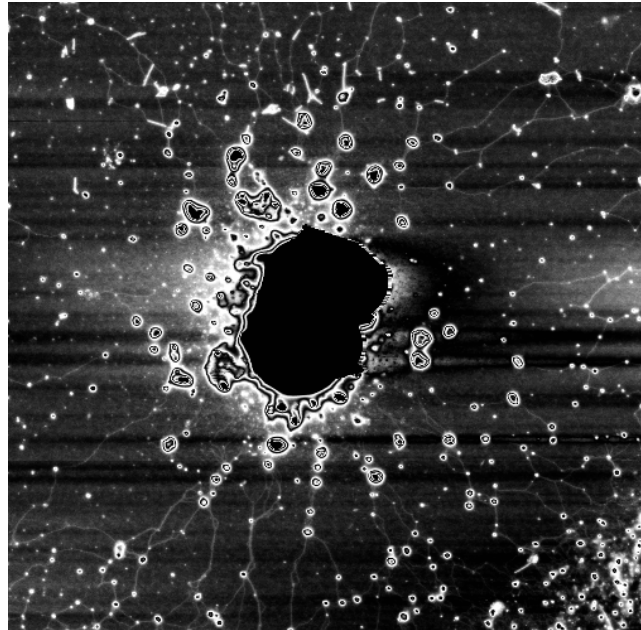


**MODULATION DER BIOFILMBILDUNG IN
STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS
UND
FUNKTIONALE CHARAKTERISIERUNG DER IS256 TRANSPOSASE**



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

vorgelegt von

Susanne Hennig

aus Rostock

Institut für Molekulare Infektionsbiologie

Würzburg 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. J. Hacker

Gutachter: Prof. Dr. J. Reidl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2002 bis April 2006 am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg angefertigt.

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

DANKSAGUNG

Viele Personen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. An dieser Stelle sei deshalb gedankt:

- Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Übernahme des Erstgutachtens und freundliche Unterstützung während meiner Zeit am Institut
- PD Dr. Wilma Ziebuhr für die Betreuung und Diskussionsbereitschaft, die Geduld in schwierigen Phasen meiner Arbeit und ihre große Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik während der Niederschrift der Dissertation
- Prof. Dr. Joachim Reidl für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens
- Prof. Dr. Bernt Eric Uhlén und Dr. Sun Nyunt Wai für zwei fruchtbare Forschungsaufenthalte in Umeå, ihre große Diskussionsbereitschaft sowie ihre persönliche Unterstützung und Hilfe während der Zeit in Schweden. Tack så mycket!
- Stina Berglund und Monica Persson für die kompetente Betreuung und Hilfe bei den AFM-Studien. En jättestor tack! Auch allen anderen Labormitgliedern in Umeå sei für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Aufnahme gedankt, besonders Anna, Annika, Barbro und Jurate.
- allen hilfreichen Händen bei den zeitraubenden Exzisionsversuchen: Katja Dietrich, Elena Katzowitsch und Katharina Schlereth. Danke für Eure Geduld! Elena danke ich auch besonders für die Unterstützung bei der Immunofluoreszenzmikroskopie.
- der ganzen Staphylokokkengruppe für freundliches Miteinander und praktische Hilfe, besonders den Mitstreitern in meinem Labor Martin, Katja, Hennes und natürlich Nadine. Es war schön mit Euch! Besonderen Dank an Martin nicht nur für Hilfe am Computer, sondern auch für die gute Nachbarschaft während all der Zeit.
- allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs 587/2 für wissenschaftliche und unwissenschaftliche Abenteuer
- Claudi für alle Arten von Unterstützung in Würzburg und Schweden (von A wie Ablenkung bis Z wie zitternde Hände ersetzen, Du weißt schon). Es hat Spaß gemacht mit Dir!
- der Truppe, die dafür sorgte, dass ich nie das Mittagessen vergaß: Martin, Stefan, Matthias, Barbara und Claudi. Und dafür, dass ich nicht zum Bowlen musste!
- allen Freunden und lieben Menschen, die mir in schwierigen Phasen Kraft gegeben haben, besonders Kai.
- meinen Eltern und meinem Bruder gilt mein großer Dank für Liebe, Verständnis und Aufmunterung während des Studiums und der Promotion. Ohne Euch wäre ich nie so weit gekommen. Dank besonders an die Familienlektorin, die mir half, die Klippen der Neuen Rechtschreibung erfolgreich zu umschiffen!

INHALTSVERZEICHNIS

1.a	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.b	SUMMARY	3
2.	EINLEITUNG	5
2.1	Mobile genetische Elemente – integraler Bestandteil prokaryotischer Genome	5
2.2	Bedeutung mobiler genetischer Elemente für die Gattung <i>Staphylococcus</i>	7
2.2.1	Allgemeines	7
2.2.2	Mobile genetische Elemente in <i>S. epidermidis</i>	7
2.2.3	Biofilmbildung und Phasenvariation in <i>S. epidermidis</i>	10
2.2.4	Die Insertionssequenz IS256	13
2.3	Transposition von IS-Elementen	15
2.3.1	Allgemeines	15
2.3.2	DNA-Prozessierung und Strang-Transfer	16
2.4.	Zielstellung dieser Arbeit	20
3.	MATERIAL	21
3.1.	Spezielle Laborgeräte/ Hilfsmittel	21
3.2	Chemikalien	21
3.3	Plasmide	22
3.4	Enzyme	23
3.5	Oligonukleotide	24
3.6	Mikroorganismen	26
3.7	Medien	27
3.8	Allgemeine Puffer und Lösungen	27
3.9	Antibiotika und Medienzusätze	28
3.10	Kits	28
3.11	Software	28

4.	METHODEN	29
4.1	Extinktionsmessung	29
4.2	Stammhaltung	29
4.3	Kultivierung	29
4.3.1	Allgemeines	29
4.3.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> für die CaCl ₂ -Transformation	30
4.3.3	Herstellung kompetenter <i>S. aureus</i> für die Elektroporation	30
4.3.4	Herstellung kompetenter <i>S. epidermidis</i> für die Elektroporation	30
4.3.5	Frequenzbestimmung der präzisen Exzision von IS256 in <i>S. epidermidis</i>	31
4.4	Speziesbestimmung	32
4.4.1	Api-Staph	32
4.4.2	16s rDNA-Sequenzierung	32
4.5	Adhärenzassay	32
4.6	Arbeiten mit DNA	33
4.6.1	Isolation chromosomaler DNA aus Staphylokokken	33
4.6.2	Polymerasekettenreaktion	34
4.6.3	PCR-Produktreinigung	34
4.6.4	DNA-Gelelektrophoresis	34
4.6.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	35
4.6.6	Extraktion kleiner DNA-Fragmente aus dem Polyacrylamidgel	35
4.6.7	Phenolextraktion	35
4.6.8	Ethanol-fällung	36
4.6.9	Plasmidisolation im kleinen Maßstab (Minipräp)	36
4.6.10	Plasmidisolation im mittleren Maßstab (Midipräp)	37
4.6.11	Restriktionsverdau	37
4.6.12	Dephosphorylierung von DNA (Antarctic Phosphatase)	37
4.6.13	Ligation von DNA	38
4.6.14	Transformation von Bakterien	39
4.6.14.1	Transformation von <i>E. coli</i> (CaCl ₂ -Methode)	39
4.6.14.2	Transformation von <i>S. aureus</i> (Elektroporation)	39
4.6.14.3	Transformation von <i>S. epidermidis</i> (Elektroporation)	40
4.6.15	Southern Blot	40
4.6.16	DNA-Sequenzierung	43
4.6.17	Pulsfeldgelelektrophorese	44

4.7	Arbeiten mit RNA	46
4.7.1	Allgemeines	46
4.7.2	Extraktion von Gesamt-RNA aus Staphylokokken	46
4.7.3	Northern Blot	47
4.8	Arbeiten mit Protein	49
4.8.1	Gewinnung von Proteinrohextrakten aus <i>Staphylococcus</i>	49
4.8.2	Gewinnung von Zellwandproteinextrakten aus <i>Staphylococcus</i>	49
4.8.3	Zellanzucht und Zellernte bei der heterologen Proteinexpression	49
4.8.4	Zellaufschluss	50
4.8.5	Reinigung der IS256 Transposase mittels Affinitäts-Chromatographie	51
4.8.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	52
4.8.7	Mini-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
4.8.8	Coomassie-Färbung	53
4.8.9	Silberfärbung	54
4.8.10	Western Blot	54
4.8.11	EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)	56
4.9	Mikroskopie	59
4.9.1	Immunofluoreszenzmikroskopie	59
4.9.2	Atomic Force Mikroskopie	60
5.	ERGEBNISSE	63
5.1	Präzise Exzision von IS256	63
5.1.1	Konstruktion einer <i>icaC::IS256</i> und <i>icaC::IS256Δtnp</i> Insertionsmutante	63
5.1.2	Screening nach präziser Exzision von <i>icaC::IS256</i> und <i>icaC::IS256Δtnp</i>	65
5.1.3	Deletion der rechten <i>target site</i> Duplikation von IS256	67
5.1.4	Screening nach präziser Exzision von <i>icaC::IS256</i> und <i>icaC::IS256Δtnp</i> bei deletierter rechter <i>target site</i> Duplikation	69
5.1.5	Konstruktion eines Vektors zur Quantifizierung der präzisen Exzision von IS256	69
5.1.6	Bestimmung der Wahrscheinlichkeit präziser Exzision von IS256	72
5.1.7	Mutation von IS256 und der rechten <i>target site</i> Duplikation im Vektor	73
5.1.8	Bestimmung der Wahrscheinlichkeit präziser Exzision der IS256-Varianten	74
5.1.9	Zusammenfassung der Ergebnisse zur präzisen Exzision von IS256	77

5.2	Phasenvariation durch einen alternativen PIA-unabhängigen Mechanismus zur Biofilmbildung	78
5.2.1	Phänotypischer Vergleich von <i>S. epidermidis</i> CSF41498 WT und CSF41498-1	78
5.2.2	Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf die Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> CSF41498 WT und PIA-negativen Phasenvarianten	83
5.2.3	Zellwandassoziierte Proteine in <i>S. epidermidis</i> CSF41498 WT und PIA-negativen Phasenvarianten	84
5.2.4	Expression von <i>aap</i> und <i>bhp</i> in <i>S. epidermidis</i> CSF41498 WT und PIA-negativen Phasenvarianten	85
5.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse zur alternativen Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> CSF41498-1	88
5.3	Charakterisierung der IS256 Transposase	89
5.3.1	<i>In silico</i> Analyse der IS256 Transposase	89
5.3.2	Überexpression und Reinigung der IS256 Transposase	91
5.3.2.1	Klonierung des <i>tnp</i> -Gens in p-CAL-n-FLAG	91
5.3.2.2	Expression und Reinigung	92
5.3.2.3	Versuche zur Entfernung des N-terminalen <i>tags</i> der CBP-Transposase	93
5.3.2.4	Test auf Funktionalität <i>in vivo</i>	94
5.3.3.	<i>In vitro</i> Experimente zur spezifischen DNA-Bindung	96
5.3.3.1	Bindung von CBP-Transposase an die <i>inverted repeats</i>	96
5.3.3.2	Bindung der CBP-Transposase an <i>inverted repeats</i> mit spezifischen Deletionen	98
5.3.3.3	Bindung der CBP-Transposase an <i>circle junction</i> DNA	100
5.3.3.4	Expression verkürzter CBP-Transposasederivate	104
5.3.3.5	Bindung der verkürzten CBP-Transposasederivate an die <i>inverted repeats</i>	105
5.3.3.6	Expression von CBP-Transposasederivaten mit Einzelaminosäureaustausch	106
5.3.3.7	Bindung der CBP-Transposasederivaten mit Einzelaminosäureaustausch an IR _R	108
5.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der IS256 Transposase	110

6.	DISKUSSION	111
6.1	Präzise Exzision von IS256	111
6.2	Phasenvariation durch alternative Biofilmbildung	118
6.3	Charakterisierung der IS256 Transposase	126
6.4	Fazit und Ausblick	138
7.	LITERATURVERZEICHNIS	139
	ANHANG	
I.	Abkürzungsverzeichnis	151
II.	<i>Atomic force</i> Mikroskopie Aufnahmen	152
III.	Sequenzvergleich IS256 Familie	156

1.a ZUSAMMENFASSUNG

Staphylokokken, insbesondere *Staphylococcus aureus* sowie der Koagulase-negative *Staphylococcus epidermidis*, haben sich in den letzten Jahren als dominante Erreger nosokomialer Infektionen etabliert. Diese erstaunliche Anpassung an eine neue ökologische Nische beruht bei *S. epidermidis* vor allem auf drei Faktoren: (i) der Fähigkeit, Biofilme auf abiotischen Oberflächen auszubilden, (ii) dem Erwerb multipler Antibiotikaresistenzen und (iii) einer hohen genotypischen Variabilität.

Ein markantes Beispiel für genotypische Variabilität ist die Phasenvariation der Biofilmbildung durch Insertion und präzise Exzision der Insertionssequenz IS256 aus dem *ica*-Operon. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der „OFF→ON“ Mechanismus der Phasenvariation, die präzise Exzision von IS256, untersucht. Dabei wurde demonstriert, dass IS256 inklusive der 8 bp *target site* Duplikation in einem Transposase-unabhängigen Prozess vollständig aus dem Chromosom entfernt wird, ohne chromosomale Umordnungen oder neue Insertionen. Präzise Exzision war hingegen abhängig von der Integrität der *target site* Duplikationen. Auch nach Insertion von IS256-Derivaten auf einem Plasmidsystem (*spc::IS256*) konnte präzise Exzision Transposase-unabhängig erfolgen. Die Wahrscheinlichkeit der Exzision für die vollständige IS256-Sequenz betrug in diesem System ca. 1×10^{-11} pro Generation und Zelle. Ab einer Verkürzung der Mikrohomologien zwischen den 8 bp *target site* Duplikationen auf 6 bp war präzise Exzision nicht mehr nachweisbar. Bei Verkürzung der IS256-Sequenz auf ca. 160 bp (*target site* Duplikation und *inverted repeats* blieben intakt) wurde die Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision ca. dreifach erhöht. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass diese Form der illegitimen Rekombination durch *replicational slippage* verursacht wird. Gleichzeitig weisen die Daten darauf hin, dass bei der Phasenvariation durch IS256 Insertions- und Exzisionshäufigkeit im Ungleichgewicht stehen.

Während der Durchführung der Experimente zur präzisen Exzision aus *icaC* wurden nach mehrtägiger Passage häufig Varianten isoliert, die trotz noch vorhandener *icaC::IS256* Insertion starke Biofilmbildner waren. Derartige biofilmpositive, PIA-negative Phasenvarianten wiesen im *Atomic force* Mikroskop einen anderen Phänotyp als der Wildtyp auf. Anstelle von fädiger extrazellulärer Substanz wie beim Wildtyp wurde verstärkt eine polymorphe, aus globulären Untereinheiten bestehende Matrix produziert.

Im Gegensatz zum Wildtyp, der in einem vorrangig polysaccharidbasierten Biofilm wuchs, wurde dieser alternative Biofilm durch Proteinkomponenten vermittelt. Die Regulation des proteinogenen Biofilms unterschied sich vom PIA-Biofilm. Zugabe von 4 % NaCl inhibierte den proteinogenen Biofilm vollständig, während es im Wildtyp die Biofilmbildung induzierte. Zusatz von 3 % Ethanol im Medium bewirkte eine wesentlich stärkere Induktion der Biofilmbildung als beim Wildtyp. Die Transkriptmenge des *accumulation associated protein*, *aap*, war in der Phasenvariante im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Dies spiegelte sich auch auf Proteinebene in einer erhöhten Expression von Aap wider. Die Daten zeigen, dass *S. epidermidis* über einen alternativen Mechanismus der Biofilmbildung verfügt, der zu einer Modulation der IS256-bedingten Phasenvariation der Biofilmbildung führen kann.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die spezifische DNA-Bindung der IS256 Transposase *in vitro* näher charakterisiert. Dazu wurde die IS256 Transposase heterolog überexprimiert und mittels eines N-terminalen *Calmodulin binding tag* (CBP) gereinigt. Im *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) band die CBP-Transposase spezifisch an IR_L bzw. IR_R DNA-Fragmente, zeigte jedoch eine leicht erhöhte Affinität zum IR_R. Durch *Atomic force* Mikroskopie ließ sich die Bindung der CBP-Transposase an die *inverted repeats* innerhalb eines *circle junction* DNA-Fragments sowie unspezifische DNA-Endbindung nachweisen. Deletionen innerhalb der DNA-Sequenz des linken und rechten *inverted repeats* und anschließende EMSA-Experimente demonstrierten, dass die Transposase den inneren Bereich der *inverted repeats* erkennt und bindet. EMSA-Experimente mit verkürzten Transposasederivaten wiesen darauf hin, dass sich das DNA-Bindungsmotiv in der N-terminalen Domäne der Transposase befindet. Die identifizierte Proteinregion (Aa 100-130) umfasste zwei α -Helices, getrennt durch einen kurzen *turn*, mit typischen Charakteristika eines *Helix-turn-helix* Motivs. Durch Punktmutationen wurden sechs konservierte Aminosäuren in diesem Bereich ausgetauscht und der Effekt im EMSA überprüft. Austausch von L103 und L127 gegen den Helixbrecher Prolin hatte keinen Effekt auf das Bindungsverhalten. Die Mutationen Y111→A, G114→W, T117→A und R118→A hingegen führten zu einer stark abgeschwächten Bindung bzw. zum Verlust des Bindungsvermögens. Damit wurde erstmals die DNA-Bindungsdomäne eines Elements der IS256-Familie näher beschrieben.

1.b SUMMARY

During the past decades, Staphylococci, especially *Staphylococcus aureus* and the coagulase-negative *Staphylococcus epidermidis*, have been established as a predominant cause of nosocomial infections. This remarkable adaptation to a new ecological niche by *S. epidermidis* is due to three main factors: (i) the ability to colonize abiotic surfaces as biofilms, (ii) the acquisition of multiple resistances to antibiotics and (iii) a high genotypic and phenotypic variability.

A prominent example of genotypic and phenotypic variability is phase variation in biofilm formation caused by insertion and excision of the insertion sequence IS256 within the *ica* operon. In the first part of this thesis, the mechanism of “OFF→ON” transition, caused by precise excision of IS256 from the *ica* operon, was studied. It was demonstrated that IS256 including the duplicated 8 bp target site is excised completely from the chromosome in a transposase-independent manner, neither accompanied by chromosomal rearrangements nor new insertions. However, precise excision depended on the integrity of the target site duplications. Even after insertion of IS256 onto a plasmid (*spc::IS256*) transposase-independent precise excision was detected. The probability of this event was calculated to be 1×10^{-11} per cell generation. After shortage of the microhomology between the 8 bp target site duplications to 6 bp or less, precise excision was not detectable any longer. Deletion of the transposase gene, leading to a 160 bp IS256 fragment still harbouring complete inverted repeats and flanked by intact target site duplications, enhanced the probability of precise excision about threefold. These observations support the hypothesis that precise excision is caused by the illegitimate recombination process of replicational slippage. Furthermore, the data indicate an imbalance between insertion and excision of IS256 within the phase variation process.

When studying precise excision from *icaC*, strong biofilm producing variants still carrying the *icaC::IS256* insertion were isolated frequently after several days of passaging. Such biofilm-positive, PIA-negative variants showed a phenotype different from the wild type as displayed by Atomic force microscopy. Instead of a fibrous extracellular substance as in the wild type, the variants produced a polymorphous matrix formed by more or less globular substructures. In contrast to the wild type growing in a polysaccharide-mediated biofilm, the alternative biofilm's extracellular matrix consisted of proteins. Regulation of

proteinaceous biofilm formation differed compared to PIA-dependent biofilm. Addition of 4 % sodium chloride abolished proteinaceous biofilm formation completely, while it induced biofilm formation in the wild type. Addition of 3 % ethanol caused a considerably stronger induction of biofilm formation compared to the wild type. The transcript level of accumulation associated protein, *aap*, was enhanced in comparison to the wild type; an observation that was also confirmed at the protein level. Taken together, these data indicate that *S. epidermidis* is capable of switching to an alternative mode of biofilm formation, thus possibly modulating the previously described phase variation by IS256 insertion and excision.

In the third part of this thesis, specific binding of IS256 transposase was characterized *in vitro*. To this end, IS256 transposase was overexpressed heterologously and purified using an N-terminal calmodulin binding tag (CBP). In electrophoretic mobility shift assays (EMSA) CBP-transposase bound to IR_L and IR_R containing DNA fragments specifically, albeit with slightly higher affinity to IR_R. Binding of CBP-transposase to the inverted repeats within circle junction DNA as well as unspecific end binding could be confirmed by Atomic force microscopy. Deletions within the sequence of the right or left inverted repeat revealed that CBP-transposase binds to the inner part of the inverted repeats. EMSA experiments with truncated transposase derivatives suggested a DNA binding motif within the N-terminal domain of the transposase. The identified protein region (amino acid 100 – 130) consists of two α -helices separated by a short turn, displaying typical features of a helix-turn-helix motif. Six conserved amino acid residues within this putative motif were exchanged by point mutations and the effect of the mutation was tested in EMSA. Exchange of L103 and L127 against the helix-breaking amino acid proline had no detectable effect on DNA binding. However, exchange Y111→A, G114→W, T117→A and R118→A strongly reduced or completely abolished DNA binding. This is the first description of a DNA binding domain of a member of the IS256 family.

2. EINLEITUNG

2.1 Mobile genetische Elemente – integraler Bestandteil prokaryotischer Genome

Bakterien sind in ihren natürlichen Habitaten oft schnell wechselnden Umweltbedingungen unterworfen, denen sie stärker als andere, mehrzellige Organismen ausgeliefert sind. Allein durch ihr großes Oberflächen/Volumen-Verhältnis sowie die selektiv permeable Membran mit ihren zahlreichen Transportsystemen befinden sie sich ständig im Austausch mit ihrer Umgebung. Um unter solchen Voraussetzungen erfolgreich überleben zu können, ist eine Vielzahl von Anpassungen nötig.

Derartige Adaptationen können zum einen durch *differentielle Genexpression* erfolgen. Dabei unterscheidet man generell Regulationsmechanismen auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, translationeller und posttranslationeller Ebene. Mechanismen dieser Art ermöglichen eine rasche Antwort auf veränderte Umweltsignale. Zum anderen verfügen Bakterien aber auch über Strategien, sich durch Veränderungen auf *genomischer* Ebene neue ökologische Nischen zu erschließen oder sich in ihren Habitaten zu behaupten. Diese Genomplastizität wird hauptsächlich durch Punktmutationen, Rekombination zwischen homologen DNA-Bereichen und durch die Aktivität transposabler genetischer Elemente wie Insertionssequenzen erreicht (Ziebuhr *et al.*, 1999b). Die genannten Prozesse können einerseits zum Genverlust oder „*gene silencing*“, andererseits zu Veränderungen von Genexpressionsniveaus führen. Darüber hinaus kann aber auch genetisches Material durch horizontalen Gentransfer neu erworben werden (Hacker und Carniel, 2001).

Generell kann man bei den meisten bekannten Bakterienarten dem mehr oder weniger statischen Kerngenom einen flexiblen Genpool gegenüberstellen. Während das Kerngenom alle für essentielle zelluläre Funktionen notwendigen Proteine kodiert, umfasst der flexible Genpool zusätzliche Faktoren, welche die ökologische Fitness der Art oder des Stammes unter bestimmten Umständen verbessern, wie z.B. Antibiotikaresistenzen oder virulenz-assoziierte Faktoren bei pathogenen Arten. Die Struktur des Kerngenoms ist relativ konserviert, der flexible Genpool hingegen repräsentiert variable chromosomale Bereiche (z.B. genetische Inseln), extrachromosomale genetische Elemente wie Plasmide und mobile genetische Elemente, z.B. Bakteriophagen, Transposons, Integrons oder

Insertionssequenzen (Dobrindt *et al.*, 2004). Die Gesamtheit der mobilen DNA in einer Zelle wird auch als Mobilom bezeichnet. Abb. 2.1 gibt einen Überblick über das bakterielle Mobilom und die Funktionsmodule der genetischen Elemente, die zur Gewährleistung von Mobilität bzw. Stabilität benötigt werden. Es wird ersichtlich, dass mobile genetische Elemente verschiedene „Überlebensstrategien“ entwickelt haben und folglich unterschiedliche Funktionsmodule benötigen. Andererseits müssen sie aber auch ähnliche grundlegende Prozesse gewährleisten, um sich in der Zelle erhalten bzw. weiterverbreiten zu können.

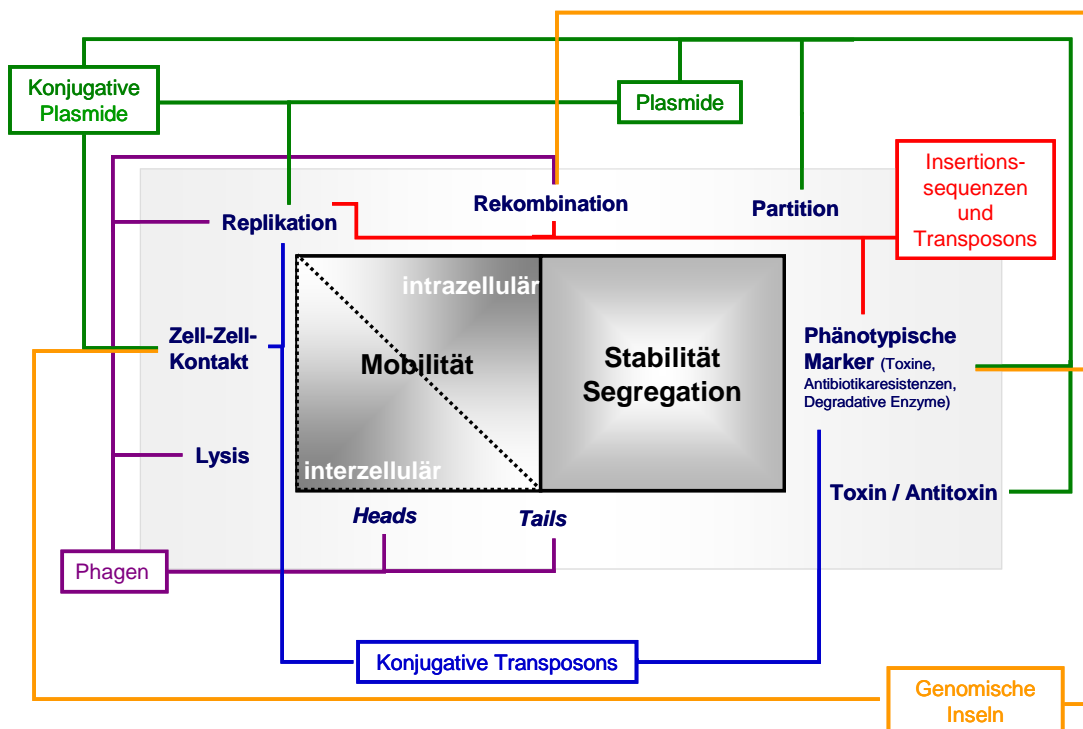


Abb. 2.1: Das bakterielle Mobilom. Die funktionellen Module, die zur Vermittlung der Mobilität einerseits und der Stabilität andererseits notwendig sind, sind in dunkelblauer Schrift bezeichnet. Mobile genetische Elemente sind als farbig umrahmte Kästchen dargestellt. Farbige Verbindungslinien illustrieren die zum jeweiligen mobilen genetischen Element gehörenden Funktionsmodule. *Modifiziert nach <http://aclame.ulb.ac.be/>, 2004*

Mobile genetische Elemente ermöglichen es Bakterien, eine hohe innerartliche Diversität aufrechtzuerhalten. Diese Flexibilität und Diversität ist vor allem dann ein Vorteil, wenn die Art einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt ist. Insbesondere gilt dies für pathogene Bakterien, deren Lebensraum stark durch die Wirtsantwort des Immunsystems und durch den Einsatz von Antibiotika und Desinfektiva geprägt ist.

2.2 Bedeutung mobiler genetischer Elemente für die Gattung *Staphylococcus*

2.2.1 Allgemeines

Staphylococcus aureus und *Staphylococcus epidermidis* sind in der Regel harmlose Kommensalen der menschlichen Haut. Die Ausbreitung dieser gram-positiven Bakterien als Erreger nosokomialer Infektionen in den letzten Jahrzehnten ist ein Beispiel für die erfolgreiche Anpassung an eine spezielle ökologische Nische dank hoher geno- und phänotypischer Variabilität. Inzwischen werden über 50 % aller nosokomialen Infektionen von *S. aureus* und *S. epidermidis* verursacht (Ohlsen *et al.*, 2006). Dies stellt besonders unter dem Aspekt der weit verbreiteten Antibiotikaresistenzen bei Staphylokokken ein ernst zu nehmendes Problem dar. Beide Arten verfügen über eine Reihe mobiler genetischer Elemente, die maßgeblich zur innerartlichen Diversität und zu ihrer Etablierung als „Krankenhauskeime“ beitragen.

2.2.2 Mobile genetische Elemente in *S. epidermidis*

Obwohl *S. epidermidis* (Abb. 2.2) wie auch andere Koagulase-negative *Staphylococcus* Arten lange Zeit als harmloser Kommensale der Haut angesehen wurden, hat diese Art in den letzten Jahrzehnten als Erreger nosokomialer Infektionen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Derartige Infektionen stehen häufig mit der Anwendung von körperfremden Materialien im Zusammenhang und treten hauptsächlich bei schwerkranken und immunsupprimierten Patienten auf (Vuong und Otto, 2002). Dort können sie akute Bakteriämie oder Sepsis hervorrufen. Allein in Deutschland werden jährlich über 2,5 Millionen Fremdkörper wie Katheter, Gelenkprothesen, Herzschrittmacher etc. implantiert, wobei bei bis zu 100 000 Patienten im Jahr größere Komplikationen in Form von Infektionen auftreten (Mack *et al.*, 2004). Die Behandlung solcher fremdkörper-assoziiierter Infektionen wird zudem oft durch Unempfindlichkeit gegenüber Antibiotika erschwert.

S. epidermidis besitzt im Gegensatz zu *S. aureus* mit Ausnahme des δ - und β -Hämolytins weder Exotoxine noch Superantigene. Dies kennzeichnet *S. epidermidis* im Vergleich zu *S. aureus* als den weniger aggressiven Erreger mit häufig subakuten und chronischen Krankheitsverläufen. Der wichtigste Pathogenitätsfaktor von *S. epidermidis* ist offenbar die Fähigkeit, an Biomaterialien zu adhären und dort geschützt von extrazellulärer Matrix

im Biofilm zu persistieren (Costerton *et al.*, 1999; Chicurel, 2000; Vuong und Otto, 2002). Die Art verfügt zusätzlich über eine Reihe von sekretierten Exoenzymen wie Lipasen, Esterasen, Proteasen und Nukleasen, um Nährstoffquellen aus dem Wirt zu erschließen (Ohlsen *et al.*, 2006).

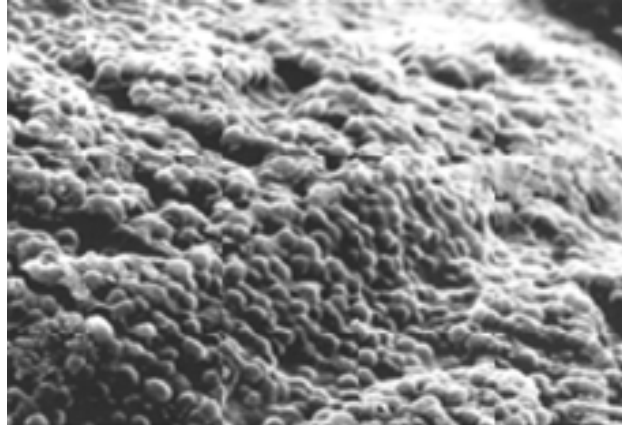


Abb. 2.2: *Staphylococcus epidermidis* Biofilm auf einer Katheteroberfläche. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. C. Hüttinger.

Die Sequenzierung zweier *S. epidermidis* Stämme (klinisches Isolat RP62A und Kommensale ATCC 12228) lieferte neue Erkenntnisse zur genetischen Organisation dieser Art (Zhang *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2005a). Das Genom von *S. epidermidis* umfasst ca. 2,5 Mbp. Bisher wurden drei genomische Inseln, ν Se1, ν Se2 und ν Se γ mit einer Größe zwischen 2,66 kbp und 38,4 kbp identifiziert. ν Se1 und ν Se2 haben ihren Ursprung in integrierten Plasmiden und kodieren eine Cadmiumresistenz bzw. LPXTG-Oberflächenproteine. Die Inseln sind stammspezifisch; ν Se1 kommt im Stamm RP62A, aber nicht im Stamm ATCC 12228 vor, während es bei ν Se2 umgekehrt ist. ν Se γ hingegen tritt in beiden Stämmen auf. Es kodiert u.a. vier β 1 phenollösliche Moduline, die an der Aktivierung des angeborenen Immunsystems beteiligt sind (Vuong *et al.*, 2004a). Neben ihren genomischen Inseln unterscheiden sich die sequenzierten Stämme auch in einem Phagen, der für den Stamm RP62A charakteristisch ist. Es handelt sich um einen *Bacillus subtilis* SP β -ähnlichen Phagen, der durch multiple Rekombinationsereignisse eine mosaikartige Struktur mit mehreren IS-Elementen aufweist. Die Existenz dieses Phagen sowie des *cap* Operons aus *Bacillus anthracis* im *S. epidermidis* Genom weisen auf genetischen Austausch mit Bacilli hin (Gill *et al.*, 2005b).

Wie in *S. aureus* treten auch in *S. epidermidis* alle Typen des SSCmec Elementes auf und können Methicillinresistenz vermitteln (Wisplinghoff *et al.*, 2003). Man spricht in diesem Fall von MRSE (MethicillinResistente Staphylococcus epidermidis). Gegenwärtig sind 80 % der *S. epidermidis* Isolate aus fremdkörperassoziierten Infektionen methicillinresistent, während die Mehrzahl der saprophytischen Isolate keine Resistenzen aufweist (Kozitskaya *et al.*, 2004). Neuere Studien deuten darauf hin, dass der Ursprung der SSCmec Elemente in Koagulase-negativen Staphylokokken liegt und sie von dort durch horizontalen Gentransfer in andere Stämme oder Arten übertragen wurden (Wienders *et al.*, 2001; Hanssen *et al.*, 2004; Mongkolrattanothai *et al.*, 2004; Katayama *et al.*, 2005).

Insertionssequenzen sind autonome genetische Elemente, die nur für ihre eigene Mobilität notwendige Funktionen kodieren. Sie gehören damit zu den kleinsten mobilen genetischen Elementen. Bis heute sind 14 IS-Elemente aus acht IS-Familien in Staphylokokken bekannt (Tabelle 2.1) (Gill *et al.*, 2005b).

Tabelle 2.1: IS-Elemente und Transposons in *S. aureus* und *S. epidermidis*. Nomenklatur nach „IS-Finder“ (<http://www-is.biotoul.fr/is.html>) und Gill *et al.* (2005b).

IS-Element / Transposon	IS Familie	Vorkommen
IS431 (assoziiert mit SSCmec)	IS6	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
IS257 / Tn4003 (<i>drfA</i>), Tn4291	IS6	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
IS256 / Tn4001 (<i>aacA-aphD</i>)	IS256	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
IS1181 / Tn5404	ISL3	<i>S. aureus</i>
IS1182 / Tn5405 (<i>aphA-3</i> , <i>aadE</i>)	ISNCY	<i>S. aureus</i>
IS1272	ISNCY	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i>
ISSep1	n.d.	<i>S. epidermidis</i>
ISSep2	IS110	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>
ISSep3	IS200	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>
ISSau1	IS30	<i>S. aureus</i>
ISSau2	IS3	<i>S. aureus</i>
ISSau4	IS3	<i>S. aureus</i>
ISSau5	IS30	<i>S. aureus</i>
ISSau6	IS6	<i>S. aureus</i>

In Anzahl und Art von IS-Elementen weist *S. epidermidis* Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede zu *S. aureus* auf. Insgesamt besitzen die sequenzierten Genome der Stämme RP62A und ATCC 12228 je 57 Kopien verschiedener IS Elemente (davon einige

verkürzte oder inaktive), während in den sequenzierten *S. aureus* Stämmen nur 10 bis 17 Kopien pro Genom vorliegen. Einige IS-Elemente kommen in beiden Arten vor, z.B. IS256, IS1272 oder IS431, andere finden sich nur in einer Spezies. Dazu gehört z.B. das neu beschriebene IS*Sep1*, das sowohl im Stamm RP62A als auch im Stamm ATCC 12228 mit 13 bis 15 Kopien im Genom das häufigste IS-Element ist. Interessanterweise befinden sich im Genom von *Staphylococcus carnosus*, einer vollständig apathogenen Art, überhaupt keine Kopien von IS-Elementen (Ohlsen *et al.*, 2006). Diese Beobachtung lässt sich als Hinweis auf die Bedeutung von IS Elementen für die Ausbildung neuer, pathogener Varianten auslegen.

2.2.3 Biofilmbildung und Phasenvariation in *S. epidermidis*

Fremdkörperassoziierte Infektionen durch *S. epidermidis* stehen in direktem Zusammenhang mit der Entwicklung vielschichtiger Biofilme auf Polymer- und Metalloberflächen. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ist stammspezifisch. Während die meisten kommensalen Isolate keinen Biofilm ausbilden, sind klinische Isolate in der Regel biofilmpositiv (Kozitskaya *et al.*, 2004). Die Besiedlung inerter Materialien erfolgt in zwei Phasen: (i) primäre Anheftung von Zellen an das Biomaterial und (ii) Akkumulation von Bakterienzellen in vielen Schichten, Glykokalyxbildung und somit Ausbildung eines reifen Biofilms (Abb. 2.3).

