kharat, A. S., Coursange, E., Noirclerc-Savoye, M., Lacoste, J. and Blot, M., 2006. IS1 transposition is enhanced by translation errors and by bacterial growth at extreme glucose levels. *Acta Biochim Pol* 53, 729-38.
- 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. and 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, 779-82.
- Kirby, W. M., 1944. Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant *Staphylococci*. *Science* 99, 452-3.
- Kiss, J. and Olsasz, F., 1999. Formation and transposition of the covalently closed IS30 circle: the relation between tandem dimers and monomeric circles. *Mol Microbiol* 34, 37-52.

- Kloss, P., Xiong, L., Shinabarger, D. L. and Mankin, A. S., 1999. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol Biol* 294, 93-101.
- Kluytmans, J., van Belkum, A. and Verbrugh, H., 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10, 505-20.
- Knobloch, J. K., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H. H. and Mack, D., 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol* 183, 2624-33.
- Kobayashi, N., Urasawa, S., Uehara, N. and Watanabe, N., 1999. Distribution of insertion sequence-like element IS1272 and its position relative to methicillin resistance genes in clinically important Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2780-2.
- 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., Witte, W. and Friedrich, A. W., 2014. Systematic literature analysis and review of targeted preventive measures to limit healthcare-associated infections by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Euro Surveill* 19.
- Kohanski, M. A., DePristo, M. A. and Collins, J. J., 2010. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 37, 311-20.
- Kozitskaya, S., Cho, S. H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K. and 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, 1210-1215.
- Krebs, M. P. and Reznikoff, W. S., 1986. Transcriptional and translational initiation sites of IS50. Control of transposase and inhibitor expression. *J Mol Biol* 192, 781-91.
- Kreiswirth, B. N., Lofdahl, S., Betley, M. J., O'Reilly, M., Schlievert, P. M., Bergdoll, M. S. and Novick, R. P., 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature* 305, 709-12.
- Kropinski, A. M., Kovalyova, I. V., Billington, S. J., Patrick, A. N., Butts, B. D., Guichard, J. A., Pitcher, T. J., Guthrie, C. C., Sydlaske, A. D., Barnhill, L. M., Havens, K. A., Day, K. R., Falk, D. R. and McConnell, M. R., 2007. The genome of epsilon15, a serotype-converting, Group E1 *Salmonella enterica*-specific bacteriophage. *Virology* 369, 234-44.
- Kullik, I., Giachino, P. and 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, 4814-20.
- Kullik, I., Jenni, R. and Berger-Bächi, B., 1998. Sequence of the putative alanine racemase operon in *Staphylococcus aureus*: insertional interruption of this operon reduces D-alanine substitution of lipoteichoic acid and autolysis. *Gene* 219, 9-17.
- Kullik, I. I. and Giachino, P., 1997. The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus*: regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock. *Arch. Microbiol.* 167, 151-9.

- Kuroda, H., Kuroda, M., Cui, L. and Hiramatsu, K., 2007. Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system. *FEMS Microbiol Lett* 268, 98-105.
- Kuroda, M., Kuroda, H., Oshima, T., Takeuchi, F., Mori, H. and Hiramatsu, K., 2003. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 49, 807-21.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. and Hiramatsu, K., 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357, 1225-40.
- 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* 55, 3714-9.
- Lasa, I., Toledo-Arana, A., Dobin, A., Villanueva, M., de los Mozos, I. R., Vergara-Irigaray, M., Segura, V., Fagegaltier, D., Penades, J. R., Valle, J., Solano, C. and Gingeras, T. R., 2011. Genome-wide antisense transcription drives mRNA processing in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20172-7.
- Lasa, I., Toledo-Arana, A. and Gingeras, T. R., 2012. An effort to make sense of antisense transcription in bacteria. *RNA Biol* 9, 1039-44.
- Lauderdale, K. J., Boles, B. R., Cheung, A. L. and Horswill, A. R., 2009. Interconnections between Sigma B, *agr*, and proteolytic activity in *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *Infect. Immun.* 77, 1623-35.
- Layer, F., Cuny, C., Strommenger, B., Werner, G. and Witte, W., 2012. [Current data and trends on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 55, 1377-86.
- Lechner, S., Lewis, K. and Bertram, R., 2012. *Staphylococcus aureus* persists tolerant to bactericidal antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol* 22, 235-44.
- Lei, M. G., Cue, D., Roux, C. M., Dunman, P. M. and Lee, C. Y., 2011. Rsp inhibits attachment and biofilm formation by repressing *fnbA* in *Staphylococcus aureus* MW2. *J Bacteriol* 193, 5231-41.
- Lemaire, S., Kosowska-Shick, K., Appelbaum, P. C., Verween, G., Tulkens, P. M. and Van Bambeke, F., 2010. Cellular pharmacodynamics of the novel biaryloxazolidinone radezolid: studies with infected phagocytic and nonphagocytic cells, using *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, and *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 2549-59.
- Leonard, C. and Mahillon, J., 1998. IS231A transposition: conservative versus replicative pathway. *Res Microbiol* 149, 549-55.
- Lewis, L. A., Astatke, M., Umekubo, P. T., Alvi, S., Saby, R., Afrose, J., Oliveira, P. H., Monteiro, G. A. and Prazeres, D. M., 2012. Protein-DNA interactions define the mechanistic aspects of circle formation and insertion reactions in IS2 transposition. *Mob DNA* 3, 1.
- Lewis, L. A., Li, K., Bharosay, M., Cannella, M., Jorgenson, V., Thomas, R., Pena, D., Velez, M., Pereira, B. and Sassine, A., 1990. Characterization of gentamicin-resistant

- respiratory-deficient (res-) variant strains of *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol 34, 587-605.
- Li, D., Renzoni, A., Estoppey, T., Bisognano, C., Francois, P., Kelley, W. L., Lew, D. P., Schrenzel, J. and Vaudaux, P., 2005. Induction of fibronectin adhesins in quinolone-resistant *Staphylococcus aureus* by subinhibitory levels of ciprofloxacin or by *sigma B* transcription factor activity is mediated by two separate pathways. Antimicrob Agents Chemother 49, 916-24.
- Li, M., Cheung, G. Y., Hu, J., Wang, D., Joo, H. S., Deleo, F. R. and Otto, M., 2010. Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J Infect Dis 202, 1866-76.
- Li, Y., Cao, B., Zhang, Y., Zhou, J., Yang, B. and Wang, L., 2011. Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* T0131, an ST239-MRSA-SCCmec type III clone isolated in China. J. Bacteriol. 193, 3411-2.
- Lim, Y., Jana, M., Luong, T. T. and Lee, C. Y., 2004. Control of glucose- and NaCl-induced biofilm formation by rbf in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 186, 722-9.
- Lin, G., Ednie, L. M. and Appelbaum, P. C., 2010. Antistaphylococcal activity of ACHN-490 tested alone and in combination with other agents by time-kill assay. Antimicrob Agents Chemother 54, 2258-61.
- Lindsay, J. A. and Holden, M. T., 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Trends Microbiol 12, 378-85.
- Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S. E., Daum, R. S., Fridkin, S. K., Gorwitz, R. J., Kaplan, S. L., Karchmer, A. W., Levine, D. P., Murray, B. E., M, J. R., Talan, D. A. and Chambers, H. F., 2011. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. Clin Infect Dis 52, 285-92.
- Liu, C. and Chambers, H. F., 2003. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob Agents Chemother 47, 3040-5.
- Liu, Y., Wang, Y., Schwarz, S., Li, Y., Shen, Z., Zhang, Q., Wu, C. and Shen, J., 2013. Transferable multiresistance plasmids carrying cfr in *Enterococcus* spp. from swine and farm environment. Antimicrob Agents Chemother 57, 42-8.
- Liu, Y., Wu, N., Dong, J., Gao, Y., Zhang, X., Mu, C., Shao, N. and Yang, G., 2010. Hfq is a global regulator that controls the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. PLoS One 5.
- Liu, Y. C., Huang, W. K., Huang, T. S. and Kunin, C. M., 1999. Detection of antimicrobial activity in urine for epidemiologic studies of antibiotic use. J Clin Epidemiol 52, 539-45.
- Locke, J. B., Finn, J., Hilgers, M., Morales, G., Rahawi, S., G, C. K., Picazo, J. J., Im, W., Shaw, K. J. and Stein, J. L., 2010. Structure-activity relationships of diverse oxazolidinones for linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* strains possessing the cfr methyltransferase gene or ribosomal mutations. Antimicrob Agents Chemother 54, 5337-43.