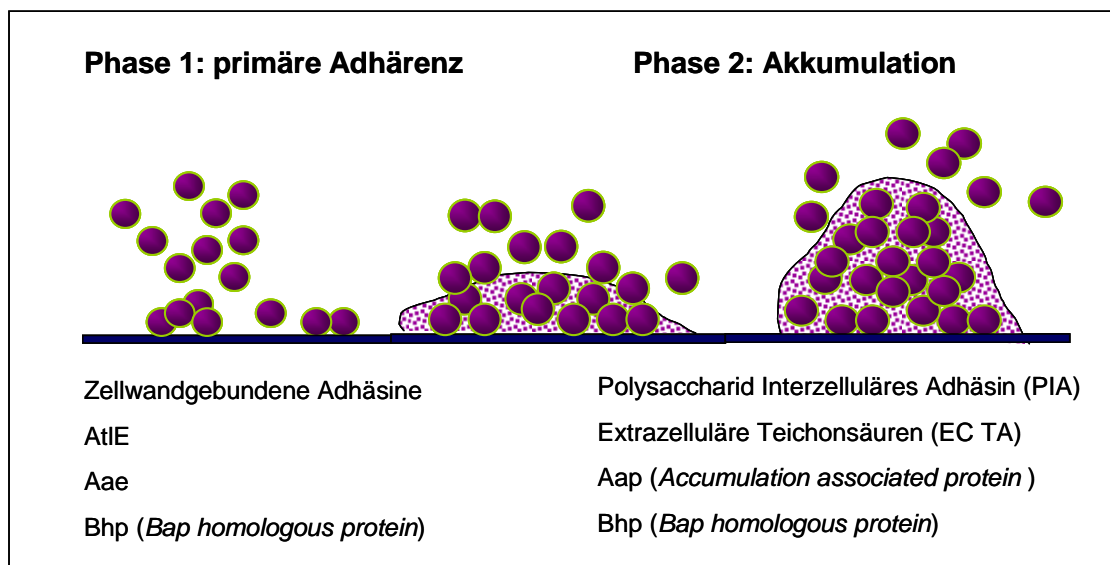


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Entwicklung eines reifen Biofilms und der bekannten daran beteiligten Faktoren.

Die primäre Adhärenz an hydrophobe Kunststoffoberflächen wird vor allem durch die Hydrophobizität der bakteriellen Zelloberfläche bestimmt (Vacheethasane *et al.*, 1998). Im menschlichen Körper werden Plastikoberflächen jedoch sehr schnell von extrazellulären Matrixproteinen überzogen. Deshalb könnte die Interaktion mit Matrix-Proteinen im Vergleich zur direkten Bindung an Kunststoff den wichtigeren Mechanismus für die primäre Adhäsion darstellen (Vuong und Otto, 2002).

S. epidermidis ist in der Lage, an Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Kollagen und Laminin zu binden (Herrmann *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 1994; Heilmann *et al.*, 1997; Bowden *et al.*, 2002). Per *in silico* Analyse wurden 11 zellwandgebundene Proteine mit LPXTG-Motiv identifiziert (Bowden *et al.*, 2005), von denen bislang SdrG (Fbe), Embp, GehD, AtlE und Ebps als potentielle Adhäsine beschrieben wurden (Park *et al.*, 1996; Nilsson *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2001; Bowden *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2002). So bindet das Autolysin AtlE an nicht modifizierte Polymeroberflächen sowie an Vitronectin (Heilmann *et al.*, 1997). Die Bedeutung von AtlE für die Biofilmbildung *in vivo* wurde in einem Ratten-Katheter Tiermodell bestätigt (Rupp *et al.*, 2001). Aae, ein anderes zellwandassoziiertes Autolysin, adhärirt an Fibrinogen und Fibronectin (Heilmann *et al.*, 2003) Ein weiteres in die primäre Adhärenz involviertes Protein ist Bap, das allerdings auch Bedeutung für die akkumulative Phase der Biofilmbildung hat (Cucarella *et al.*, 2001; Tormo *et al.*, 2005).

Während der zweiten Phase der Biofilmbildung wird von den Bakterien eine extrazelluläre Matrix produziert, in die die Zellen eingebettet liegen. Diese Matrix besteht zumeist aus einem Polysaccharid, PIA (*Polysaccharid Intercellular Adhesin*). PIA ist ein Homoglykan aus β -1,6-verknüpften N-Acetylglukosaminresten (Mack *et al.*, 1994; Mack *et al.*, 1996; McKenney *et al.*, 1998). Ca. 30 % der Reste sind deacetyliert und ca. 20 % des PIA trägt eine negative Nettoladung aufgrund partieller O-Succinyl-Substitutionen (Sadovskaya *et al.*, 2005). Die für die PIA-Synthese verantwortlichen Gene sind im *icaADBC*-Operon organisiert (Heilmann *et al.*, 1996). *icaA* und *icaD* kodieren eine Glykosyltransferase, während IcaC, ein Membranprotein, in den Export des synthetisierten Polysaccharid involviert zu sein scheint (Gerke *et al.*, 1998). Die Funktion von IcaB wurde erst kürzlich aufgeklärt; das Protein vermittelt die partielle Deacetylierung des Poly-N-Acetylglukosamins (Vuong *et al.*, 2004b) Neben seiner Funktion als interzelluläres Adhäsion ist PIA auch für die Hämagglutinationsaktivität von *S. epidermidis* verantwortlich

(Rupp *et al.*, 1995). Das *ica*-Operon ist in der Mehrzahl der klinischen Blutkulturisolat (85 %), aber nur selten in Saprophyten (6 %) nachweisbar (Ziebuhr *et al.*, 1997; Frebourg *et al.*, 2000; Kozitskaya *et al.*, 2004). Es wird deshalb auch als molekularer Marker zur Identifizierung pathogener *S. epidermidis* Isolate herangezogen. In verschiedenen Tiermodellen konnte die zentrale Bedeutung der PIA-Synthese für die Virulenz von *S. epidermidis* demonstriert werden (Mack *et al.*, 1994; Rupp *et al.*, 1999a; Rupp *et al.*, 1999b).

Neben PIA tragen auch Proteine zur interzellulären Adhäsion bei, wie das bereits erwähnte Bhp sowie das *accumulation associated protein*, Aap (Hussain *et al.*, 1997). Neuere Arbeiten zeigen, dass Aap für die PIA-unabhängige Zellakkumulation in *ica*-negativen Isolaten verantwortlich ist (Rohde *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2005). Der Wirkmechanismus von Aap konnte jedoch bisher nicht geklärt werden.

Als weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix von *S. epidermidis* RP62A wurden extrazelluläre Teichonsäuren (EC TA) nachgewiesen (Hussain *et al.*, 1991; Hussain *et al.*, 1992; Hussain *et al.*, 2001; Sadovskaya *et al.*, 2005). EC TA sind auch in biofilmpositiven, PIA-negativen Isolaten Koagulase-negativer Staphylokokken neben proteinogenen Komponenten die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix (Kogan *et al.*, 2006).

Die Regulation der Biofilmbildung ist relativ komplex. Die Stärke des produzierten Biofilms variiert einerseits beträchtlich zwischen verschiedenen Stämmen, andererseits auch innerhalb eines Stammes in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen. So kann Biofilmbildung beispielsweise durch Glukose (Mack *et al.*, 1992), subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen (Rachid *et al.*, 2000b), Eisenlimitation (Deighton und Borland, 1993), Temperaturerhöhung, hohe Osmolarität (Rachid *et al.*, 2000a), anaerobes Wachstum (Cramton *et al.*, 2001) oder Ethanol (Knobloch *et al.*, 2001) induziert werden. Als in die Biofilmbildung involvierte Regulatoren wurden bislang in *S. epidermidis* SigB, RsbU (Knobloch *et al.*, 2001), das *agr* und das *luxS* Quorum sensing System (Vuong *et al.*, 2003; Vuong *et al.*, 2004c; Xu *et al.*, 2006) und IcaR (Conlon *et al.*, 2002) identifiziert.

Neben Regulationsmechanismen auf transkriptioneller Ebene können die PIA-Produktion und somit die Biofilmbildung aber auch auf genetischer Ebene beeinflusst werden. So zeigten frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass sich aus biofilmpositivem *S.*

epidermidis Isolaten durch Passagieren mit einer Häufigkeit von 1,4 bis $1,9 \times 10^{-6}$ pro Generation und Zelle neue, biofilmnegative Varianten isolieren lassen (Ziebuhr *et al.*, 1999a). Diese Varianten gliedern sich generell in drei Untergruppen. Zur ersten Gruppe gehören biofilmnegative Varianten, deren *ica*-Operon intakt bleibt. Der biofilmnegative Phänotyp entsteht durch Veränderungen auf regulatorischer Ebene (Loessner, 2002). In der zweiten Gruppe wird das *ica*-Operon z.B. durch Deletionen oder umfangreiche Rekombinationsereignisse irreversibel inaktiviert bzw. geht ganz verloren (Ziebuhr *et al.*, 2000a). Bei der dritten Gruppe handelt es sich um Phasenvarianten, da hier der PIA-negative Phänotyp wieder in einen PIA-positiven Phänotyp revertieren kann. Dies wird durch Insertionen von IS256 in *icaA* oder *icaC* verursacht, die für ca. 30 % der biofilmnegativen Varianten verantwortlich sind (Ziebuhr *et al.*, 1999a). Wird das IS-Element mit *target site* Duplikation (siehe 2.2.3) nach wiederholten Passagen wieder präzise herausgeschnitten, kann das *ica*-Operon wieder vollständig transkribiert und PIA synthetisiert werden. Die Rate der präzisen Exzision ist mit $< 10^{-8}$ pro Generation und Zelle allerdings bedeutend niedriger als die IS256-Insertionsrate (Ziebuhr *et al.*, 1999a).

Insertionen von IS256 ins *ica*-Operon treten nicht nur *in vitro* auf, sondern wurden auch in klinischen Isolaten nachgewiesen (Cho *et al.*, 2002). Außerdem kann IS256 die PIA-Expression nicht nur durch Insertion im *ica*-Operon beeinflussen. So wurde kürzlich gezeigt, dass Inaktivierung von *rsbU* oder *sarA* durch IS256-Insertion ebenfalls zu einer verminderten PIA-Produktion führen kann (Conlon *et al.*, 2004). IS256 kann darüber hinaus auch größere Deletionen durch Rekombination zwischen zwei entfernten IS256 Kopien verursachen (Loessner, 2002). Zusätzlich kann Phasenvariation in der Biofilmbildung auch in IS256-negativen Stämmen beobachtet werden. Es muss also noch weitere, bisher unbekannte Faktoren geben, die eine derartige Phasenvariation verursachen können.

2.2.4 Die Insertionssequenz IS256

Die Insertionssequenz IS256 wurde erstmals als Bestandteil des ca. 4,5 kbp großen Transposons Tn4001 (GenBank *accession number* M18086) beschrieben (Lyon *et al.*, 1987b), das in Staphylokokken und Enterokokken auftritt. Auf dem Transposon wird das Resistenzgen *aacA-aphD*, das ein bifunktionales AAC(6')-APH(2'')-modifizierendes Enzym kodiert, von zwei IS256-Elementen flankiert (Byrne *et al.*, 1989). *aacA-aphD*

vermittelt Resistenz gegen die Aminoglykoside Gentamycin, Tobramycin und Kanamycin (Lyon *et al.*, 1987a). Sowohl Tn4001 als auch IS256 allein treten auf Plasmiden (v.a. auf Multiresistenzplasmiden der pSK1-Familie), aber auch chromosomal kodiert auf (Gillespie *et al.*, 1987).

IS256 ist 1324 bp lang. Es enthält einen einzigen 1172 bp langen Leserahmen (*tnp*), der für ein 390 Aminosäuren großes Protein, die Transposase, kodiert (Abb. 2a). Stromaufwärts des Leserahmens befinden sich ein putativer Promotor P1 (TTGTGT - 17nt – TATAAC) mit Ähnlichkeit zur *Bacillus subtilis* σ^A Konsensussequenz sowie eine potentielle Ribosomenbindungsstelle (CAGGAGG), ebenfalls mit starker Ähnlichkeit zur *Bacillus subtilis* Konsensussequenz (AAAGGAGG). Neben P₁ existieren noch zwei weitere potentielle, nach außen gerichtete Promotoren P₂ (nt 1272 bis 1299) und P₃ (nt 143 bis 115) (Abb. 2a) sowie eine -35 Box am äußersten Ende der Sequenz (IR_R) und eine -10 Box ganz am Beginn (IR_L), die bei Insertion in passendem Abstand zu einer -10 Box einen potenten Hybridpromotor formen können (Mahillon und Chandler, 1998). Die Bedeutung der -35 Box im IR_R von IS256 für die Bildung solcher Hybridpromotoren und die daraus folgende Aktivierung benachbarter Gene wurden am Beispiel von *Ilm* in *S. aureus* (Maki und Murakami, 1997) und *mecA* in *S. sciuri* demonstriert (Couto *et al.*, 2003).



Abb. 2.4: IS256. a) Struktur von IS256. Schwarz ist der Leserahmen der kodierten Transposase dargestellt. Hellgraue Boxen markieren die Imperfect Inverted Repeats (IR). P1-3 bezeichnet die vorhandenen Promotorstrukturen; D, D, E deuten die Position des katalytischen Motivs der Transposase an. Links und rechts der IS256 Sequenz wurde eine durch Insertion erzeugte 8 bp Target site Duplikation illustriert. b) Sequenz der Inverted repeats. Die 17 identischen Nukleotide sind grau hinterlegt.

An den beiden Enden des Elements befinden sich *Inverted Repeats* (IR_L und IR_R), die imperfekt sind, d.h. lediglich 17 bp der 26 bp stimmen überein (Abb. 2.4b) (Byrne *et al.*,

1989). Ungewöhnlich für die *Inverted repeats* ist dabei, dass die äußersten zwei Nukleotide nicht identisch sind.

Die IS256 Transposase (Tpase) gehört zur Transposase-Mutator Proteinfamilie, die wiederum der Superfamilie der Polynukleotidyltransferasen zuzurechnen ist. Hierzu zählen auch andere Enzyme wie RNaseH oder die RuvC Resolvase, die Phosphoryltransferreaktionen vermitteln (Rice *et al.*, 1996). IS256 Transposase besitzt ein klassisches DDE-Motiv, die konservierte Aminosäuretriade der katalytischen Domäne der meisten Transposasen und retroviralen Integrasen. Bei Insertion des IS-Elementes entstehen durch um 8 bp versetztes Schneiden der DNA-Stränge und eine anschließende Wiederauffüllreaktion charakteristische 8 bp *target site* Duplikationen links und rechts von IS256 (Abb. 2.4a). Kürzlich konnte demonstriert werden, dass die IS256 Transposase die Bildung zirkulärer IS- oder Transposonintermediate katalysiert, bei denen das linke und rechte IS-Ende durch einen kurzen Linker verbunden sind (Loessner *et al.*, 2002; Prudhomme *et al.*, 2002).

Während Tn4001 und IS256 zunächst als zur Typisierung geeignete relativ stabile Genombestandteile angesehen wurden (Deplano *et al.*, 1997), ist inzwischen bekannt, dass IS256 außerordentlich aktiv ist und damit vielfältige Veränderungen im Genom verursachen kann, wie z.B. Genaktivierungen oder –inaktivierungen durch Insertion, aber auch große chromosomale Umordnungen oder Deletionen durch Rekombination zwischen zwei IS256 Kopien (Ziebuhr *et al.*, 1999a; Ziebuhr *et al.*, 2000a; Ziebuhr *et al.*, 2000b; Ziebuhr *et al.*, 2001). Interessanterweise tritt IS256 (zusammen mit SCCmec und dem *ica* Operon) weitaus häufiger in klinischen (47 bis 87 %) als in saprophytischen (4,8 %) *S. epidermidis* Isolaten auf. Andere IS-Elemente wie IS257 oder IS1272 sind hingegen in pathogenen und saprophytischen Isolaten gleich häufig vertreten (Kozitskaya *et al.*, 2004; Kozitskaya *et al.*, 2005).

2.3 Transposition von IS Elementen

2.3.1 Allgemeines

Transposable Elemente wurden zuerst von Barbara McClintock durch eine Reihe eleganter Experimente in Mais entdeckt (McClintock, 1951). Sie werden definiert als diskrete DNA-

Segmente, die in der Lage sind, sich innerhalb von oder zwischen verschiedenen Genomen von einem Lokus zum anderen zu bewegen. Transposable Elemente sind in allen drei Domänen des Lebens vertreten und spielen eine fundamentale Rolle als Motoren der Genomplastizität (Haren *et al.*, 1999). Generell unterscheidet man transposable Elemente zunächst daran, ob die Transposition über ein RNA-Zwischenstadium verläuft oder ob ausschließlich DNA-Intermediate vorkommen. DNA-Elemente (Transposons und Insertionssequenzen) treten in allen Domänen auf, während Retroviren und Retrotransposons, die RNA-Intermediate zur Transposition nutzen, auf Eukaryoten beschränkt sind.

Insertionssequenzen stellen den einfachsten und vermutlich auch häufigsten Typ von transposablen DNA-Elementen dar. Derzeit sind über 600 bakterielle IS-Elemente, die in mehr als 17 IS-Familien eingeordnet werden, bekannt (Mahillon *et al.*, 1999). Transposition kann dabei so unterschiedliche Folgen wie Fusion zweier DNA-Moleküle, Inversionen, Deletionen, Duplikationen oder Translokation fremder DNA haben (Turlan und Chandler, 2000). Diese *Rearrangements* werden von Transposasen (Tpasen) katalysiert, deren größte Untergruppe die Klasse der DDE-Transposasen darstellt. Eine fundamentale Gemeinsamkeit dieser Klasse von Transposasen ist die von ihnen katalysierte Reaktion: der nukleophile Angriff eines der zwei DNA-Stränge am Ende des IS-Elements, der zur Entstehung eines freien 3'OH-Endes führt.

Die große Mehrzahl der IS-Elemente besitzt an ihren Enden kurze *inverted repeat* (IR) Sequenzen. Diese IRs lassen sich in zwei funktionelle Domänen unterteilen: einen inneren Bereich, der an der Erkennung und Bindung der Transposase beteiligt ist und einen äußeren, der die terminalen 2 oder 3 bp umfasst und für die katalytische Spaltung der DNA und den folgenden Strangtransfer benötigt wird (Mahillon und Chandler, 1998).

2.3.2 DNA-Prozessierung und Strang-Transfer

Die eigentliche Transpositionsreaktion ist in mehrere Schritte unterteilt: (i) nach der Bindung der Transposase an die Enden des Transposons wird ein synaptischer Komplex gebildet, bestehend aus Transposase, eventuell zusätzlichen Proteinen und beiden Transposonenden, sowie gleichzeitige oder nachfolgende Rekrutierung der Ziel-DNA, gefolgt von (ii) DNA-Hydrolyse und Strangtransfer der Transposonenden zur Ziel-DNA

und (iii) Prozessierung des Strangtransfer-Intermediats zu einem Endprodukt. Die für diese Schritte notwendigen DNA-Protein-Komplexe werden auch als Transpososom bezeichnet (Mahillon und Chandler, 1998; Turlan und Chandler, 2000).

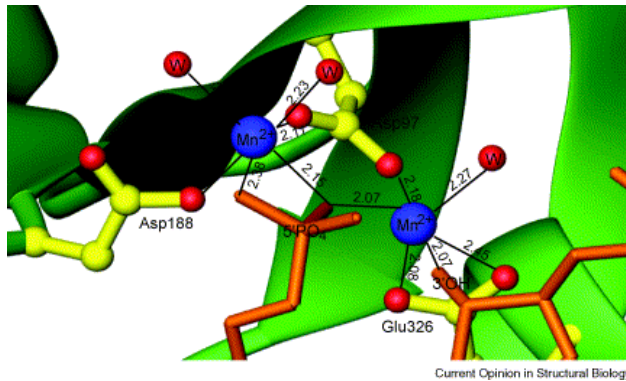


Abb. 2.5: Aktives Zentrum der Tn5 Transposase. Die katalytische Triade DDE koordiniert zwei Mn^{2+} -Ionen. Jedes Mn^{2+} besitzt 6 Liganden: die geladenen DDE Reste, mehrere Wassermoleküle (rote „W“-Bälle), den 5'-Phosphatrest des nicht transferierten DNA-Strangs und den 3'-OH-Rest des transferierten Strangs (DNA in orange). Aus Steiniger-White et al., 2004.

Alle DDE-Transposasen katalysieren die Spaltung der DNA am 3'-Ende des Elements. Dies erfolgt durch einen nukleophilen Angriff, in der Regel von einem Wassermolekül ausgehend, und führt zur Freisetzung einer 3'-OH-Gruppe, die wiederum selber als Nukleophil wirkt und in einer Transveresterungsreaktion eine 5'-Phosphatgruppe der Ziel-DNA angreift. Diese Reaktion benötigt keine zusätzliche Energie und beinhaltet keine kovalente Bindung zwischen Enzym und Substrat. Die Funktion der hochkonservierten Aminosäuretriade Aspartat-Aspartat-Glutamat (DDE) besteht dabei darin, in einer „katalytischen Tasche“ zwei divalente Metallionen (meist Mg^{2+}) zu koordinieren. Diese werden für die Katalyse der verschiedenen nukleophilen Angriffe benötigt (Abb.2.6).

Bei Transpositionsreaktionen können zwei generelle Typen unterschieden werden, in Abhängigkeit davon, ob das Transposon an das DNA-Donormolekül gebunden bleibt oder ausgeschnitten wird. Im ersten Fall wird nur das 3'-Ende geschnitten und das Donor-DNA-Rückgrat bleibt einzelsträngig an das 5'-Ende des Transposons gebunden. Durch Transfer des 3'-Endes zu einer Zielsequenz entsteht eine potentielle Replikationsgabel. Auf diese Weise entstehen Kointegrate (Fusionen) aus Donor- und Zielsequenz. Dieser replikative Weg (Abb. 2.6) wird z.B. vom Bakteriophagen Mu und höchstwahrscheinlich von Elementen der Tn3 und IS6 Familien genutzt (Turlan und Chandler, 2000).

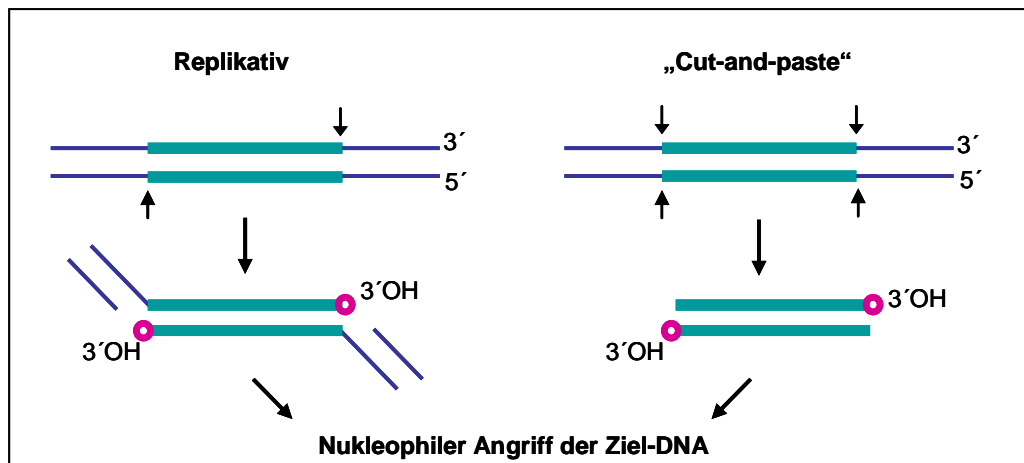


Abb. 2.6: Einzel- und Doppelstrangspaltung an den Enden des Transposons. Das Transposon ist in türkis, die Donor-DNA in blau, freie 3'-OH-Enden als violette Kreise dargestellt. Nukleophile Angriffe, die zur Entstehung freier 3'-OH-Enden führen, sind durch Pfeile markiert. Nach Turlan und Chandler, 2000.

Beim zweiten Typ von Transposition wird das Transposon vor dem Strangtransfer aus der Donor-DNA freigesetzt (Abb. 2.6). Dieser so genannte „Cut-and-paste“ Mechanismus trifft z.B. für Tn7 (Craig, 1996), IS10 (Kleckner *et al.*, 1996), IS50 (Reznikoff, 1993) und Elemente der IS3-Familie wie IS911 (Polard *et al.*, 1996) zu. Obwohl all diesen Elementen als erster Schritt die Erzeugung eines freien 3'-OH-Endes durch Hydrolyse des ersten DNA-Stranges gemeinsam ist, nutzen sie doch unterschiedliche Mechanismen zur Auflösung des zweiten Stranges und Erzeugung eines freien 5'-Endes (Turlan und Chandler, 2000). Drei Strategien, nach denen bakterielle IS-Elemente dieses Typs die Freisetzung des 5'-Endes erreichen, sind im Folgenden kurz dargestellt.

1. Spaltung des transferierten und des nicht transferierten Strangs durch zwei Enzyme (Abb. 2.7/1):

Wenn gleichzeitig mit den 3'-Enden auch die 5'-Enden geschnitten werden, wird das Transposon komplett aus der Donorsequenz freigesetzt und kann nachfolgend in eine Ziel-DNA inseriert werden. Tn7 nutzt für diese einfache Insertionsstrategie neben der DDE-Transposase TnsA ein zweites Enzym, TnsB, das für die Spaltung der 5'-Enden verantwortlich ist (Craig, 1996).

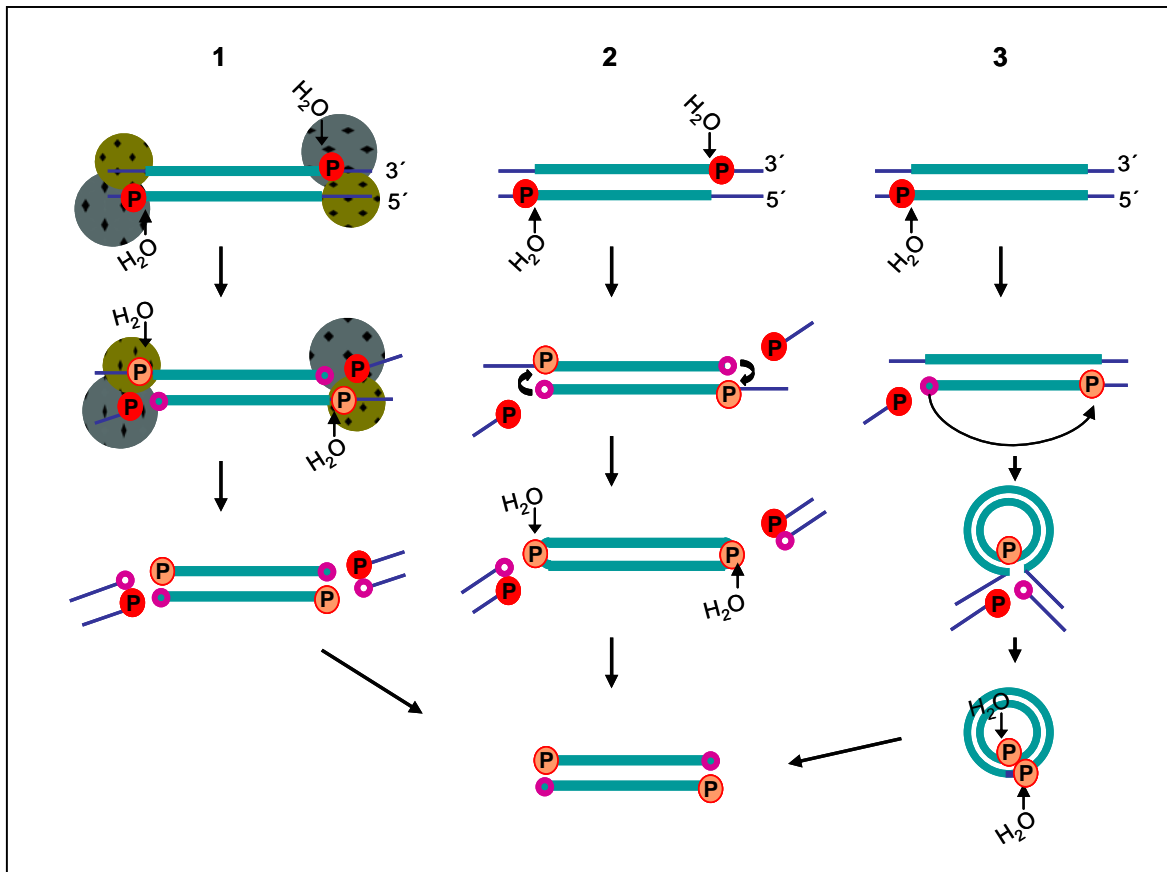


Abb. 2.7: DNA-Strangtransfer bei „Cut and paste“-Transposition. Transposon-DNA = türkis, Donor-DNA = blau, freie 3'-OH-Gruppe = violetter Kreis, Phosphatgruppe = rot / rötlich umkreistes P, TnsA = blauer Kreis, TnsB = gelbgrüner Kreis. Kleine Pfeile indizieren nukleophile Angriffe. (1) Tn7: Freisetzung der 3'-OH-Gruppe katalysiert von TnsA und Freisetzung des 5'-Endes durch ein zweites Enzym, TnsB. (2) Nukleophiler Angriff der der 3'-OH-Gruppe benachbarten Phosphatgruppe des gegenüberliegenden DNA-Strangs, Transveresterung und daraus resultierende Haarnadelbildung. Freisetzung des 5'-Endes durch anschließende Hydrolyse der Haarnadelstruktur. (3) Nukleophiler Angriff einer freien 3'-OH-Gruppe am selben DNA-Strang des entgegengesetzten Transposonendes und nachfolgende Prozessierung zum kovalent geschlossenen Doppelstrangzirkel. Freisetzung des 5'-Endes durch Hydrolyse der circle junction des Transposonzirkels. Alle Mechanismen führen zur Entstehung eines freien Transposons, das erneut integrieren kann. **Modifiziert nach Turlan und Chandler, 2000.**

2. Haarnadelbildung (Abb. 2.7/2):

In einem alternativen Mechanismus, z.B. bei IS10 und IS5, kann eine einzige Transposase Doppelstrangspaltung katalysieren (Kennedy *et al.*, 1998; Bhasin *et al.*, 1999). Dabei greift das im ersten Schritt entstandene frei 3'-OH am komplementären DNA-Strang genau gegenüber an. Dies führt zu einem Doppelstrangbruch der Donor-DNA und der Ausbildung einer Haarnadelstruktur am Transposonende; das Element wird aus der Donor-DNA freigesetzt. Schließlich kann die Einzelstrangbrücke wieder aufgelöst werden und der Transfer in die Ziel-DNA erfolgen (Mahillon und Chandler, 1998).

3. Zirkelbildung (Abb. 2.7/3):

In einer weiteren Variante greift die freie 3'-OH-Gruppe das 5'-Ende des Elementes auf demselben Strang an. Die so entstehenden Intermediate werden anschließend unter Beteiligung von Wirtsenzymen zu freien Transposonzirkeln prozessiert und können im Anschluss wieder in eine Ziel-Sequenz integrieren. Dieser Mechanismus wurde besonders gut bei IS911, einem Element der IS3-Familie, charakterisiert, tritt aber auch bei IS-Elementen anderer Familien wie z.B. IS256 auf (Polard und Chandler, 1995; Ton-Hoang *et al.*, 1997; Ton-Hoang *et al.*, 1998; Ton-Hoang *et al.*, 1999; Loessner *et al.*, 2002; Prudhomme *et al.*, 2002). Da im Falle von IS911 nur ein DNA-Strang ausgeschnitten und repliziert wird, während der zweite in die Donor-DNA inseriert bleibt, spricht man bei diesem Mechanismus auch von „Copy-and-paste“ (Duval-Valentin *et al.*, 2004).

2.4 Zielstellung dieser Arbeit

Die Mehrzahl klinischer *Staphylococcus epidermidis* Isolate besitzt - im Gegensatz zu saprophytischen Isolaten - multiple Kopien der Insertionssequenz IS256. Dieses Element kann besonders den wichtigsten Virulenzfaktor von *S. epidermidis*, die Fähigkeit zur Biofilmbildung, durch Insertionen ins *ica*-Operon modulieren. Dieser Vorgang ist reversibel und kann deshalb Phasenvariation in der Biofilmbildung verursachen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche molekularen Mechanismen für die präzise Exzision des IS256-Elementes aus dem *ica*-Operon verantwortlich sind und welchen Einfluss sie auf die Modulation der Biofilmbildung ausüben.

IS256 transponiert mittels eines ungewöhnlichen Mechanismus' über zirkuläre Intermediate. Bisher wurde jedoch keine Transposase aus der IS256-Familie näher charakterisiert. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte deshalb die Funktion der IS256 Transposase durch *in vitro* Experimente genauer analysiert werden. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Charakterisierung der DNA-Erkennung und DNA-Bindung durch die Transposase, dem ersten Schritt der Transposition.

3 MATERIAL

3.1 Spezielle Laborgeräte / Hilfsmittel

Tabelle 3.1: Bezugsquellen spezieller Laborgeräte.

Gerätetyp	Hersteller
Chemilumineszenzkamera Chemi Lux	Intas, Göttingen
DNA-Elektrophoresekammer	Institutswerkstatt / BioRad, Hercules, USA
Elektroblotter	Institutswerkstatt
Elektroporationsgerät	Easyject prima, Equibio, Kent, UK
ELISA-Reader	BioRad, Hercules, USA
Gene Linker	BioRad, Hercules, USA
Konfokalmikroskop	Axiolab HBO50, Zeiss, Oberkochen
Mini-Protean® II	BioRad, Hercules, USA
Nanoscope III Multimode AFM	Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA
Protean® II xi Cell	Biorad, Hercules, CA, USA
Pulsfeldgelelektrophoresekammer	BioRad, CHEF-DR® III, Hercules, USA
Savant FastPrep	Bio101, Carlsbad, Calif., USA
Typhoon™ Scanner	GE Healthcare Lifescience, Little Chalfont, UK
Ultraschallsonde, Tip UW70	Bandelin Sonoplus HD70; Berlin
Vacuum blotting system VacuGene XL	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Tabelle 3.2: Bezugsquellen spezieller Hilfsmittel.

Hilfsmittel	Hersteller
Calmodulin Affinity Resin	Stratagene, La Jolla, USA
Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe
FastPrep Tubes, Lysing Matrix E	Bio101, Carlsbad, Calif., USA
Hyperfilm ECL™	GE Healthcare Lifescience, Little Chalfont, UK
Nitrocellulose-Membran	Schleicher&Schuell Bioscience, Dassel
Nylonmembran (positiv geladen)	Schleicher&Schuell Bioscience, Dassel
VivaSpin 15R Concentrator	Vivascience, Hannover

3.2 Chemikalien

Tabelle 3.3: Bezugsquellen verwendeter spezieller Chemikalien.

Substanz	Hersteller
Complete Mini, EDTA free	Roche, Mannheim
Cy3-konjugierter goat- α -mouse	Jackson immunoresearch, Cambridgeshire, UK
Cy3-konjugierter goat- α -rabbit	Jackson immunoresearch, Cambridgeshire, UK
GeneRuler™ 1 kb DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ DNA ladders, low range	Fermentas, St. Leon-Rot
HRP-konjugierter goat- α -rabbit	Dianova, Hamburg
HRP-konjugierter goat- α -mouse	Dianova, Hamburg
Lambda Ladder PFG Marker	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Low Range PFG Marker	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Protein Full range Rainbow marker RPN800	GE Healthcare Lifescience
Roti®-Nanoquant	Roth, Karlsruhe
α -FLAG-tag monoclonal M2 mouse	Sigma, Taufkirchen

Alle weiteren, nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe) bzw. Serva (Heidelberg) bezogen.

3.3 Plasmide

Tabelle 3.4: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
puc18	Amp ^R . <i>lacZ</i> _a , ori ColE1	Messing, 1983; Norrander <i>et al.</i> , 1983
pGEM [®] -T easy	AT-Klonierungsvektor, Amp ^R . <i>lacZ</i> _a , ori ColE1	Promega, Mannheim
pBT2	Shuttlevektor für <i>E. coli</i> und <i>Staphylococcus</i> , ori ColE1, p194	Brückner, 1997
pCAL-n-FLAG	Replikonbasierter T-sensitiver ori für <i>Staphylococcus</i> , Amp ^R , Cm ^R	Stratagene
pACYC184	Proteinexpressionsvektor, ori pBR322, lacIq, pT7/lacO, Amp ^R	
pIL2	Cm ^R , Tet ^R , ori p15A	Chang und Cohen, 1978
pIL2Δ <i>tnp</i>	Shuttlevektor pRB472 mit <i>icaC</i> ::IS256 Insertion	Loessner, 2002
pIL2-D167A	Shuttlevektor pRB472 mit <i>icaC</i> ::IS256 Insertion	Dittrich, 2002
pSH1	Shuttlevektor pRB472 mit <i>icaC</i> ::IS256 Insertion	diese Arbeit
pSH1Δ <i>tnp</i>	Aminosäureaustausch IS256 Transposase D167→A	diese Arbeit
pSH2	Shuttlevektor pBT2 mit <i>icaC</i> ::IS256Δ <i>tnp</i> Insertion	diese Arbeit
pSH2Δ <i>tnp</i>	pSH1-Derivat mit 3 bp Deletion der rechten <i>target site</i> Duplikation	diese Arbeit
pTH1	pSH1Δ <i>tnp</i> -Derivat mit 3 bp Deletion der rechten <i>target site</i> Duplikation	diese Arbeit
pTH2	Shuttle-Vektor pBT2 mit <i>scrB</i> :: <i>spc</i> ::IS256 Insertion (inklusive 8 bp <i>target site</i> Duplikation)	diese Arbeit
pTH3	pTH1 Derivat mit verkürztem IS256 (IR _L -IR _R)	diese Arbeit
pTH4	pTH1 Derivat mit 2 bp Deletion in der rechten <i>target site</i> Duplikation	diese Arbeit
pTH5	pTH1 Derivat mit 4 bp Deletion in der rechten <i>target site</i> Duplikation	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i>	pTH1 Derivat mit 6 bp Deletion in der rechten <i>target site</i> Duplikation	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG-Δ <i>tnp</i>	pCAL-n-FLAG mit IS256 <i>tnp</i> Sequenz	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> -FXa	pCAL-n-FLAG mit verkürzter IS256 <i>tnp</i> Sequenz (Aa 1- 310)	diese Arbeit
pACYC184-IS256Δ <i>tnp</i>	pCAL-n-FLAG mit IS256 <i>tnp</i> Sequenz und FaktorXA-Schnittstelle	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> D167A	pACYC184 mit inaktivem IS256, Cm ^R	diese Arbeit
	pCAL-n-FLAG mit IS256 <i>tnp</i> Sequenz mit Aminosäureaustausch D167-A	diese Arbeit

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> 1-130	pCAL-n-FLAG mit verkürzter IS256 <i>tnp</i> Sequenz (Aa 1-130)	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> 100-230	pCAL-n-FLAG mit verkürzter IS256 <i>tnp</i> Sequenz (Aa 100-230)	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> 200-390	pCAL-n-FLAG mit verkürzter IS256 <i>tnp</i> Sequenz (Aa 200-390)	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> L103P	pCAL-n-FLAG mit IS256 <i>tnp</i> Sequenz und Aminosäureaustausch L103-P in der <i>tnp</i> Sequenz	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> Y111A	pCAL-n-FLAG mit IS256 <i>tnp</i> Sequenz und Aminosäureaustausch Y111-A in der <i>tnp</i> Sequenz	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> G114W	pCAL-n-FLAG mit IS256 <i>tnp</i> Sequenz und Aminosäureaustausch G114-W in der <i>tnp</i> Sequenz	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> T117A	pCAL-n-FLAG mit IS256 <i>tnp</i> Sequenz und Aminosäureaustausch T117-A in der <i>tnp</i> Sequenz	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> R118A	pCAL-n-FLAG mit IS256 <i>tnp</i> Sequenz und Aminosäureaustausch R118-A in der <i>tnp</i> Sequenz	diese Arbeit
pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> L127P	pCAL-n-FLAG mit IS256 <i>tnp</i> Sequenz und Aminosäureaustausch L127-P in der <i>tnp</i> Sequenz	diese Arbeit
pIL2-IRR1	pIL2-Derivat mit 2 nt Deletion im IR _R	diese Arbeit
pIL2-IRR2	pIL2-Derivat mit 6 nt Deletion im IR _R	diese Arbeit
pIL2-IRR3	pIL2-Derivat mit 9 nt Deletion im IR _R	diese Arbeit
pIL2-IRL1	pIL2-Derivat mit 2 nt Deletion im IR _L	diese Arbeit
pIL2-IRL2	pIL2-Derivat mit 6 nt Deletion im IR _L	diese Arbeit
pIL2-IRL3	pIL2-Derivat mit 3 nt Deletion im IR _L	diese Arbeit

3.4 Enzyme

Tabelle 3.5: Bezugsquellen verwendeter Enzyme.

Enzym	Anbieter
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt/Main
DNase (RNase-frei)	Roche, Mannheim
Elongase	Invitrogen, Karlsruhe
Factor Xa Protease	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Lysostaphin	Sigma, Taufkirchen / Dr Petry Genmedics, Reutlingen
Lysozym	Sigma, Taufkirchen
<i>Pfu</i> Polymerase	Stratagene, La Jolla, US
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Finnzyme / New England Biolabs, Frankfurt/Main
Platinum [®] <i>Pfx</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt/Main
RNase A	Sigma, Taufkirchen
RNase A	Sigma, Taufkirchen
T4 Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/Main
T4 Quick Ligase	New England Biolabs, Frankfurt/Main
<i>Taq</i> DNA Polymerase, rekombinant	Invitrogen, Karlsruhe
TripleMaster [™] PCR System	Eppendorf, Hamburg

Die Enzyme wurden nach Herstellerangaben gelagert und verwendet.

3.5 Oligonukleotide

Tabelle 3.6: Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5'-3'	T _a	Beschreibung
27f	GAG TTT GAT CCT GGC TCA	57 °C	Universeller eubakterieller 16s rRNA Primer
1492r	TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACTT	57 °C	Universeller eubakterieller 16s rRNA Primer
M13 universal	TGT AAA ACG ACGGCC AGT	56,7 °C	puc18 Sequenzierprimer
M13 r	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	56,7 °C	puc18 Sequenzierprimer
<i>icaC</i> upper <i>EcoRI</i>	ATAAACTTGAATTCGTGTATT	55 °C	Klonierung von <i>icaC</i> ::IS256 in pBT2
<i>icaC</i> lower <i>KpnI</i>	ATAAACTCTGGTACCATCATT	55 °C	Klonierung von <i>icaC</i> ::IS256 in pBT2
<i>icaC</i> for	ATAAACTTGAATTAGTGTATT	42 °C	Amplifikation von <i>icaC</i>
<i>icaC</i> rev	ATATATAAACTCTCTTAACA	42 °C	Amplifikation von <i>icaC</i>
<i>icaC</i> int for	GTTGTTTTAGGACAATGGTAT	57 °C	Amplifikation des inneren Bereiches von <i>icaC</i> ::IS256
<i>icaC</i> int rev	TGCGCCTAAAGTTAACATAA	57 °C	Amplifikation des inneren Bereiches von <i>icaC</i> ::IS256
<i>icaC</i> -IRR 3bp del for	GTCTGGACTTGACTGGTTACAT TGGCTATAATTATG	59,4 °C	Einführung einer 3 bp Deletion in der rechten <i>target site</i> Duplikation in <i>icaC</i> ::IS256
IRR- <i>icaC</i> rev	CAGTCAAGTCCAGACTCCTGTG TA	59,4 °C	Einführung einer 3 bp Deletion in der rechten <i>target site</i> Duplikation in <i>icaC</i> ::IS256
Se1640 <i>EcoRI</i> for	GGCCATGAATTCGTGGAGT GGACTCGTGAA	58 °C	Klonierung von <i>scrB</i> in pBT2
Se1640 <i>EcoRV</i> rev	CGGCATGATATCAGTACCAT CTACTGACTC	58 °C	Klonierung von <i>scrB</i> in pBT2
<i>Spc BamHI</i> for	GGCCATGGATCCGCGTTCTC TAATTTAC	58,8 °C	Klonierung von <i>spc</i> in pTH1a
<i>Spc</i> <i>HindIII</i> rev	GCCCGATAAGCTTTCTGTAG AC	58,8 °C	Klonierung von <i>spc</i> in pTH1a
<i>Spc BglII</i> for	CAAACATTA AAAATCGTAA AAGATCTATTTGGAAGTTCA ATAG	52,5 °C	Einführung einer <i>BglII</i> Schnittstelle in <i>spc</i>
<i>Spc BglII</i> rev	CGATTTTTAATGTTTGAATC GCTTGATTTGGTA	52,5 °C	Einführung einer <i>BglII</i> Schnittstelle in <i>spc</i>
IS256 <i>BglII</i> for	CGTAAAAGATCTATGATAA AGTCCGTATAATTGTG	59 °C	Klonierung von IS256 in pTH1b
IS256 <i>BglII</i> rev	CCAAATAGATCTAGTCAAG TCCAGACTCCTGTG	59 °C	Zur Klonierung von IS256 in pTH1b
RTSD 2bp for	GTCTGGACTTGACTAGATAT TTGGAAGTTCAATAG	59,8 °C	Deletion von 2 bp der rechten <i>target site</i> Duplikation auf pTH1
RTSD 4 bp for	GTCTGGACTTGACTAGATTT GGAAGTTCAATAG	59,8 °C	Deletion von 4 bp der rechten <i>target site</i> Duplikation auf pTH1
RTSD 6 bp for	GTCTGGACTTGACTAGTTGG AAGTTCAATAG	59,8 °C	Deletion von 6 bp der rechten <i>target site</i> Duplikation auf pTH1
RTSD rev	AGTCAAGTCCAGACTCCTGT GTAAAA	59,8 °C	Reverser Primer für "RTSD 2bp for", "RTSD 4bp for" und "RTSD 6 bp for"
IRR overlap	CATATAACAGTCCTCCGTTT TTATGGAC	59,6 °C	Konstruktion von pTH2 (<i>spc</i> ::IR _L -IR _R)
IRL overlap	AGGACTGTTATATGGCCTTT TTACTTTTACAC	59,6 °C	Zur Konstruktion von pTH2 (<i>spc</i> ::IR _L -IR _R)

Name	Sequenz 5'-3'	T _a	Beschreibung
<i>Spc</i> for	GTCCTTCCCACCTTATCATC	57 °C	Screening nach IS256 Integration / Exzision, Sequenzierung
<i>Spc</i> rev	CCAAATCAAGCGATTCAAA C	57 °C	Screening nach IS256 Integration / Exzision, Sequenzierung
LIC1	GACGACGACAAGATGAACC AAGTACATTTTACA	60 °C	Ligation von <i>tnp</i> in pCAL-n-FLAG
LIC2	GGAACAAGACCCGTTTACC ATTTCTACTTATCAAAA	60 °C	Ligation von <i>tnp</i> in pCAL-n-FLAG
Prot / FakXA	ACCCAAGTACATTTTACTACT GAAAAGCGAAGAGATT	61 °C	Einfügen einer Faktor Xa Schnittstelle durch rekombinante PCR
FakXA2	CAGTGTA AAAATGTACTTGG GTCATCCTGCCCTCGAT	61 °C	Einfügen einer Faktor Xa Schnittstelle durch rekombinante PCR
IRL rev EMSA	GTCCTCCTGGGTATGT	57,5 °C	Nachweis extrachromosomaler IS256 Zirkel
IS invR	CAAGGAAATTCCCACAATG	57,5 °C	Nachweis extrachromosomaler IS256 Zirkel
<i>icaC</i> for EMSA	GCGAAAATACAATGATATT A	57,5 °C	Amplifikation eines IR _L -Fragments für EMSA
IRR for	CATTGTATAGCATTTTACAC AGG	57,5 °C	Amplifikation eines IR _R -Fragments für EMSA
<i>icaC</i> int rev	TGCGCCTAAAGTTAACATA A	57,5 °C	Amplifikation eines IR _R -Fragments für EMSA
Tnp LC for	GATGGCGACCGTGAAATTA T	58 °C	Amplifikation eines inneren 107 bp Fragmentes aus der <i>tnp</i> Sequenz
Tnp LC rev	GCAGAGACTAATCCTTTGTG	58 °C	Amplifikation eines inneren 107 bp Fragmentes aus der <i>tnp</i> Sequenz
LIC 5	GGAACAAGACCCGTCTATTT	59 °C	Ligation von <i>tnp</i> Aa1-130 in pCAL-n-FLAG
Tnp130r	ACCACAAAGTTCTTC		
LIC 3 Tnp 100f	GACGACGACAAGGAAAAAG CCCTCATGGCTTA	59 °C	Ligation von <i>tnp</i> Aa 100-230 in pCAL-n-FLAG
LIC 6 Tnp 230r	GGAACAAGACCCGTCTAAA CGAGTTCCGTACCTTG	59 °C	Ligation von <i>tnp</i> Aa 100-230 in pCAL-n-FLAG
LIC 4 Tnp 200f	GACGACGACAAGGGCTTCA TGATTCAAAGTGGC	59 °C	Ligation von <i>tnp</i> Aa 200-390 in pCAL-n-FLAG
L103P rev	GGGCTTTTTTCGTTTCGTTGA TAACG	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
L103P for	CGAAACGAAAAAGCCCCCA TGGCTTCAATGTTG	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
Y111A for	TCAATGTTGGAAATGGCTGT ATCAGGCGTTTCA	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
Y111A rev	CATTTCCAACATTGAAGCCA TG	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
G114W for	GAAATGTATGTATCATGGGT TTCAACTCGTAA	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
G114W rev	TGATACATACATTTCCAACA TTGA	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
T117A for	GTATCAGGCGTTTCAGCTCG TAAAGTATCA	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
T117A rev	TGAAACGCCTGATACATAC ATTTT	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
R118A for	GTATCAGGCGTTTCAACTGC TAAAGTATCAAAA	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
V120P for	GTTTCAACTCGTAAACCATC AAAAATTGTG	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
V120P rev	TTTACGAGTTGAAACGCCTG ATAC	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR

Name	Sequenz 5'-3'	T _a	Beschreibung
L127P for	CAAAAATTGTTGGAAGAAC CTTGTTGTAATCC	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
L127P rev	GTTCTTCCACAATTTTTGAT ACTTTACG	58,5 °C	Einfügen einer Punktmutation in pCAL-n-FLAG- <i>tnp</i> durch rekombinante PCR
IRR Mut1 for	GGAGTCTGGACTTGAGGTG GTTACATTGGCTATAATTA	56,9 °C	Einführen einer Deletion in IRR durch rekombinante PCR
IRR Mut1 rev	TCAAGTCCAGACTCC	56,9 °C	Einführen einer Deletion in IRR durch rekombinante PCR
IRR Mut2 for	TTTACACAGGAGTCTGACTG GTGGTTACATTGG	57,7 °C	Einführen einer Deletion in IRR durch rekombinante PCR
IRR Mut2 rev	AGACTCCTGTGTA AAAATGC	57,7 °C	Einführen einer Deletion in IRR durch rekombinante PCR
IRR Mut3 for	ATTGTATAGCAGGAGTCTG GACTTGAC	58,3 °C	Einführen einer Deletion in IRR durch rekombinante PCR
IRR Mut3 rev	TGCTATATACAATGTTTTTA CCATTTCTAC	58,3 °C	Einführen einer Deletion in IRR durch rekombinante PCR
IRL Mut1 for	CTTTTTCTTAGGTGGTTAAA GTCCGTATAATTGTGTAA	58,9 °C	Einführen einer Deletion in IRL durch rekombinante PCR
IRL Mut1 rev	TAACCACCTAAGAAAAAGT AGAATATCCATC	58,9 °C	Einführen einer Deletion in IRL durch rekombinante PCR
IRL Mut2 for	TTCTTAGGTGGTTAGATAGT ATAATTGTGTAA	58,9 °C	Einführen einer Deletion in IRL durch rekombinante PCR
IRL Mut3 for	GATAAAGTCCGTATAATGT AAAAGTAAAAAGGCC	57,7 °C	Einführen einer Deletion in IRL durch rekombinante PCR
IRL Mut3 rev	ATTATACGGA CTTTATCTAA CCACCTAAG	57,7 °C	Einführen einer Deletion in IRL durch rekombinante PCR

3.6 Mikroorganismen

Tabelle 3.7: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Mikroorganismen.

Stamm	Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A	<i>icaADBC</i> -positiv, IS256-positiv	ATCC 35984
<i>S. epidermidis</i> CSF41498	klinisches Isolat, <i>icaADBC</i> -positiv, IS256-negativ	Conlon, 2002
<i>S. epidermidis</i> CSF41498-1	<i>icaC</i> ::IS256-Insertionsmutante	diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> CSF41498-2	<i>icaC</i> ::IS256Δ <i>tnp</i> -Insertionsmutante	diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> CSF41498-3	<i>icaC</i> ::IS256-Insertionsmutante mit 3 bp Deletion der rechten <i>target site</i> Duplikation	diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> CSF41498-4	<i>icaC</i> ::IS256Δ <i>tnp</i> -Insertionsmutante mit 3 bp Deletion der rechten <i>target site</i> Duplikation	diese Arbeit
<i>S. aureus</i> RN4220	Restriktionsnegatives Derivat von <i>S. aureus</i> 8325/4, 11 bp Deletion in <i>rsbU</i>	Kreiswirth, 1983
<i>Escherichia coli</i> DH 5α	Wirtsstamm für die Konstruktion von rekombinanten Plasmiden; <i>lacZ</i> -negativ	MBI-Fermentas
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_Bm_B) dcm gal λ</i> (DE3)	Merck Biosciences
<i>Escherichia coli</i> Rosetta	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_Bm_B) dcm gal λ lacYI</i> (DE3) <i>pRARE</i> (Cm ^R)	Merck Biosciences

3.7 Medien

Tabelle 3.8: Zusammensetzung der verwendeten Medien.

Medium	Komponente	Menge / l
Luria-Bertani-Medium	NaCl	5 g
	Hefeextrakt	5 g
	Trypton	10 g
BHI-Medium	BHI (Brain-Heart-Infusion; Oxoid)	37 g
TSB-Medium	Trypticase Soy Broth (Difco)	30 g
Kongorotagar	TSB	30 g
	Glucose	10 g
	Agar	15 g
	Kongorot (in 100 ml H ₂ O getrennt autoklavieren)	0,8 g

Zur Herstellung von Festmedien wurde 1,5 % Agar zugesetzt. Die Zugabe von Antibiotika und anderer hitzempfindlicher Substanzen erfolgte nach Abkühlen der Medien auf ca. 50 °C.

3.8 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tabelle 3.9: Zusammensetzung verwendeter allgemeiner Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Komponente	Endkonzentration	Bemerkungen
0,5 M EDTA	EDTA	0,5 M	pH mit 10 N NaOH auf 8,0 einstellen
6 x DNA-Probenpuffer	Glycerol	30 % (v/v)	in 1 x TBE-Puffer
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)	
	EDTA	1 mM	
10 x PBS	NaCl	80 g	
	KH ₂ PO ₄	2 g	
	KCl	2 g	
	Na ₂ HPO ₄	11,4 g	ad 1 l
20 x SSC-Lösung	NaCl	3 M	pH 7,0; autoklavieren
	Natriumcitrat	0,3 M	
50 x TAE	Tris	2 M	
	Essigsäure (konz.)	57,1 ml	
	0,5 M EDTA	50 mM	
10 x TBE	Tris/HCl (pH 8,0)	0,9 M	
	Borsäure	0,9 M	
	EDTA	10 mM	
10 x TPE	Tris/HCl	0,9 M	
	EDTA	20 mM	pH mit Phosphorsäure auf 8,0 einstellen
1 x TE	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM	
	EDTA	1 mM	
1 x TBS	Tris/HCl (pH 7,5)	20 mM	
	NaCl	15 mM	

3.9 Antibiotika und Medienzusätze

Tabelle 3.10: Konzentrationen verwendeter Antibiotika und Medienzusätze.

Antibiotikum	Konzentration Stammlösung	Eingesetzte Endkonzentration
Ampicillin	100 mg / ml in H ₂ O	100 µg / ml
Chloramphenicol	10 mg / ml in 100 % Ethanol	10 µg / ml
Erythromycin	10 mg / ml in 100 % Ethanol	2,5 µg / ml
IPTG	100 mM	0,05 mM (0,5 ml ad 1 l)
Spectinomycin	150 mg / ml in H ₂ O	150 µg / ml
X-Gal	2 % in DMFO	0,006 % (3 ml ad 1 l)

3.10 Kits

Tabelle 3.11: Bezugsquellen verwendeter Kits.

Kit	Anbieter
ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	PE Biosystems, Langen
Affinity™ LIC Cloning and Protein purification kit	Stratagene, La Jolla, USA
API-Staph	bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich
DIG Gel Shift Kit	Roche, Mannheim
ECL™ Advance Detection Kit	GE Healthcare Lifescience, Little Chalfont, UK
ECL™ Detection Kit	GE Healthcare Lifescience, Little Chalfont, UK
LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial viability kit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
PCR Purification and Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
pGEM®-T easy Vector System I	Promega, Mannheim
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.11 Software

Tabelle 3.12: Hersteller verwendeter Software

Bezeichnung	Anbieter
Adobe Photoshop 6.0	Adobe (USA)
Artemis v6	Freeware unter www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/
Bioedit 7.0.5.2	Hall, 1999, Freeware unter www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
FastPCR, Version 3.6.64	Kalendar, 1999; Freeware unter www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm
LSM Image Browser 3.5	Zeiss, Oberkochen
MS Office 2000	Microsoft (USA)
pDRAW32 1.0	Olesen, 1998; Freeware unter www.acaclone.com
UTHSCSA ImageTool	Freeware unter http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html
WinPep 3.01	Hennig, 1999; Freeware unter www.ipw.agr.ethz.ch/~lhennig/winpep.html

4 METHODEN

4.1 Extinktionsmessung

Absorptionsmessungen wurden an einem Spektralphotometer ausgeführt. Für Messungen im Bereich des sichtbaren Lichtes wurden Kunststoffküvetten verwendet. Die optische Dichte von Bakterienkulturen in LB, BHI und TSB wurde bei 600 nm bestimmt. Als Richtwert gilt dabei, dass eine OD_{600nm}-Einheit einer Bakteriendichte von $7,4 \times 10^8$ Zellen / ml entspricht.

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde in Quarzglasküvetten (100 µl) bei 260 nm und 280 nm durchgeführt. Die Konzentration ergibt sich aus der gemessenen A_{260nm}-Einheit in Abhängigkeit von der eingesetzten Nukleinsäure (Sambrock *et al.*, 1989). Der Reinheitsgrad lässt sich durch Bestimmung des A_{260nm} / A_{280nm}-Quotienten ermitteln. Bei einer reinen DNA- oder RNA-Lösung liegt er zwischen 1,8 und 2,0.

4.2 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden die Bakterien bei 37 °C bzw. 30 °C ÜN kultiviert. Die Kultur wurde in Stammhaltungsröhrchen mit 20 % (v/v) Glycerin verdünnt und gut gemischt. Die Glycerinkultur wurde bei –80 °C bzw. bei –20 °C (kurzfristig) aufbewahrt.

4.3 Kultivierung

4.3.1 Allgemeines

Soweit nicht anders angegeben, wurde *Staphylococcus* in TSB-Medium und *E. coli* in LB-Medium (Tabelle 3.1), wenn notwendig unter Zusatz des benötigten Antibiotikums (Tabelle 3.10), in Schüttelkultur bei 37 °C im Rotationsschüttler angezogen.

4.3.2 Herstellung kompetenter *E. coli* für die CaCl₂-Transformation

200 ml LB-Medium (Tabelle 3.8) wurden mit 500 µl einer *E. coli* ÜNK angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 - 0,7 geschüttelt. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis gestellt und anschließend in vorgekühlten Greinerröhrchen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und ca. 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 10 ml eiskaltem, sterilfiltriertem 0,1 M CaCl₂ / 15 % Glycerin (v/v) aufgenommen und nochmals 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden in 200 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgefäße gefüllt und bei -80 °C eingefroren.

4.3.3 Herstellung kompetenter *S. aureus* für die Elektroporation

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer *S. aureus* ÜNK angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD von 0,6 bis 0,7 geschüttelt. Die Kultur wurde 5 min bei 6000 rpm und 20 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zunächst zwei- bis dreimal mit 50 ml sterilem H₂O und anschließend zweimal mit 20 ml 10 % Glycerin (v/v) gewaschen. Die Zellen wurden in 10 bis 15 ml 10 % Glycerin resuspendiert, 15 min bei RT inkubiert, 7 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und schließlich in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden in 70 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

4.3.4 Herstellung kompetenter *S. epidermidis* für die Elektroporation

Die Herstellung kompetenter *S. epidermidis* erfolgte wie beschrieben durch Anzucht in BHI-Medium (Tabelle 3.8) bis zu einer OD_{600nm} ≈ 2, anschließende 15-minütige Inkubation auf Eis und fünfmaliges Waschen mit eiskaltem, sterilem H₂O (Conlon *et al.*, 2002). Die kompetenten Zellen wurden stets direkt transformiert.

4.3.5 Frequenzbestimmung der präzisen Exzision von IS256 in *S. epidermidis*

Die Wahrscheinlichkeit des Eintritts eines Ereignisses (P) pro Zelle und Generation wird mittels der Formel:

$P = 1 - \sqrt[n]{1-x}$ berechnet, wobei: $n =$ Anzahl stattgefunderer Zellteilungen

$$x = \frac{\text{Anzahl cfu mit IS256 freier spc Sequenz}}{\text{Gesamtzahl cfu im ausplattierten Volumen}}$$

Die Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen n berechnet sich wie folgt:

$$n = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2}, \text{ wobei: } N = \text{Gesamtzahl der Bakterien in der Kultur}$$

$$N_0 = \text{Anzahl der Bakterien im Inokulum}$$

Zunächst wurde eine Einzelkolonie des zu testenden Stammes gepickt und in 50 ml sterilem PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden jeweils 1 μ l, 10 μ l, und 25 μ l in 50 ml TSB-Medium mit Chloramphenicol [10 μ g / ml] angeimpft und im Schüttler bei 30 °C inkubiert, bis die Kultur in der stationären Phase war (ca. 48 h). Parallel dazu wurden die gleichen Volumina der Bakteriensuspension auf TSB + Chloramphenicol [10 μ g / ml] Agar ausplattiert, um die Ausgangszellzahl N_0 im Inokulum zu bestimmen.

Nach 48 h wurde nur mit dem Versuchsansatz weitergearbeitet, der ein möglichst kleines, auf den Agarplatten auszählbares Inokulum N_0 enthielt. Von diesem Ansatz wurde die $OD_{600\text{nm}}$ der Kultur bestimmt und die Zellzahl pro ml abgeschätzt. Dann wurden entsprechende Verdünnungen auf TSB + Chloramphenicol [10 μ g / ml] Agar ausplattiert, um nach Inkubation bei 30 °C die Gesamtzellzahl der Kultur N zu bestimmen.

Parallel dazu wurden 10 ml der Kultur abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und schließlich auf spectinomycinhaltigem [300 μ g / ml] TSB-Agar ausplattiert und 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Spectinomycinresistente Kolonien wurden gepickt und mittels Lysat-PCR mit *spc*-spezifischen Primern auf Exzision von IS256 überprüft. Aus dieser Zahl konnte schließlich x und somit P berechnet werden.

4.4 Speziesbestimmung

4.4.1 API-Staph

Der API-Staph-Test (Tabelle 3.11) besteht aus 20 Mikroröhrchen, in denen sich verschiedene Substrate für biochemische Reaktionen befinden. Die Durchführung kann dem vom Hersteller mitgelieferten Standardprotokoll entnommen werden. Das Ergebnis wurde in ein vorgegebenes Auswertungsformular übertragen und zu einem numerischen Code zusammengefasst, aus dem man in einem Analyse-Profil-Index die Spezies ablesen kann.

4.4.2 16S rDNA Sequenzierung

Zur Speziesbestimmung wurde auch eine 16S rDNA Sequenzierung durchgeführt. Zur Amplifikation wurden zwei generelle 16S rDNA Primer (Lane, 1991) verwendet, 27f und 1492r (Tabelle 3.6). Das entstandene PCR-Produkt (1475 bp) wurde mit dem pGEM[®]T-easy Vektor ligiert (siehe 4.6.12.1) und mit Hilfe der M13 Primer (Tabelle 3.6) sequenziert (siehe 4.6.14). Die Artbestimmung erfolgte durch Sequenzvergleich mit der BLAST Software (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.5 Adhärenzassay

Die Biofilmbildung bei Staphylokokken lässt sich in einem Adhärenzassay in Polystyren-Mikrotiterplatten nachweisen. Dazu wurde eine ÜNK im Verhältnis 1:1000 verdünnt. Je 100 µl dieser Suspension wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Gewebekulturplatte pipettiert, wobei jeder Stamm achtfach angesetzt wurde. Als Positivkontrolle diente *S. epidermidis* RP62A. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C ca. 18 bis 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Kulturgefäße vorsichtig entleert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit PBS-Puffer (Tabelle 3.9) gewaschen, die dann noch anhaftenden Bakterien auf einem Heizblock bei 60 °C hitzefixiert und mit Kristallviolett für ca. 5 min gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde unter fließendem Wasser abgewaschen. Nach dem Trocknen konnte die Dichte des Biofilms mit einem ELISA-Reader (Tabelle 3.2) bei einer Wellenlänge von 492 nm bestimmt werden. Messwerte unter 0,12 wurden als negativ bewertet, Stämme mit Werten zwischen 0,12 und 0,24 als schwach adhärent und Ergebnisse über 0,24 als stark adhärent. Der Grenzwert von 0,12 entspricht dabei dem dreifachen Durchschnittswert der Negativkontrolle.

Um das unterschiedliche Wachstum der Zellen bei verschiedenen Inkubationsbedingungen zu berücksichtigen, wurde der sogenannte Biofilmindex berechnet. Er bezieht die Stärke des Biofilms auf das Wachstum im Überstand. Der Biofilmindex ergab sich aus dem Quotienten „Messwert Biofilm Elisa / OD_{600nm} Überstand“.

Sollte überprüft werden, ob die Biofilmmatrix sich vorrangig aus extrazellulären Polysacchariden oder Proteinen zusammensetzte, wurde der Biofilm mit NaIO₄ oder Proteinase K behandelt (Wang *et al.*, 2004). Dabei kann NaIO₄ PIA-artige Polysaccharide durch Spaltung von C-C Brücken auflösen (Mack *et al.*, 1996), während Proteinase K proteinogene Biofilmstrukturen zerstört. Nach der Anzucht des Biofilms für 24 h (wie oben beschrieben) wurde der Überstand vorsichtig abgezogen, die *wells* mit je 200 µl 40 mM NaIO₄ bzw. Proteinase K (1 mg / ml, in 100 mM Tris) überschichtet und für weitere 23 h im Kühlschrank (NaIO₄) bzw. 4 h bei 37 °C (Proteinase K) inkubiert. Als Kontrolle wurden weitere *wells* parallel mit 200 µl PBS überschichtet. Im Anschluss wurden die Mikrotiterplatten wie üblich gewaschen und der Biofilm mit Kristallviolett angefärbt.

4.6 Arbeiten mit DNA

4.6.1 Isolation chromosomaler DNA aus Staphylokokken

Die Bakterien wurden ÜN bei 37 °C in 4 ml TSB-Medium mit 1 % Glycin geschüttelt. 2 ml der Kultur wurden bei 8000 rpm 5 min zentrifugiert und das Bakterienpellet einmal mit 1 ml TE-Puffer (Tabelle 3.9) gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien in 100 µl 10 mM Tris / HCl, 25 % Saccharose, pH 7,5 gründlich resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl EDTA 0,5 M, pH 8, und 10 µl Lysostaphin (2 mg/ml) wurden die Bakterien bei 37 °C inkubiert, bis der Ansatz viskös wurde (ca. 15 - 30 min). Im Anschluss wurden 375 µl TE-Puffer, 225 µl 10 % SDS und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und bei 55 °C 30 min inkubiert. Danach wurden 150 µl 5 M Natriumperchlorat zugesetzt, der Ansatz kurz geschwenkt, 0,5 Volumenanteil (ca. 450 µl) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dazu gegeben und der Ansatz mindestens 1,5 h in einem Tischrüttler (modifizierter Vortexer) kräftig geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und auf zwei neue Eppendorfcaps verteilt. Die DNA wurde mit dem doppelten Volumen 100 % Ethanol gefällt, 10 min abzentrifugiert (14000 rpm, RT), der Alkohol entfernt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der DNA wurde

diese in 50 µl Tris/HCl, pH 8,5 aufgenommen und vor Gebrauch mindestens 12 h bei 4 °C gelagert.

4.6.2 Polymerasekettenreaktion

PCR-Reaktionen wurden nach Herstellerangaben für die entsprechende Polymerase (Tabelle 3.5) durchgeführt. Die Annealing-Temperaturen der Primer wurde mit der Software FastPCR (Tabelle 3.12) bestimmt.

Eine PCR mit Hilfe von Bakterienlysaten durchzuführen bietet durch die Möglichkeit, mehrere Kolonien gleichzeitig zu untersuchen, eine effiziente und schnelle Art des „Vorscreenings“. Zu diesem Zweck wurden eine oder mehrere *E. coli* Kolonien in den PCR-Mix eingegeben. Die PCR-Reaktion erfolgte unter Standardbedingungen mit Ausnahme einer längeren initialen Denaturierung (5 min). Im Falle von *Staphylococcus* wurde zunächst Zellmaterial einer oder mehrerer Kolonien in 50 µl H₂O suspendiert, der Ansatz nach zehnminütiger Inkubation mit 1 µl Lysostaphin (2 mg/ml) aufgeköcht (5 min, 100 °C) und sofort auf Eis gestellt. Entstandene Zellfragmente wurden kurz abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Für die PCR wurden 1 - 2 µl des Lysats eingesetzt.

4.6.3 PCR-Produktreinigung

Zur Abtrennung der Primer, Nukleotide, Enzyme und Salze von den PCR-Produkten wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Tabelle 3.11) verwendet. Die genaue Versuchsdurchführung kann dem vom Händler mitgelieferten Protokoll entnommen werden.

4.6.4 DNA-Gelelektrophorese

Zur Integritäts- und Größenkontrolle der DNA-Fragmente diente die Agarose-Gelelektrophorese. Die DNA-Proben wurden hierzu mit sechsfach konzentriertem Probenpuffer (Tabelle 3.9) im Verhältnis 1:6 versetzt. Die Auftrennung erfolgte in 0,8 - 2%igen TAE-Agarosegelen (Sambrock, 1989) in TAE-Puffer (Tabelle 3.9). Als Größenstandard diente eine DNA-1kB-Ladder (Tabelle 3.3). Die DNA-Fragmente wurden nach Anfärben mit Ethidiumbromid unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

4.6.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

DNA-Fragmente bis zu 10 kb wurden mit dem „DNA Gel extraction kit“ (Tabelle 3.11) nach Herstellerangaben aus dem Agarosegel gereinigt. Größere Fragmente wurden mittels der „freeze-and-squeeze“ Methode extrahiert. Hierbei wurde das DNA enthaltende Gelstück ausgeschnitten, in ein Stück Parafilm eingeschlagen und für mindestens 20 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Danach wurde das Gelstück im Parafilm aufgetaut, die DNA-haltige Flüssigkeit herausgepresst und mittels Phenolextraktion (4.6.7) und Ethanolfällung (4.6.8) gereinigt.

4.6.6 Extraktion kleiner DNA-Fragmente aus dem Polyacrylamidgel

Zur Reinigung kleiner DNA-Fragmente zwischen 50 und 300 bp wurden sechsprozentige $1 \times$ TBE-Polyacrylamid-Minigele verwendet. Die DNA wurde durch Elektrophorese bei 100 V gemeinsam mit einem *low range* Marker aufgetrennt. Das Gel wurde vorsichtig auf Whatmanpapier aufgezogen und in ein Ethidiumbromid-Färbebad überführt. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht visualisiert, ausgeschnitten und mit 2 Volumina Elutionspuffer überschichtet. Die Gelstückchen wurde 4 h bei ÜN bei RT geschüttelt, um die DNA zu eluieren. Im Anschluss wurde der Ansatz 10 min abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand vorsichtig abgezogen. Die DNA wurde nun mit 2 Volumina 96 % Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 100 μl TE-Puffer gelöst und im Anschluss nochmals mit 0,3 M Natriumacetat pH 5,2 und 96 % Ethanol gefällt, zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in einem kleinen Volumen TE-Puffer resuspendiert.

4.6.7 Phenolextraktion

Verunreinigte DNA konnte mit einer Phenolextraktion mit anschließender Ethanolfällung von Proteinen und Salzen befreit werden. Zu einer DNA-Lösung wurde das gleiche Volumen einer Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1) gegeben, gut gemischt und 1 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, in der sich die DNA befand, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform/IAA (24:1) versetzt und 5 min auf einem Tischrüttler geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA konnte nun mit Ethanol gefällt werden (siehe 4.6.7).

4.6.8 Ethanolfällung

Die in Lösung befindliche DNA wurde mit Natriumacetat (Tabelle 3.9) auf eine Endkonzentration von 0,3 M eingestellt. Es wurde das zweieinhalbfache Volumen 100 % Ethanol zugegeben, gut gemischt und der Ansatz mindestens 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde 30 min bei 13000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und bei RT getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in einem angemessenen Volumen Puffer oder H_2O aufgenommen.

4.6.9 Plasmidisolierung im kleinen Maßstab (Minipräp)

Die Bakterien wurden ÜN unter Selektionsdruck des jeweiligen Antibiotikums in 3 ml LB-Medium angezogen. Davon wurden 1,5 ml abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 150 μl Puffer I (Tabelle 4.1) aufgenommen. Anschließend wurde die gleiche Menge Puffer II (Tabelle 4.1) dazugegeben, kurz geschwenkt, bis der Ansatz klar und viskös erschien und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 150 μl Puffer III (Tabelle 4.1) dazugegeben, kurz gemischt und das Reaktionsgefäß 10 min auf Eis gestellt, um chromosomale DNA und Proteine zu fällen. Anschließend wurde 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand sofort mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und mit 0,7 Volumina Isopropanol versetzt, um die Plasmide zu fällen. Die DNA wurde bei einem weiteren Zentrifugationsschritt 15 min bei 14000 rpm pelletiert und anschließend mit 500 μl 70 % Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet bei RT getrocknet wurde, wurde die DNA in 50 μl 50 mM Tris (pH 8,5) aufgenommen. Für eine Restriktion zur Überprüfung von klonierten Fragmenten in gängige Vektoren oder als Template in einer PCR-Reaktion konnte die Plasmid-DNA in diesem Reinheitsgrad verwendet werden. Sollte im Anschluss eine Sequenzierreaktion durchgeführt werden, so musste die DNA in einem weiteren Schritt gereinigt werden. Dies erfolgte mit dem „PCR-Purification-Kit“ (Tabelle 3.11).