- Locke, J. B., Hilgers, M. and Shaw, K. J., 2009. Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and torezolid (TR-700). *Antimicrob Agents Chemother* 53, 5265-74.
- Locke, J. B., Rahawi, S., Lamarre, J., Mankin, A. S. and Shaw, K. J., 2012. Genetic environment and stability of cfr in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CM05. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 332-40.
- Locke, J. B., Zurenko, G. E., Shaw, K. J. and Bartizal, K., 2014. Tedizolid for the management of human infections: in vitro characteristics. *Clin Infect Dis* 58 Suppl 1, S35-42.
- Lodise, T. P. and Low, D. E., 2012. Ceftaroline fosamil in the treatment of community-acquired bacterial pneumonia and acute bacterial skin and skin structure infections. *Drugs* 72, 1473-93.
- Loessner, I., Dietrich, K., Dittrich, D., Hacker, J. and Ziebuhr, W., 2002. Transposase-Dependent Formation of Circular IS256 Derivatives in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 184, 4709-4714.
- Long, K. S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwarz, S. and Vester, B., 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2500-5.
- Lopez, E., Elez, M., Matic, I. and Blazquez, J., 2007. Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 64, 83-93.
- Lorian, V., 1975. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. *Bull N Y Acad Med* 51, 1046-55.
- Luong, T. T., Newell, S. W. and Lee, C. Y., 2003. Mgr, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 185, 3703-10.
- Lyon, B. R., Gillespie, M. T. and Skurray, R. A., 1987. Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 3031-8.
- Lyon, B. R., May, J. W. and Skurray, R. A., 1984. Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet* 193, 554-6.
- Ma, C. and Simons, R. W., 1990. The IS10 antisense RNA blocks ribosome binding at the transposase translation initiation site. *EMBO J* 9, 1267-74.
- Mabe, S. and Champney, W. S., 2005. A comparison of a new oral streptogramin XRP 2868 with quinupristin-dalfopristin against antibiotic-resistant strains of haemophilus influenzae, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Microbiol* 51, 363-6.
- Mahillon, J. and Chandler, M., 1998. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 725-74.
- Maiques, E., Ubeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R. P., Barbe, J. and Penades, J. R., 2006. beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188, 2726-9.
- Majerczyk, C. D., Sadykov, M. R., Luong, T. T., Lee, C., Somerville, G. A. and Sonenshein, A. L., 2008. *Staphylococcus aureus* CodY negatively regulates virulence gene expression. *J Bacteriol* 190, 2257-65.

- Maki, H., McCallum, N., Bischoff, M., Wada, A. and Berger-Bächi, B., 2004. *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1953-9.
- Maki, H. and Murakami, K., 1997. Formation of potent hybrid promoters of the mutant *llm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179, 6944-8.
- Malabarba, A. and Goldstein, B. P., 2005. Origin, structure, and activity in vitro and in vivo of dalbavancin. *J Antimicrob Chemother* 55 Suppl 2, ii15-20.
- Mandelstam, J. and Rogers, H. J., 1958. Chloramphenicol-resistant incorporation of amino-acids into Staphylococci and cell-wall synthesis. *Nature* 181, 956-7.
- Manna, A. C. and Cheung, A. L., 2003. *sarU*, a *sarA* homolog, is repressed by SarT and regulates virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 71, 343-53.
- Marshall, J. H. and Wilmoth, G. J., 1981. Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J Bacteriol* 147, 900-13.
- Massey, R. C., Buckling, A. and Peacock, S. J., 2001. Phenotypic switching of antibiotic resistance circumvents permanent costs in *Staphylococcus aureus*. *Curr Biol* 11, 1810-4.
- McAleese, F., Wu, S. W., Sieradzki, K., Dunman, P., Murphy, E., Projan, S. and Tomasz, A., 2006. Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate-*S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J Bacteriol* 188, 1120-33.
- McClintock, B., 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A* 36, 344-55.
- McEvoy, C. R., Tsuji, B., Gao, W., Seemann, T., Porter, J. L., Doig, K., Ngo, D., Howden, B. P. and Stinear, T. P., 2013. Decreased Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus* caused by IS256 Tempering of WalKR Expression. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- Mediavilla, J. R., Chen, L., Mathema, B. and Kreiswirth, B. N., 2012. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr Opin Microbiol* 15, 588-95.
- Meehl, M., Herbert, S., Götz, F. and Cheung, A., 2007. Interaction of the GraRS two-component system with the *VraFG* ABC transporter to support vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2679-89.
- Mehta, S., Cuirolo, A. X., Plata, K. B., Riosa, S., Silverman, J. A., Rubio, A., Rosato, R. R. and Rosato, A. E., 2012. *VraSR* two-component regulatory system contributes to *mprF*-mediated decreased susceptibility to daptomycin in in vivo-selected clinical strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 92-102.
- Meier, S., Goerke, C., Wolz, C., Seidl, K., Homerova, D., Schulthess, B., Kormanec, J., Berger-Bächi, B. and Bischoff, M., 2007. *sigmaB* and the *sigmaB*-dependent *arlRS* and *yabJ-spoVG* loci affect capsule formation in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 75, 4562-71.
- Meka, V. G., Pillai, S. K., Sakoulas, G., Wennersten, C., Venkataraman, L., DeGirolami, P. C., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Jr. and Gold, H. S., 2004. Linezolid

- resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis* 190, 311-7.
- Memmi, G., Nair, D. R. and Cheung, A., 2012. Role of ArlRS in autolysis in methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* 194, 759-67.
- Mendes, R. E., Deshpande, L. M. and Jones, R. N., 2014b. Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist Updat* 17, 1-12.
- Mendes, R. E., Flamm, R. K., Hogan, P. A., Ross, J. E. and Jones, R. N., 2014a. Summary of linezolid activity and resistance mechanisms detected during the 2012 LEADER surveillance program for the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 1243-7.
- Mendes, R. E., Tsakris, A., Sader, H. S., Jones, R. N., Biek, D., McGhee, P., Appelbaum, P. C. and Kosowska-Shick, K., 2012. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* displaying increased MICs of ceftaroline. *J Antimicrob Chemother* 67, 1321-4.
- Mendiola, M. V. and de la Cruz, F., 1989. Specificity of insertion of IS91, an insertion sequence present in alpha-haemolysin plasmids of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 3, 979-84.
- Mesak, L. R., Miao, V. and Davies, J., 2008. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on SOS and DNA repair gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3394-7.
- Michel, B., 2005. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. *PLoS Biol* 3, e255.
- Miller, H. K., Carroll, R. K., Burda, W. N., Krute, C. N., Davenport, J. E. and Shaw, L. N., 2012. The extracytoplasmic function sigma factor *sigmaS* protects against both intracellular and extracytoplasmic stresses in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 194, 4342-54.
- Miller, M. H., Wexler, M. A. and Steigbigel, N. H., 1978. Single and combination antibiotic therapy of *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: emergence of gentamicin-resistant mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 14, 336-43.
- Mishra, N. N., Liu, G. Y., Yeaman, M. R., Nast, C. C., Proctor, R. A., McKinnell, J. and Bayer, A. S., 2011. Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 526-31.
- Mitchell, G., Fugere, A., Pepin Gaudreau, K., Brouillette, E., Frost, E. H., Cantin, A. M. and Malouin, F., 2013. SigB is a dominant regulator of virulence in *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *PLoS One* 8, e65018.
- Miyazaki, E., Chen, J. M., Ko, C. and Bishai, W. R., 1999. The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (orf159) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *J Bacteriol* 181, 2846-51.
- Mockenhaupt, M., Idzko, M., Grosber, M., Schopf, E. and Norgauer, J., 2005. Epidemiology of staphylococcal scalded skin syndrome in Germany. *J Invest Dermatol* 124, 700-3.
- Moisan, H., Brouillette, E., Jacob, C. L., Langlois-Begin, P., Michaud, S. and Malouin, F., 2006. Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small-colony

- variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J Bacteriol* 188, 64-76.
- Moisan, H., Pruneau, M. and Malouin, F., 2010. Binding of ceftaroline to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 65, 713-6.
- Moore, G. E., Gerner, R. E. and Franklin, H. A., 1967. Culture of normal human leukocytes. *JAMA* 199, 519-24.
- Moreira, B., Boyle-Vavra, S., deJonge, B. L. and Daum, R. S., 1997. Increased production of penicillin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1788-93.
- Morikawa, K., Inose, Y., Okamura, H., Maruyama, A., Hayashi, H., Takeyasu, K. and Ohta, T., 2003. A new staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Genes Cells* 8, 699-712.
- Morikawa, K., Maruyama, A., Inose, Y., Higashide, M., Hayashi, H. and Ohta, T., 2001. Overexpression of sigma factor, sigma(B), urges *Staphylococcus aureus* to thicken the cell wall and to resist beta-lactams. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 385-9.
- Morikawa, K., Takemura, A. J., Inose, Y., Tsai, M., Nguyen Thi le, T., Ohta, T. and Msadek, T., 2012. Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 8, e1003003.
- Morton, T. M., Johnston, J. L., Patterson, J. and Archer, G. L., 1995. Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1272-80.
- Mulhbacher, J., Brouillette, E., Allard, M., Fortier, L. C., Malouin, F. and Lafontaine, D. A., 2010. Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways. *PLoS Pathog* 6, e1000865.
- Mulhbacher, J. and Lafontaine, D. A., 2007. Ligand recognition determinants of guanine riboswitches. *Nucleic Acids Res* 35, 5568-80.
- Müller, M., Reiss, S., Schlüter, R., Mäder, U., Beyer, A., Reiss, W., Marles-Wright, J., Lewis, R. J., Pförtner, H., Völker, U., Riedel, K., Hecker, M., Engelmann, S. and Pané-Farre, J., 2014. Deletion of membrane-associated Asp23 leads to upregulation of cell wall stress genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 93, 1259-68.
- Münch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E. and Jahn, D., 2003. PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic Acids Res* 31, 266-9.
- Murphy, E., 1985. Nucleotide sequence of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Staphylococcus aureus* and its relationship to AAD(3") (9). *Mol Gen Genet* 200, 33-9.
- Murphy, E., 1985. Nucleotide sequence of ermA, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 162, 633-40.
- Murphy, E., Huwyler, L. and de Freire Bastos Mdo, C., 1985. Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. *EMBO J* 4, 3357-65.
- Murphy, E., Phillips, S., Edelman, I. and Novick, R. P., 1981. Tn554: isolation and characterization of plasmid insertions. *Plasmid* 5, 292-305.

- Naas, T., Blot, M., Fitch, W. M. and Arber, W., 1994. Insertion sequence-related genetic variation in resting *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 136, 721-30.
- Nagel, M., Reuter, T., Jansen, A., Szekat, C. and Bierbaum, G., 2011. Influence of ciprofloxacin and vancomycin on mutation rate and transposition of IS256 in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 229-36.
- Nagy, Z. and Chandler, M., 2004. Regulation of transposition in bacteria. *Res. Microbiol.* 155, 387-98.
- Nair, D., Memmi, G., Hernandez, D., Bard, J., Beaume, M., Gill, S., Francois, P. and 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, 2332-5.
- Nair, S. P., Bischoff, M., Senn, M. M. and Berger-Bächi, B., 2003. The *sigma B* regulon influences internalization of *Staphylococcus aureus* by osteoblasts. *Infect Immun* 71, 4167-70.
- Nakao, M., Kitanaka, E., Ochiai, K. and Nakazawa, S., 1972. Cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus* in the presence of protein synthesis inhibitory agents. I. Lincomycin, clindamycin and macrolide antibiotics. *Jpn J Microbiol* 16, 403-13.
- Norström, T., Lannergard, J. and Hughes, D., 2007. Genetic and phenotypic identification of fusidic acid-resistant mutants with the small-colony-variant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 4438-46.
- Novick, R. P. and Jiang, D., 2003. The staphylococcal saeRS system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiology* 149, 2709-17.
- Novick, R. P. and Richmond, M. H., 1965. Nature and Interactions of the Genetic Elements Governing Penicillinase Synthesis in *Staphylococcus Aureus*. *J Bacteriol* 90, 467-80.
- Oger, C., Mahillon, J. and Petit, F., 2003. Distribution and diversity of a cadmium resistance (*cadA*) determinant and occurrence of IS257 insertion sequences in Staphylococcal bacteria isolated from a contaminated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol* 43, 173-83.
- Ohtsubo, Y., Genka, H., Komatsu, H., Nagata, Y. and Tsuda, M., 2005. High-temperature-induced transposition of insertion elements in *burkholderia multivorans* ATCC 17616. *Appl Environ Microbiol* 71, 1822-8.
- Okuma, K., Iwakawa, K., Turnidge, J. D., Grubb, W. B., Bell, J. M., O'Brien, F. G., Coombs, G. W., Pearman, J. W., Tenover, F. C., Kapi, M., Tiensasitorn, C., Ito, T. and Hiramatsu, K., 2002. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* 40, 4289-94.
- Olivier, A. C., Lemaire, S., Van Bambeke, F., Tulkens, P. M. and Oldfield, E., 2009. Role of *rsbU* and staphyloxanthin in phagocytosis and intracellular growth of *Staphylococcus aureus* in human macrophages and endothelial cells. *J Infect Dis* 200, 1367-70.
- Opdyke, J. A., Kang, J. G. and Storz, G., 2004. GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 6698-705.
- Otto, M. P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G. and Dumitrescu, O., 2013. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 68, 1524-32.

- Palma, M. and Cheung, A. L., 2001. sigma(B) activity in *Staphylococcus aureus* is controlled by RsbU and an additional factor(s) during bacterial growth. *Infect. Immun.* 69, 7858-65.
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Forstner, K., Engelmann, S. and Hecker, M., 2006. The *sigmaB* regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 237-58.
- Pané-Farré, J., Jonas, B., Hardwick, S. W., Gronau, K., Lewis, R. J., Hecker, M. and Engelmann, S., 2009. Role of RsbU in controlling SigB activity in *Staphylococcus aureus* following alkaline stress. *J Bacteriol* 191, 2561-73.
- Pasternak, C., Ton-Hoang, B., Coste, G., Bailone, A., Chandler, M. and Sommer, S., 2010. Irradiation-induced *Deinococcus radiodurans* genome fragmentation triggers transposition of a single resident insertion sequence. *PLoS Genet* 6, e1000799.
- Peleg, A. Y., Miyakis, S., Ward, D. V., Earl, A. M., Rubio, A., Cameron, D. R., Pillai, S., Moellering, R. C., Jr. and Eliopoulos, G. M., 2012. Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* 7, e28316.
- Pelz, A., Wieland, K. P., Putzbach, K., Hentschel, P., Albert, K. and Götz, F., 2005. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 280, 32493-8.
- Peng, H. L., Novick, R. P., Kreiswirth, B., Kornblum, J. and Schlievert, P., 1988. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 170, 4365-72.
- Perichon, B. and Courvalin, P., 2009. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4580-7.
- Peschel, A., Vuong, C., Otto, M. and Götz, F., 2000. The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2845-7.
- Pförtner, H., Burian, M. S., Michalik, S., Depke, M., Hildebrandt, P., Dhople, V. M., Pané-Farré, J., Hecker, M., Schmidt, F. and Völker, U., 2014. Activation of the alternative sigma factor SigB of *Staphylococcus aureus* following internalization by epithelial cells - an in vivo proteomics perspective. *Int J Med Microbiol* 304, 177-87.
- Plague, G. R., 2010. Intergenic transposable elements are not randomly distributed in bacteria. *Genome Biol Evol* 2, 584-90.
- Polard, P. and Chandler, M., 1995. An in vivo transposase-catalyzed single-stranded DNA circularization reaction. *Genes Dev* 9, 2846-58.
- Popov Iu, A., Kaprel'iants, A. S., Ostrovskii, D. N. and Ignatov, V. V., 1976. [Study of the membranes of pigment-free mutant of *Staphylococcus aureus*]. *Biokhimiia* 41, 1116-20.
- Proctor, R. A., Balwit, J. M. and Vesga, O., 1994. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis* 3, 302-12.
- Proctor, R. A., van Langevelde, P., Kristjansson, M., Maslow, J. N. and Arbeit, R. D., 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 20, 95-102.

- Prudhomme, M., Turlan, C., Claverys, J. P. and Chandler, M., 2002. Diversity of Tn4001 transposition products: the flanking IS256 elements can form tandem dimers and IS circles. *J. Bacteriol.* 184, 433-43.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Wallner, U., Hacker, J., Hecker, M. and Ziebuhr, W., 2000. Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J Bacteriol* 182, 6824-6.
- Radman, M., 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci* 5A, 355-67.
- Reimann, C., Moore, R., Little, S., Savioz, A., Willetts, N. S. and Haas, D., 1989. Genetic structure, function and regulation of the transposable element IS21. *Mol Gen Genet* 215, 416-24.
- Reipert, A., Ehlert, K., Kast, T. and Bierbaum, G., 2003. Morphological and Genetic Differences in Two Isogenic *Staphylococcus aureus* Strains with Decreased Susceptibilities to Vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 568-576.
- Reiss, S., Pane-Farre, J., Fuchs, S., Francois, P., Liebeke, M., Schrenzel, J., Lindequist, U., Lalk, M., Wolz, C., Hecker, M. and Engelmann, S., 2012. Global analysis of the *Staphylococcus aureus* response to mupirocin. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 787-804.
- Remy, J. M., Tow-Keogh, C. A., McConnell, T. S., Dalton, J. M. and Devito, J. A., 2012. Activity of delafloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: resistance selection and characterization. *J Antimicrob Chemother* 67, 2814-20.
- Reznikoff, W. S., 2003. Tn5 as a model for understanding DNA transposition. *Mol Microbiol* 47, 1199-206.
- Rice, L. B., Marshall, S. H. and Carias, L. L., 1992. Tn5381, a conjugative transposon identifiable as a circular form in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 174, 7308-15.
- Rice, L. B. and Thorisdottir, A. S., 1994. The prevalence of sequences homologous to IS256 in clinical enterococcal isolates. *Plasmid* 32, 344-9.
- Roberts, D., Hoopes, B. C., McClure, W. R. and Kleckner, N., 1985. IS10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell* 43, 117-30.
- Rodvold, K. A. and McConeghy, K. W., 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clin Infect Dis* 58 Suppl 1, S20-7.
- Romilly, C., Lays, C., Tomasini, A., Caldelari, I., Benito, Y., Hammann, P., Geissmann, T., Boisset, S., Romby, P. and Vandenesch, F., 2014. A non-coding RNA promotes bacterial persistence and decreases virulence by regulating a regulator in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 10, e1003979.
- Ross, J. A., Ellis, M. J., Hossain, S. and Haniford, D. B., 2013. Hfq restructures RNA-IN and RNA-OUT and facilitates antisense pairing in the Tn10/IS10 system. *RNA* 19, 670-84.
- Ross, J. A., Wardle, S. J. and Haniford, D. B., 2010. Tn10/IS10 transposition is downregulated at the level of transposase expression by the RNA-binding protein Hfq. *Mol Microbiol* 78, 607-21.
- Roth, A. L., Lister, P. D. and Hanson, N. D., 2013. Effect of drug treatment options on the mobility and expression of blaKPC. *J Antimicrob Chemother* 68, 2779-85.