Tabelle 4.1: Puffer für Minipräp.

Puffer	Zusammensetzung
Puffer I	50 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM EDTA, pH 8 0,1 mg/ml RNase kühl aufbewahren
Puffer II	1 % SDS 0,2 N NaOH direkt vor Gebrauch mischen
Puffer III	3 M Natriumacetat, pH 4,8

4.6.10 Plasmidisolierung im mittleren Maßstab (Midipräp)

Die Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab wurde mit dem „Midi Plasmid Purification Kit“ (Tabelle 3.11) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen so lysiert wie bei einer Minipräparation, die Plasmid-DNA wurde jedoch anschließend durch Adsorption an eine spezielle Säule, die nach dem Prinzip eines Anionenaustauschers funktioniert, gereinigt. Nach verschiedenen Waschschrinen wurde die DNA mit einem Puffer mit erhöhter Salzkonzentration eluiert und auf Eis mit Isopropanol gefällt. Die verwendeten Kartuschen erlauben eine Ausbeute von bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus 10-100 ml Bakterienkultur. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und die genaue Durchführung können dem vom Hersteller mitgelieferten Standardprotokoll entnommen werden.

Bei der Midipräp von Staphylokokken wurden die Zellen zunächst in 0,5 ml Puffer 1 aufgenommen und anschließend mit 20 µl Lysostaphin (2 mg/ml) (Tabelle 3.5) ca. 30 min bei 37 °C inkubiert, bis die Lösung viskös wurde. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangabe.

4.6.11 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme (Tabelle 3.5) wurden nach Herstellerangaben im geeigneten Puffer verwendet. Im Allgemeinen erfolgte der Verdau für 1 h bei 37 °C, wenn erforderlich auch ÜN.

4.6.12 Dephosphorylierung von DNA (Antarctic Phosphatase)

Die terminale 5'-Dephosphorylierung von DNA-Strängen erfolgte mittels Antarctic Phosphatase (Tabelle 3.5) nach Herstellerangaben. Die Inkubationszeit betrug 15 min für 5'-Überhänge und 60 min für 3'-Überhänge (bei 37 °C). Anschließend konnte die Antarctic Phosphatase durch fünfminütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert und der Ansatz direkt zur Ligation eingesetzt werden.

4.6.13 Ligation von DNA

Ligation in pGEM[®]T-easy

Das pGEM[®]T-easy Vektor System (Tabelle 3.11) ist ein sehr effizientes System für die Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor mit hoher Kopienzahl. Der Vektor verfügt über 3'-Thymidin-Überhänge an der Insertionsstelle, die eine Religation verhindern und eine einfache Ligation von PCR-Produkten mit 5'-Adenin-überhängenden Enden in die multiple Klonierungsstelle (MCS) ermöglichen. Die MCS des Vektors pGEM[®]T-easy liegt in dem Gen für die α -Peptid-Region des Enzyms β -Galaktosidase. Durch Insertionsinaktivierung war eine Blau/Weiß-Selektion auf geeigneten Indikatorplatten möglich. Ein Standardansatz für die Ligation eines PCR-Produktes in den Vektor setzte sich wie folgt zusammen:

2 x T4 DNA Ligationspuffer	5 μ l
pGEM [®] T-easy Vektor (50 ng)	1 μ l
PCR-Produkt	1-3 μ l
T4 DNA-Ligase	1 μ l
H ₂ O	ad 10 μ l

Der Ansatz wurde gemischt und bei 1 h bei RT bzw. 4 °C ÜN inkubiert.

Ligation mit T4-Ligase

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Kondensation einer 5'-Phosphatgruppe mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe von doppelsträngigen (ds) DNA-Molekülen unter ATP-Verbrauch. Vor einer Ligation mussten 5'-Ende und 3'-Ende der zu ligierenden DNA-Fragmente mit der gleichen Restriktionsendonuklease geschnitten werden. Für „sticky end“ Klonierungen sollten die zu ligierenden DNA-Fragmente in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:5 vorliegen (z.B. 30 fmol Vektor und 150 fmol Insert). Daneben wurden Ligasepuffer, 1 μ l T4-DNA-Ligase (Tabelle 3.5, 1u/ μ l) und H₂O bis zum gewünschten Endvolumen zugesetzt. Dabei war zu beachten, dass dieses Volumen möglichst gering sein sollte, um die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von Vektor und Insert zu erhöhen. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert. Anschließend setzte man ca. 10 μ l für eine Transformation ein und bewahrte den Rest bei -20 °C auf.

Ligation mit NEB T4 Quick Ligase

Die Verwendung der T4 Quick Ligase (Tabelle 3.5) ermöglicht Ligationen innerhalb von 5 min bei RT sowohl für überlappende als auch glatte Enden. Die Verwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Dabei wurde ein molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1:5 gewählt.

4.6.14 Transformation von Bakterien

4.6.14.1 Transformation von *E. coli* (CaCl₂-Methode)

200 µl kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit ca. 50 - 100 ng Plasmid-DNA oder mit 10 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 - 45 min auf Eis gestellt. Dann wurde ein Temperaturschock durchgeführt, wobei die Zellen für 2 min auf 42 °C erhitzt und danach kurz auf Eis abgekühlt wurden. Im Anschluss daran wurde 1 ml steriles LB-Medium zugegeben, und die Bakterien zur Expression der plasmidkodierten Resistenzgene 45 - 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach plattierte man 100 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten aus. Der Rest wurde kurz abzentrifugiert und nach dem Entfernen des Überstands bis auf ein Endvolumen von etwa 100 µl in konzentrierter Form ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert, gewachsene Kolonien konnten anschließend vereinzelt und mit Hilfe einer Minipräparation oder Lysat-PCR in Bezug auf eine erfolgreiche Transformation überprüft werden.

4.6.14.2 Transformation von *S. aureus* (Elektroporation)

70 µl kompetente *S. aureus*-Zellen wurden bei RT aufgetaut, mit ca. 250-500 ng Plasmid-DNA (in H₂O) versetzt und für 15 - 30 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde in Elektroporationsküvetten mit 1 mm Spaltdurchmesser gefüllt und mit einer Spannung von 1,8 kV elektroporiert. Dann wurde sofort 1 ml BHI-Medium in die Küvette gegeben, der gesamte Ansatz in ein Reagenzröhrchen überführt und ca. 2 h bei 30 °C geschüttelt. Danach wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert. Der Rest wurde kurz abzentrifugiert und nach dem Entfernen des Überstands bis auf ein Endvolumen von etwa 100 µl in konzentrierter Form ebenfalls ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 30 °C inkubiert, gewachsene Kolonien konnten dann vereinzelt und mit Hilfe einer Mini- oder Midipräparation im Hinblick auf eine erfolgreiche Transformation überprüft werden.

4.6.14.3 Transformation von *S. epidermidis* (Elektroporation)

50 µl kompetente *S. epidermidis* Zellen wurden auf Eis mit 1-5 µg Plasmid-DNA in 20 - 50 µl A. bidest versetzt. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten mit 1 mm Spaltdurchmesser gefüllt und mit 1,8 kV elektroporiert. Anschließend wurde sofort 1 ml BHI + 0,5 M Saccharose mit einer subinhibitorischen Chloramphenicolkonzentration (0,1 µg/ml) in die Küvette gegeben, der Ansatz in ein Röhrchen überführt und ca. 2 bis 3 h bei 30 °C sanft geschüttelt. Danach wurde der Transformationsansatz auf BHI + 0,5 M Saccharose + Cm [10 µg/ml] Agar ausplattiert und die Platten 24 bis 48 h bei 30 °C inkubiert.

4.6.15 Southern Blot

Mit der Southern-Blot-Analyse können spezifische Restriktionsfragmente in einem komplexen Gemisch von Restriktionsfragmenten identifiziert werden. Man macht sich dabei die außerordentliche Spezifität der Nukleinsäurehybridisierung zunutze.

Tabelle 4.2: Lösungen zum Southern Blot.

Lösung	Zusammensetzung
Denaturierungslösung	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung	1 M Tris (pH 7,5) 2 M NaCl
Wadchpuffer 1	0,1 – 1 x SSC 0,4 % SDS (w/v)
Waschpuffer II	2 x SSC
Hybridisierungspuffer	Hyb-Puffer (Gold) 500 ml 0,5 M NaCl 5 % (w/v) Blocking Reagenz

DNA-Verdau und Elektrophorese

Die zu analysierende DNA wurde zunächst vollständig mit einem Restriktionsenzym gespalten und die entstandenen Fragmente anschließend in einem 1% TPE-Agarosegel aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurde das Gel in Hinblick auf vollständige Spaltung der DNA überprüft und mit einem an der Seite angelegten Lineal fotografiert. Dies ermöglichte später eine Zuordnung der Hybridisierungsbanden zu einem Fragmentgrößenbereich. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel zunächst 15 min in einer 0,25 M HCl-Lösung geschwenkt, danach 15 min in Denaturierungslösung und schließlich

15 min in Neutralisierungslösung (Tabelle 4.2). Nach dieser Vorbehandlung konnte die DNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran übertragen werden.

Kapillarblot

Der Kapillarblot wurde verwendet, wenn die zu übertragenden DNA-Fragmente nicht größer als ca. 20 - 50 kb waren. Der Transferpuffer (ca. 500 ml 20 x SSC) wurde in eine Plastikwanne gegeben, über die Wanne wurde eine Glasplatte gebreitet. Über die Glasplatte wurde ein langer Streifen Whatmanpapier gelegt, so dass dieser mit den Enden in den Puffer tauchte und sich damit vollsog. Das Gel wurde möglichst luftblasenfrei auf das Papier platziert und danach ebenfalls luftblasenfrei eine in Gelgröße zurechtgeschnittene mit H₂O angefeuchtete Membran. Es folgten drei Stücke Whatmanpapier (in Gelgröße) und ein ca. 10-15 cm hoher Stapel Papiertücher. Zum Abschluss wurde eine zweite Glasplatte oben auf den Stapel gelegt, was einer gleichmäßigen Gewichtsverteilung dient, und der Aufbau mit einem Gewicht von ca.1 kg beschwert. Die DNA wurde durch die entstehenden Kapillarkräfte aus dem Gel auf die Nylonmembran transferiert. Im Anschluss musste die DNA durch UV-Licht auf der Membran fixiert werden.

Hybridisierung

Das ECL-System von Amersham (*Enhanced Chemiluminescence Labelling and Detection System*, Tabelle 3.11) stellt ein zuverlässiges Detektionssystem für komplementäre DNA-Stränge dar, bei dem komplett denaturierte DNA- oder RNA-Sonden nicht-radioaktiv mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase markiert und anschließend in einer Hybridisierung verwendet werden. Die Peroxidase ist mit einem positiv geladenen Polymer komplexiert, das sich durch Ladungskräfte locker an die DNA bindet. Diese ionische Bindung wird durch die Zugabe von Glutaraldehyd zu einer chemischen Bindung umgewandelt, so dass die Sonde fest mit der Markierung verbunden ist.

Die Standarddurchführung für die Markierung einer Sonde sah wie folgt aus: 200 – 400 ng der Sonden-DNA (z.B. PCR-Produkt) wurden in 20 µl H₂O aufgenommen. Eine Denaturierung der DNA erfolgte 5 min bei 100 °C, danach musste die DNA sofort auf Eis abgekühlt werden. Es folgte die Zugabe von 10 µl des *Labelling*-Reagenz, nach kurzem Mischen wurden 10 µl Glutaraldehyd zugegeben, gut gemischt, 10 min bei 37 °C inkubiert und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Nach einer Vorhybridisierung der Membran konnte die Hybridisierung unter Zugabe der markierten Sonde über Nacht erfolgen. Die Vorhybridisierung diente dazu, alle unspezifischen Bindungsstellen der Nylonmembran abzudecken, so dass die Sonde während der Hybridisierung nur spezifisch an die DNA binden konnte. Für die Vorhybridisierung wurde die Membran kurz in 5 x SSC geschwenkt, mit ca. 20 ml Hybridisierungspuffer (Tabelle 4.2) zusammen in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und 1 h bei 42 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Die markierte Sonde wurde zugegeben und es folgte eine Inkubation ÜN bei 42 °C.

Detektion

Die Hybridisierungslösung wurde anschließend verworfen und die Membran 2 x 10 min bei 55 °C mit Waschpuffer I (Tabelle 4.2) gewaschen. Der Gehalt an SSC in Waschpuffer I bestimmte die Stringenz, mit der die restliche Sonde während dieses Waschschruttes entfernt wurde. Es wurden je nach Signalintensität der Sonde verschiedene Waschpuffer für unterschiedliche Sonden verwendet. Der zweite Waschschrut mit Waschpuffer II (Tabelle 4.2) wurde 2 x 5 min bei RT durchgeführt. Nachdem der Waschpuffer entfernt wurde, konnte der Blot nun mit der Detektionslösung bedeckt werden. Die Detektionslösung wurde im Verhältnis 1:1 aus zwei Einzellösungen hergestellt, die im Kit enthalten sind (1 bis 2 ml je nach Membrangröße). Die Membran wurde leicht mit Whatmanpapier getrocknet, die Detektionslösung darauf geträufelt und mit einem Stück Haushaltsfolie bedeckt, so dass die Lösung die Membran als dünner Film bedeckte. Nach 1 min wurde die Membran kurz auf Whatmanpapier getrocknet, in eine neue Frischhaltefolie eingepackt und in der Dunkelkammer mit einem ECL-Hyperfilm bedeckt bzw. am „Chemi Lux Imager“ detektiert. Detektionsreagenz 1 zerfällt in Wasserstoffperoxid, das Substrat der Peroxidase. Das in Detektionslösung enthaltene Luminol wird daraufhin oxidiert, wobei es zu einer Lichtreaktion und zum Aussenden von blauem Licht kommt, das auf dem der Membran aufgelegten Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Je nach Signalstärke verblieb der Film 1 - 60 min auf der Membran. Genauere Angaben sind dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

4.6.16 DNA-Sequenzierung

Man bedient sich hierbei der Methode einer zyklischen Sequenzierung, wobei durch Anwendung des „ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Tabelle 3.11) Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleotide während einer PCR-Amplifikation durch die spezifisch modifizierte Taq-Polymerase eingebaut werden und zum Kettenabbruch führen.

Sequenzierungsansatz

Die Sequenzierungsreaktion mit den vier farbstoffmarkierten Nukleotiden fand in einem Reaktionsansatz statt.

Sequencing Buffer	1 µl
HiDye 1.1	1 µl
Template (PCR-Produkt)	1-2 µl
Primer (50 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 5 µl

Die anschließende PCR-Amplifikation wurde im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	30 sec	95 °C
Primer-Annealing	15 sec	45 - 60 °C
Primer-Extension	4 min	60 °C

Es wurden in der Regel 25 Reaktionszyklen durchlaufen. Anschließend wurde der Ansatz auf 4 °C gehalten.

Reinigung der amplifizierten DNA

Um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte Nukleotide und Enzyme zu entfernen, musste die DNA gereinigt werden. Am wirkungsvollsten lassen sich die nicht eingebauten Nukleotide, welche die spätere Auswertung verfälschen würden, durch eine Ethanol-fällung abtrennen. Dazu wurden 90 µl H₂O und 10 µl 3 M Natriumacetat (Tabelle 3.9) zu dem Sequenzierungsansatz gegeben und gemischt. Die DNA wurde durch die Zugabe von 250 µl 100 % Ethanol gefällt und anschließend in 15 min bei 14000 rpm und RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl TSR aufgenommen.

Zuletzt wurde die DNA durch Inkubation für 2 min bei 90 °C denaturiert und stand damit für die Auftrennung im hauseigenen ABI-Sequenzierer zur Verfügung.

4.6.17 Pulsfeldgelelektrophorese

Bei der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wird die gesamte genomische DNA mit Hilfe selten schneidender Restriktionsenzyme in große Fragmente zerlegt und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. In der hier genutzten PFGE-Apparatur lassen sich Fragmente bis zu einer Größe von ca. 700 kb analysieren. Die Auftrennung der großen DNA-Fragmente wird durch das Anlegen eines elektrischen Wechselfeldes erreicht. Bei der hier verwendeten „*Contour-clamped homogeneous electric field* Elektrophorese (CHEF)“ sind die Elektroden hexagonal angeordnet. Der elektrophoretische Trenneffekt beruht darauf, dass lange DNA-Moleküle wesentlich längere Zeit brauchen als kurze DNA-Fragmente, um sich im wechselnden Feld zu orientieren und durch das Agarosegel zu wandern.

Tabelle 4.3: Lösungen für die Pulsfeldgelelektrophorese.

Lösung	Zusammensetzung
SE-Puffer	75 mM NaCl
EC-Puffer	25 mM EDTA pH 8,0
	6 mM Tris/HCl pH6
	1 M NaCl
	100 mM EDTA
	0,5 % Bridj 58
10 x Puffer für LGT-Agarose	0,2 % (w/v) Desoxycholat
	0,5 % (w/v) N-Laurylsarcosyl
	10 mM Tris/HCl
	10 mM MgCl ₂
	0,1 mM EDTA

Präparation chromosomaler DNA aus Staphylokokken für die PFGE

Die in der PFGE aufzutrennende chromosomale DNA konnte nicht auf herkömmlichem Weg isoliert werden, da sie vor jeglichen Scherkräften geschützt und nur an definierten Restriktionsstellen in Fragmente zerlegt werden soll. Zu diesem Zweck wurden ganze Zellen in Agarose eingebettet und in fixierter Form den vor der Elektrophorese notwendigen enzymatischen Reaktionen unterzogen. Die Bakterien wurden ÜN in 10 ml LB-Medium mit 1 % Glycin bei 37 °C geschüttelt. Davon wurden 2 ml abzentrifugiert, das Bakterienpellet zweimal in je 1 ml SE-Puffer gewaschen und schließlich in 0,5 ml SE-Puffer (Tabelle 15) aufgenommen. 100 µl der Bakteriensuspension wurden mit 900 µl H₂O gemischt und die

OD_{600nm} bestimmt. Diese sollte zwischen 0,7 und 1 liegen. Die Reaktionsgefäße mit der Bakteriensuspension wurden bei 37 °C in einem Inkubator vorgewärmt, während zweiprozentige LGT-Agarose (Tabelle 4.3) zum Schmelzen gebracht wurde. Nun wurden 500 µl der Bakteriensuspension, 500 µl der etwas abgekühlten Agarose und 20 µl Lysostaphin (2 mg/ml) gemischt und sofort in eine Gießvorrichtung für Agaroseblöckchen gegossen. Die Blöckchen wurden nach dem Erkalten in ca. 2 x 3 mm große Stückchen zerschnitten, in 3 ml EC-Puffer (Tabelle 4.3) gegeben und bei 37 °C 30 min bis 1 h im Schüttler inkubiert. Der EC-Puffer wurde danach durch 3 ml neuen EC-Puffer ersetzt, dem Proteinase K zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt war. Es folgte eine Inkubation der Blöckchen ÜN im Schüttelwasserbad bei 55 °C. Der Puffer wurde durch 10 ml TE-Puffer ersetzt, der noch weitere dreimal ausgetauscht werden musste, um die Proteinase K vollständig aus den Blöckchen zu entfernen. Bis zur Restriktion konnten die Blöckchen bei 4 °C aufbewahrt werden (mindestens 1 Woche, längstens 1 Jahr).

Restriktion

Zur Spaltung von Staphylokokken-DNA für die PFGE hat sich das Enzym *Sma*I bewährt, da es sehr selten im AT-reichen Staphylokokkengenom schneidet. Die Blöckchen wurden in 500 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers 1 h bei 50 °C vorinkubiert. Der Puffer wurde entfernt, durch 100 µl frischen Puffer ersetzt und 20 U des Enzyms zugegeben. Der Ansatz wurde bei 25 °C für 4 h inkubiert.

Beladung des Gels und Elektrophorese

Die Blöckchen wurden aus dem Puffer auf den horizontal liegenden Kamm der Gießvorrichtung gelegt, zusätzlich musste ein Blöckchen mit einem DNA-Größenstandard für PFGE aufgebracht werden. Mit einem Papiertuch wurde überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Dann wurde ein einprozentiges Agarosegel in 0,5 x TBE (Tabelle 3.9) in der Gießvorrichtung für Pulsfeldgele gegossen. Nachdem die Agarose etwas abgekühlt war, wurde der Kamm mit den auf ihm liegenden Agaroseblöckchen in die warme Agarose getaucht. Das musste vorsichtig, aber zügig geschehen, damit die Blöckchen nicht fortgeschwemmt wurden, sondern auf dem Kamm haften blieben. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm herausgezogen und das Gel in die PFGE-Apparatur gelegt. Es wurde das „CHEF-DR® III Pulsed Field Elektrophoresis System“ von BIO-RAD verwendet. Genaueres zum Aufbau und

den dazugehörigen Geräten kann dem mitgelieferten Handbuch entnommen werden. Die Bedingungen für die Elektrophorese richteten sich nach dem Größenbereich, in dem die beste Auftrennung erfolgen sollte. Werden kurze Pulszeiten (Umpolung des Feldes) verwendet, so werden kleinere Fragmente gut aufgetrennt, bei langen Pulszeiten ist der Bereich mit den großen DNA-Fragmenten besser aufgetrennt. Als Längenstandard wurde der Lambda Ladder PFG Marker und der Low Range PFG Marker (Tabelle 3.3) verwendet. Außerdem wurde chromosomale DNA des kartierten Stammes *S. aureus* 8325/4 mit *Sma*I gespalten und aufgetragen. Die entsprechenden Größen der Banden sind den Abbildungen zu entnehmen.

Normale Auftrennung: 10 h 5-40 s

10 h 0,5-10 s

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Die DNA konnte für eine anschließende Southern Blot Analyse durch Vakuumblot auf eine Nylonmembran übertragen werden (s. 4.16.2.).

4.7 Arbeiten mit RNA

4.7.1 Allgemeines

Um den Eintrag von RNasen zu vermeiden, wurde bei allen Experimenten mit Handschuhen gearbeitet. Um RNasen aus destilliertem Wasser zu entfernen, wurde es mit 0,1 % DEPC versetzt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend 30 min autoklaviert.

4.7.2 Extraktion von Gesamt-RNA aus Staphylokokken

20 ml TSB-Medium wurden mit 50 µl einer ÜNK beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} ≈ 1,5 (ca. 3 bis 4 h) geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur mit der gleichen Menge *RNAprotect* (Qiagen) versetzt, sofort gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Dabei wurden die Zellen fixiert und weitere RNA-Transkription verhindert. Der Ansatz wurde 10 min bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen konnten nun bis zu zwei Wochen bei -20 °C aufbewahrt oder sofort weiterverarbeitet werden. Zur Isolierung der RNA wurde das Pellet in 1,5 ml RLT-Puffer resuspendiert und in ein FastPrep-Röhrchen mit vorbereiteten Glaskügelchen gegeben. Nun wurden die Zellen zweimal 30 s auf Stufe 6 in der

FastPrep aufgeschlossen und sofort auf Eis abgekühlt. Um die Glaskügelchen aus dem Ansatz zu entfernen, wurde das Röhrchen 10 s bei 30000 g zentrifugiert und der Überstand (1 ml) mit dem gleichen Volumen 70 % Ethanol versetzt. Das Lysat wurde auf eine *RNeasy* Mini-Säule gegeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die gebundene RNA zweimal mit je 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Zum Schluss wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration durch photometrische Messung bestimmt.

4.7.3 Northern Blot

Elektrophorese von RNA in Agarosegelen

Zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurden denaturierende 0,6%ige RNA-Gele (mit Formaldehyd) mit den Maßen 14 cm × 15 cm, Dicke ca. 0,7 cm genutzt. Für ein derartiges Gel wurde in eine Glasflasche 0,9 g Agarose eingewogen und mit 111 ml DEPC-Wasser und 15 ml 10 × MOPS-Puffer (Tabelle 4.4) aufgefüllt. Im Mikrowellenherd wurde die Agarose unter zwischenzeitlichem Aufschütteln in ca. 6 × 30 s zur Quellung gebracht. Im Anschluss wurde die heiße Agaroselösung 30 min auf 65 °C temperiert und dann 12,75 ml Formaldehyd zugegeben und vorsichtig, aber gründlich gemischt, bevor die Gele gegossen werden konnten. Für ein 0,6%iges Gel wurden ca. 130 ml Agaroselösung in den gereinigten, waagrecht austarierten Gießstand gegossen.

Die aufzutrennenden RNA-Proben (10 µg) wurden in Eppendorfgefäßen mit RNase-freiem Wasser auf 5 µl aufgefüllt und mit 5 µl RNA-Probenpuffer (Tabelle 4.4) gemischt. Nach dem Erstarren der Agaroselösung (ca. 45 min) wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1 × MOPS überschichtet. Zunächst wurde ein zehnminütiger Vorlauf bei 60 V durchgeführt. Während dieser Zeit wurden die RNA-Proben bei 65 °C denaturiert, danach sofort auf Eis gestellt und das Gel zügig beschickt. Wenn erforderlich, wurde ein RNA-Molekulargewichtsstandard (3 µl Invitrogen in 3 µl Probenpuffer) aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 80 V (entspricht 4 V / cm Elektrodenabstand) für 3 h.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die RNA-Gele 20 min in SybrGreen I (Tabelle 4.4) gefärbt und die Nukleinsäuren im Anschluss am Typhoon sichtbar gemacht und dokumentiert.

Tabelle 4.4: Verwendete Lösungen zur RNA-Agarose-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Komponente	Konzentration / Menge
10 x MOPS	MOPS	200 mM
	Na-Acetat	50 mM
	EDTA	10 mM
SybrGreen I -Färbelösung	SybrGreen in 1 x MOPS	1:10000 verdünnte Stocklösung
RNA-Probenpuffer	Formamid	6,5 ml
	Formaldehyd	1,2 ml
	10 x MOPS-Puffer	2,0 ml
	Saccharose (50%)	0,4 ml
	Bromphenolblau	20 mg
	Xylencyanol	20 mg

Northern Blotting

Um definierte Transkripte in der Gesamt-RNA durch Hybridisierungsexperimente nachzuweisen, musste die RNA zunächst auf Nylonmembranen übertragen und fixiert werden. Dazu wurde das Northern Blotting genutzt.

Der Transfer erfolgte mittels Kapillarblot. Zunächst wurde eine Nylonmembran der Größe 15 cm x 15 cm 10 min in 20 x SSC eingelegt. Während dieser Zeit wurde das Gel für jeweils 10 min in Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung (Tabelle 4.5) geschwenkt. Durch die Inkubation mit der Denaturierungslösung wird eine partielle alkalische Hydrolyse der RNA erreicht, wodurch hochmolekulare RNA-Moleküle im Gel fragmentiert werden. Dadurch kann die Transfereffizienz auf die Nylonmembran erhöht werden. Im Anschluss wurde der Kapillarblot wie unter 4.6.15 beschrieben, aber unter Verwendung von RNase-freien Lösungen, durchgeführt. Nach Ende des Transfers wurden die Membranen zum Entfernen von Agaroseresten 2 min in 20 x SSC geschwenkt und zur Fixierung im Anschluss mit UV-Licht gecrosslinkt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Membranen in Kunststoffbeutel eingeschweißt und bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 4.5: Lösungen zum Northern-Transfer.

Bezeichnung	Komponente	Endkonzentration
Denaturierungslösung	NaOH	50 mM
	NaCl	10 mM
Neutralisierungslösung	Tris/HCl (pH 7,4)	100 mM

Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte wie unter 4.6.15 für Southern Blots beschrieben. Als Sonde wurden gereinigte PCR-Produkte (200 bis 400 ng) eingesetzt. Für die Detektion wurde das sensitivere *ECLTM Advance* Kit (Tab. 3.11) verwendet.

4.8 Arbeiten mit Protein

4.8.1 Gewinnung von Proteinrohextrakten aus *Staphylococcus*

Zur Gewinnung von Proteinrohextrakten aus *S. epidermidis* wurden die Zellen bei der gewünschten OD geerntet, auf Eis gekühlt und auf eine $OD_{600nm} \approx 1,0$ verdünnt. Anschließend wurde ca. 1 ml der Suspension in ein FastPrep-Röhrchen mit Glaskügelchen überführt und in der FastPrep mechanisch aufgeschlossen (2 Intervalle, 40 s, Stufe 6). Danach wurde das Röhrchen sofort auf Eis abgekühlt. Nach Absetzen der Glaskügelchen wurde der Überstand mit $5 \times$ SDS-Probenpuffer versetzt und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

4.8.2 Gewinnung von Zellwandproteinextrakten aus *Staphylococcus*

Um zellwandgebundene Proteine aus *S. epidermidis* zu isolieren, wurde das Protokoll von Simon Foster verwendet (Clarke, 2002). Dazu wurden 50 ml TSB 1:50 mit einer ÜNK des entsprechenden Stammes beimpft und bis zur gewünschten OD bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und auf eine $OD_{600nm} \approx 1,0$ verdünnt. Anschließend wurden 50 ml der Zellsuspension bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 16100 g 5 min abzentrifugiert. Nun wurden die Zellen in 1 ml TBS/ 0,5 mM PMSF/ 1 mg/ml Iodacetamid resuspendiert und in ein FastPrep-Röhrchen überführt. Die Suspension wurde zehnmal 40 s bei Stufe 6 in der FastPrep aufgeschlossen, wobei das Röhrchen zwischen jedem Intervall auf Eis abgekühlt wurde. Nach Absetzen der Glaskügelchen wurde der Überstand abgenommen und das unlösliche Zellwandmaterial durch zehnminütige Zentrifugation bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 16100 g abgetrennt. Das Pellet wurde zweimal in 10 Volumina TBS gewaschen ($4\text{ }^\circ\text{C}$, 16100 g , 10 min) und schließlich in $200\text{ }\mu\text{l}$ $1 \times$ SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Probe wurde 3 min bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ aufgekocht und das unlösliche Material durch Zentrifugation ($4\text{ }^\circ\text{C}$, 16100 g , 10 min) entfernt. Die Probe stand nun zur Auftrennung im SDS-PAGE bereit.

4.8.3 Zellanzucht und Zellernte bei der heterologen Proteinexpression

Zur Überexpression der Transposase wurde eine 3 ml Vorkultur des entsprechenden *E. coli* Expressionsstamms in LB + Ampicillin [$100\mu\text{g}/\mu\text{l}$] bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,6 bis 1,2 angezogen. 2 ml dieser Vorkultur wurden abzentrifugiert und in 1 ml frischem LB-Medium resuspendiert, um damit eine 200 ml Hauptkultur zu beimpfen (LB + Ampicillin [$50\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$]). Die Hauptkultur wurde bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ bis zu einer OD von 0,6 bis 1 geschüttelt. Danach wurde die Transposaseexpression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Nach Induktion wurden die

Zellen weitere 2 h bei 30 °C (bzw. bei 18 °C ÜN) geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gestellt und dann 10 min bei 4 °C und 4500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet konnte im Anschluss bei –20 °C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet werden. Der Erfolg der Induktion wurde in einem Protein-Minigel (4.7.5) getestet.

4.8.4 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Dazu wurden die Pellets auf Eis in 7,5 ml Lysispuffer (Tabelle 4.6) in einem 50 ml Falconröhrchen vereinigt. Die Zellsuspension wurde 15 min bei RT inkubiert und anschließend mit einer Ultraschallsonde fünfmal 30 s aufgeschlossen. Dabei wurde eine Erhitzung der Suspension vermieden. Die Zelltrümmer wurden 20 min bei 4 °C und 13000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit einem Proteaseinhibitormix (Tabelle 3.3) versetzt.

Tabelle 4.6: *Lysispuffer.*

Komponente	Konzentration / Menge
Tris pH 8	50 mM
EDTA pH 8	2,5 mM
β-Mercaptoethanol	1 % (v/v)
Lysozym	0,1 mg/ml
Triton® X-100	0,1 % (v/v)

Vor der weiteren Reinigung musste der Proteinrohextrakt in CaCl₂-haltigen Bindungspuffer (Tabelle 4.7) umgepuffert werden. Dies erfolgte mittels Dialyse bei 4 °C in 1,5 bis 2 l Puffervolumen (8h bis ÜN).

Tabelle 4.7: *CaCl₂ Bindungspuffer.*

Komponente	Konzentration / Menge
Tris pH 8	50 mM
Magnesiumacetat	1 mM
β-Mercaptoethanol	1 % (v/v)
Natriumchlorid	150 mM
Calciumchlorid	2 mM
Imidazol	1 mM

4.8.5 Reinigung der IS256 Transposase mittels Affinitäts-Chromatographie

Die mit Hilfe des pCAL-n-FLAG Vektors (Tabelle 3.11) in *E. coli* überexprimierte IS256 Transposase ist mit einem 4 kDa N-terminalen *tag* versehen. Dieser *tag* enthält sowohl die Sequenz des FLAG-Epitops als auch des Calmodulin-bindenden Peptids (CBP). Zur Reinigung der Transposase aus dem Proteinrohextrakt wurde die hohe Affinität ($K_d=10^{-9}$) des CBP für Calmodulin in Anwesenheit von Ca^{2+} genutzt. Zunächst wurde die *Calmodulin Affinity Resin* (Tabelle 3.1) durch dreimaliges Waschen mit CaCl_2 -Bindungspuffer (Tabelle 4.7) equilibriert. Dann wurde die Resin mit ca. zwei Resinvolumina Bindungspuffer versetzt und der gegen Bindungspuffer dialysierte Proteinrohextrakt zugegeben. Die Mischung wurde 6 h bis ÜN bei 4 °C unter sanftem Schütteln inkubiert. Dabei erfolgte die Bindung der CBP-Transposase an das Calmodulin. Für die weitere Reinigung wurde die Resin-Suspension in ein 20 ml Glassülchen gefüllt. Nach Absetzen der Resin wurde der Säulendurchlauf (Proteinrohextrakt ohne CBP-Transposase) aufgefangen. Die Säule wurde zehn- bis zwölfmal mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine vollständig zu entfernen. Nun wurde die CBP-Transposase unter Ca^{2+} -freien Bedingungen mittels Zugabe von 5 - 10 ml Elutionspuffer (Tabelle 4.8) von der Säule eluiert. Alle Schritte erfolgten bei 4 °C.

Tabelle 4.8: Elutionspuffer.

Komponente	Konzentration / Menge
Tris pH 8	50 mM
EGTA	2 mM
β -Mercaptoethanol	1 % (v/v)
Natriumchlorid	300 mM

Tabelle 4.9: Cleavage buffer.

Komponente	Konzentration / Menge
Tris/HCl pH 6,5	20 mM
NaCl	50 mM
CaCl_2	1 mM

Tabelle 4.10: Storage buffer.

Komponente	Konzentration / Menge
Glycerol	20 % (v/v)
Tris pH 8	50 mM
NaCl	100 mM
EDTA pH 8	0,1 mM
DTT	1mM

Der Proteingehalt der Fraktionen wurde bestimmt (siehe 4.8.6) und die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration vereinigt. Zur anschließenden Behandlung mit Faktor Xa wurde das gereinigte Protein gegen 1 x *Cleavage buffer* (Tabelle 4.9) dialysiert. Für eine Lagerung des gereinigten Proteins musste zunächst in *Storage buffer* (Tabelle 4.10)

umgepuffert werden. Dies erfolgte mittels Dialyse ÜN gegen 1 l *Storage buffer*. Wenn erforderlich, wurde das gereinigte Protein im Anschluss mittels VivaSpin Filtration aufkonzentriert. Gereinigtes, konzentriertes Protein wurde in 10 µl Aliquots bei – 20 °C bzw. – 80 °C (längere Zeiträume) gelagert.

4.8.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Dazu wurde der zu messende Proteinextrakt zunächst in 200 µl A. dest. verdünnt (z.B. 190 µl A. dest. und 10 µl Proteinextrakt) sowie durch Mischen von 5 × Roti-Nanoquant und A. dest. im Verhältnis 1:5 die Nachweislösung vorbereitet. Im Anschluss wurden 800 µl der Nanoquant-Lösung mit der verdünnten Proteinprobe gemischt und im Spektralphotometer bei 590 nm und 450 nm gegen A. dest. gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der gemessenen Quotienten aus der Absorption bei 590 nm und 450 nm berechnet. Der lineare Bereich, in dem sich der gemessene Quotient befinden sollte, lag zwischen 0,6 und 1,3. Die Proteinmenge ergab sich aus einer mit BSA ermittelten Eichkurve.

4.8.7 Mini-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen nach ihrem apparenten Molekulargewicht erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Zur Präparation von zwei diskontinuierlichen Minigelen (bestehend aus Trenn- und Sammelgel) wurden die Gießapparaturen (Tabelle 3.1) nach den Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Dann wurde zunächst das Trenngel (Tabelle 4.11) bis ca. 1 cm unterhalb der Kammhöhe gegossen und mit ca. 1 ml A. bidest oder Isopropanol überschichtet. Nach ca. einer Stunde wurde das Sammelgel (Tabelle 4.12) auf das polymerisierte Trenngel gegossen und der Kamm mit den Auftragstaschen eingesetzt.

Tabelle 4.11: Zusammensetzung des Trenngels nach Laemmli, 1970.

Komponente	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)
A. bidest	4 ml	3,3 ml	2,3 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
30 % Acrylamid / Bis (37,5:1)	3,3 ml	4 ml	5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl	4 µl

Tabelle 4.12: Zusammensetzung des Sammelgels nach Laemmli, 1970.

Komponente	Sammelgel
A. bidest	2,7 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,3 ml
30 % Acrylamid / Bis (37,5:1)	0,83 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Nach Polymerisieren des Sammelgels wurden vorsichtig die Kämme entfernt und die Gele in die Laufkammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer (Tabelle 4.13) befüllt und die Auftragstaschen kurz mit Laufpuffer gespült. Die Proteinproben wurden in 4 × SDS-Probenpuffer (Tabelle 4.14) verdünnt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach wurden die Proben kurz anzentrifugiert, auf Eis gestellt und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Protein-Größenstandard (Tabelle 3.3) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei RT und einer Spannung von 150 V (ca. 1 bis 2 h). Im Anschluss konnten die Gele gefärbt oder weiter zum Western-Blot verwendet werden.

Tabelle 4.13: 10 × Laufpuffer.

Komponente	Menge
Tris	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
	ad 1 l A. dest.

Tabelle 4.14: 4 × SDS-Probenpuffer.

Komponente	Konzentration
Glycerin	40 % (v/v)
DTE	40 mM DTE
SDS	10 % (v/v)
Tris pH 6,8	250 mM
Bromphenolblau	0,4 %

4.8.8 Coomassie-Färbung

Tabelle 4.15: Lösungen zur Coomassiefärbung.

Lösung	Zusammensetzung
Färbelösung	0,6 g ServaBlue G250 0,6 g ServaBlue R250 454 ml 96 % Ethanol 92 ml konzentrierte Essigsäure A. dest. ad 1 l
Entfärbelösung	330 ml 96 % Ethanol 100 ml konzentrierte Essigsäure A. dest. ad 1 l

Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und danach 30 min, gegebenenfalls auch länger, in Entfärbelösung entfärbt (Tabelle 4.15). Das Gel konnte nun eingescannt oder in Zellophanfolie getrocknet werden.

4.8.9 Silberfärbung

Um auch in nur geringen Mengen vorhandene Proteine zu detektieren, wurde die im Vergleich zur Coomassiefärbung sensitivere Silberfärbung durchgeführt. Hierzu wurde das Gel zunächst mindestens 1 h in Fixierlösung (Tabelle 4.16) geschwenkt. Im Anschluss wurde das Gel dreimal je 20 min mit 50 % Ethanol gewaschen. Es folgte eine einminütige Inkubation mit Sensitivierungslösung (Tabelle 4.16). Danach wurde das Gel wiederum zweimal 20 min mit A. bidest. gewaschen. Nun wurde das Gel für 20 min mit der Färbelösung (Tabelle 4.16) versetzt und anschließend zweimal 20 s mit A. bidest gewaschen. Schließlich wurde das Gel mit Entwicklerlösung (Tabelle 4.16) inkubiert und der Entwicklungsprozess sofort nach Sichtbarwerden der Proteinbanden durch Zugabe von Stopplösung (Tabelle 4.16) unterbrochen. Nach 30 Sekunden wurde das Gel weitere 30 s mit A. bidest. gespült, anschließend weitere 15 min in Stopplösung und schließlich 30 min in A. bidest gewaschen.

Tabelle 4.16: Lösungen zur Silberfärbung von Proteingelen.

Lösung	Zusammensetzung
Fixierlösung	50 % (v/v) Ethanol 12 % (v/v) Essigsäure 0,5 ml / l Formaldehyd (37 %)
Sensitivierungslösung	0,8 mM Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O
Färbelösung	1,2 mM AgNO ₃ 0,5 ml / l Formaldehyd (37 %)
Entwickler	280 mM Na ₂ CO ₃ 16 mM Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O 0,5 ml / l Formaldehyd (37 %)
Stopplösung	1 % (w/v) Glycin

4.8.10 Western Blot

Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zwecks Immunodetektion erfolgte mit Hilfe eines Graphit-Elektroblotters. Zuerst wurde die Anodenseite mit A. dest. befeuchtet. Darauf wurden 6 Lagen in Anodenpuffer I und 3 Lagen in Anodenpuffer II (Tabelle 4.17) getränktes Whatmanpapier platziert, gefolgt von der mit Anodenpuffer II

befeuchteten Nitrocellulosemembran. Nun wurde das Proteingel vorsichtig auf der Membran platziert und eventuelle Luftblasen entfernt. Das Paket wurde mit 3 Lagen in Kathodenpuffer (Tabelle 4.17) getränktem Whatmanpapier bedeckt und die ebenfalls mit A. dest. befeuchtete Kathodenplatte aufgelegt. Zum Blotten (1 h, 44 mA/Minigel, maximale Voltzahl) wurde die Apparatur mit ca. 3 kg beschwert.

Nach dem Blotten wurde die Membran (Proteinseite nach oben) in ein Schälchen überführt. Zunächst wurde die Membran 1 bis 2 h bei RT in Blotto (Tabelle 4.17) geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (1:200 bis 1:1000 in Blotto) ÜN bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal 15 min mit TBST (Tabelle 4.17) bei RT gewaschen. Daran schloss sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG bzw. Anti-Maus IgG, 1:2000 in Blotto) für 1 h bei RT an. Zuletzt wurde der Blot nochmals in TBST gewaschen und schließlich mit einem dünnen Film des ECL-Substrates bedeckt.

Tabelle 4.17: Puffer für den Western Blot.

Puffer	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	0,3 M Tris pH 7,5 20 % (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris pH 7,5 20 % (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris pH 7,5 40 mM Aminocaprinsäure 20 % (v/v) Methanol
TBST	TBS (Tabelle 9) + 0,05 % Tween20
Blotto	TBS (Tabelle 9) + 5 % Magermilchpulver

4.8.11 EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*)

Um das Bindungsvermögen der Transposase an DNA *in vitro* zu untersuchen, wurden EMSA-Experimente durchgeführt. Hierzu wurde das *DIG Gel Shift Kit* (Tab. 3.11) genutzt.

Markierung der DNA

Die Markierung der DNA erfolgte durch Anhängen von Digoxigenin-11-ddUTP an das 3'-Ende mittels Terminaler Transferase. Dazu wurden 3,85 pmol des zu markierenden DNA-Fragments mit A. bidest. auf 10 µl aufgefüllt. Sodann wurde auf Eis zugefügt:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
5 x Labeling Puffer (Tabelle 4.18)	4 µl	1x
CoCl ₂ -Lösung	4 µl	5 mM
DIG-ddUTP	1 µl	0,05 mM
Terminale Transferase	1 µl	20 U/µl

Nach kurzem Mischen folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C. Danach wurde der Ansatz auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von zunächst 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8) und 3 µl A. bidest. gestoppt. Die Endkonzentration der markierten Sonde betrug somit 0,155 pmol/µl.

Tabelle 4.18: Zusammensetzung des Labeling Puffers.

Puffer	Zusammensetzung
5 x Labeling Puffer, pH 6,6	1 M Kaliumcacodylat 0,125 M Tris-HCl 1,25 mg/ml BSA

Test der Markierungseffizienz

Um den Erfolg der Markierungsreaktion zu bestimmen, wurden je 1 µl von Verdünnungen der markierten DNA-Sonde (155 fmol/µl, 15,5 fmol/µl, 1,55 fmol/µl, 0,15 fmol/µl) sowie eines bereits markierten Kontroll-Oligonukleotids in TEN-Puffer (Tabelle 4.19) auf ein kleines Stück positiv geladener Nylonmembran aufgetropft. Danach wurde die Membran einer immunologischen Detektion unterzogen. Die Markierung wurde als erfolgreich angesehen, wenn der „0,15 fmol“-Spot noch ein Signal zeigte.

Tabelle 4.19: Zusammensetzung des TEN-Puffers.

Puffer	Zusammensetzung
TEN-Puffer	10 mM Tris pH 8 1 mM EDTA pH 8 0,1 M NaCl

EMSA Reaktion

Um die Bindung des zu untersuchenden Proteins an die markierte DNA zu testen, wurde die Sonde mit TEN-Puffer zunächst auf eine Konzentration von 15 fmol/ μ l verdünnt. Anschließend wurden auf Eis gemischt:

Bindungspuffer 5x (Tabelle 4.20)	2 μ l
Poly[d(I-C)] [1 μ g/ μ l]	0,5 μ l
Poly L-Lysine [0,1 μ g/ μ l]	0,5 μ l
Protein	1 – 5 μ l
A. bidest.	ad 9 μ l
DIG-markierte DNA [15,5 fmol/ μ l]	1 μ l

Tabelle 4.20: Zusammensetzung 5 x Bindungspuffer.

Puffer	Zusammensetzung
Bindungspuffer	100 mM Hepes pH 7,6 5 mM EDTA 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 5 mM DTT 1 % (w/v) Tween 20 150 mM KCl

Unspezifische Kompetitor-Nukleinsäure und Protein wurden stets vor Zugabe der markierten DNA gemischt, um unspezifische Bindungen an die markierte DNA zu verhindern. Die Proteinkonzentrationen wurden variiert. Verdünnungen erfolgten im *Storage buffer* (Tabelle 4.9) des Proteins.

Der Ansatz wurde nach sorgfältigem Mischen 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden sofort 2 μ l Ladepuffer (0,2 % [w/v] Bromphenolblau, 40 % Glycerin, 60 % [v/v] 1 x TBE) zugesetzt und die Proben auf Eis gestellt.

Gelelektrophorese

Die DNA-Protein-Komplexe wurden in sechsprozentigen nativen 0,5 x TBE-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einem 30 bis 60-minütigen Vorlauf

bei 150 V wurden die Proben sorgfältig, aber zügig in die Taschen pipettiert. Der Lauf erfolgte für 1,5 h bei 100 V und RT (kleines Gel) bzw. für 3 h bei 200 V und 4 °C (großes Gel), bis die Bromphenolblau-Lauffront das Gelende erreicht hatte.

Blotten und Crosslinken der Membran

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde zunächst eine Glasplatte vorsichtig entfernt. Eine für 5 min in 0,5 x TBE prä-äquilibrierte positiv geladene Nylonmembran passender Größe wurde sorgfältig auf das Gel platziert. Darauf wurden 4 Lagen mit 0,5 x TBE getränkten Whatmanpapiers gelegt. Durch sanftes Rollen mit einer Pipette wurden eventuelle Luftblasen entfernt. Dann wurde der aus Gel, Membran und Papier bestehende Stapel von der zweiten Glasplatte abgehoben und die andere Seite des Gels mit weiteren 4 Lagen von in 0,5 x TBE getränktem Whatmanpapier bedeckt. Der entstandene „Sandwich“ wurde zwischen die Elektroden des Elektrobloppers gelegt und die Apparatur verschlossen. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 30 min. Nach Abschluss des Transfers wurde die DNA auf der Membran durch Crosslinken mittels UV-Licht fixiert (Tabelle 3.1). Schloss sich die Detektion nicht direkt an, wurde die Membran luftgetrocknet zwischen Whatmanpapier im Kühlschrank aufbewahrt.

Chemilumineszente Detektion

Zuerst wurde die Membran kurz (3 - 5 min) in Waschpuffer (Tabelle 4.21) geschwenkt. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen durch 30-minütige Inkubation in 80 ml Blocking-Lösung (Tabelle 4.21) abgesättigt. Die Antikörper-Bindung erfolgte während einer 30-minütigen Inkubation in Antikörperlösung (Tabelle 4.21). Nun wurde die Membran zweimal 30 min in je 100 ml Waschpuffer gewaschen und dann 3 - 5 min in 20 ml Detektionspuffer (Tabelle 4.21) äquilibriert. Zum Schluss wurde die Membran mit der DNA-Seite nach oben auf eine Klarsichtfolie platziert und 1 ml CSPD®-Lösung (Tabelle 4.21) appliziert. Sofort danach wurde die Membran mit einem weiteren Stück Klarsichtfolie bedeckt, so dass sich das Substrat gleichmäßig als dünner Film über der Oberfläche verteilte. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurde überschüssige Flüssigkeit herausgedrückt und die Membran eingeschweißt. Die feuchte Membran wurde weitere 10 min bei 37 °C inkubiert, um die lumineszente Reaktion zu verstärken. Schließlich wurden die chemilumineszenten Signale mittels Röntgenfilm oder Chemi Lux Imager (Tab.3.1) detektiert.

Tabelle 4.21: Zusammensetzung der für die Detektion benötigten Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,3 % (v/v) Tween 20 pH 7,5
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl Mit NaOH-Plätzchen auf pH 7,5 einstellen
Detektionspuffer	0,1 M Tris/HCl 0,1 M NaCl pH 9,5
Blocking Vorratslösung (zehnfach konzentriert)	Blocking Reagenz (Roche) 10 % (w/v) in Maleinsäurepuffer bei 65 °C unter Rühren auflösen, Aliquots bei -20 °C einfrieren
1 x Blocking-Lösung	Blocking Vorratslösung 1:10 in Maleinsäurepuffer verdünnen immer frisch ansetzen
Antikörperlösung	Anti-Digoxigenin-AP 5 min 10000 rpm zentrifugieren, dann 1:10 000 in Blocking Lösung verdünnen
CSPD®-Lösung	0,1 mg/ml Vorratslösung 1: 100 in Detektionspuffer verdünnen (1 ml Endvolumen)

4.9 Mikroskopie

4.9.1 Immunofluoreszenzmikroskopie

Zum mikroskopischen Nachweis zellwandgebundener Proteine im Biofilm wurde zunächst je 1 ml TSB-Medium in separaten Kammern eines Kammerobjektträgers (*chamber slide*) mit jeweils 10^7 Zellen einer ÜNK der Stämme *S. epidermidis* CSF41498 WT sowie *S. epidermidis* CSF41498-1 PVA und PVC beimpft. Der Objektträger wurde 18 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand sehr vorsichtig abgezogen und 200 µl des primären Antikörpers (1:100 in TSB verdünnt) zugesetzt. Der Objektträger wurde weitere 30 min bei 37 °C inkubiert, gefolgt von dreimaligem vorsichtigen Waschen mit je 500 µl TSB-Medium und nachfolgender Zugabe des sekundären, Cy3-markierten α -Maus-Antikörpers (200 µl; 1:200 in TSB-Medium, Anregung 528–552 nm, Emission 578-637 nm). Nach 30 min bei 37 °C wurden die Kammern wiederum dreimal vorsichtig mit TSB-Medium gespült und die Zellen im Biofilm schließlich mit dem *LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial viability Kit* gefärbt (je 1 µl Syto9 und Propidiumiodid pro 1 ml TSB). Dabei färbt das im Kit enthaltene Syto9 alle Zellen fluoreszenzgrün (Anregung 480 nm / Emission 500 nm), während Propidiumiodid (Anregung 490 nm nm / Emission 635 nm) nur tote oder beschädigte Zellen fluoreszenzrot anfärbt.

Nach 15-minütiger Dunkelinkubation konnten die Fluoreszenzfärbungen an einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop ausgewertet werden. Mit Hilfe eines Transmissionsfilters wurden die Intensitäten der drei vom Laser emittierten Wellenlängen separat justiert, um die verschiedenen Farbstoffe (Cy3, Syto9, Propidiumiodid) in der Probe gleichmäßig zu illuminieren. Unter Verwendung des 100×-Immersionsölobjektivs wurden optische Einzelbilder aufgenommen. Dabei wurde den vom Detektor im Cy3-Bereich empfangenen Lichtsignalen die Falschfarbe Blau zugeordnet. Die gewonnenen Rohdaten wurden mit der Software LSM Image Browser (Tab. 3.12) bearbeitet, wobei durch Überlagerung von Einzelbildern Mischfarben entstanden.

4.9.2 Atomic Force Mikroskopie

Die *Atomic Force* Mikroskopie (AFM) wurde 1986 von Binnig, Quate und Gerber entwickelt (Binnig *et al.*, 1986). Es handelt sich um eine Variante der *Scanning Probe* Mikroskopie (SPM), wobei eine scharfe Spitze über eine Oberfläche scannt und Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probenoberfläche gemessen werden. Bei der AFM ist die Spitze am Ende eines flexiblen Arms (*cantilever*) angebracht. Durch die zwischen Probenoberfläche und Spitze wirkenden Kräfte wird der *cantilever* abgelenkt. Diese Ablenkung kann durch einen optischen Detektor gemessen werden. Mittels eines Rückkopplungsmechanismus wird dieses Signal genutzt, um die Kräfte zwischen Probenoberfläche und Spitze zu minimieren (Fotiadis *et al.*, 2002). Dabei eignet sich der *tapping mode* insbesondere für weiche, biologische Proben, da der Kontakt zur Probenoberfläche gering gehalten wird und die Probe somit beim Scannen so wenig wie möglich beschädigt wird. Diese Technik erlaubt es, hochauflösende Bilder biologischer Objekte zu erhalten, ohne die Proben zuvor aufwändigen Manipulationen zu unterziehen.

Arbeiten mit dem *Atomic force* Mikroskop wurden in der Arbeitsgruppe von Bernt Eric Uhlin (Molekularbiologisches Institut, Umeå universitet, Schweden) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem Nanoscope III Multimode AFM im *tapping mode* (Luft) gewonnen. Es wurden Standard Silikon Cantilever (Spitzenradius 20 - 40 nm) benutzt.

Typische Scan Parameter waren:

Scan rate 1 Hz
Driving frequency 250 - 350 kHz
Humidity 10 - 15 %

Bakterielle Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: Ein bis drei frische Kolonien wurden von einer Agarplatte geschabt und in 50 µl ultrareinem, filtriertem (0,22 µm) Wasser suspendiert. Alternativ wurde etwas Biofilm aus einer Gewebekulturflasche entnommen und resuspendiert. 25 µl der Suspension wurden auf ein frisch abgezogenes Mica-Plättchen getropft und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension vorsichtig mit der Pipette abgezogen, ohne die Mica-Oberfläche zu berühren und zweimal mit 1 ml filtriertem Wasser gespült. Verbleibende Flüssigkeit wurde mit einem Filterpapierstreifen entfernt. Die Plättchen wurden mindestens 2 h in einem Exsikkator getrocknet.

Zur Visualisierung von DNA wurden zunächst silikonisierte Mica-Plättchen hergestellt. Diese weisen eine positiv geladene Oberfläche auf, was die Bindung der DNA an die Mica verbessert. Die Silikonisierung erfolgte nach der Methode von Lyubchenko (1997). Vor der Verwendung wurden die AP-Micas ÜN in Argon-Atmosphäre gelagert, jedoch nie länger als eine Woche.

Ca. 10 bis 40 ng gereinigte DNA wurden in filtriertem, ultrareinem Wasser verdünnt. Je nach Versuchsansatz wurde Protein zugemischt. 25 µl der DNA-Lösung wurden auf eine AP-Mica getropft und 2 min bei 37 °C inkubiert, um die gleichmäßige Verteilung der DNA auf dem Substrat zu gewährleisten. Hiernach wurde die DNA-Lösung mit einem Filterpapier abgesaugt und die Mica vorsichtig mit 1 ml ultrareinem, filtriertem Wasser gespült. Flüssigkeitsreste wurden mit Filterpapier abgezogen und die Mica mindestens 1 h im Exsikkator getrocknet.

5. ERGEBNISSE

5.1 Präzise Exzision von IS256

5.1.1 Konstruktion einer *icaC::IS256* und *icaC::IS256 Δ tnp* Insertionsmutante

In früheren Arbeiten unserer Gruppe wurde gezeigt, dass IS256 durch reversible Insertion in das *ica*-Operon Phasenvariation der Biofilmbildung verursachen kann. Während die Insertion eine Transposase-vermittelte Reaktion ist, war der Mechanismus der präzisen Exzision von IS256 bisher nicht bekannt. Bei diesem Prozess wird das IS-Element inklusive einer 8 bp *target site* Duplikation vollständig entfernt und so wieder die *icaC*-Originalsequenz hergestellt. In einem ersten Schritt sollte deshalb geprüft werden, ob die Exzision von IS256 ein Transposase-abhängiger Prozess ist. Dazu wurden zunächst zwei IS256-Insertionsmutanten konstruiert. In der ersten Mutante wurde eine komplette Kopie von IS256 in das *icaC*-Gen inseriert, während bei der zweiten Mutante das IS256 *tnp*-Gen durch eine 20 bp Deletion inaktiviert war und somit keine Transposase exprimiert werden konnte.

Als Ausgangsvektoren wurden pIL2 und pIL2 Δ tnp von Isabel Lössner verwendet, die auf einer natürlichen *icaC::IS256* Insertion eines klinischen *S. epidermidis* Isolates basieren (Loessner, 2002). Das 2,3 kb große *icaC::IS256* / *icaC::IS256 Δ tnp* Insert wurde jeweils von pIL2 und pIL2 Δ tnp per PCR amplifiziert, wobei die Primer „*icaC* upper *EcoRI*“ und „*icaC* lower *KpnI*“ (Tabelle 3.6) mit einer *KpnI* bzw. *EcoRI* Schnittstelle versehen waren. Anschließend wurden die PCR-Fragmente und das Plasmid pBT2 mit *EcoRI* und *KpnI* geschnitten. Bei pBT2 handelt es sich um einen Shuttle-Vektor, der zwei *origins of replication* (einen pBR-basierten *ori* für gram-negative und einen temperatursensitiven *ori* für gram-positive Organismen) besitzt (Brückner, 1997). Außerdem sind auf dem Vektor eine Ampicillinresistenz-Determinante (*bla*) sowie eine Chloramphenicolresistenz-Determinante (*cat*) lokalisiert, die Selektion in *E. coli* bzw. in Staphylokokken erlauben. Das *icaC::IS256* / *icaC::IS256 Δ tnp* Insert wurde mit pBT2 ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Die entstandenen Vektoren wurden pSH1 und pSH1 Δ tnp benannt (Abb. 5.1).

Nach Transformation in den restriktionsnegativen Stamm *S. aureus* RN4220 und Selektion auf Chloramphenicol wurde das Plasmid durch Midipräp re-isoliert, um es schließlich in

S. epidermidis CSF41498 einzubringen. Bei diesem Stamm handelt es sich um ein biofilmpositives, *icaADBC*-positives, aber IS256-negatives klinisches Isolat, das mittels Elektroporation transformierbar ist. Der Erfolg der Transformation wurde durch Isolierung des Plasmids, Rücktransformation in *E. coli* DH5 α und Testrestriktion überprüft. Zusätzlich wurde zur Kontrolle mittels Api-Staph eine Speziesbestimmung vorgenommen.

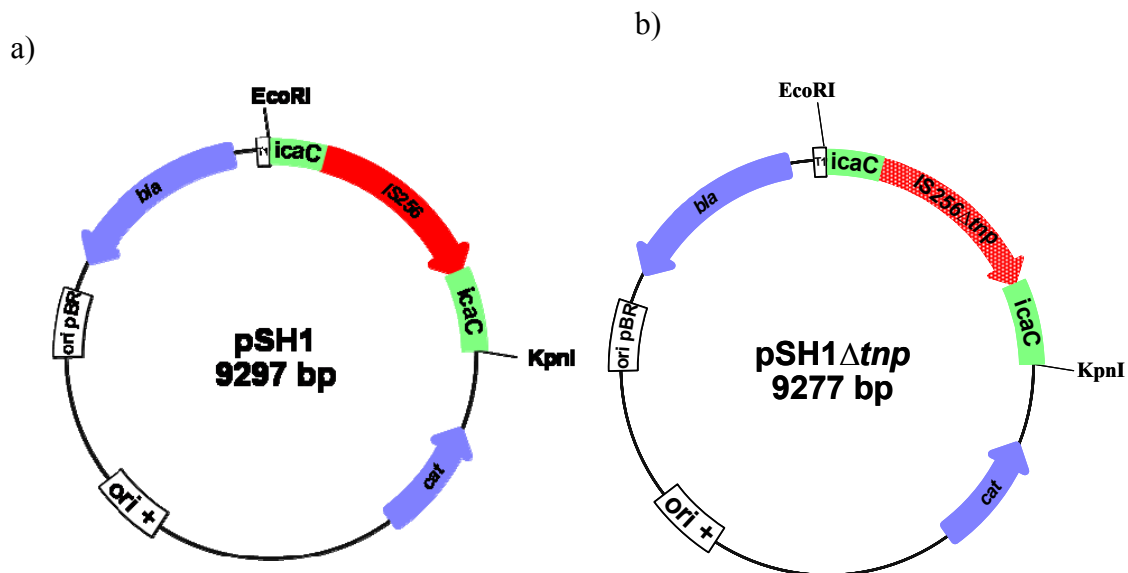


Abb. 5.1: Shuttle-Vektoren zur Einführung einer *icaC*::*IS256* bzw. *icaC*::*IS256 Δ tnp* Mutation in *S. epidermidis*. Beide Konstrukte sind pBT2 basiert. a) Intaktes *IS256*, b) *IS256 Δ tnp* mit 20 bp Deletion.

Zur chromosomalen Integration wurden *S. epidermidis* CSF41498 pSH1 bzw. pSH1 Δ tnp in TSB-Medium ÜN bei 30 °C unter Zusatz von Chloramphenicol angezogen. Danach wurde durch eine Erhöhung der Kultivierungskultur von 30 °C auf 42 °C in chloramphenicol-freiem TSB-Medium die Replikation des Vektors unterbunden (temperatursensitiver *ori*) und auf Kongorotagar (KGR) nach Kolonien gesucht, die nach Doppel-Crossover eine *icaC*::*IS256* Insertion besaßen und dadurch einen biofilmmnegativen Phänotyp aufwiesen. Diese erscheinen auf KRA als rote, glatte Kolonien, während biofilmpositive Kolonien schwarz und rau mit metallischem Schimmer sind.

Rote Kolonien wurden mittels Lysat-PCR auf Insertion von *IS256* ins *icaC*-Gen überprüft und der Verlust der Biofilmbildung phänotypisch im Adhärenzassay bestätigt. *IS256*-positive Klone wurden auf Sensitivität gegenüber Chloramphenicol (Verlust des Vektors) getestet. Die korrekte Insertion wurde durch *Southern Blot* mit einer *IS256*-, *icaC*- und pBT2-Sonde und Sequenzierung mit „*icaC* int“ Primern überprüft (Abb. 5.2a). Durch Pulsfeldgelelektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass die Mutanten aus dem

Stamm CSF41498 hervorgegangen sind und dabei keine größeren Genomumordnungen stattgefunden haben (Abb. 5.2b). Die entstandenen Mutanten wurden CSF41498-1 (*icaC::IS256*) und CSF41498-2 (*icaC::IS256 Δ tnp*) benannt.

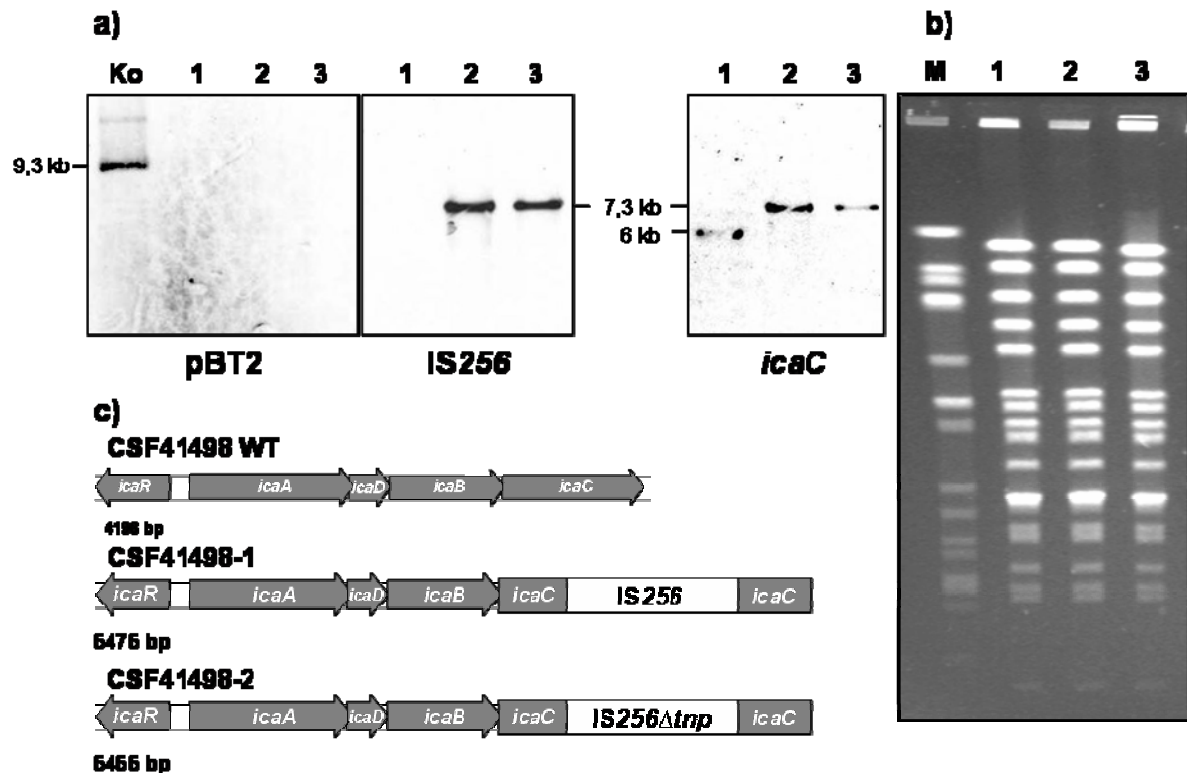


Abb. 5.2. Konstruktion einer *icaC::IS256* und *icaC::IS256 Δ tnp* Insertionsmutante in *S. epidermidis*. 1 – CSF41498-WT, 2 – CSF41498-1 (*icaC::IS256*), 3 – CSF41498-2 (*icaC::IS256 Δ tnp*). **a) Southern Blot.** Die DNA wurde mit *EcoRI* verdaut. Die zur Hybridisierung verwendete Sonde ist jeweils unter dem Blot vermerkt. Ko – Kontrolle (*pSH1* Plasmid-DNA). **b) Pulsfeldgelelektrophorese.** M – Kontrolle (DNA von *S. aureus* 8325). **c) Schematische Darstellung des *ica*-Operons in WT und Insertionsmutanten.**

5.1.2 Screening nach präziser Exzision von *IS256* und *IS256 Δ tnp*

Um nach präziser Exzision von *IS256* bzw. *IS256 Δ tnp* aus dem *icaC*-Gen zu suchen, sollten biofilmpositive Revertanten selektiert werden. Dazu wurden die Stämme CSF41498-1 und CSF41498-2 in TSB-Medium in Gewebekulturflaschen passagiert. Das Medium wurde täglich verworfen, die Flaschen mit sterilem PBS gespült und danach mit frischem Medium aufgefüllt. Auf diese Weise sollten Zellen, deren *icaC*-Sequenz wiederhergestellt wurde und die dadurch wieder auf der Polystyrenofoam-Oberfläche wuchsen, angereichert werden. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da aus früheren Experimenten bekannt war, dass die präzise Exzision ein sehr seltenes Ereignis mit einer Häufigkeit von $< 10^{-8}$ ist (Ziebuhr *et al.*, 1999). Sobald sich ein deutlicher Biofilm gebildet hatte (nach 7

bis 14 Tagen), wurden die Bakterien abgeschabt, in PBS resuspendiert und auf KRA ausplattiert.

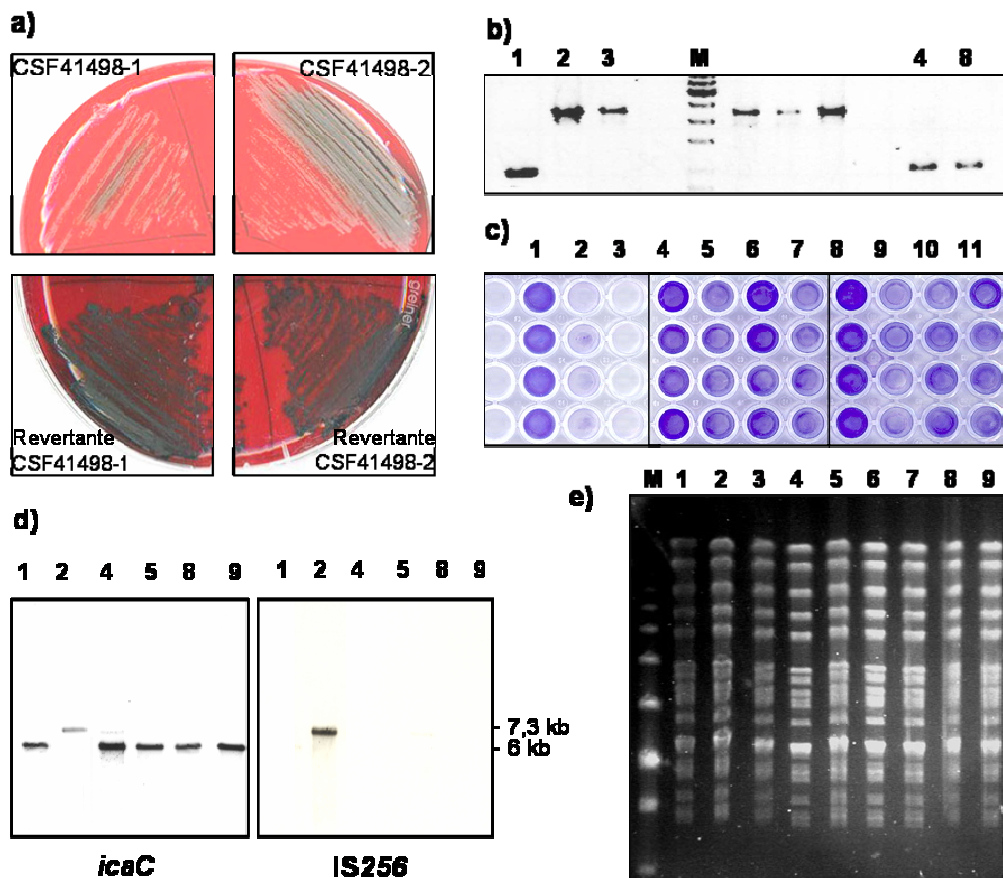


Abb. 5.3. Detektion von präzisen Exzisionsereignissen in *CSF41498-1* und *CSF41498-2*. 1 = *CSF41498* WT, 2 = *CSF41498-1*, 3 = *CSF41498-2*, 4 - 7 = Revertanten *CSF41498-1*, 8 - 11 = Revertanten *CSF41498-2*. **a) Phänotypische Differenzierung auf Kongorotagar.** **b) Lysat-PCR.** Beispiel eines Screenings nach Exzision von *IS256*. PCR mit *icaC*-spezifischen Primern. Insertionsmutante – 2,3 kb Bande, WT und Revertante – 1 kb Bande, M - Marker. Nicht beschriftete Banden sind falsch-positive Revertanten (PIA-unabhängige Biofilmbildung), bei denen keine Exzision stattgefunden hat. **c) Adhärenzassay.** **d) Southern Blot.** Die DNA wurde mit *EcoRI* verdaut. Die verwendeten Sonden sind jeweils unter dem Blot angezeigt. **e) Pulsfeldgelelektrophorese.** Die Revertanten weisen dasselbe Muster wie der WT auf. M = low range Pulsfeldgelmarker.

Nach zweitägiger Inkubation wurden eindeutig schwarze Kolonien (Abb. 5.3a) gepickt und mittels Lysat-PCR mit „*icaC* upper“ und „*icaC* lower“ Primern (Tabelle 3.6) auf Verlust der *IS256*-Sequenz überprüft. Mit der Wildtyp *icaC*-Sequenz als *template* entsteht dabei ein Amplikon von ca. 1 kb, mit *icaC*::*IS256* bzw. *IS256* Δ *tnp* als *template* hingegen von ca. 2,3 kb. Dabei wurden sowohl bei *CSF-1* als auch bei *CSF-2* Revertanten gefunden, deren *icaC*-Sequenz die Größe des Wildtyps aufwies (Abb. 5.3b). Durch Sequenzierung von *icaC* wurde in all diesen Fällen bestätigt, dass die Originalsequenz wiederhergestellt war. Um auszuschließen, dass die gefundenen Revertanten Kontaminanten waren (die bei einer mehrtägigen Passage ohne Selektionsdruck mitunter auftreten können) und gleichzeitig mögliche Genomumordnungen zu detektieren, wurde eine Pulsfeldgelelektrophorese

durchgeführt (Abb. 5.3e). Weiterhin wurde mittels Southern Blot geprüft, ob IS256 eventuell an neuen *loci* im Genom inseriert war. Bei keiner der getesteten Revertanten (41 bei CSF41498-1 und 30 bei CSF41498-2) konnte jedoch eine neue Insertion festgestellt werden. Stattdessen war IS256 jeweils komplett aus dem Genom entfernt (Abb. 5.3d).

Das Experiment wurde mit jeder Mutante mindestens dreimal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die Anzahl der Passagen bis zur Bildung eines deutlichen Biofilms variierte dabei beträchtlich, auch die Anzahl der gefundenen Revertanten war variabel. So lag der Anteil der schwarzen Kolonien zwischen 0,005 % und 0,67 % der Gesamt-CFU auf KRA. Beim Test der phänotypisch biofilmpositiven Varianten zeigte sich außerdem, dass auch bei schwarzen Kolonien in vielen Fällen IS256 bzw. IS256 Δ *tnp* noch in *icaC* inseriert war, so dass trotz ausgeprägter Biofilmbildung und umfangreichem Screening nur wenige Revertanten detektiert wurden. Häufig hatten die Bakterien offenbar die Fähigkeit zur PIA-unabhängigen Biofilmbildung erworben.

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Reversionsversuche mit CSF41498-1 und CSF41498-2. Die Zahlen in der Klammer geben jeweils die Zahl der mit Southern Blot getesteten Kolonien an.

	CSF41498-1	CSF41498-2
Anzahl Passagen	12 - 21	9 - 16
Biofilmbildung	+	+
Anzahl getesteter Kolonien	$\approx 0,6 \times 10^6 - 1 \times 10^6$	$\approx 0,5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$
IS256 Exzision	+	+
IS256 Neuinsertion	- (41)	- (30)

Da präzise Exzision sowohl im CSF41498-1 als auch im CSF41498-2 (also bei inaktivierter Transposase) erfolgte, lässt sich schlussfolgern, dass die präzise Exzision von IS256 ein Transposase-unabhängiger Prozess ist. Zudem wurden keine neuen Insertionen detektiert, wie sie bei einem Transpositionereignis zu erwarten wären.