- Rouch, D. A., Byrne, M. E., Kong, Y. C. and Skurray, R. A., 1987. The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J Gen Microbiol* 133, 3039-52.
- Rouch, D. A. and Skurray, R. A., 1989. IS257 from *Staphylococcus aureus*: member of an insertion sequence superfamily prevalent among gram-positive and gram-negative bacteria. *Gene* 76, 195-205.
- Said-Salim, B., Dunman, P. M., McAleese, F. M., Macapagal, D., Murphy, E., McNamara, P. J., Arvidson, S., Foster, T. J., Projan, S. J. and Kreiswirth, B. N., 2003. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* 185, 610-9.
- Samuelsen, O., Haukland, H. H., Kahl, B. C., von Eiff, C., Proctor, R. A., Ulvatne, H., Sandvik, K. and Vorland, L. H., 2005. *Staphylococcus aureus* small colony variants are resistant to the antimicrobial peptide lactoferricin B. *J Antimicrob Chemother* 56, 1126-9.
- Saravolatz, S. N., Martin, H., Pawlak, J., Johnson, L. B. and Saravolatz, L. D., 2014. Ceftaroline-heteroresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 3133-6.
- Sass, P. and Bierbaum, G., 2009. Native *graS* mutation supports the susceptibility of *Staphylococcus aureus* strain SG511 to antimicrobial peptides. *Int J Med Microbiol* 299, 313-22.
- Sau, S., Bhasin, N., Wann, E. R., Lee, J. C., Foster, T. J. and Lee, C. Y., 1997. The *Staphylococcus aureus* allelic genetic loci for serotype 5 and 8 capsule expression contain the type-specific genes flanked by common genes. *Microbiology* 143 ( Pt 7), 2395-405.
- Schaaff, F., Bierbaum, G., Baumert, N., Bartmann, P. and Sahl, H. G., 2003. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 293, 427-35.
- Schaaff, F., Reipert, A. and Bierbaum, G., 2002. An elevated mutation frequency favors development of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3540-8.
- Schreiber, F., Szeekat, C., Josten, M., Sahl, H. G. and Bierbaum, G., 2013. Antibiotic-induced autoactivation of IS256 in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 6381-4.
- Schriever, C. A., Fernandez, C., Rodvold, K. A. and Danziger, L. H., 2005. Daptomycin: a novel cyclic lipopeptide antimicrobial. *Am J Health Syst Pharm* 62, 1145-58.
- Schulthess, B., Meier, S., Homerova, D., Goerke, C., Wolz, C., Kormanec, J., Berger-Bächi, B. and Bischoff, M., 2009. Functional characterization of the *sigmaB*-dependent *yabJ-spoVG* operon in *Staphylococcus aureus*: role in methicillin and glycopeptide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1832-9.
- Schwarz, S., Werckenthin, C. and Kehrenberg, C., 2000. Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2530-3.
- Senn, M. M., Giachino, P., Homerova, D., Steinhuber, A., Strassner, J., Kormanec, J., Fluckiger, U., Berger-Bächi, B. and Bischoff, M., 2005. Molecular analysis and organization of the *sigmaB* operon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 187, 8006-19.

- Shapiro, J. A., 1979. Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1933-7.
- Shaw, L. N., Lindholm, C., Prajsnar, T. K., Miller, H. K., Brown, M. C., Golonka, E., Stewart, G. C., Tarkowski, A. and Potempa, J., 2008. Identification and characterization of sigma, a novel component of the *Staphylococcus aureus* stress and virulence responses. *PLoS One* 3, e3844.
- Shen, J., Wang, Y. and Schwarz, S., 2013. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfrr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 68, 1697-706.
- Shimaoka, M., Takenaka, Y., Mihara, Y., Kurahashi, O., Kawasaki, H. and Matsui, H., 2006. Effects of *xapA* and *guaA* disruption on inosine accumulation in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 3069-72.
- Shlaes, D. M., Shlaes, J. H., Vincent, S., Etter, L., Fey, P. D. and Goering, R. V., 1993. Teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* expresses a novel membrane protein and increases expression of penicillin-binding protein 2 complex. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 2432-7.
- Shore, A. C., Brennan, O. M., Ehricht, R., Monecke, S., Schwarz, S., Slickers, P. and Coleman, D. C., 2010. Identification and characterization of the multidrug resistance gene *cfrr* in a Panton-Valentine leukocidin-positive sequence type 8 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* IVa (USA300) isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 4978-84.
- Shukla, S. K., Kislow, J., Briska, A., Henkhaus, J. and Dykes, C., 2009. Optical mapping reveals a large genetic inversion between two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Bacteriol* 191, 5717-23.
- Sibbald, M. J., Ziebandt, A. K., Engelmann, S., Hecker, M., de Jong, A., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Stokroos, I., Arends, J. P., Dubois, J. Y. and van Dijl, J. M., 2006. Mapping the pathways to staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 755-88.
- Sieradzki, K., Leski, T., Dick, J., Borio, L. and Tomasz, A., 2003. Evolution of a vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strain in vivo: multiple changes in the antibiotic resistance phenotypes of a single lineage of methicillin-resistant *S. aureus* under the impact of antibiotics administered for chemotherapy. *J Clin Microbiol* 41, 1687-93.
- Sieradzki, K., Pinho, M. G. and Tomasz, A., 1999. Inactivated *pbp4* in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 274, 18942-6.
- Signon, L. and 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, 1123-36.
- Siguier, P., Gourbeyre, E. and Chandler, M., 2014. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38, 865-91.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J. and Chandler, M., 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* 34, D32-6.

- Siguier, P., Varani, A., Perochon, J. and Chandler, M., 2012. Exploring bacterial insertion sequences with ISfinder: objectives, uses, and future developments. *Methods Mol Biol* 859, 91-103.
- Silverman, J. A., Perlmutter, N. G. and Shapiro, H. M., 2003. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2538-44.
- Simons, R. W. and Kleckner, N., 1983. Translational control of IS10 transposition. *Cell* 34, 683-91.
- Singh, V. K., Schmidt, J. L., Jayaswal, R. K. and Wilkinson, B. J., 2003. Impact of *sigB* mutation on *Staphylococcus aureus* oxacillin and vancomycin resistance varies with parental background and method of assessment. *Int J Antimicrob Agents* 21, 256-61.
- Smith, K., Gould, K. A., Ramage, G., Gemmell, C. G., Hinds, J. and Lang, S., 2010. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 380-7.
- Song, B., Wang, G. R., Shoemaker, N. B. and Salyers, A. A., 2009. An unexpected effect of tetracycline concentration: growth phase-associated excision of the *Bacteroides mobilizable* transposon NBU1. *J Bacteriol* 191, 1078-82.
- Song, L., Pan, Y., Chen, S. and Zhang, X., 2012. Structural characteristics of genomic islands associated with GMP synthases as integration hotspot among sequenced microbial genomes. *Comput Biol Chem* 36, 62-70.
- Ster, C., Allard, M., Boulanger, S., Lamontagne Boulet, M., Mulhbach, J., Lafontaine, D. A., Marsault, E., Lacasse, P. and Malouin, F., 2013. Experimental treatment of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infection using a guanine riboswitch ligand analog. *J Dairy Sci* 96, 1000-8.
- Stewart, P. R., Dubin, D. T., Chikramane, S. G., Inglis, B., Matthews, P. R. and Poston, S. M., 1994. IS257 and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* 31, 12-20.
- Sugiyama, M., Yuasa, K., Bhuiyan, M. Z., Iwai, Y., Masumi, N. and Ueda, K., 1996. IS431*mec*-mediated integration of a bleomycin-resistance gene into the chromosome of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Japan. *Appl Microbiol Biotechnol* 46, 61-6.
- Swingle, E. L., 1935. Studies on Small Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 29, 467-89.
- Tamber, S., Schwartzman, J. and 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, 3637-46.
- Tao, L., Wu, X. and Sun, B., 2010. Alternative sigma factor *sigmaH* modulates prophage integration and excision in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 6, e1000888.
- Tasina, E., Haidich, A. B., Kokkali, S. and Arvanitidou, M., 2011. Efficacy and safety of tigecycline for the treatment of infectious diseases: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 11, 834-44.
- Tattevin, P., Basuino, L. and Chambers, H. F., 2009. Subinhibitory fluoroquinolone exposure selects for reduced beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and alterations in the SOS-mediated response. *Res Microbiol* 160, 187-92.