5.1.3 Deletion der rechten *target site* Duplikation von IS256

Aus den ersten Reversionsversuchen ging hervor, dass die präzise Exzision Transposase-unabhängig erfolgt. Deshalb sollte nun untersucht werden, ob es sich stattdessen um ein Rekombinationsereignis handelt, bei dem die IS256-Sequenz vollständig aus dem Genom entfernt wird. Dabei wäre es denkbar, dass die 8 bp *target site* Duplikationen, die das IS-Element links und rechts flankieren, als homologe Bereiche für die Rekombination dienen. Um die Notwendigkeit der *target site* Duplikationen für die präzise Exzision zu

überprüfen, wurden deshalb zwei weitere Mutanten konstruiert, bei denen die mittleren 3 bp der rechten *target site* Duplikation deletiert wurden und dadurch die Homologie zwischen den flankierenden *target site* Duplikationen eingeschränkt wurde (Abb. 5.4).

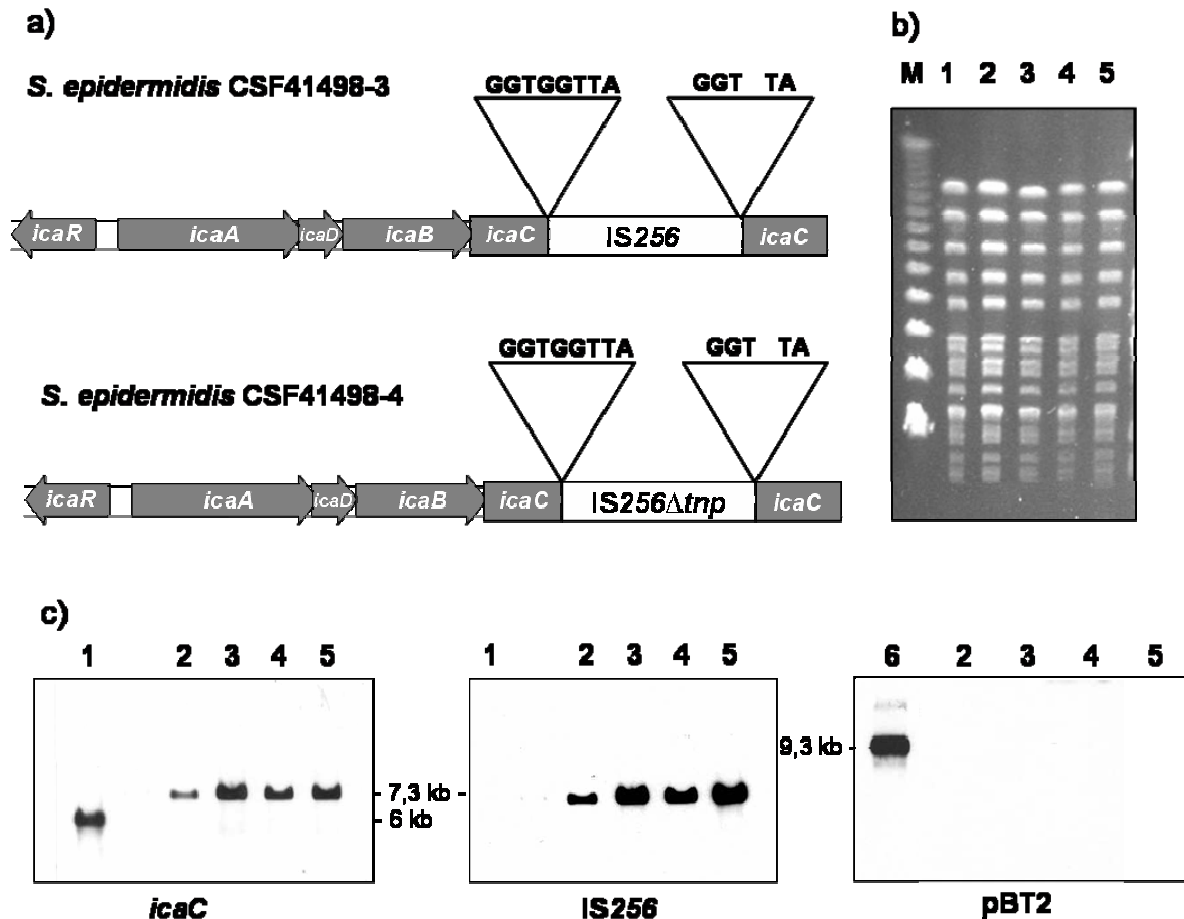


Abb. 5.4 Deletion von 3bp in der rechten *target site* Duplikation von CSF41498-1 und CSF41498-2. 1 = CSF41498 WT, 2,3 = CSF41498-3 (*icaC*::*IS256* Δ 3bp rechte *target site* Duplikation), 4,5 = CSF41498-4 (*icaC*::*IS256* Δ *tnp* Δ 3bp rechte *target site* Duplikation), 6 = Vektor *pSH3*. **a)** Schematische Darstellung des *ica*-Operons und der *target site* Duplikationen der Insertionsmutanten. In der rechten *target site* Duplikation wurden 3 bp (TGG) deletiert. **b)** Pulsfeldgelelektrophorese. Vergleich von CSF41498 WT und CSF41498-3/CSF41498-4. M = High range Pulsfeldgelmarker. **c)** Southern Blot. Die DNA wurde mit *EcoRI* verdaut. Die zur Hybridisierung verwendete Sonde ist jeweils unter dem Blot vermerkt.

Dazu wurden durch Elongase-PCR mit den überlappenden Primern „*icaC*-IRR 3bp del for“ und „IRR-*icaC* rev“ zunächst die Plasmide *pSH1* und *pSH1* Δ *tnp* amplifiziert. In der Primersequenz von „*icaC*-IRR 3bp del for“ waren die gewünschten 3 Nukleotide TGG deletiert. Nach der PCR wurde der Ansatz mit *DpnI* verdaut, um methylierte Template-DNA zu entfernen, und nach Inaktivierung des Enzyms ein Aliquot in *E. coli* DH5 α transformiert. Durch Rekombination der überlappenden Enden des PCR-Fragments entstanden so die Plasmide *pSH2* und *pSH2* Δ *tnp* mit jeweils einer 3 bp Deletion in der rechten *target site* Duplikation. Die korrekte Deletion wurde durch Sequenzierung des

icaC::IS256 Bereiches bestätigt. Die weiteren Schritte zur Konstruktion der chromosomalen *S. epidermidis* Mutanten (Transformation, chromosomale Integration) erfolgten wie unter 5.1.1 beschrieben. Die Stämme wurden CSF41498-3 (*S. epidermidis* CSF41498 *icaC::IS256* $\Delta 3\text{bp}_{\text{rechte target site Duplikation}}$) und CSF41498-4 (*S. epidermidis* CSF41498 *icaC::IS256* Δtnp $\Delta 3\text{bp}_{\text{rechte target site Duplikation}}$) benannt (Abb. 5.4).

5.1.4 Screening nach präziser Exzision von IS256 und IS256 Δtnp bei deletierter rechter *target site* Duplikation

Mit den Mutanten CSF41498-3 und CSF41498-4 wurden nun Passagenversuche in Gewebekulturflaschen und Screening nach biofilmpositiven Revertanten wie unter 5.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Versuche wurden dabei pro Stamm siebenmal wiederholt. Dabei bildete sich bei allen Mutanten jedesmal nach sieben bis zehn Tagen ein Biofilm aus. Die Zahl der schwarzen Kolonien auf KRA war sehr variabel (zwischen 0,0018 und 95 %). Generell stieg der Anteil der schwarzen Kolonien mit der Anzahl der Passagen. Trotz sorgfältigen Screenings konnten jedoch bei CSF41498-3 und CSF41498-34 in keinem Fall Revertanten, bei denen IS256 präzise entfernt war, nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu CSF41498-1 und CSF41498-2, bei denen in parallel durchgeführten Versuchen Revertanten gefunden wurden. Die Ergebnisse der Passagenversuche sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2 Zusammenfassung der Reversionsversuche mit CSF41498-3 und CSF41498-4. Die Zahlen in der Klammer geben die Zahl durchgeführten Experimente an.

	CSF41498-3	CSF41498-4
Anzahl Passagen	6 – 25 (7)	6 – 25 (7)
Biofilmbildung	+	+
Anzahl gescreenter Kolonien	$\approx 1 \times 10^6 - 1,5 \times 10^6$	$\approx 1 \times 10^6 - 1,5 \times 10^6$
IS256 Exzision	-	-

5.1.5 Konstruktion eines Vektors zur Quantifizierung der präzisen Exzision von IS256

Aus den unter 5.1.1 bis 5.1.4 beschriebenen Experimenten ergab sich Folgendes: (i) Die präzise Exzision erfolgt Transposase-unabhängig und ist (ii) von keinen neuen IS256-Insertionen begleitet, sondern führt zum kompletten Verlust des IS-Elements. Präzise

Exzision kommt (iii) nicht (oder zumindest seltener) vor, wenn die 8 bp Mikrohomologie zwischen den *target site* Duplikationen aufgehoben wird.

Die oben vorgestellte Screening-Methode auf KRA hatte jedoch einige entscheidende Nachteile. Zum einen mussten sehr viele Kolonien getestet werden, da die präzise Exzision sehr selten auftritt. Zum zweiten wurde die Suche nach Revertanten durch die Tatsache erschwert, dass sich nach mehrtägiger Passage in den Gewebekulturflaschen ein PIA-unabhängiger Biofilm ausbildete und somit im Biofilm nicht ausschließlich Revertanten mit *icaC* WT-Sequenz angereichert wurden. Deshalb konnten aus den gewonnenen Ergebnissen keine quantitativen Aussagen abgeleitet werden. Um die Frequenz der präzisen Exzision zu bestimmen, wurde eine andere Screening-Methode gewählt. Hierbei wurde IS256 inklusive einer 8 bp *target site* Duplikation in das *spc* Gen, das Resistenz gegen Spectinomycin vermittelt, inseriert. Kommt es zur präzisen Exzision, wird die *spc*-Sequenz wiederhergestellt und die Bakterien sind in der Lage, auf spectinomycinhaltigem Agar zu wachsen.

Als Ausgangsvektor für die Klonierung wurde der Shuttle-Vektor pBT2 verwendet. Zunächst wurde das 1473 bp große *scrB*-Gen (kodiert die Sucrose-6-Phosphat-Hydrolase) und ein ca. 500 bp langer *downstream* Bereich mit den Primern „*scrB EcoRI* for“ und „*scrB EcoRV* rev“ amplifiziert. Nach Restriktion des 2 kb Fragments mit *EcoRI* / *EcoRV*, deren Schnittstellen in die Primer integriert waren, wurde das Insert mit dem ebenfalls *EcoRI* / *EcoRV* gespaltenen pBT2 ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Das entstandene 8,8 kb Plasmid wurde pTH1a benannt (Abb. 5.5). Im nächsten Schritt wurde das *spc*-Gen mit den Primern „*spc BamHI* for“ und „*spc HindIII* rev“ amplifiziert und die Enden mit *BamHI* und *HindIII* geschnitten. Gleichzeitig wurde pTH1a mit denselben Restriktionsenzymen verdaut. Da sich in der *scrB* Sequenz an Position 501 eine *BamHI*-Schnittstelle und an Position 1412 eine *HindIII*-Schnittstelle befinden, entstanden durch Verdau von pTH1a mit *BamHI* und *HindIII* ein ca. 8,1 kb großes Fragment und ein ca. 900 bp großes Fragment. Das 8,1 kb Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt, mit dem *spc*-Fragment ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert, wodurch das 8,8 kb Plasmid pTH1b entstand (Abb. 5.5).

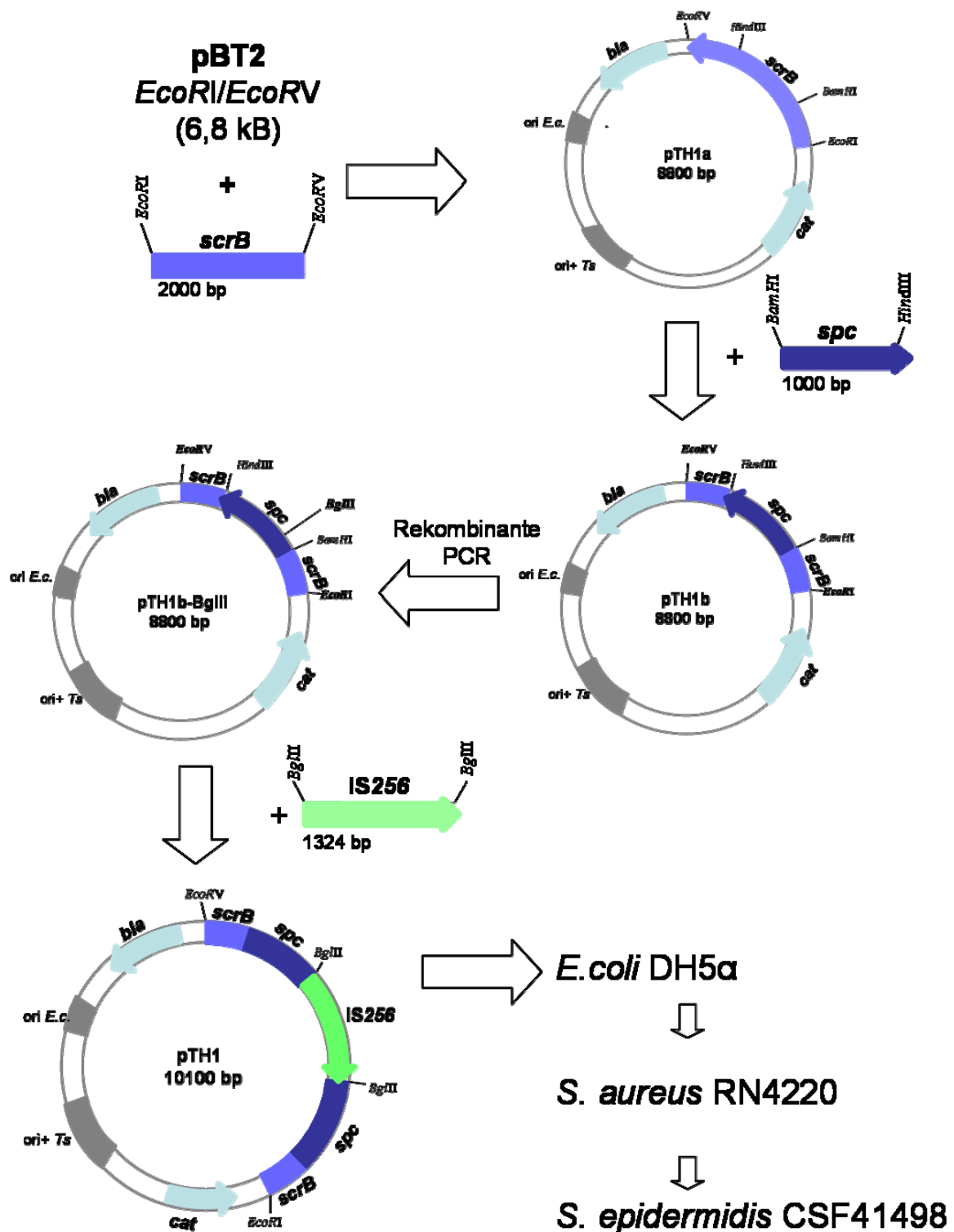


Abb. 5.5: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pTH1. *scrB* wurde mit pBT2 zu pTH1a ligiert. Durch Insertion von *spc* in pTH1a nach *HindIII* / *BamHI* Verdau entstand pTH1b. Mittels rekombinanter PCR wurde eine *BglII* Schnittstelle in *spc* eingefügt. Insertion von IS256 inklusive einer 8 bp target site Duplikation führte zum Vektor pTH1.

Als nächstes wurde durch PCR mit überlappenden Primern eine stille Mutation in das *spc*-Gen eingeführt, so dass durch Austausch eines Nukleotids an Position 64 eine *Bgl*III-Schnittstelle entstand (AGA TTT zu AGA TCT). Dazu wurde mit den Primern „*spc Bgl*III for“ sowie „*spc Bgl*III rev“ und Elongase das gesamte pTH1b Plasmid amplifiziert, Template-DNA mit *Dpn*I verdaut und der Ansatz danach in *E.coli* DH5α transformiert. Ampicillinresistente Klone wurde mittels Testrestriktion auf eine funktionale *Bgl*III-Schnittstelle überprüft. Zusätzlich wurde das *spc*-Gen zur Überprüfung sequenziert.

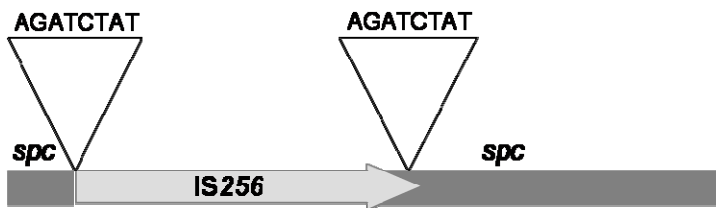


Abb. 5.6. : Insertion von IS256 in *spc* inklusive einer 8 bp target site Duplikation.

Im letzten Schritt wurde IS256 mit den Primern „IS256 *Bgl*III for“ und „IS256 *Bgl*III rev“ amplifiziert. Die Primer waren so konstruiert, dass neben der *Bgl*III Schnittstelle einige Basen der *spc*-Sequenz eingefügt waren, so dass bei der nachfolgenden Ligation mit *Bgl*III verdaulichem, dephosphoryliertem pTH1b eine IS256-Insertion inklusive einer 8 bp target site Duplikation entstand (Abb. 5.6). Die korrekte Richtung der Insertion und die Identität der 8 bp Duplikationen wurden durch Testrestriktion und Sequenzierung des *spc*::IS256-Bereiches bestätigt. Das als pTH1 bezeichnete 10,1 kb Plasmid wurde nun in *S. aureus* RN4220 und schließlich in *S. epidermidis* CSF41498 transformiert (Abb. 5.5). Die entstandenen Transformanten waren spectinomycinsensitiv und chloramphenicolresistent.

5.1.6 Bestimmung der Wahrscheinlichkeit präziser Exzision von IS256

Die Frequenz der präzisen Exzision wurde mit *S. epidermidis* CSF41498 pTH1 wie unter 2.3.5 beschrieben bestimmt. Dabei zeigte sich, dass eine zusätzliche Überprüfung der spectinomycinresistenten Kolonien mittels Lysat-PCR erforderlich war, da die Resistenz nur in einem Teil der Fälle durch präzise Exzision von IS256 verursacht war. Es wurden aber dennoch in jedem der durchgeführten Versuche Revertanten detektiert.

Tabelle 5.3: Häufigkeit der präzisen Exzision von IS256 aus pTH1 in *S. epidermidis* CSF41498.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
N_0 (cfu Inokulum)	555	38	408
N (Gesamtzahl cfu)	$7,65 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{10}$	4×10^9
Anzahl Revertanten	5	1	2
x (Anteil Revertanten an ausplattierten Zellen)	$3,27 \times 10^{-10}$	$2,78 \times 10^{-10}$	5×10^{-10}
Zellteilungen	21,4	23,2	19,9
P (Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision pro Generation und Zelle)	$1,5 \times 10^{-11}$	$1,2 \times 10^{-11}$	$2,51 \times 10^{-11}$

Tabelle 5.3 fasst die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammen. Die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision von IS256 aus pTH1 lag bei ca. $1,7 \times 10^{-11}$ pro Generation und Zelle.

5.1.7 Mutation von IS256 und der rechten *target site* Duplikation im Vektor

Um die Frequenz der präzisen Exzision in Abhängigkeit von intakter Transposase, intakter *target site* Duplikation und Abstand zwischen den IRs zu untersuchen, wurden Varianten von pTH1 hergestellt (Abb. 5.7). Zunächst wurde IS256 auf die äußersten 50 bp links und die äußersten 116 bp rechts (insgesamt 166 bp) verkürzt. Dazu wurde mit den überlappenden Primern „IRL overlap“ und „IRR overlap“ pTH1 amplifiziert und nach *DpnI* Verdau in *E. coli* DH5 α transformiert, wodurch das rekombinante Plasmid pTH2 (ca. 9 kb) entstand. Die verkürzte IS256-Insertion wurde durch Sequenzierung mit *spc*-spezifischen Primern überprüft.

In einer weiteren Serie von Vektoren (pTH3, pTH4, pTH5) wurde schrittweise die rechte 8 bp *target site* Duplikation auf 6 bp, 4 bp bzw. 2 bp verkürzt. Dies erfolgte durch rekombinante PCR mit den überlappenden Primern „RTSD 2 bp for“ (pTH3), „RTSD 4 bp for“ (pTH4), „RTSD 6 bp for“ (pTH5) und „RTSD rev“ (alle) sowie anschließenden *DpnI* Verdau und Transformation in *E. coli* DH5 α . Die Fehlerfreiheit der erhaltenen Plasmide im Bereich der mutierten *spc*::IS256-Insertionen wurde durch Sequenzierung mit *spc*-

spezifischen Primern bestätigt. Schließlich wurden alle aufgeführten Plasmide wie unter 5.1.1 beschrieben in *S. epidermidis* CSF41498 transformiert.

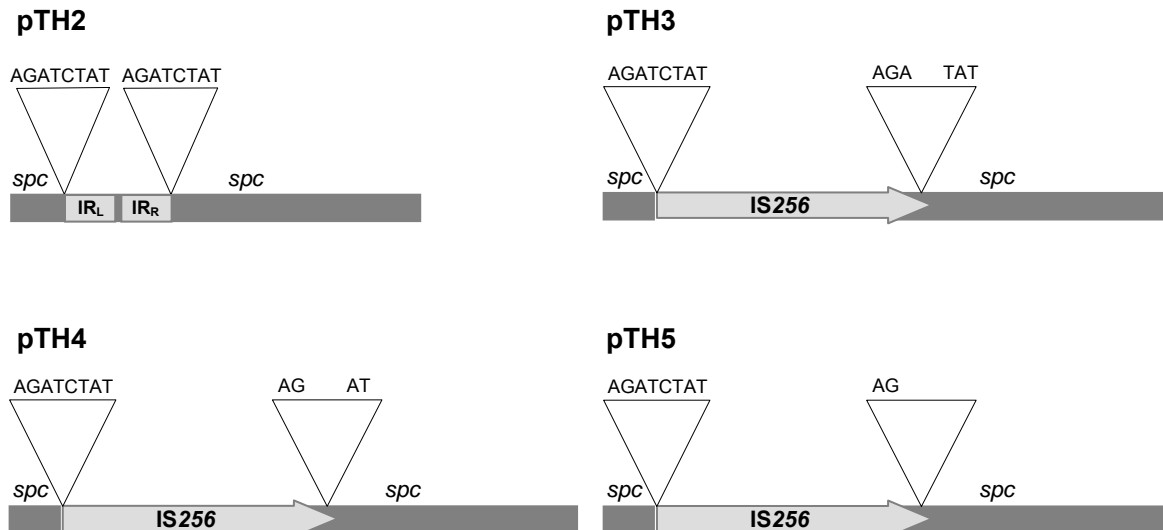


Abb. 5.7.: Darstellung der mutierten Bereiche von pTH2, pTH3, pTH4 und pTH5.

5.1.8 Bestimmung der Wahrscheinlichkeit präziser Exzision der IS256-Varianten

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde nun die Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision von IS256 bzw. dessen Derivaten für die Konstrukte pTH2, pTH3, pTH4 und pTH5 bestimmt. Die Experimente wurden wie für pTH1 unter 5.1.4 beschrieben durchgeführt.

Für das stark verkürzte IS256 auf pTH2 (siehe Abb. 5.7) wurden in *S. epidermidis* CSF41498 präzise Exzisionsereignisse detektiert (Tabelle 5.5). Im Mittel betrug die Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision des verkürzten IS-Elements $5,25 \times 10^{-11}$. Im Vergleich zum intakten IS256 auf pTH1 war die präzise Exzision von pTH2 damit ein ca. dreimal häufigeres Ereignis.

Tabelle 5.4: Häufigkeit der präzisen Exzision von IS256 (IR_L-IR_R) aus pTH2 in *S. epidermidis* CSF41498.

pTH2	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
N ₀ (cfu Inokulum)	178	54	396
N (Gesamtzahl cfu)	$3,1 \times 10^9$	$1,43 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$
Anzahl Revertanten	2	3	2
x (Anteil Revertanten an ausplattierten Zellen)	$6,45 \times 10^{-10}$	$2,1 \times 10^{-9}$	$5,56 \times 10^{-10}$
Zellteilungen	20,7	21,3	19,8
P (Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision pro Generation und Zelle)	$3,11 \times 10^{-11}$	$9,83 \times 10^{-11}$	$2,81 \times 10^{-11}$

Die Mutation in pTH2 führte zum Verlust intakter Transposase, bewirkte jedoch keinen Verlust der Fähigkeit zur präzisen Exzision, wie schon unter 5.1.2 für IS256 Δ tnp qualitativ beschrieben. Die Experimente mit *S. epidermidis* CSF41498 pTH3, pTH4 bzw. pTH5 bestätigten die qualitativen Ergebnisse für CSF41498-3 bzw. CSF41498-4 (5.1.4), bei denen nach einer Deletion innerhalb der *target site* Duplikation keine präzisen Exzisionsereignisse mehr beobachtet wurden. Die quantitativen Versuche (Tabelle 5.5) zeigten, dass schon nach einer Deletion von 2 bp (pTH3) die Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision auf $< 1,95 \times 10^{-13}$ pro Generation und Zelle sank und keine Revertanten nachgewiesen werden konnten. Wertet man die Experimente für pTH3, pTH4 und pTH5 gemeinsam aus, war die Wahrscheinlichkeit einer präzisen Exzision pro Generation und Zelle $< 1,24 \times 10^{-13}$.

Tabelle 5.5: Häufigkeit der präzisen Exzision von IS256 mit verkürzter *target site* Duplikation aus pTH3, pTH4 und pTH5 in *S. epidermidis* CSF41498.

pTH3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
N ₀ (cfu Inokulum)	178	38	1587
N (Gesamtzahl cfu)	$2,74 \times 10^{11}$	$1,39 \times 10^{11}$	$2,12 \times 10^{11}$
Anzahl Revertanten	0	0	0
x (Anteil Revertanten an ausplattierten Zellen)	0	0	0
Zellteilungen	27,2	28,4	23,7
P (Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision pro Generation und Zelle)	$< 1,34 \times 10^{-13}$	$< 2,52 \times 10^{-13}$	$< 1,99 \times 10^{-13}$

pTH4	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
N₀ (cfu Inokulum)	966	1144	1372
N (Gesamtzahl cfu)	$4,17 \times 10^{11}$	$3,87 \times 10^{11}$	$8,27 \times 10^{11}$
Anzahl Revertanten	0	0	0
x (Anteil Revertanten an ausplattierten Zellen)	0	0	0
Zellteilungen	25,4	25	25,8
P (Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision pro Generation und Zelle)	$< 9,46 \times 10^{-13}$	$< 1,03 \times 10^{-14}$	$< 4,67 \times 10^{-13}$
pTH5	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
N₀ (cfu Inokulum)	61	30	579
N (Gesamtzahl cfu)	$3,02 \times 10^{11}$	$2,81 \times 10^{11}$	$7,06 \times 10^{11}$
Anzahl Revertanten	0	0	0
x (Anteil Revertanten an ausplattierten Zellen)	0	0	0
Zellteilungen	28,9	29,8	26,8
P (Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision pro Generation und Zelle)	$< 1,15 \times 10^{-13}$	$< 1,19 \times 10^{-13}$	$< 5,28 \times 10^{-14}$

5.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse zur präzisen Exzision von IS256

1. IS256 kann aus der chromosomalen Insertionsstelle (*icaC*::IS256) präzise entfernt werden.
2. Die präzise Exzision erfolgt Transposase-unabhängig.
3. Präzise Exzision ist nicht begleitet von neuen Insertionen oder größeren chromosomalen Umordnungen.
4. Präzise Exzision ist abhängig von der Integrität der 8 bp *target site* Duplikationen.
5. Auch nach Insertion von IS256 auf einem Plasmid (*spc*::IS256) kann präzise Exzision Transposase-unabhängig erfolgen.
6. Die Wahrscheinlichkeit der Exzision für die vollständige IS256-Sequenz beträgt $1,7 \times 10^{-11}$ pro Generation und Zelle.
7. Bei Verkürzung der Sequenz zwischen den Mikrohomologien auf ca. 160 bp (*inverted repeats* bleiben erhalten) beträgt die Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision ca. $5,3 \times 10^{-11}$ pro Generation und Zelle.
8. Ab einer Verkürzung der Mikrohomologien zwischen den 8 bp *target site* Duplikationen auf 6 bp ist präzise Exzision nicht mehr nachweisbar ($P < 1,24 \times 10^{-13}$ pro Generation und Zelle).

5.2 Phasenvariation durch einen alternativen, PIA-unabhängigen Mechanismus der Biofilmbildung

5.2.1 Phänotypischer Vergleich von *S. epidermidis* CSF41498 WT und CSF41498-1

Wie bereits unter 5.1.5 erwähnt, kam es bei mehrtägiger Passage PIA-negativer Derivate von *S. epidermidis* CSF41498 nach ca. sieben bis zehn Tagen in den Gewebekulturflaschen stets zur Ausbildung eines Biofilms, selbst wenn keine Exzision von IS256 aus dem *icaC*-Gen nachweisbar war. Zudem bildeten einige der isolierten *icaC*::IS256-positiven Phasenvarianten auch im Adhärenzassay einen deutlichen Biofilm (Abb. 5.8).

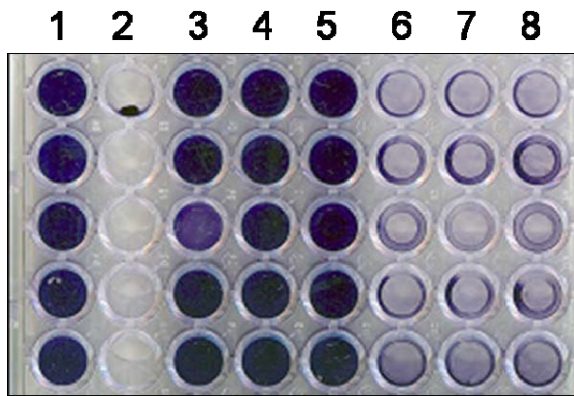


Abb. 5.8: Adhärenzassay von *S. epidermidis* CSF41498, CSF41498-1 und Phasenvarianten.
1: WT. 2: CSF41498-1 (*icaC*::IS256). 3-8: CSF41498-1 Phasenvarianten (*icaC*::IS256).

Um dieses Phänomen genauer zu überprüfen, wurden Wildtyp, die PIA-negative Mutante CSF41498-1 sowie eine der aus einer Passage von CSF41498-1 gewonnenen biofilmpositiven, *icaC*::IS256-positiven Phasenvarianten („PVA“) zunächst phänotypisch mittels *Atomic Force* Mikroskopie (AFM) untersucht. Diese Technik bietet den Vorteil, dass die Zellen vor der Aufnahme sehr wenig manipuliert werden, womit auch die Gefahr von Artefakten sinkt. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp, biofilmmnegativer Mutante und PVA (Abb. 5.9). In Aufnahmen des Wildtyps war eine deutlich fädige Matrix erkennbar, die von der Zelloberfläche auszugehen schien. Daneben ließen sich z.T. globuläre, z.T. polymorphe extrazelluläre Formen beobachten, die offenbar mit den fädigen Strukturen assoziiert waren. Die Zelloberfläche des Wildtyps wirkte bei höherer Vergrößerung eher unregelmäßig (Abb. 5.9a). Der biofilmmnegative CSF41498-1 hingegen wies neben einer glatten Zelloberfläche keine fädige Matrix und kaum polymorphe, schleimartige Strukturen auf (Abb. 5.9b). Die biofilmpositive, *icaC*::IS256-positiv Phasenvariante PVA wiederum besaß zwar keine fädigen Strukturen, jedoch sehr

viel der schleimartigen, aus globulären Substrukturen bestehenden Matrix. Bei stärkerer Vergrößerung wirkte die Zelloberfläche wie bedeckt von einer dicken Schicht dieses Materials (Abb. 5.9c).

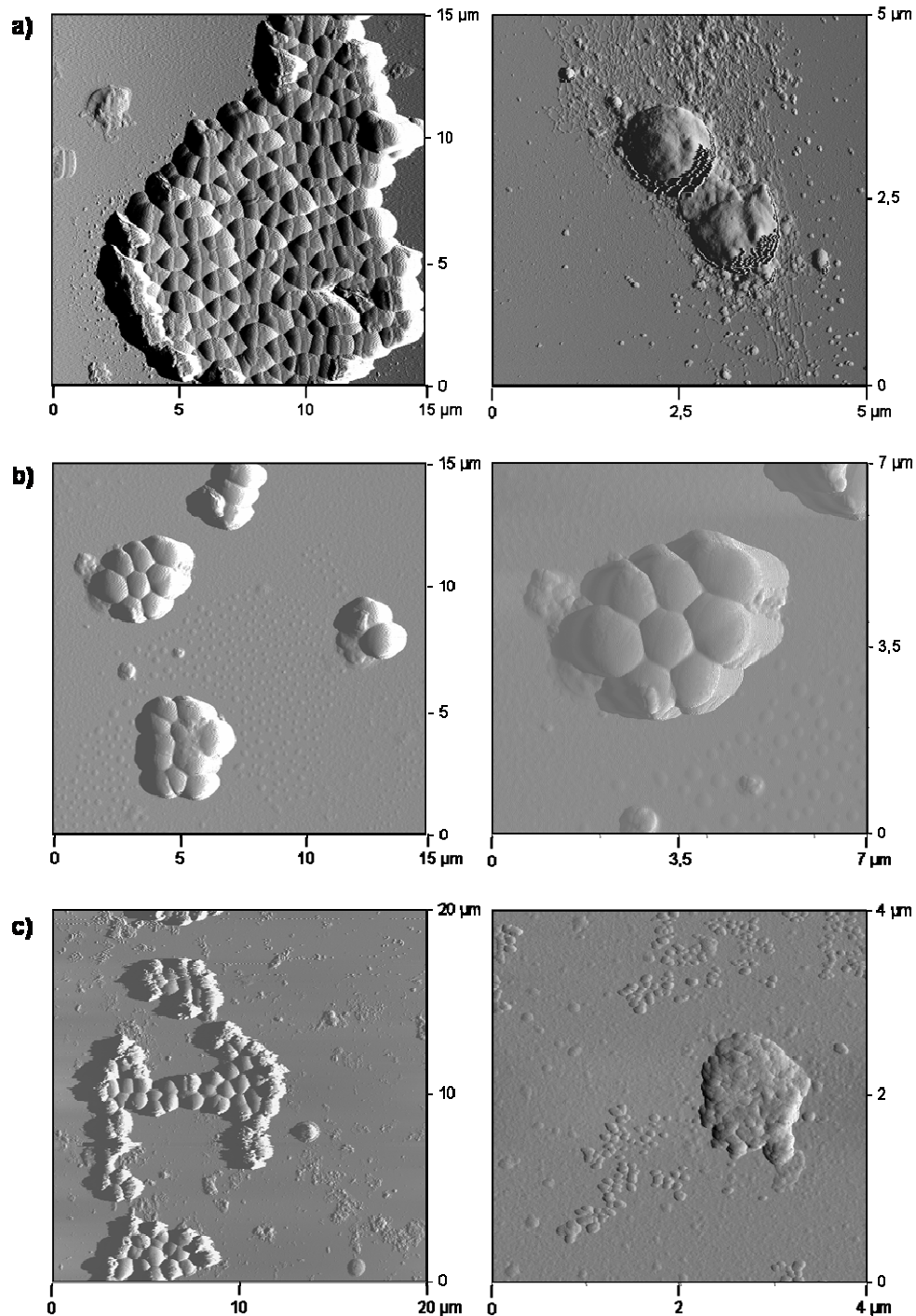


Abb. 5.9: Mikroskopische Darstellung von *S. epidermidis* CSF41498, CSF41498-1 und Phasenvariante mittels AFM. a) CSF41498 WT: PIA-positiv, biofilmpositiv. b) CSF41498-1: PIA-negativ, biofilmmnegativ. c) CSF41498-1/PVA: PIA-negativ, biofilmpositiv.

Die extrazelluläre Matrix des Wildtyps wurde in einigen Detailaufnahmen näher betrachtet (Abb. 5.10). Dabei ließ sich erkennen, dass die „Fäden“ untereinander vernetzt waren. Der Durchmesser der „Fäden“ variierte zwischen ca. 20 und 30 nm. Auffällig war zudem, dass regelmäßig an den „Fäden“ globuläre Strukturen auftraten, häufig an den „Knotenpunkten“ des Netzes. Detailaufnahmen der extrazellulären Matrix der PIA-negativen Phasenvariante (Abb. 5.11) zeigten hingegen keinerlei fädige Strukturen dieser Art. Stattdessen traten vermehrt globuläre Strukturen mit einem Durchmesser von 64 ± 19 nm auf.