- Tenover, F. C. and Moellering, R. C., Jr., 2007. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 44, 1208-15.
- Teras, R., Jakovleva, J. and Kivisaar, M., 2009. Fis negatively affects binding of Tn4652 transposase by out-competing IHF from the left end of Tn4652. *Microbiology* 155, 1203-14.
- Toh, S. M., Xiong, L., Arias, C. A., Villegas, M. V., Lolans, K., Quinn, J. and Mankin, A. S., 2007. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol Microbiol* 64, 1506-14.
- Tomich, P. K., An, F. Y. and Clewell, D. B., 1980. Properties of erythromycin-inducible transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 141, 1366-74.
- Trecarichi, E. M., Cauda, R. and Tumbarello, M., 2012. Detecting risk and predicting patient mortality in patients with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae bloodstream infections. *Future Microbiol* 7, 1173-89.
- Tsiodras, S., Gold, H. S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering, R. C. and Ferraro, M. J., 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 358, 207-8.
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T. and Hiramatsu, K., 2010. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 4352-9.
- Tuchscher, L., Medina, E., Hussain, M., Volker, W., Heitmann, V., Niemann, S., Holzinger, D., Roth, J., Proctor, R. A., Becker, K., Peters, G. and Löffler, B., 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med* 3, 129-41.
- Tzagoloff, H. and Novick, R., 1977. Geometry of cell division in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 129, 343-50.
- Ubeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R. P. and Penades, J. R., 2005. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* 56, 836-44.
- Ubeda, C., Tormo, M. A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T. J., Lasa, I. and Penades, J. R., 2003. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 49, 193-210.
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J. M., Amorena, B., Penades, J. R. and Lasa, I., 2003. SarA and not *sigmaB* is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 48, 1075-87.
- Valle, J., Vergara-Irigaray, M., Merino, N., Penades, J. R. and Lasa, I., 2007. *sigmaB* regulates IS256-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotypic variation. *J Bacteriol* 189, 2886-96.
- van Hal, S. J., Lodise, T. P. and Paterson, D. L., 2012. The clinical significance of vancomycin minimum inhibitory concentration in *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 54, 755-71.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M. E. and Etienne, J., 2003. Community-

- acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 9, 978-84.
- Venezia, R. A., Domaracki, B. E., Evans, A. M., Preston, K. E. and Graffunder, E. M., 2001. Selection of high-level oxacillin resistance in heteroresistant *Staphylococcus aureus* by fluoroquinolone exposure. *J Antimicrob Chemother* 48, 375-81.
- Vogel, V., Falquet, L., Calderon-Copete, S. P., Basset, P. and Blanc, D. S., 2012. Short term evolution of a highly transmissible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone (ST228) in a tertiary care hospital. *PLoS One* 7, e38969.
- von Eiff, C., Heilmann, C., Proctor, R. A., Woltz, C., Peters, G. and Götz, F., 1997. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. *J Bacteriol* 179, 4706-12.
- Wada, A., Katayama, Y., Hiramatsu, K. and Yokota, T., 1991. Southern hybridization analysis of the *mecA* deletion from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* 176, 1319-25.
- Wadström, T., 1971. Chitinase activity and substrate specificity of endo- -N-acetylglucosaminidase of *Staphylococcus aureus*, strain M18. *Acta Chem Scand* 25, 1807-12.
- Wagner, E. G. and Simons, R. W., 1994. Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu Rev Microbiol* 48, 713-42.
- Wang, Y., Li, D., Song, L., Liu, Y., He, T., Liu, H., Wu, C., Schwarz, S. and Shen, J., 2013. First report of the multiresistance gene *cfr* in *Streptococcus suis*. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 4061-3.
- Watanabe, T., Ohashi, K., Matsui, K. and Kubota, T., 1997. Comparative studies of the bactericidal, morphological and post-antibiotic effects of arbekacin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 39, 471-6.
- Weinreich, M. D. and Reznikoff, W. S., 1992. Fis plays a role in Tn5 and IS50 transposition. *J Bacteriol* 174, 4530-7.
- Werth, B. J., Barber, K. E., Ireland, C. E. and Rybak, M. J., 2014. Evaluation of ceftaroline, vancomycin, daptomycin, or ceftaroline plus daptomycin against daptomycin-nonsusceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model of simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother* 58, 3177-81.
- Werth, B. J., Steed, M. E., Kaatz, G. W. and Rybak, M. J., 2013. Evaluation of ceftaroline activity against heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-intermediate methicillin-resistant *S. aureus* strains in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model: exploring the "seesaw effect". *Antimicrob Agents Chemother* 57, 2664-8.
- Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A. and Nouwen, J. L., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5, 751-62.
- Wetzel, K. J., Bjorge, D. and Schwan, W. R., 2011. Mutational and transcriptional analyses of the *Staphylococcus aureus* low-affinity proline transporter OpuD during in vitro growth and infection of murine tissues. *FEMS Immunol Med Microbiol* 61, 346-55.

- Whitman, W. B., Coleman, D. C. and Wiebe, W. J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6578-83.
- Wiener, S. L., Wiener, R., Urivetzky, M. and Meilman, E., 1972. Inhibition of ribonuclease by diethyl pyrocarbonate and other methods. *Biochim Biophys Acta* 259, 378-85.
- Witkin, E. M., 1991. RecA protein in the SOS response: milestones and mysteries. *Biochimie* 73, 133-41.
- Wolter, N., Smith, A. M., Farrell, D. J., Schaffner, W., Moore, M., Whitney, C. G., Jorgensen, J. H. and Klugman, K. P., 2005. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3554-7.
- Wong-Beringer, A., Joo, J., Tse, E. and Beringer, P., 2011. Vancomycin-associated nephrotoxicity: a critical appraisal of risk with high-dose therapy. *Int J Antimicrob Agents* 37, 95-101.
- Wu, S., de Lencastre, H. and Tomasz, A., 1996. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. *J Bacteriol* 178, 6036-42.
- Wunderink, R. G., Niederman, M. S., Kollef, M. H., Shorr, A. F., Kunkel, M. J., Baruch, A., McGee, W. T., Reisman, A. and Chastre, J., 2012. Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study. *Clin Infect Dis* 54, 621-9.
- Yang, X., Kang, C. M., Brody, M. S. and Price, C. W., 1996. Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. *Genes Dev* 10, 2265-75.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J., 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-19.
- Yarwood, J. M., McCormick, J. K. and Schlievert, P. M., 2001. Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183, 1113-23.
- Yuan, W., Hu, Q., Cheng, H., Shang, W., Liu, N., Hua, Z., Zhu, J., Hu, Z., Yuan, J., Zhang, X., Li, S., Chen, Z., Hu, X., Fu, J. and Rao, X., 2013. Cell wall thickening is associated with adaptive resistance to amikacin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 68, 1089-96.
- Zhanel, G. G., Calic, D., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Adam, H., Lagace-Wiens, P. R., Rubinstein, E., Gin, A. S., Hoban, D. J. and Karlowisky, J. A., 2010. New lipoglycopeptides: a comparative review of dalbavancin, oritavancin and telavancin. *Drugs* 70, 859-86.
- Zhanel, G. G., Schweizer, F. and Karlowisky, J. A., 2012. Oritavancin: mechanism of action. *Clin Infect Dis* 54 Suppl 3, S214-9.
- Zhanel, G. G., Sniezek, G., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagace-Wiens, P. R., Rubinstein, E., Gin, A. S., Hoban, D. J. and Karlowisky, J. A., 2009. Ceftaroline: a novel broad-spectrum cephalosporin with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Drugs* 69, 809-31.

- Zhang, W. J., Wu, C. M., Wang, Y., Shen, Z. Q., Dai, L., Han, J., Foley, S. L., Shen, J. Z. and Zhang, Q., 2011. The new genetic environment of *cfr* on plasmid pBS-02 in a *Bacillus* strain. *J Antimicrob Chemother* 66, 1174-5.
- Zhang, W. J., Xu, X. R., Schwarz, S., Wang, X. M., Dai, L., Zheng, H. J. and Liu, S., 2014. Characterization of the IncA/C plasmid pSCEC2 from *Escherichia coli* of swine origin that harbours the multiresistance gene *cfr*. *J Antimicrob Chemother* 69, 385-9.
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lössner, I., Götz, F. and 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, 345-56.
- Zimmer, M., Scherer, S. and Loessner, M. J., 2002. Genomic analysis of *Clostridium perfringens* bacteriophage phi3626, which integrates into *guaA* and possibly affects sporulation. *J Bacteriol* 184, 4359-68.

## 7 Anhang

**Tabelle A 1: Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.**

**I. Oligonukleotide, die bei der Genomsequenzierung von SA137/93G für das Schließen der Lücken verwendet wurden.**

Forward-Primer	Sequenz (5' - 3')	Revers-Primer	Sequenz (5' - 3')
G-354597-for	ATC CGT CCA ATC AAC CAT TTG T	G-354909-rev	CGT TAA AAG CAA TTA TGA AAA GAG
G-367430-for	ACA ACG TAA ATG AAG TTT ATT CG	G-368946-rev	CTT TTT TAT CAA TTC ATT TTC AT
G-397927-for	ATG TAT CTG ACT GTT GGT CCC	G-398342-rev	CCT GTA TAG AAG TTG GCA AGT
G-477775-for	AAG AAA CAC AAG TGT ATC GTT A	G-478695-rev	ACT CTA TCT GTA AGA TCC CC
G-528922-for	GGC AAA CAA AAC AAC TCA ACT	G-534379-rev	AAT CGC TTG CTT CTT TCC TC
G-553156-for	AAA CTG AAG AGT AAT TTT AAT CTG	G-553296-rev	AAA CTT TAG TAC AAA GTA ATA AAG
G-632304-for	AGA TGT AAT AGC GAA TTG AAA AC	G-632661-rev	CAG AAT ACT TTC TTA TCG AAA ATT
G-639305-for	ATT CAG ACT CAG ATA GCG ACT	G-643579-rev	GTC CGA ATC TGA GTC GCT AT
G-682086-for	ATT TTA ATT TGT TGC ATC ATA ATA C	G-682487-rev	GAT AAC TTT AGA TTC ACA TAG CA
G-749896-for	ATT GAA ATG ATT AAC TGC TAT AGT	G-750222-rev	CAC ACT ACT TTT TAG TAT TTT CAA
G-898780-for	AGT ACG ATG AGG ACG TGC TT	G-899091-rev	TCATAGCCTCAAGGTCAGTAG
G-1050461-for	TTA ATA GCG TTG TGA AGT ATA AA	G-1050856-rev	TTC ACA TCT AAC TCA TGT ACC
G-1175563-for	TTA CAT TTC TCT ACA TTT TGT TTG	G-1175821-rev	GTG TTG AAT TAT GTT TAC TTC G
G-1181148-for	TTA ATG TAG CAA CTG ATA AAT TAC	G-1181702-rev	AAT CCC CTA TCA TAT TTT TAT TAA
G-1235391-for	AAA TTA GCA GTT TAT ATT CTG TC	G-1235819-rev	AAT TAA AAG TAA ACA TCC CAG TG
G-1263122-for	TAC TAA AGA ATA TAA CTT TAT GGG	G-1263223-rev	TTA GCA ACA ATA ACC TCA TGT T
G-1440384-for	TTA CTG TCT GCT AAC AGC TAA	G-1440781-rev	CTT TAG TCA AGG TTG ATA CAT T
G-1452601-for	CGA ATA AAC AAT CAT AAA TTA CG	G-1452997-rev	CAA TAA GAA AAT TAT GAA GAA TTA T
G-1736716-for	CGC TTC TAC AAG ACT GGT AAA	G-1737003-rev	GTC ATT TTA TTG TTA AAT TCA AAA
G-1779572-for	AAA CGT ATC GCT GCT AAA TCA A	IS1272-for	CTA TAT GAA TGT GAT GAC TGT
G-1914556-for	TTT CCA CTA CCT ATT TTG GTA	G-1915487 for	AAG AAA CAC AAG TGT ATC GTT A
G-1932041-for	CTA TTA TTA GTT GAA GTT AAG GC	G-1934369-rev	GCG GGT GAC GAA AGA ATA A
G-1972797-for	AAG TTG AAA CAA ATA TAT AAC CC	G-1974547-rev	TCA AAA TCC CGT TCC ACT TGT
G-2111971-for	TTG CGG TCT CAA TGC GGC T	G-2112255-rev	CGA GGT GGA AGC ATG GTG A
G-2137018-for	ATT ATT AAA ACA CAT CCA CGC A	G-2137191-rev	GTT CTT ATA AAA AAC AAT AGG GC
G-2226330-for	TCC CCC TTT GCT CTA TGT AAT T	G-2227817-rev	TAC AAG CTG AAA ATC ATC ATT ATA
IS1272-for	CTA TAT GAA TGT GAT GAC TGT	G-2255566-rev	TGG TTT AGA TGT AGT TGA AGT T
G-2283932-for	AAT ATA CTT TAT CCA ATA CAA CG	G-2285207-rev	ATTACAATGTTTTCTATCAAATGT
G-2369264-for	TCC TAT TAT GAA ATT ATA ACA CTA	G-2369603-rev	ATT CCC AAT TTA TAC ATT ATG TAC
G-2415116for	GAA AGT TTA AAA GTG ACA TTT TT	G-2415473rev	TGA TTA GTG GCT TGT AAA GAC
G-2559760-for	ACC CGT TTT TGG TCC GTG TT	G-2561713-rev	ACT TTT ACA CCA GAA GCG CC
G-2563334-for	ATT TCT ACT ATC ATG TGG GTC	G-2563629-rev	TAA GGG ATG AAG ACT TGA TGA A
G-2564786-for	CAA TAC CCT ACT ATA TAT CAC A	G-2564873-rev	CTC AGT AAA ATT GGA ACA CGA A
G-2680596-for	CTG TAA ACA AAA ACT AAT TTA TAC	G-2680819-rev	CTA CGA AAA CTA AAT TCT AAT A
G-2709057-for	TCC GAT GGA CAT ACA GGC G	G-2709367-rev	TTC AAC ACA TCT TAG AAA GGA G
G-JK439755-for	TCG CAT AAA TCA CTT TTT CT	G-JK440004-rev	CAG CTT ATA TGA ACG ATT AG
G-711659-for	AAG TGA AGA TAC GAT TAC TAA AA	G-712101-rev	CTA TCA AAG TAA ACA TCT ATG G

## II. Oligonukleotide, die bei der Genomsequenzierung von SA137/93G zur Verifizierung der IS256-Insertionsstellen verwendet wurden (Masterarbeit Annegret Zweynert, 2013).