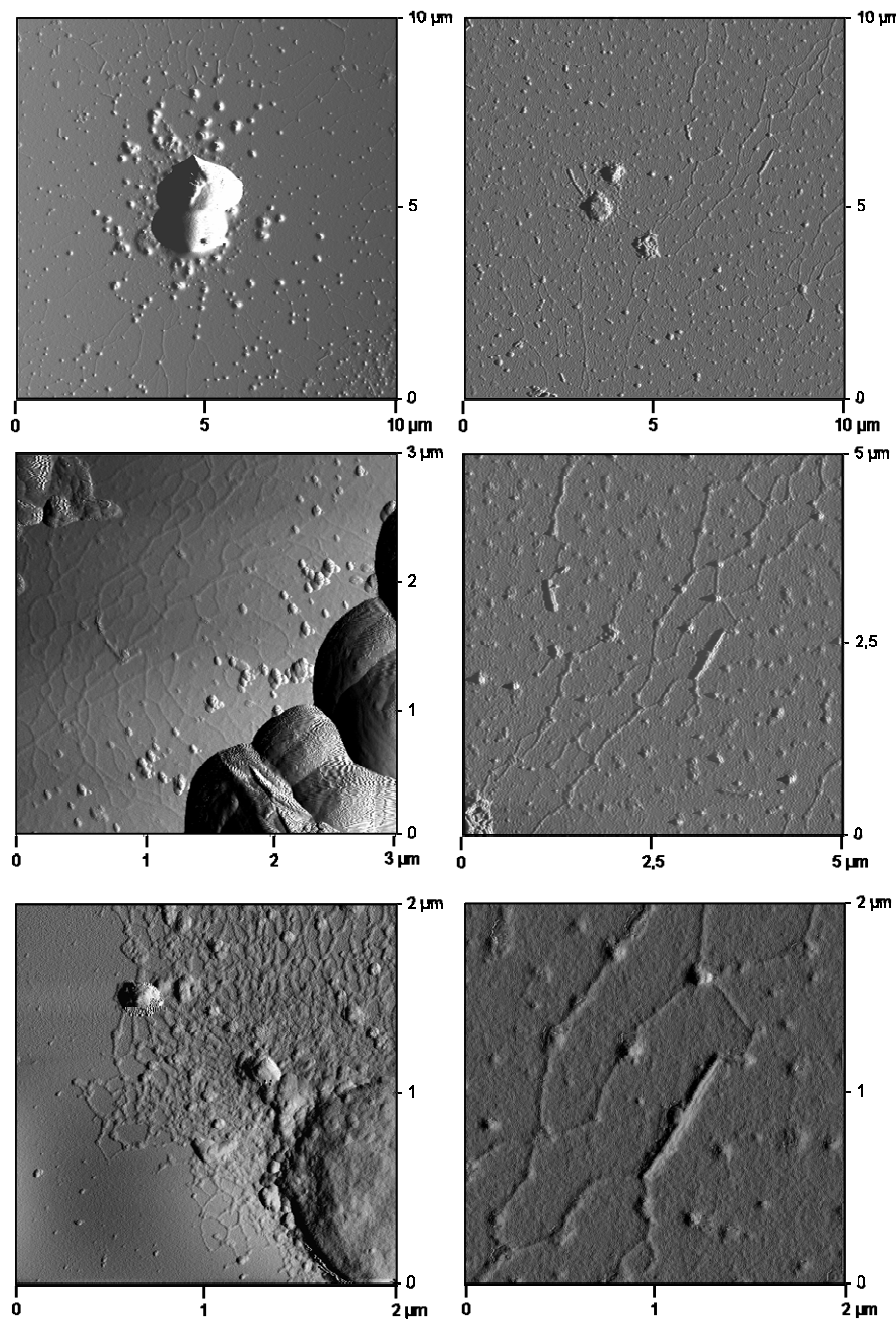


Abb. 5.10: AFM-Detailaufnahmen der extrazellulären Matrix von *S. epidermidis* CSF41498 WT.

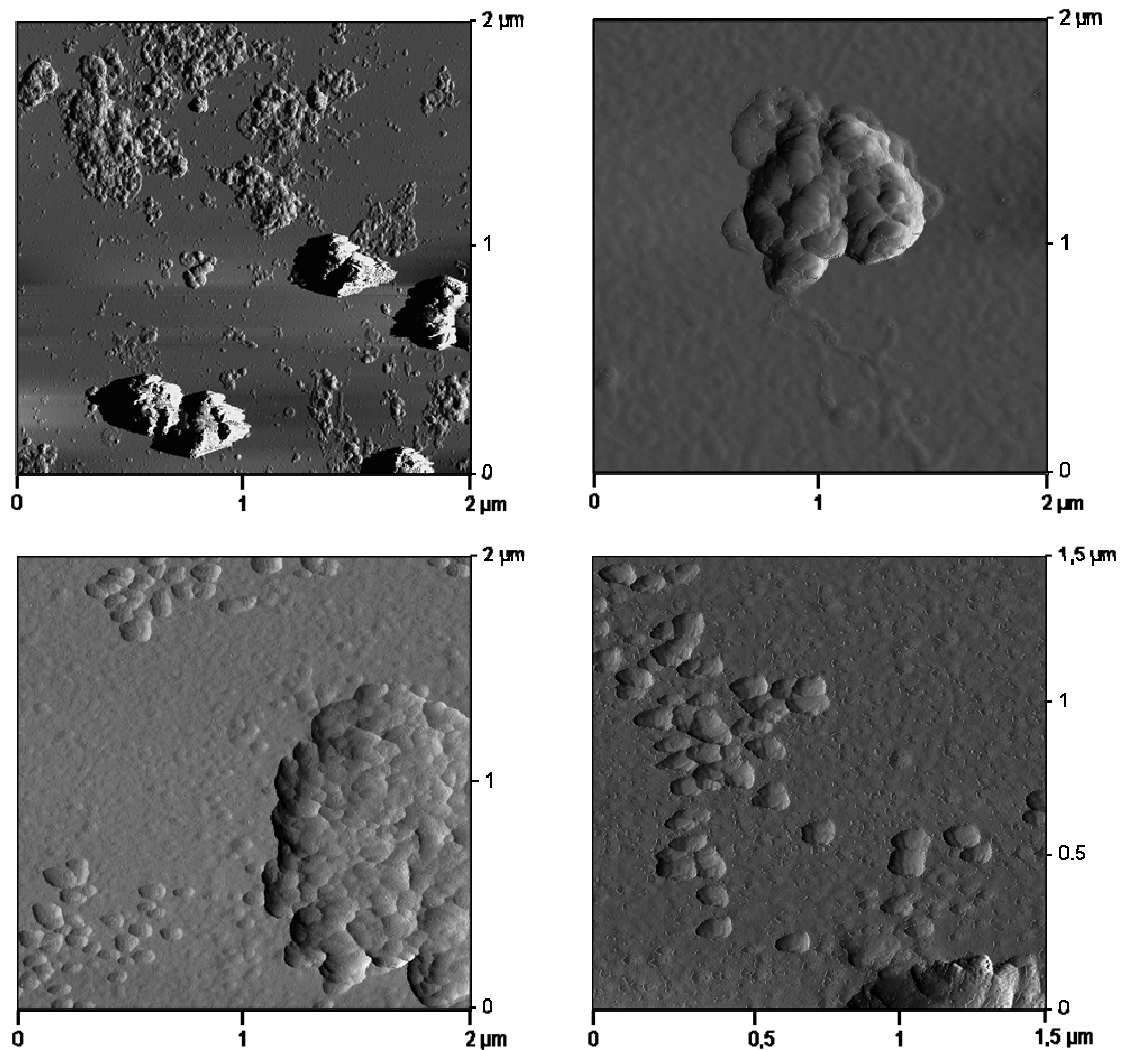


Abb. 5.11: AFM-Detaillaufnahmen der extrazellulären Matrix von *S. epidermidis* CSF41498-1/PVA.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass (i) PIA eine fädige Struktur ausbildet, da diese in der PIA-negativen *icaC::IS256* Mutante und deren Phasenvarianten nicht nachweisbar ist; und (ii) in der biofilmpositiven, PIA-negativen Phasenvariante ein anderer Faktor verstärkt exprimiert wird, der zur Akkumulation einer „schleimigen“ Matrix führt. Um diese Hypothese weiter zu prüfen, wurden CSF41498 WT und Phasenvariante in einem Adhärenzassay einer Behandlung mit NaIO_4 bzw. Proteinase K unterzogen (Abb. 5.12). Während der WT ähnlich wie der Kontrollstamm RP62A einen polysaccharidbasierten Biofilm produzierte, der sich durch Behandlung mit 40 mM NaIO_4 fast vollständig auflösen ließ, wuchs die Phasenvariante in einem eindeutig proteinvermittelten Biofilm, der sich nicht durch NaIO_4 , jedoch durch Behandlung mit Proteinase K vollständig auflösen ließ.

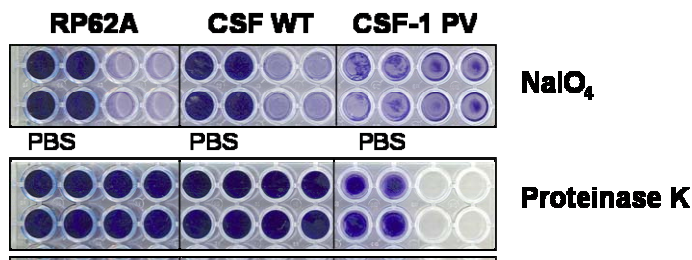


Abb. 5.12: Adhärenzassay nach Natriumperiodat- und ProteinaseK-Behandlung.

Getestete Stämme: *S. epidermidis* RP62A (Positivkontrolle), *S. epidermidis* CSF41498 WT und *S. epidermidis* CSF41498-1 Phasenvariante PVA (PV). Die mit PBS beschrifteten wells wurden mit PBS (Kontrolle), die restlichen wells wie jeweils rechts angegeben mit 40 mM NaIO₄ bzw. 1 mg / ml Proteinase K behandelt.

In der Wachstumskurve (TSB, 37 °C, Schüttelkultur) zeigten CSF41498-1 und zwei biofilmpositive Phasenvarianten (PVA, PVC) keine Unterschiede (Abb. 5.13a). Der WT hingegen hatte reproduzierbar eine längere lag-Phase, erreichte aber in der stationären Phase schließlich eine OD wie CSF41498-1. Nach Inkubation der Schüttelkultur ÜN bildete der WT an der Übergangslinie von Medium zu Luft einen ausgeprägten Biofilm aus, was bei den Phasenvarianten CSF41498-1 PVA und PVC nicht der Fall war (Abb. 5.13c).

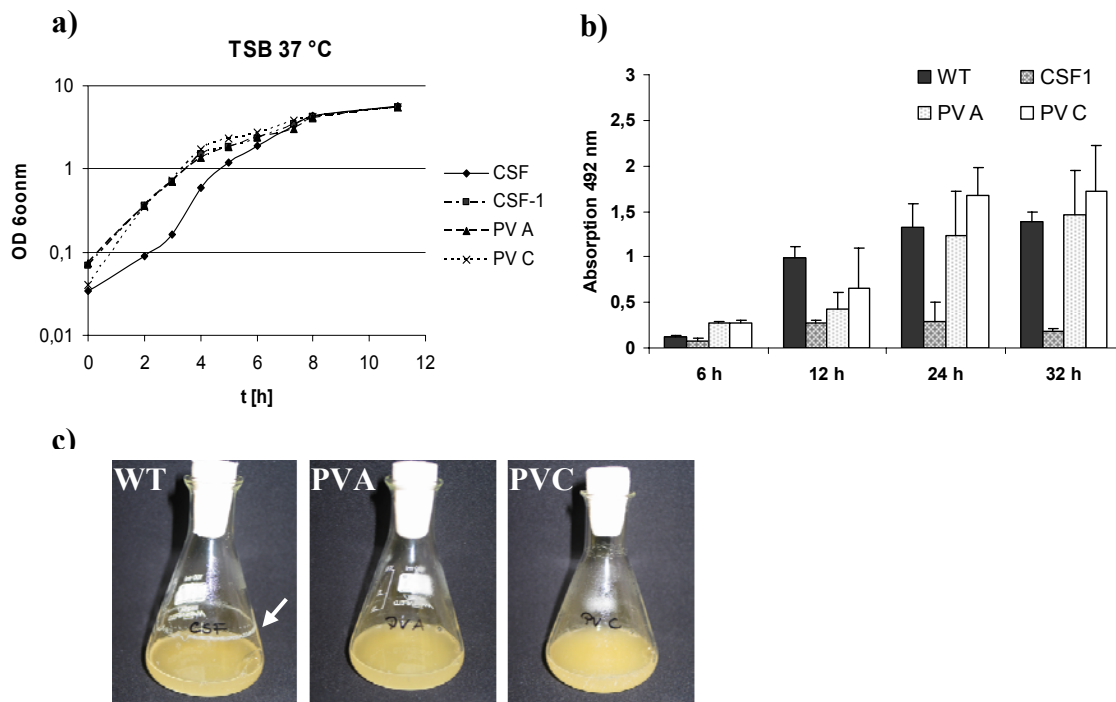


Abb. 5.13: Wachstum von *S. epidermidis* CSF41498 WT, CSF141498-1 und Phasenvarianten PVA / PVC als Schüttelkultur und als Biofilm. a) Wachstumskurve. Schüttelkultur in TSB-Medium, 37 °C. b) Adhärenzassay. Wachstum als Biofilm in 96-well plates, 37 °C in TSB-Medium. c) Schüttelkultur nach Inkubation ÜN. Im WT (CSF) ist ein deutlicher Biofilm entlang der Schüttellinie sichtbar (Pfeil).

Beim Wachstum als Biofilm (37 °C, TSB) waren entlang der Zeitachse einige Unterschiede zwischen WT und Phasenvarianten zu beobachten (Abb. 5.13c). In der Anfangsphase der Biofilmbildung (6 h) adhärten die Phasenvarianten mehr als doppelt

so stark wie der WT. Nach 12 h kehrte sich dieser Effekt jedoch um; der WT bildete nun einen wesentlich stärkeren Biofilm als die Phasenvarianten aus. Nach 24 bis 32 h schließlich erreichte der Biofilm der Phasenvarianten wieder das Niveau des WT.

5.2.2 Einfluss verschiedener Wachstumsbedingungen auf die Biofilmbildung in *S. epidermidis* CSF41498 WT und PIA-negativen Phasenvarianten

Neben Wachstum und Biofilmbildung in TSB-Medium bei 37 °C wurde auch die Biofilmbildung von *S. epidermidis* CSF41498 WT und Phasenvarianten unter verschiedenen als biofilminduzierend beschriebenen Bedingungen verglichen. Dabei wurde zum einen die Biofilmbildung in TSB-Medium unter Zusatz von 1 % Glukose, 4 % NaCl bzw. 3 % Ethanol, zum anderen die Biofilmbildung bei verschiedenen Inkubationstemperaturen gemessen. Im Wildtyp wurde die Biofilmbildung durch Zugabe von Ethanol geringfügig, durch Zusatz von NaCl aber deutlich induziert (Abb. 5.14a). Interessanterweise zeigten sich bei den Phasenvarianten andere Ergebnisse: Hier hatte NaCl einen sehr stark biofilminhibierenden Effekt. Ethanol im Medium hingegen führte – stärker als im WT- zu einer erhöhten Biofilmbildung in PVA und PVC. Zusatz von 1 % Glukose veränderte die Biofilmbildung im Vergleich zu reinem TSB-Medium weder im WT noch in den Phasenvarianten signifikant.

Bei 30 °C wurde lediglich in PVA weniger Biofilm als im WT gebildet. Der Biofilmindex erhöhte sich sowohl bei den Phasenvarianten als auch beim WT mit steigender Temperatur, wobei der Anstieg bei PVA von 30 °C zu 37 °C besonders sprunghaft war. (Abb. 5.14b).

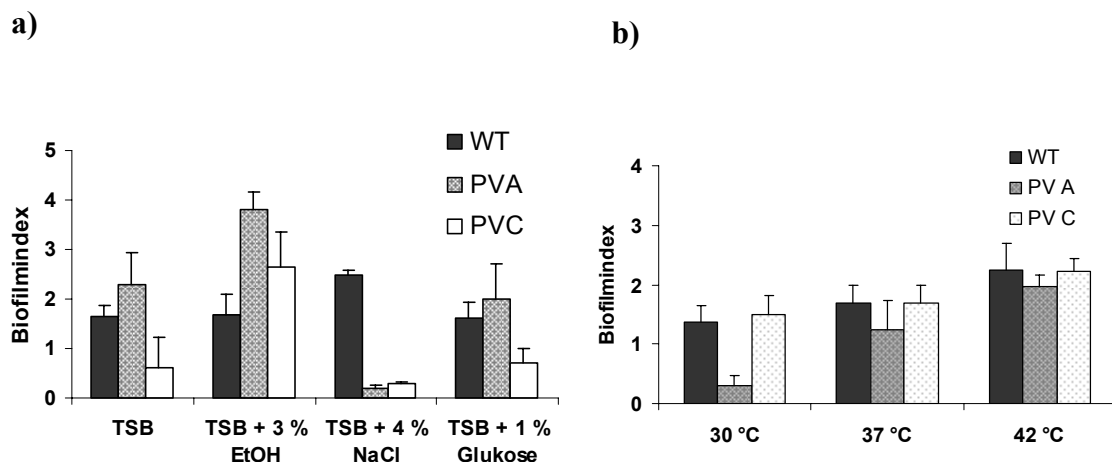


Abb. 5.14. Adhärenzassay *S. epidermidis* CSF41498 WT und CSF41498-1 Phasenvarianten PVA /PVC unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. a) Biofilmindex bei 37 °C: TSB, TSB + 3 % Ethanol, TSB + 4 % NaCl und TSB + 1% Glukose. b) Biofilmindex in TSB bei 30 °C, 37 °C und 42 °C.

Die Adhärenzassays erbrachten somit folgende Ergebnisse: Die Biofilmbildung unterliegt in den Phasenvarianten einer anderen Regulation als im WT. In den Phasenvarianten – im Gegensatz zum WT- wird die Biofilmbildung durch Zusatz von NaCl vollständig inhibiert. Auf Zusatz von Ethanol reagieren die Phasenvarianten mit einer stärkeren Induktion der Biofilmbildung als der Wildtyp. Temperaturveränderungen und Zusatz von Glukose hingegen haben im Vergleich zum WT keine Veränderungen zur Folge.

5.2.3 Zellwandassoziierte Proteine in *S. epidermidis* CSF41498 und PIA-negativen Phasenvarianten

Um zu testen, ob eventuell eine erhöhte Expression eines zellwandgebundenen Proteins für den veränderten Phänotyp verantwortlich ist, wurden zellwandgebundene Proteine aus einer ÜNK von CSF41498 WT, CSF41498-1 sowie PVA und PVC isoliert, in einem 20 × 20 cm 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und silbergefärbt. Wie aus Abb. 5.15 ersichtlich, konnte mit dieser Methode kein Protein identifiziert werden, das in PV A oder PV C stärker als im WT exprimiert war. Hingegen wurden mehrere Banden identifiziert, die in PV A und PV C schwächer als im WT und CSF41498-1 ausgeprägt waren. Dieser Effekt war am deutlichsten bei vier Banden zwischen ca. 37 und 45 kDa zu beobachten.

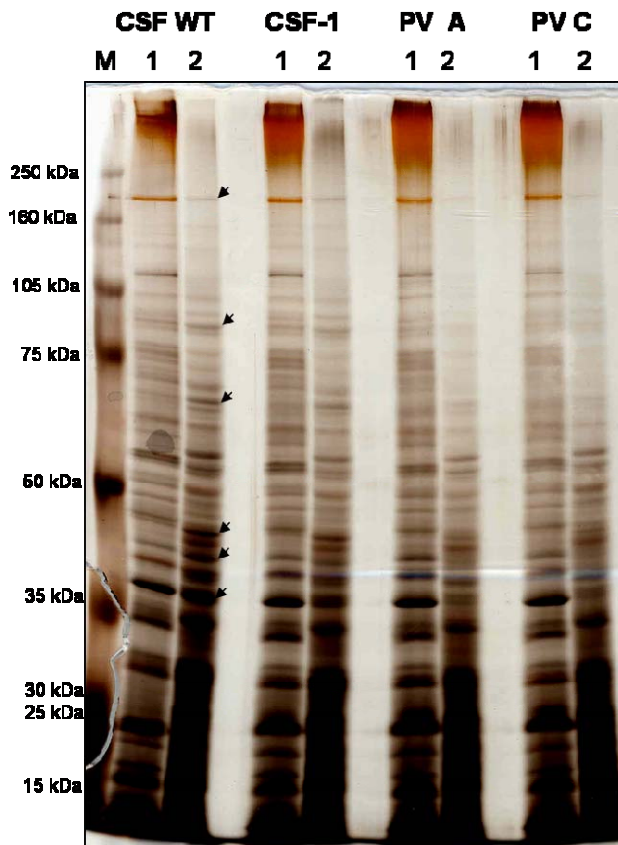


Abb. 5.15. Silbergefärbtes 12 % SDS-PAGE von *S. epidermidis* CSF41498 WT, CSF41498-1 sowie CSF41498-1/PVA und PVC. M = Marker. 1 = Zellextrakt. 2 = Zellwandextrakt. Pfeile indizieren in PVA und PVC schwächer exprimierte Proteine.

5.2.4 Expression von *aap* und *bhp* in *S. epidermidis* CSF41498 und PIA-negativen Phasenvarianten

Durch Analyse der zellwandgebundenen Proteine konnte kein Protein identifiziert werden, das in den Phasenvarianten im Vergleich zum WT bzw. CSF41498-1 eindeutig verstärkt exprimiert war. Dies könnte methodische Ursachen haben. Allerdings waren aus der Literatur zellwandgebundene Proteine bekannt, die an der akkumulativen Phase der Biofilmbildung beteiligt sind, z.B. das *accumulation associated protein*, Aap und das *Bap homologous protein*, Bhp (Cucarella *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 2005). Deshalb wurde in einem nächsten Schritt das Expressionsniveau dieser Gene mittels einer weiteren Methode, dem Northern Blot, überprüft. Die RNA wurde aus Schüttelkulturen von CSF41498-1, PVA und PVC in TSB bei 37 °C in der logarithmischen (OD \approx 1,5) und in der stationären (OD \approx 4,5) Wachstumsphase isoliert.

Zwei Blots dieser RNA wurden mit ca. 500 bp großen DNA-Sonden für *aap* und *bhp* hybridisiert (Abb. 5.16). *aap* wurde im CSF41498-1 nur sehr schwach exprimiert. In den Phasenvarianten hingegen, vor allem in der logarithmischen Phase bei PVC, wurde *aap* deutlich stärker als im biofilmmnegativen CSF41498-1 exprimiert. Es traten mehrere nahe beieinander liegende Banden mit Größen zwischen 7 und 8 kb auf. Dieser Größenbereich entspricht einem monocistronischen *aap*-Transkript.

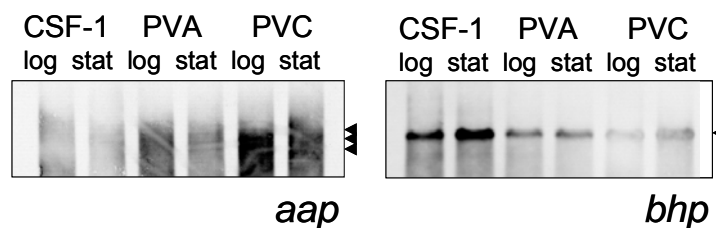


Abb. 5.16: Northern Blot *S. epidermidis* CSF41498-1 und Phasenvarianten PVA und PVC. Pro Spur wurden 10 μ g RNA in einem 0,6%igen denaturierenden Agarosegel aufgetragen. log = logarithmische Wachstumsphase. stat = Stationäre Phase. Die verwendeten Sonden sind jeweils unter dem Blot angegeben. Pfeile markieren detektierte Banden.

Im Gegensatz zu *aap* wurde *bhp* in den Phasenvarianten schwächer als im WT exprimiert (Abb. 5.16). Das Transkript lief als einzelne Bande mit einer ungefähren Größe von 7,4 kb. Dies befindet sich ebenfalls in Übereinstimmung mit einem monocistronischen Transkript. In der stationären Phase wurde *bhp* stärker exprimiert als in der logarithmischen Phase.

Um die erhöhte Expression von *aap* in den Phasenvarianten auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurde aus Kulturen von CSF WT sowie PVA und PVC in der stationären Phase die Fraktion der zellwandgebundenen Proteine isoliert und neben der cytosolischen Fraktion im SDS-PAGE aufgetrennt. Als Antikörper wurde Anti-Aap-Serum aus der Maus verwendet (Bowden *et al.*, 2005), der freundlicherweise von Dr. M.G. Bowden zur Verfügung gestellt wurde. Dabei zeigten sich in der Fraktion der zellwandgebundenen Proteine multiple Banden, mit Hauptbanden bei ca. 240 kDa, 220 kDa, 140 kDa und 110 kDa. PVA und PVC exprimierten im Vergleich zum WT deutlich mehr Aap (Abb. 5.17).

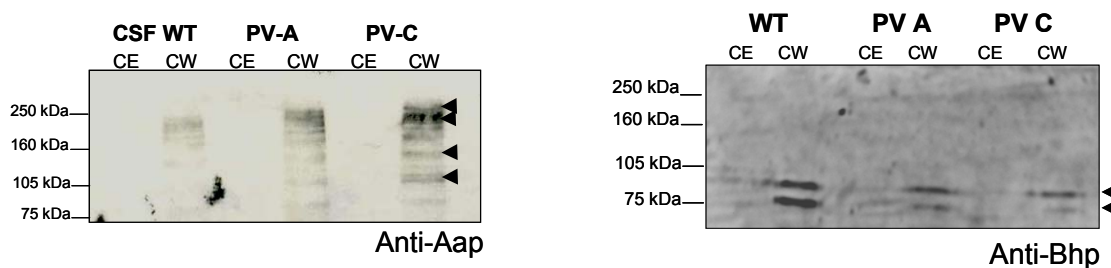


Abb. 5.17: Anti-Aap und Anti-Bhp Western Blot. Die Zellen wurden in der stationären Phase (TSB, 37 °C, Schüttelkultur) geerntet, die zellwandgebundenen Proteine von den cytosolischen Proteinen getrennt und beide Fraktionen in einem 10%igen 1D-SDS-PAGE aufgetrennt. CE = Zellextrakt. CW = Zellwandextrakt. CSF WT = *S. epidermidis* CSF41498 WT. PVA, PVC = *S. epidermidis* CSF41498-1 Phasenvariante.

Auch die Expression von Bhp wurde mittels Western Blot überprüft. Das Anti-Bhp-Antiserum stammte ebenfalls aus dem Labor von Dr. Bowden. In der Fraktion der zellwandgebundenen Proteine wurden zwei Banden detektiert, von denen jedoch keine der erwarteten Größe von Bhp (260 kDa) entsprach. Stattdessen zeigten die detektierten Banden apparente Größen zwischen 75 und 100 kDa (Abb. 5.17). Die Banden waren im WT etwas intensiver ausgeprägt als in den Phasenvarianten.

Schließlich wurde mit Hilfe des Anti-Aap-Serums Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Hierzu wurden CSF WT sowie die Phasenvarianten PVA und PVC 18 h in *chamber slides* als Biofilm angezogen und anschließend wie unter 4.9.1 beschrieben gefärbt. Wie Abb. 5.18 in Übereinstimmung zum Western Blot zeigt, wurde Aap in den Phasenvarianten stärker exprimiert als im WT.

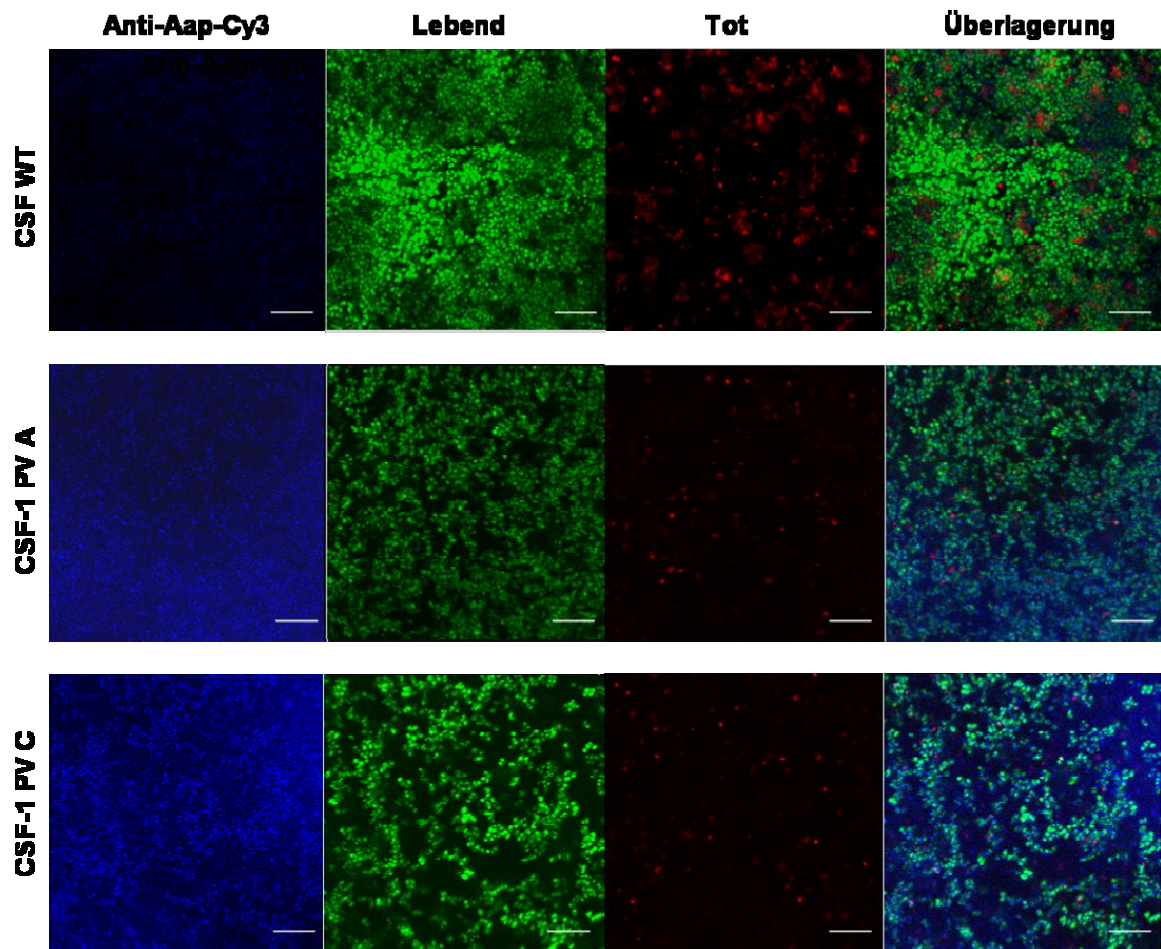


Abb. 5.18: *Immunofluoreszenzmikroskopie Biofilm S. epidermidis CSF41498 WT und Phasenvarianten CSF41498-1 PVA / PVC.* Der Biofilm wurde in chamber slides über 18 h angezogen und anschließend mit Anti-Aap Antiserum und sekundärem Cy3-markierten Anti-Maus Antikörper behandelt. Zum Schluss erfolgte eine Lebend-Tot-Färbung mit dem „Bacterial viability Kit“ (siehe Tabelle 3.11). Weißer Balken = 10 μm.

5.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse zur alternativen Biofilmbildung von *S. epidermidis* CSF41498-1

1. PIA-negative Mutanten von *S. epidermidis* CSF41498 können nach mehrtägiger Passage als Biofilm wachsen.
2. Derartige biofilmpositive, PIA-negative Phasenvarianten weisen im AFM einen anderen Phänotyp als der WT auf. Anstelle von fädiger extrazellulärer Substanz wie beim WT wird verstärkt eine polymorphe, aus globulären Untereinheiten bestehende Matrix produziert.
3. Im Gegensatz zum WT, der in einem vorrangig polysaccharidbasierten Biofilm wächst, wird dieser alternative Biofilm durch Proteinkomponenten vermittelt.
4. Die Phasenvarianten haben in Schüttelkultur eine kürzere *lag*-Phase als der WT, erreichen aber in der stationären Phase ähnliche optische Dichten.
5. Die Regulation des proteinogenen Biofilms unterscheidet sich vom PIA-Biofilm. Zugabe von 4 % NaCl inhibiert den proteinogenen Biofilm vollständig, während dieselben Bedingungen im WT die Biofilmbildung induzieren. Zusatz von 3 % Ethanol im Medium bewirkt eine wesentlich stärkere Induktion der Biofilmbildung als beim WT. Zugabe von 1 % Glukose und Wachstum bei verschiedenen Temperaturen führen zu ähnlichen Effekten wie beim WT.
6. Mittels 1D-SDS-Page lassen sich nur geringe Unterschiede im zellwandgebundenen Proteom von WT und Phasenvarianten erkennen.
7. Die Transkriptmenge des *accumulation associated protein*, *aap*, ist in der Phasenvariante im Vergleich zum WT erhöht. Dies spiegelt sich auch auf Proteinebene in einer erhöhten Expression von Aap wider.
8. Die Transkriptmenge des *bap homologous protein*, *bhp*, ist in den Phasenvarianten im Vergleich zum WT leicht vermindert. Auf Proteinebene ließ sich keine eindeutige Aussage über die Expression von Bhp treffen.

5.3 Charakterisierung der IS256 Transposase

5.3.1 *In silico* Analyse der IS256 Transposase

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die IS256 Transposase funktionell charakterisiert werden. Dazu wurde das Protein zunächst auf bioinformatischem Weg näher analysiert. Die IS256 Transposase ist ein 390 aa großes Protein mit einem Molekulargewicht von 45,7 kDa und einem pI von 9,08. Der „Grand average of hydropathicity“ (GRAVY) klassifiziert die IS256 Transposase mit -0,606 als hydrophiles Protein (Kyte und Doolittle, 1982). Die IS256 Transposase besitzt keine Signalsequenz und keine Membranspannungsdomänen und ist somit ein cytosolisches Protein. Mit bioinformatischen Mitteln wurden in der Aminosäuresequenz weder *repeats* (<http://www.ebi.ac.uk/Radar/>) noch *coiled-coiled* Regionen (<http://multicoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/multicoil>) detektiert (Wolf *et al.*, 1997).

Laut Sekundärstrukturvorhersage mittels PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000) handelt es sich bei der IS256 Transposase um ein überwiegend α -helikales Protein (Abb. 5.19). Neben 15 α -Helices wurden jedoch auch 11 kurze β -Faltblatt-Bereiche prognostiziert. Diese liegen, abgesehen von β 1 - β 3, im C-terminalen Teil des Proteins, dem auch die katalytische Domäne zuzuordnen ist. Die Aminosäuren des DDE-Motivs (Aspartat, Aspartat, Glutamat) befinden sich an Position 167, 233 bzw. 341. Aspartat167 gehört dabei zum ersten von fünf direkt aufeinander folgenden β -Faltblättern (β 4 - β 8). Aspartat233 liegt ebenfalls in einem β -Faltblatt (β 9), Glutamat341 hingegen direkt am Beginn einer α -Helix (α 14). Neben diesen Resten sind noch weitere, innerhalb der IS256-Familie konservierte Aminosäuren der katalytischen Domäne zuzuordnen. Dazu zählen Alanin234, Glycin237 und Leucin238, außerdem Leucin334, Serin336, Threonin337, Asparagin338, Valin347 und Arginin348.

Da einige DDE-Transposasen Helix-Turn-Helix-Motive zur spezifischen DNA-Erkennung besitzen, wurde nach einem solchen Motiv auch in der Sequenz der IS256 Transposase gesucht. Mit dem Algorithmus auf http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hth.html (Dodd und Egan, 1990) wurde allerdings kein solches Motiv vorhergesagt. Ein Zink-Finger, ein weiteres bekanntes DNA-Bindemotiv z.B. in IS1 (Ohta *et al.*, 2004), konnte ebenfalls nicht detektiert werden. Weiterhin enthält die Sequenz

keinen Leucin-Zipper (Bornberg-Bauer *et al.*, 1998), wie ihn beispielsweise IS911 im N-Terminus besitzt (Haren *et al.*, 2000). Somit konnte mittels *in silico* Analyse zunächst kein DNA-Bindungsmotiv für die IS256 Transposase vorhergesagt werden.