Primer	Sequenz (5' - 3')	Primer	Sequenz (5' - 3')
Ins1_for	TCA CCG TGA ACA ATC TTG TCT AA	Ins20_for	TCA TAT ATA TTT ACG CCT CAT TTC CA
Ins1_rev	AAA AGC CAA TCC TGA CAT TGA G	Ins20_rev	TGA ATT AAG CGG TAT GTG AAA CA
Ins2_for	GAT GAT ACA CCA CTT GCT AAA AGA	Ins21_for	GGC CAG TTG CAG GTA TCT CT
Ins2_rev	CGT AAG GTA TAA CAT TGT CAT TG	Ins21_rev	TTG CTG TAA TCC AAG CAA AA
Ins3_for	AGT AGT CAT TGG AGT TCA GCA A	Ins22_for	TTC GTA TCA ATG GCT GAT GC
Ins3_rev	TCA AGA CAG GCA TCC ACA TC	Ins22_rev	TGT ATT TAT ATT TGT CTC CCC TAC TTT
Ins4_for	GCG TTT GTC AGT TCA TTA TGG	Ins23_for	CCC AGC TAA GCT AAG TAT TGA AA
Ins4_rev	TGG TTG GTT TAG CTT CGT CAT	Ins23_rev	GCA ACA TTA TTG GGA CTT GGA
Ins5_for	TGC GAC TGA TGG TTT TTC AGC	Ins24_for	CAG GTG ATA GCG AAG AAG TTC A
Ins5_rev	TGC TCA TGT CAT TAC CTC CGT A	Ins24_rev	TGC CAA GAC AAT TAC CAC CTT
Ins6_for	GCT TCA AAA TCA ATG GAC GAG	Ins25_for	GCA GAT GAA CGC CGT ATT TT
Ins6_rev	TCT GCT TCG TTT GGC ATA ACT	Ins25_rev	TCT GCA AGG GAT CGT TCT TT
Ins7_for	AGG TCG CTG ACA AAT TGC TTA	Ins26_for	GCA AAA CAT GTT CGT TTG CT
Ins7_rev	GCA TTT TAT AGA AAG TCA ACC GA	Ins26_rev	GCA GAT GCA ACG ACG AAT AC
Ins8_for	TCA CAA TGA GCA TAA AAA TGG TG	Ins37_for	TTT AGA AAC AGC GGA AAA ACT C
Ins8_rev	GTC TTT CCT CCG AGC CTG AT	Ins27_rev	CAC ACG ATT CTT TAC ACT CGA AA
Ins9_for	GGA ATT TTA CCA GAA ACG GAA T	Ins28_for	CAA AAG CAG TAG GAA GTA ATC ATC A
Ins9_rev	TTT AGT AGT CAT ATC TAT CTC CT	Ins28_rev	CGT CCT GAT TTG CAG TGA GA
Ins10_for	GGG GTG GAA ATA TGA AAA GAG A	Ins29_for	AAT CCA AGC GAG GAT AAA TAA A
Ins10_rev	AAG CGC ATT TTC GTT CAG TC	Ins29_rev	TCC ACA TCC CCC AAT AAA AA
Ins11_for	GGC AAA CCA TAT CCC ATT TC	Ins30_for2	AAC AGT TAA TAA ACC TTC GTT AC
Ins11_rev	CCT CAC AGT AAT TCC ACA GTT TCA	Ins30_rev2	GTT ATT TCA AAA ATA TGT TAG GAC
Ins12_for	TCC ATG GAA CAT AAT CAG TTA GG	Ins31_for	CTT GCT TTC TAT TCA ATT GTC AAA
Ins12_rev	TCT CAC CCT TCC CTA TCA TAC A	Ins31_rev	AGC CTC ATT CGG TTT GAT TT
Ins13_for	GCC TCT TAT GCA GTT GCG TAG T	Ins32_for	TCA CCG ATA CGC ATG TCA TT
Ins13rev2	TCT CTA TAA AAA TGT ATT GAA TCG	Ins32_rev	TCG TCT ACA CAT AAT TGG ACA AAA
Ins14_for	GCA TGA TGA CAC TTT TCA AAC AA	Ins33_for	GCTA TAA ACC CAA ATG AAC TGG
Ins14_rev	AAT TTG AAA CAA TTG AAC ATC CTT	Ins34_for	CCT ATT GAA ACT ATT GTT TAT GGA
Ins15_for	AAA TCA AAT GTG CAA TTG TTA ATA TAG	Ins35_for	GCG CTT TTG TTA TAC TTT GAC TTC
Ins15_rev	TCC ACA TTG TAT TAA AGC ATC AAA	Ins35_rev	AAA CAG AGA GAA GGG GTT GTT AAA
Ins16_for	CAG TGT GCC CAA TGC TAA TG	Ins36_for	TTT GTT TGA TGT TGG GAT GC
Ins16_rev	CGC CTC CAT GTT AAT GAA AAG	Ins36_rev	TCA AGA CTT TAA AGG GTT AGT TCC A
Ins17_for	CAT ATG CCC CAG TTC CTC TT	Ins41_for	TGT TAT CGA CCG TTT TGT ATC C
Ins42rev	AAA ATA AGA ATT TTT CAA ATC CAC A	Ins43_for	ATC TTC ATA CTT TAA TAG ATG TAC
Ins18_for	CAA TTT CGT CCA AAC GTT CA	Ins43_rev	GAC AAA ACA ACG TAA ATC AGC TA
Ins18_rev	TCA AGT TAA ACA CCC CAT CAA A		
Ins19_for	TCG GGC ATT TCA TTA CAT CA		
Ins19_rev	GCT GAG CAA ATT GGA GCA CT		

**III. Oligonukleotide, die bei der Genomsequenzierung von SA137/93A neben den in I. genannten Oligonukleotiden für das Schließen von Lücken sowie zur Verifizierung der IS256-Insertionsstellen verwendet wurden.**

Forward-Primer	Sequenz (5' - 3')	Revers-Primer	Sequenz (5' - 3')
A-36130-for	ATC TAT GGT AGT GAA ATC AAA CG	A-38297-rev	TTA ACG TAA CTG TAT TAT CAC ATT
A-59297-for	GGC TCA CCT GAT GTT ATT GTA	A-60452-rev	CTG GTT CCA TTG TTG GAT CTA
A-89191-for	TAA GAC GAG TAT GAA AAT AGT	A-89572-rev	TCA CGA TAG CCT TCC TTA TC
A-147435-for	CGT CCT GTC AAA ATG AAT AGT	A-147673-rev	CTC GAA CTG AAA TGA TGA TCT
A-352468-for	TTT TCA TAC CAA TAC AAA TTA AC	A-352771-rev	TCC TCT TAA CAT ATA ATC ACC
A-745124-for	GGT ATG AGT GAT TAT GAA AGT	A-745365-rev	AAT TGT AAA TGG ATA TAG TTG G
A-793405-for	ATG TTG TAC TGT CTT GAC CAC	A-793708-rev	CTA TTC ATC GTA CAT AAA TGA A
A-1389184-for	GAA CAT TGG TTT AGG TAC TA	A-1389468-rev	ACT AGC AAG ACA CCA GAA A
A-1993991-for	GAT AAA CAA AAC CGT ATA ACT	A-1994277-rev	TCG TGT TAC CGC CGA TAA TA
A-2074077-for	AAT AGC AGT TCC CAA AGT TG	A-2074356-rev	CAA ATT ACA TCA ACA TTT CAG
G-1779572-for	AAA CGT ATC GCT GCT AAA TCA A	A-1781670-rev	AGT TTT GAG CCA AGT ACG CA
A-2253298-for	GTT AAT AAC CCT TTG TAT CG	G-2255566-rev	TGG TTT AGA TGT AGT TGA AGT T
P-8778-for	TCT GCT CTA TTC ATC AGT TA	P-10359-rev	CCA AAT CAC TTG ATA TAA CT
P-21378-for	GGA GAT GGA AAA ATG ATC GC	P-22242-rev	GCA AAG TTG AAT TTA TAG TAT A
P-28366-for	CCG CTA TTG TAC CAA ATT A	P-29361-rev	CTT TGA TAC TAT AAA AGA TTC

**IV. Oligonukleotide, die bei der Genomsequenzierung von SA1450/94 neben den in I. und II. genannten Oligonukleotiden für das Schließen von Lücken sowie zur Verifizierung der IS256-Insertionsstellen verwendet wurden.**

Forward-Primer	Sequenz (5' - 3')	Revers-Primer	Sequenz (5' - 3')
ND-2795344-for	CGA AAT AAA GAC GAT ACC CA	ND-2795588-rev	GA TTC TGT TTA TGG GGA TTG T
ND-35791-for	CCT ATA TTC TTT AGG AAT CTT G	ND-37249-rev	ATC CTT TAA CGA TTG AAC CAC
ND-52231-for	GTT TAG ACA TGA AAG ATG ATA A	ND-52553-rev	ATC CAC AAC CTC ATT TTT AG
ND-153336-for	A CGA TAT GTA ATA TGT AAA TAC	ND-153900-rev	TA ACT GCT GTA CCG TCT GC
ND-243661-for	ACG GAA GAA CTT ATG AAA AC	ND-243830-rev	TTA TTT CGC TTC GTA ATT TG
ND-338596-for	CGA TCC TAA AAC AGG CGA A	ND-338864-rev	TCT CCC TAC TAC TAT GAT TT
ND-477494-for	GTA ACA ATG TCA AAG AAC GT	G-478695-rev	ACT CTA TCT GTA AGA TCC CC
ND-675775-for	GTA CAT ACG TTT GAA GTT CA	ND-676001-rev	AAT AAT ATA GAA CAA CCT CC
ND-728281-for	AGC AGA CAA TGA AAT GAA AG	ND-728516-rev	CTA GTA TTA AAT CTT TAA CCG
ND-1109979-for	GTA ACT TAA TAA CGA TTT GG	ND-1110204-rev	CCT TTA ATT CTT TCT TAA CA
ND-1331405-for	CAT AGA AAG AGA CAC CTT AA	ND-1331622-rev	TAT CAA GTA AAT CAT CAA GG
ND-1834046-for	TTA GTA ACT AAT TGA GGA ATT	ND-1834896-rev	AAA GAA CGT GTT GAA GGA TT
ND-1908555-for	ATA TTT GCC ATC GTC ATA AA	ND-1908909-rev	AAC TGA ATC AGA TGG TAA AT
ND-1910127-for	TTC CGC AGT TTC TTC ATC TA	ND-1910363-rev	AAT GTT ATT CCT TAT GAT GC
G-1914556-for	TTTCCACTACCTATTTTGGTA	ND-1915769-for	GTA ACA ATG TCA AAG AAC GT
G-2226330-for	TCC CCC TTT GCT CTA TGT AAT T	ND-2227985-rev	TCA CTA CTT GCA CTT TCC AT
ND-2284631-for	AGT ACC TAT TAA CTC TAC AT	ND-2284939-rev	CGC ATA TAA CTT GTT AGA GA
ND-2288324-for	ATA GGT ATT TGC TAT TTT TG	ND-2288529-rev	ATA AAT AGT TGA TAT TCT GTT A
ND-2399442-for	AAT GCC ATC TTT CAT TGA TT	ND-2399709-rev	GCT TTT AAC ATT ATA CAT GC
ND-2409051-for	TTG GAT ACC ATC AAC TCA AA	ND-2409248-rev	GTC TAT GAA TAA TGT TTT CAT
ND-N2089728-for	GGT GAT GCT AAA ACG ATT GC	ND-N2089977-rev	GTT TAT GGG AAG TAG GTA AG
ND-N2131298-for	GAC AAG TTA AAT GAG TTA AGA	ND-N2131532-rev	CG TGT TCT TTT GAA TAG TC

**V. Oligonukleotide, die für die Konstruktion der pBT2-Derivate sowie für die Detektion der Antisense-RNAs von IS256 bzw. IS1181 verwendet wurden.**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' - 3')</b>
catpA3/1551 rev	AAT AAA ATT GAT TTA GAC AAT TGG AAG
catpA3/884 for	CAT TAG GCC TATC TGA CAA TTC C
ermB(XbaI)for	ATA <u>TCT AGA</u> GAA AAA CGA AAT GAT ACA CC
ermB-rev	CTC <u>TCT AGA</u> TTA TTT CCT CCC GTT AAA TAA TAG A
IS-141-for	CCC AGG AGG ACT TTT ACA TGA C
IS-75-rev	GTC GTT AAA AAC ATT GTA CCG TAA
IS-91-rev	CTT TTT ACT TTT ACA CAA TTA TAC GG
ISIRL for	GTA <u>GAA TTC</u> GGA TAA AGT CCG TAT AAT TGT GT
ISIRR rev	TGT <u>TCT AGA</u> TGC TAT ACA ATG TTT TTA CCA TTT C
pBT2 for	AGA GTC ATT ACC CCA GGC GT
pBT2 rev	ATT GTT AGA TTT CAT ACA CGG T
Spc for_HindIII	ACG <u>AAG CTT</u> AGT CAA GTC CAG ACT CCT GTG TAA AAT CGT CCA ATC TAG GGT A
Spc rev_XbaI	AAG <u>TCT AGA</u> TGA ATT TCA CAA GAG GAC
ermB-IRL256Eco-rev	ATA <u>GAA TTC</u> GAT AAA GTC CGT ATA ATT GTG TAA AAT TATT TCC TCC CGT TAA ATA
ermB_BamHI_for	ATA <u>GGA TCC</u> GAA AAA CGA AAT GAT ACA CCA ATC
IS256_BamHI_for	TTT <u>GGA TCC</u> GTA AAA AGG CCA TAT AAC AGT C
IS256_PstI_rev	TAC <u>CTG CAG</u> AGT CAA GTC CAG ACT CCT GTG
IS256_XbaI_revII	TAA <u>TCT AGA</u> AGT CAA GTC CAG ACT CCT GTG TAA AAT GCT ATA CAA TGT TTT TAC CA
RNA0rev	CTC TTC TGC GTA CTT CTT GAT TC
RNA0rev II	GGC TGA TGT TTG ATT GGG GA
RNA141for	AAA ATA TTC AAA AGC TTG CGC
RNA159for	TTC ATG ATT ATA TCG ATC AAC C
RNA100for	AAA GCT TGC GCA TCA TTG GAT G
RNA180for	GTG AGG CTA AAA ATC GAT TGA
RNA200for	ATT CAA AAT CTT TCA GAG AAG CTG
RNA300for	AAA GGA TTA GTC TCT GCC ATT AG
SigA0rev	AGC CTC ACG CGC TAA GTT AAT
SigA194for	TCG TTA TTT CTG ATG CGC AC
SigA214for	CGG TTT ACA AGG TAC GGA AC
SigA89for	GTT GGC AAA GAT GCC AAG TTC
ermB_RNA_for	TTG TTT CAA AAT GGG TCA ATC G
IS1181RNA63for	AAG ACA ACC AAG CCC AAT A
IS1181RNA0rev	AGC TCT AAA AGT TGT ATT TT
IS1181RNA0revII	AAA GAA CTA TTT TTA AAA TAC A
IS1181RNA55for	CAA GCC CAA TAA TGG ACT G
pJet 1.2 for	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC
pJet 1.2 rev	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG
PCR Anchor Primer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C
Oligo d(T)-Anchor Primer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTV

**VI. Sonstige Oligonukleotide.**

Primer	Sequenz (5' - 3')
G2_ins_for	GCT GTT CTA CTT TAA CTG TCA T
G2_ins_rev	AGA CAT AAT CGT CTT CAT ATA C
guaA_for	CATGTATCTTTGTAGACCATG
guaA_rev	AGG ATC TGA AAC ACC TTT TAA T
hemY for	AAA TCA GTG GCT ATT ATA GGA G
hemY rev	TTT ACG ATA CGA TTG AAT CTT TC
SigBfor	GTT TGC CGC GAA TCT ATC AT
SigBrev	GCA AAT TCT ATT TAT GTG CTG CTT
SigBfor3	TCG CGC TGA AAA AGA AGA AT
SigBneu for	CAT TAA TAA GCA AAT TCT ATT TAT GTG C
SigBneu rev	GTA ACT TGT CGA GAC GTT TGC
SigBforII	CA GCA AAA TTG CAA ACG ACA
SigBrevII	GGA CCT ATT TTT GAT TTA GTT GTT TC
SigBfor IV	TAA TGA TTA GTT TAG GGC TGA ATG
SigBrev IV	CA CTT ATC AAT TTT GTC GTT TGC

**Tabelle A 2: Genaue Insertionsstellen von IS256 bzw. IS256-*spc* in den detektierten *sigB*::IS256 Insertionsmutanten von *S. aureus* SA137/93G und *S. aureus* HG001.**

Insertionsmutanten von <i>S. aureus</i>	DR der Insertion in <i>sigB</i>	Orientierung von IS256	Lage der Insertion in <i>sigB</i> (771 bp)
SA137/93G wG12	TTTGAAGC	for	254 bp stromabwärts des Startkodons
HG001 W3	ATATTTTT	rev	51 bp stromabwärts des Startkodons
HG001 W4	ATATTTTT	rev	51 bp stromabwärts des Startkodons
HG001 W6	nicht genau sequenziert	-	-
HG001 W8	GTTAATTT	rev	169 bp stromaufwärts des Stoppkodons



## 8 Publikationen

### Veröffentlichungen in referierten Zeitschriften

**Schreiber, F.**, Szekat, C., Josten, M., Sahl, H. G. and Bierbaum, G., 2013. Antibiotic-induced autoactivation of IS256 in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 6381-4.

**Schreiber, F.**, Kallies, R., Zweynert, A. and Bierbaum, G., Draft Genome Sequences of three Northern German Epidemic *Staphylococcus aureus* strains containing multiple copies of IS256. Manuskript in Vorbereitung

**Schreiber, F.**, Kallies, R., Zweynert, A. and Bierbaum, G., Influence of IS256 on the genome variability of *Staphylococcus aureus*. Manuskript in Vorbereitung

### Poster

**Schreiber F.**, Nagel M., Szekat C., Bierbaum G.: "The role of insertion elements in the evolution of antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*.", 18.-21.03.2012, VAAM-Tagung, Tübingen

**Schreiber, F.**, Szekat, C., Bierbaum, G.: "How insertion sequence elements influence genetic flexibility and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*.", 30.09.-03.10.2012, DGHM-Tagung, Hamburg

**Schreiber, F.**, Szekat, C., Bierbaum, G.: "IS256 - a potent insertion sequence that influences genetic flexibility and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*.", 11.-14.11.2012, 2<sup>nd</sup> International Conference on the Pathophysiology of Staphylococci in the Post-Genomic Era, Kloster Banz

**Schreiber, F.**, Szekat, C., Bierbaum, G.: "The role of the insertion sequence IS256 in genetic flexibility in *Staphylococcus aureus*.", 10.-13.03.2013, VAAM-Tagung, Bremen

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich für meine Promotion keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe, und dass die inhaltlich und wörtlich aus anderen Werken entnommenen Stellen und Zitate als solche gekennzeichnet sind.

Diese Arbeit ist weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit, die an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn oder einer anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorgelegt worden ist. Teile der Dissertation sind vorab an den unter Punkt 8 „Publikationen“ aufgeführten Stellen auszugsweise veröffentlicht worden.

Bonn, Februar 2015

---

Franziska Schreiber