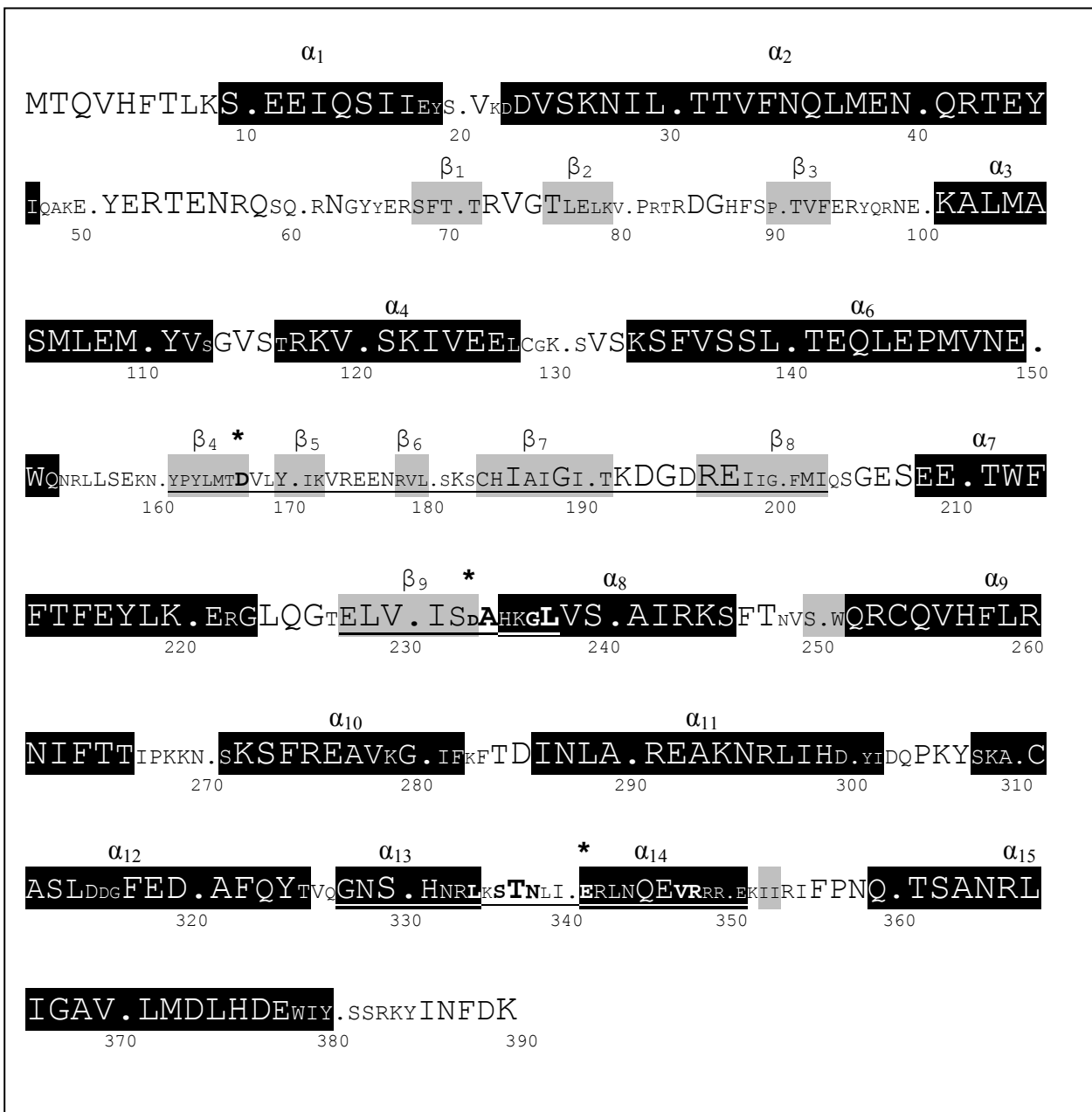


Abb. 5.19: IS256 Transposase Sekundärstruktur laut PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>). Schwarz unterlegte Aminosäuren = α-Helix. Grau unterlegte Aminosäuren = β-Faltblatt. Die Wahrscheinlichkeit der vorhergesagten Sekundärstruktur wird durch die Schriftgröße repräsentiert. * = Aminosäuren des DDE-Motivs. Fett gedruckt = innerhalb der IS256 Familie konservierte Aminosäuren des katalytischen Zentrums.

Ein Sequenzvergleich von 26 Transposase-Aminosäuresequenzen aus der IS256-Familie (siehe Anhang II) zeigte eine große Heterogenität innerhalb der ersten ca. 60 Aminosäuren des N-Terminus und innerhalb der letzten 35 bis 70 Aminosäuren des C-Terminus. Stärker konservierte Bereiche fanden sich vor allem in der Nähe der katalytischen Triade D167-

D233-E341, d.h. im Bereich von $\alpha 6$ bis $\alpha 9$ (S135 bis N261) sowie $\alpha 13$ bis $\alpha 14$ (L334 bis R348). Weitere konservierte Reste fanden sich N-terminal zur katalytischen Domäne zwischen $\beta 1$ und $\alpha 3$ (N62 bis S116).

5.3.2 Überexpression und Reinigung der IS256 Transposase

5.3.2.1 Klonierung des *tnp*-Gens in pCAL-n-FLAG

Um die Funktion der IS256 Transposase *in vitro* charakterisieren zu können, musste das Protein zunächst in ausreichender Menge und Reinheit zur Verfügung stehen. Zu diesem Zweck wurde das *tnp*-Gen in den pCAL-n-FLAG Vektor (Stratagene) kloniert. Dabei handelt es sich um einen pET11 verwandten Expressionsvektor, bei dem das gewünschte Protein nach Induktion des starken T7-Promotors mittels IPTG-Zugabe exprimiert wird. Unter nicht induzierenden Bedingungen hingegen wird die Expression durch die Bindung des LacIq-Repressors an den *lac*-Operator verhindert. Zur Reinigung des Proteins befindet sich die Sequenz für das calmodulinbindende Peptid (CBP) stromaufwärts des zu exprimierenden Gens, so dass eine N-terminale Fusion mit dem gewünschten Protein entsteht (Abb. 5.20). Dieses System wurde gewählt, weil vermutet wurde, dass Überexpression aktiver Transposase zur Schädigung der Wirtszellen führen könnte. Deshalb sollte das Protein mit dem CBP-tag als inaktive Vorstufe gereinigt und der tag im Anschluss proteolytisch entfernt werden.

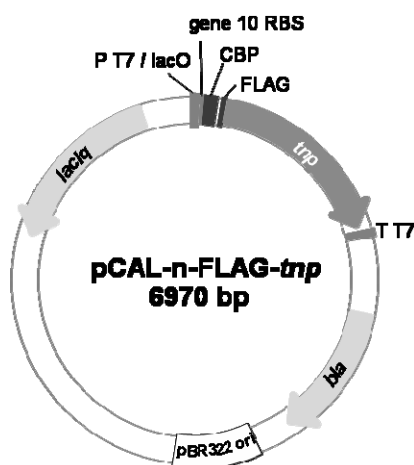


Abb. 5.20: Expressionsvektor *pCAL-n-FLAG-tnp*. P T7 / lacO – T7 Promotor / lac-Operator; gene 10 RBS – Ribosomenbindungsstelle; CBP – calmodulinbindendes Peptid; FLAG – FLAG-Epitop, T T7 – T7 Terminator; bla – Ampicillinresistenz-Determinante, lacIq – lac Repressor.

Die Klonierung der *tnp*-Sequenz erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des „LIC Clonings“. Diese Methode erlaubte es, das gewünschte *tnp*-Gen direkt C-terminal zur FLAG-Sequenz zu inserieren. Das Plasmid lag dabei linear vor; mit einem 5'-12nt-Einzelstrangüberhang im Antisensestrang, wobei das 5'-Ende dem C-terminalen Lysin der FLAG-Sequenz entsprach. Analog dazu besaß die stromabwärts liegende *cloning junction* einen 5'-13nt-Einzelstrangüberhang im kodierenden Strang.

Um PCR-Inserts zu erzeugen, wurden Primer mit 12 bzw. 13 vektorspezifischen Nukleotiden am 5'-Ende der *tnp*-spezifischen Sequenz verwendet (LIC1 und LIC2). Nach Amplifikation des Inserts wurde das PCR-Produkt in Anwesenheit von ATP mit *Pfu*-Polymerase behandelt. Durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der *Pfu* (die sich bis zum ersten dAMP-Rest erstreckte) entstanden dabei 5'-Überhänge, die komplementär zu den Überhängen des linearisierten Vektors waren. Danach wurde das Insert ohne weitere enzymatische Behandlung mit dem Vektor ligiert und in *E. coli* SoloPack® Gold superkompetente Zellen transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels Lysat-PCR auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts überprüft. Bei positiven Klonen wurde durch Sequenzierung die Integrität der *tnp*-Sequenz kontrolliert und das Plasmid schließlich zur Induktion in *E. coli* BL21-Gold (DE3) transformiert.

5.3.2.2 Expression und Reinigung

Die Expression und Reinigung der CBP-Transposase (Transposase) erfolgte wie unter 4.7.1 bis 4.7.3 beschrieben. Dabei wurde die hohe Affinität des N-terminalen calmodulinbindenden Peptids für Calmodulin in Anwesenheit von Ca^{2+} genutzt. Die beste Induktion wurde generell bei einer Temperatur von 30 °C erzielt. Abb. 5.21 demonstriert das Ergebnis einer CBP-Transposase Reinigung. Die induzierte CBP-Transposase erscheint als Bande bei ca. 50 kDa. Dies entspricht dem Gesamtmolekulargewicht aus Transposase (45,7 kDa) und CBP-*tag* (ca. 4 kDa).

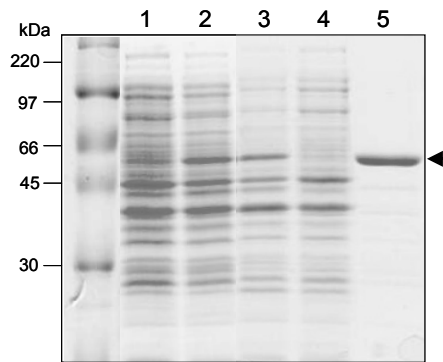


Abb. 5.21: Expression und Reinigung der CBP-Transposase. 12%iges Polyacrylamidgel, Coomassie gefärbt. 1 – Zellextrakt vor Induktion, 2 – Zellextrakt 2 h nach Zugabe von 1 mM IPTG, 3 – Zellysate, 4 – Proteinextrakt nach Bindung an Calmodulin affinity resin, 5 – gereinigte CBP-Transposase. Der Pfeil markiert die Laufhöhe der CBP-Transposase.

5.3.2.3 Versuche zur Entfernung des N-terminalen tags der CBP-Transposase

Um den CBP-tag nach erfolgreicher Expression und Reinigung vom Zielprotein entfernen zu können, befand sich ursprünglich am Ende des FLAG-tags eine Enterokinaseschnittstelle (D-D-D-D-K-↓-X). Da aus vorherigen Experimenten bekannt war, dass die Enterokinaseschnittstelle nur mit geringer Effizienz geschnitten wird, wurde diese Sequenz durch eine FaktorXa-Schnittstelle ersetzt (I-E-G-R-↓-X). Dies geschah durch rekombinante PCR mit den überlappenden Primern „Prot/FakXA“ und „FakXA2“. Dabei wurde die Sequenz GAC GAC GAC AAG durch ATC GAG GGC AGG ersetzt. Das PCR-Produkt wurde in *E. coli* SoloPack[®] Gold superkompetente Zellen transformiert.

Nachdem die erfolgreiche Mutation durch Sequenzierung bestätigt wurde, wurde das Plasmid wiederum in *E. coli* BL21-Gold (DE3) transformiert. Nun konnte die CBP-Transposase mit FaktorXa-Schnittstelle exprimiert und gereinigt werden. Im Anschluss wurde das Protein in FaktorXA cleavage buffer umgepuffert und die Effizienz der Proteolyse unter verschiedenen Inkubationsbedingungen ermittelt. Dabei wurden die Faktoren Proteasekonzentration, Inkubationszeit und Inkubationstemperatur variiert. Wie in Abb. 5.22 zu sehen, konnte nur eine sehr eingeschränkte Prozessierung durch FaktorXa beobachtet werden. Während bei längerer Inkubation bei 37 °C CBP-Transposase auch in Abwesenheit von FaktorXa degradierte, konnte bei 4 °C und RT ab 0,5 units eingesetzter Protease eine partielle Proteolyse beobachtet werden. Wurde jedoch die Inkubationszeit verlängert bzw. die Proteasekonzentration erhöht, kam es zur vollständigen Degradation der CBP-Transposase. Somit lässt sich schlussfolgern, dass es unter den getesteten Bedingungen nicht möglich war, den N-terminalen tag effizient zu entfernen.

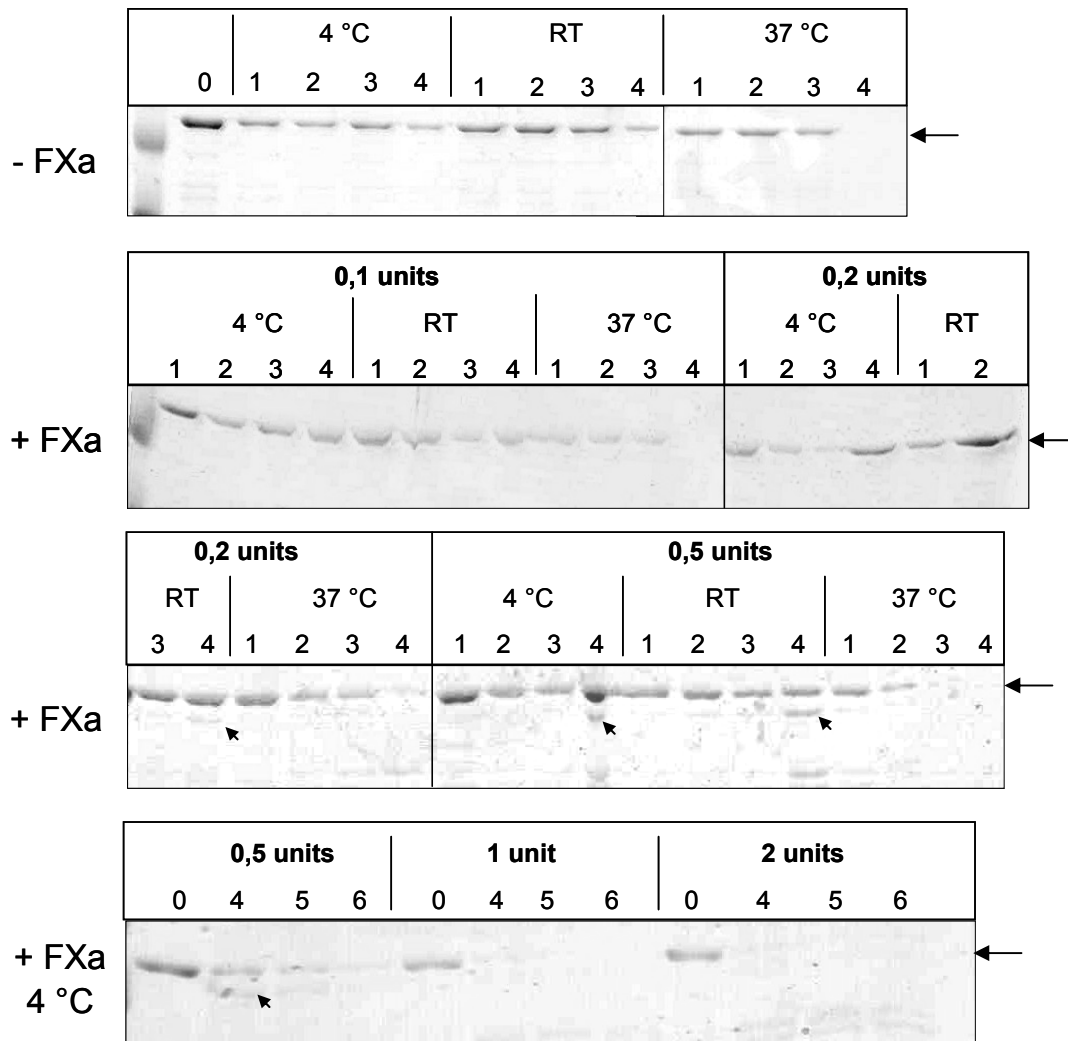


Abb. 5.22: Testproteolyse der *CBP-Transposase* durch *FaktorXa*. 12-%ige Polyacrylamidgele, Coomassie gefärbt. 0 = 0 h, 1 = 2 h, 2 = 4 h, 3 = 8 h, 4 = 16 h, 5 = 20 h, 6 = 24 h Inkubationszeit. Über den Gelausschnitten sind jeweils die Inkubationstemperatur und die eingesetzte *FaktorXa*-Menge angegeben. Der Pfeil rechts der Gele zeigt die Laufhöhe der *CBP-Transposase*, Proteolyseprodukte mit der zu erwartenden Größe von ca. 46 kDa sind mit kleinen Pfeilen markiert.

5.3.2.4 Test auf Funktionalität *in vivo*

Da die Entfernung des N-terminalen *CBP-tags* durch *FaktorXa* nicht erfolgreich war, ließ sich vermuten, dass der *tag* im gefalteten Protein für die Protease räumlich schwer zugänglich war und deshalb nicht abgespalten wurde. Diese räumliche Unzugänglichkeit könnte gleichzeitig bedingen, dass der N-terminale *CBP-tag* die Funktion der Transposase gar nicht oder nur wenig behindert. Deshalb wurde die Funktionalität der Transposase mit N-terminalem *CBP-tag* zunächst *in vivo* getestet, um die bei einer alternativen C-terminalen Fusion nötige Neuklonierung und erneute Proteinexpression und -reinigung nach Möglichkeit umgehen zu können.

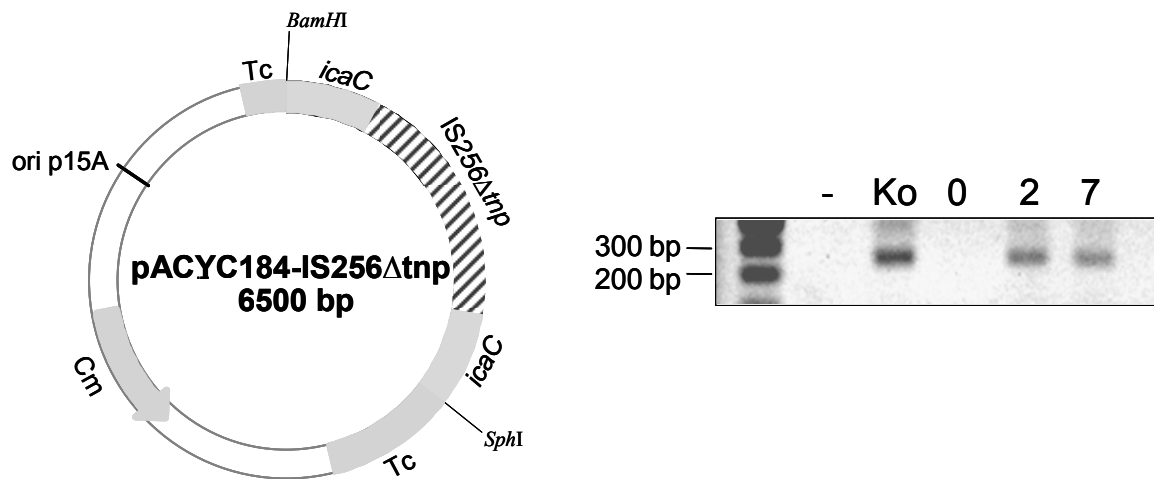


Abb. 5.23: Funktionalitätstest der CBP-Transposase *in vivo*. *pACYC184-IS256Δtnp* wurde in *E. coli* BL21 (DE3) *pCAL-n-FLAG-tnp* transformiert und diente als Substrat-Donorplasmid für die CBP-Transposase. Das *tnp* Gen auf *pACYC184-IS256Δtnp* war durch eine 20 bp Deletion inaktiviert. Nach Induktion der Transposaseexpression ließen sich extrachromosomale *IS256Δtnp* Zirkel durch inverse PCR als 300 bp PCR-Produkt nachweisen (rechte Seite). - = Negativkontrolle PCR, Ko = Positivkontrolle PCR (*pIL2* Plasmid-DNA), 0 = vor Induktion, 2 = 2 h, 7 = 7h nach IPTG-Zugabe .

Für diesen Funktionstest wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) ein zweites, *pACYC184* basiertes Plasmid transformiert. Dieses Plasmid verfügt über einen *p15A* basierten *origin of replication* und ist somit mit dem *pCAL-n-FLAG*-Vektor (*pBR*-basiert) kompatibel. Zur Selektion besitzt *pACYC184* eine Chloramphenicol- sowie eine Tetracyclinresistenz-Determinante. In das *Tc*-Resistenzgen wurde mit Hilfe der Schnittstellen *SphI* und *BamHI* die *icaC::IS256Δtnp*- Sequenz von *pIL2Δtnp* kloniert (Abb. 5.23). *IS256Δtnp* sollte dabei als Substrat für die exprimierte CBP-Transposase dienen.

Wie aus früheren Experimenten bekannt war, führt aktive Transposase zur Bildung extrachromosomaler *IS256* Zirkel, die durch inverse PCR nachweisbar sind (Loessner *et al.*, 2002). Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die Aktivität der CBP-Transposase *in vivo* zu testen. Dazu wurden vor Induktion sowie 2 bzw. 7 h nach Induktion der Transposaseexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG 1 ml Proben aus der Kultur entnommen, eine Plasmidpräparation im kleinen Maßstab durchgeführt und die gewonnene DNA als Template für eine „Zirkel-PCR“ mit den nach außen gerichteten Primern „IRL rev EMSA“ und „IS invR“ eingesetzt. Wie in Abb. 5.23 zu sehen, waren nach Induktion der CBP-Transposase-Expression extrachromosomale Zirkel in Form eines ca. 300 bp großen PCR-Produktes nachweisbar, während dies vor der Induktion nicht der Fall war. Daraus lässt sich zum einen schließen, dass die CBP-Transposase auch ohne Abspaltung

des CBP-*tags in vivo* funktional ist und zum anderen, dass die Expression der CBP-Transposase für den Wirtstamm nicht toxisch ist. Deshalb wurde in den folgenden *in vitro* Experimenten ungespaltene CBP-Transposase verwendet.

5.3.3 *In vitro* Experimente zur spezifischen DNA-Bindung

5.3.3.1 Bindung von CBP-Transposase an die *inverted repeats*

Der erste Schritt der Transposition ist gewöhnlich das Erkennen und Binden der *inverted repeats* (IR) durch die Transposase. Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob gereinigte CBP-Transposase *in vitro* an den linken bzw. rechten IR (IR_L / IR_R) bindet. Dazu wurden *Electromobility Shift Assays* (EMSA) durchgeführt. Als DNA-Fragment diente jeweils ein PCR-Produkt, das von pIL2 mit den Primern „*icaC* EMSA for“ (IR_L) sowie „IRL EMSA rev“ bzw. „IRR for“ sowie „*icaC* int rev“ (IR_R) amplifiziert wurde. Es enthielt einen Teil der *icaC*-Sequenz, die 8 bp *target site* Duplikation und den linken bzw. rechten Bereich von IS256. Diese DNA-Fragmente (147 bp für IR_L und 126 bp für IR_R) wurden in einem TBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt, ausgeschnitten, gereinigt und mittels Digoxigenin-11-dd-UTP und Terminaler Transferase 3'-terminal markiert.

Zunächst wurden verschiedene Inkubationsbedingungen und -puffer für die anschließende Elektrophorese getestet. Die besten Ergebnisse (d.h. Shift der DNA als distinkte Bande) wurden nach einer Inkubationszeit von 15 bis 20 min bei RT in *Binding buffer* mit Poly-Lysin und anschließender Auftrennung im sechszehntigen 0,5 x TBE-Polyacrylamidgel bei 150 V und RT erzielt. Als unspezifische Kompetitor-Nukleinsäure wurden dem DNA-Protein-Gemisch stets 500 ng Poly[d(I-C)] zugesetzt. Diese Bedingungen wurden in allen weiteren EMSA-Experimenten eingehalten.

Wie aus Abb. 5.24 ersichtlich, ließ sich die Bindung der CBP-Transposase sowohl an das IR_L-Fragment als auch an das IR_R-Fragment mittels EMSA nachweisen. Eine Bindung an das IR_L-Fragment erfolgte ab Konzentrationen von ca. 400 nM. Im Gegensatz dazu konnte die CBP-Transposase schon ab Konzentrationen von ca. 200 nM an das IR_R-Fragment binden. Dieses Ergebnis demonstriert eine höhere Affinität für den rechten IR *in vitro*.

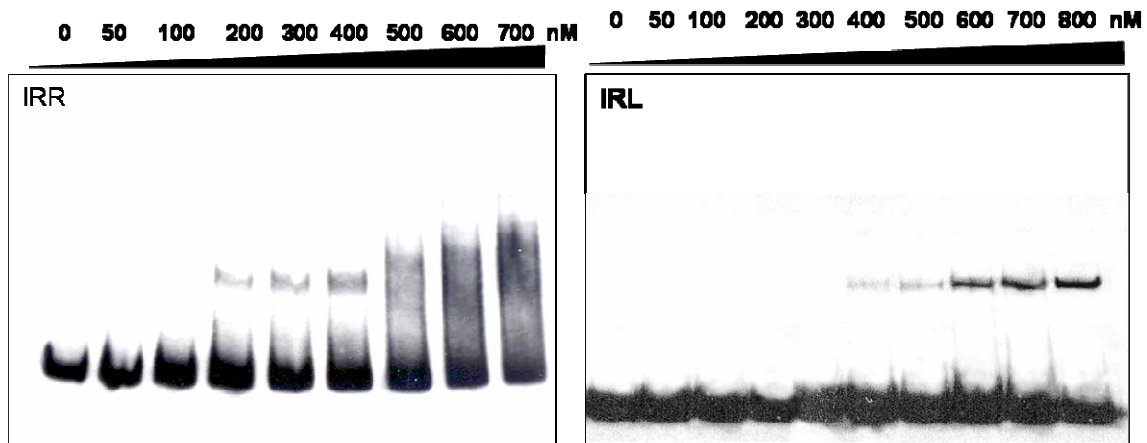


Abb. 5.24: Bindung von WT CBP-Tnp an IR_L und IR_R . DIG-markierte DNA wurde mit verschiedenen Konzentrationen CBP-Transposase (jeweils über dem Blot vermerkt) inkubiert und im Anschluss in einem 6%igen 0,5 x TBE-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als unspezifischer Kompetitor diente Poly[d(I-C)].

Um zu überprüfen, ob die Bindung an das IR_L und IR_R DNA-Fragment spezifisch erfolgte, wurde ein 107 bp Fragment aus dem inneren Bereich der Transposase-Sequenz mit den Primern „Tnp LC for“ und „Tnp LC rev“ amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, Digoxigenin markiert und für einen EMSA mit WT CBP-Transposase verwendet (Abb. 5.25). Dabei zeigte sich, dass dieses DNA-Fragment nicht von der CBP-Transposase gebunden wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die CBP-Transposase spezifisch an IR_L und IR_R bindet.

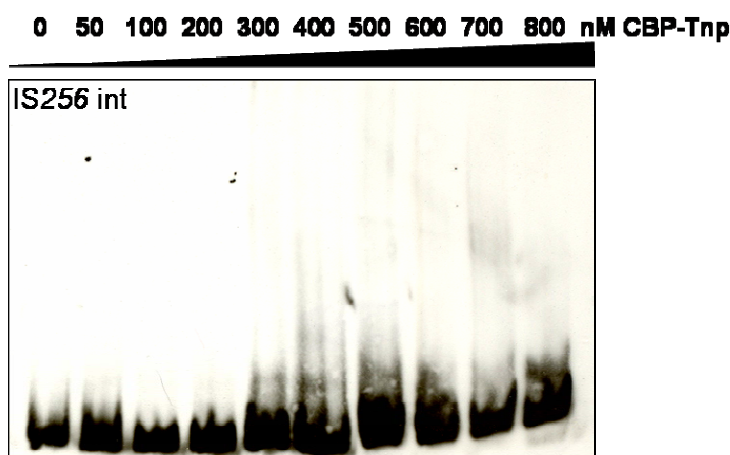


Abb. 5.25: Spezifität der DNA-Bindung von CBP-WT-Tnp. DIG-markierte DNA (107 bp PCR-Produkt aus dem inneren Bereich der tnp Sequenz) wurde mit verschiedenen Konzentrationen CBP-Transposase (jeweils über dem Blot vermerkt) inkubiert und im Anschluss in einem 6%igen 0,5 x TBE-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Kompetitor-Nukleinsäure diente Poly[d(I-C)].

5.3.3.2 Bindung der CBP-Transposase an *inverted repeats* mit spezifischen Deletionen

Um zu untersuchen, welcher Bereich der *inverted repeats* von der IS256 Transposase gebunden wird, wurden spezifische Deletionen in IR_L und IR_R eingeführt und die mutierten Fragmente mittels EMSA getestet. Im IR_R wurden nt 1323-24 (IRR1), nt 1316-1321 (IRR2) und nt 1299-1307 (IRR3) deletiert (Abb. 5.26).

1324 1299
AGTCAAGTCCAGACTCCTGTGTAAAA...
 IRR1 IRR2 IRR3

Abb. 5.26: Nukleotidsequenz des rechten inverted repeat von IS256. Fett gedruckte Nukleotide sind in IRL und IRR identisch. Unterstrichene Nukleotide wurden deletiert. Die Sequenz wurde vom Ende des IS256 Elements ausgehend dargestellt.

Die Deletionen wurden durch rekombinante PCR mit den Primerpaaren „IRR Mut1 for“ / „IRR Mut1 rev“, „IRR Mut2 for“ / „IRR Mut2 rev“ sowie „IRR Mut3 for“ / „IRR Mut3 rev“ und pIL2 als *template* und anschließende Transformation in *E. coli* DH5 α hergestellt. Von den so entstandenen Plasmidvarianten pIL2-IRR1, pIL2-IRR2 und pIL2-IRR3 wurde wie unter 5.3.3.1 beschrieben das DNA-Fragment mit der entsprechenden Deletion für den EMSA amplifiziert und gereinigt.

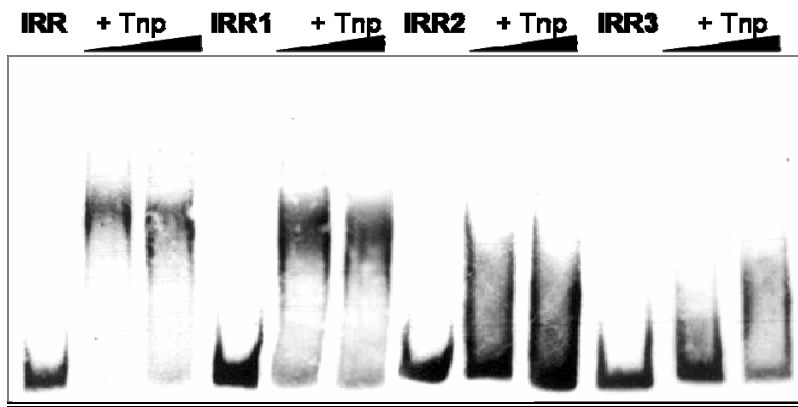


Abb. 5.27: EMSA von CBP-Tnp mit IR_R PCR-Fragment und dessen mutierten Varianten. Die Auftrennung erfolgte im sechsprozentigen 0,5 x TBE-Acrylamidgel bei 150 V nach vorheriger Inkubation mit je 0, 1,9 und 3,8 μ M Protein für 20 min bei RT. Über dem Blot ist das verwendete DNA-Fragment vermerkt.

In Gelshift-Experimenten wurde nun untersucht, ob die CBP-Transposase in der Lage ist, an die mutierten DNA-Fragmente zu binden. Die eingesetzten Transposasekonzentrationen betragen 1,9 bzw. 3,8 μ M. Mit dem IR_R DNA-Fragment kam es bei diesen Konzentrationen zur vollständigen Bindung der DNA. Bei den mutierten Varianten des IR_R zeigte sich ein differenzierteres Bild (Abb. 5.27): Die Deletion der terminalen 2 nt (IRR1) hatte keinen Einfluss auf die Bindung der CBP-Transposase. Deletion von 6 nt im äußeren konservierten Bereich (IRR2) hingegen verhinderte die Bindung der Transposase fast

vollständig, während die Deletion von 9 nt im inneren konservierten Bereich (IRR3) das Bindungsvermögen reduzierte.

Neben dem IRR wurde auch der IR_L spezifisch mutiert. Dabei wurden die terminalen nt 1-2 (IRL1) sowie die inneren nt 5-10 (IRL2) und nt 18-20 (IRL3) deletiert (Abb. 5.28). Die Deletionen wurden ebenfalls durch rekombinante PCR mit den Primerpaaren „IRL Mut1 for“ / „IRL Mut1 rev“, „IRL Mut2 for“ / „IRL Mut1 rev“ sowie „IRL Mut3 for“ / „IRL Mut3 rev“ und pIL2 als Template und anschließende Transformation in *E. coli* DH5 α hergestellt. Die neuen Plasmidvarianten wurden pIL2-IRL1, pIL2-IRL2 und pIL2-IRL3 benannt und dienten als *templates* für die Amplifikation der mutierten DNA-Fragmente für den EMSA wie unter 5.3.3.1 beschrieben.

1
GATAAAGTCCGTATAAT**TGTG**TAAAA...
 IRL1 IRL2 IRL3

26 **Abb. 5.28: Nukleotidsequenz des linken inverted repeat von IS256. Fett gedruckte Nukleotide sind in IRL und IRR identisch. Unterstrichene Nukleotide wurden deletiert.**

Die mutierten IR_L -Fragmente wurden nun in weiteren EMSA-Experimenten getestet. Die eingesetzten Transposasekonzentrationen betragen wiederum 1,9 bzw. 3,8 μ M. Das IR_L DNA-Fragment wurde bei diesen Konzentrationen vollständig von der CBP-Transposase gebunden (Abb. 5.29). Mit der Variante IRL1 (Deletion der terminalen 2 nt) wurde kein Einfluss auf die Bindung der CBP-Transposase festgestellt. Deletion von 6 nt im äußeren konservierten Bereich (IRL2) hingegen verhinderte die Bindung der CBP-Transposase vollständig. Gleichzeitig wurde auch durch die Deletion von 3 nt im inneren konservierten Bereich (IRL3) das Bindungsvermögen der CBP-Transposase verringert.

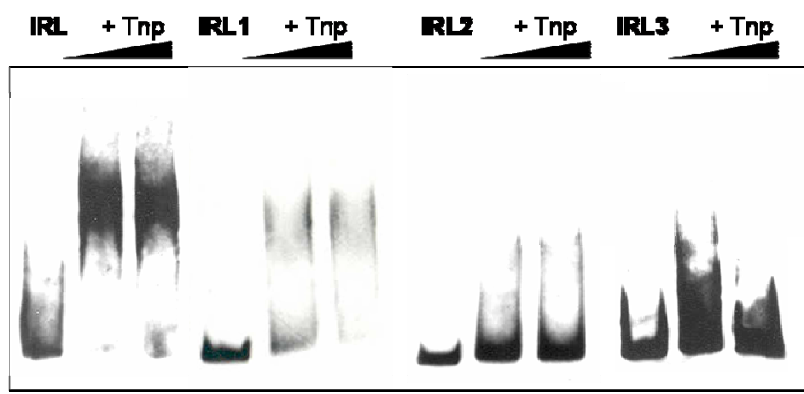


Abb. 5.29: EMSA von CBP-Tnp mit IR_L PCR-Fragment und dessen mutierten Varianten. Die Auftrennung erfolgte im sechsprozentigen 0,5 x TBE-Acrylamidgel bei 150 V nach vorheriger Inkubation mit je 0, 1,9 und 3,8 μ M Protein für 20 min bei RT. Über dem Blot ist das jeweils verwendete DNA-Fragment vermerkt.

Aus den EMSA-Experimenten lässt sich schließen, dass die terminalen 2 nt für die Bindung der Transposase an die *inverted repeats* nicht notwendig sind. Die Integrität der inneren homologen Bereiche hingegen ist Voraussetzung für die Bindung der CBP-Transposase. Dabei stimmen die Ergebnisse für den rechten und linken IR überein. Ein Vergleich zwischen der Deletion IRL3 und IRR3 zeigt, dass schon die Deletion von 3 bp ausreicht, um die Bindung der Transposase an die DNA zu verhindern.

5.3.3.3. Bindung der CBP-Transposase an *circle junction* DNA

Frühere Arbeiten unserer Gruppe haben gezeigt, dass IS256 durch die IS256 Transposase aus dem Chromosom ausgeschnitten werden und als extrachromosomaler Zirkel vorliegen kann (Loessner *et al.*, 2002). Die Zirkel stellen dabei vermutlich ein Intermediat des Transpositionsprozesses dar, das relinearisiert und schließlich wieder ins Chromosom integriert werden kann, wie es beispielsweise für IS911 demonstriert wurde (Ton-Hoang *et al.*, 1998; Ton-Hoang *et al.*, 1999). In den Zirkeln sind rechter und linker IR über eine kurze Brücke von wenigen Nukleotiden, die *circle junction*, verbunden. Um einen Hinweis auf die Beteiligung der Transposase an der Auflösung der zirkulären Intermediate zu erhalten, wurde das Bindungsvermögen der Transposase an IR_L bzw. IR_R im Kontext der *circle junction* überprüft.

Mittels *Atomic Force* Mikroskopie (AFM) wurde dabei die Bindung der CBP-Transposase an spezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Bindung eines Proteins an die DNA direkt visualisiert wird. Wählt man das DNA-Fragment so, dass sich die potentielle Bindungsstelle asymmetrisch auf dem DNA-Doppelstrang befindet, kann man durch Längenmessungen Größe und Lage des vom Protein gebundenen DNA-Bereiches abschätzen.

Dazu wurden IRL und IRR enthaltene PCR-Fragmente zunächst ohne Protein und anschließend nach Inkubation mit CBP-Transposase mittels AFM analysiert. Auswertbare Bilder wurden nur mit einem Fragment erzielt, das die *circle junction* Region aus einem extrachromosomalen IS256 Zirkel repräsentierte. Dieses 341 bp Fragment umfasste IR_L und IR_R, verbunden durch eine *junction* von 2 bp (Abb. 5.28a). Das DNA-Fragment wurde durch PCR mit den Primern „IRL rev EMSA“ und „IS invR“ amplifiziert. Als *template*

diente ein in pGEM[®]T-easy kloniertes Produkt einer inversen PCR von IS256 Zirkeln aus *E. coli* DH5a pIL2.

Zuerst wurde das DNA-Fragment in verschiedenen Verdünnungen ohne Protein in ultrareinem Wasser analysiert, um empirisch die richtige Konzentration für die Visualisierung zu ermitteln. Als optimal erwies sich eine Konzentration von 4 ng / μl , mit ca. 50 DNA-Fragmenten auf 1 μm^2 (Abb.5.30b). Die AFM-Aufnahmen wurden mit der Software „ImageTools“ analysiert und in einer Stichprobe (n = 48) die Länge der DNA-Moleküle gemessen. Die gemessene Länge des DNA-Fragments betrug 129 (\pm 7) nm, die Verteilung der Messwerte zeigte keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung (Chi-Quadrat = 4,88 , FG = 3, p < 0,01).

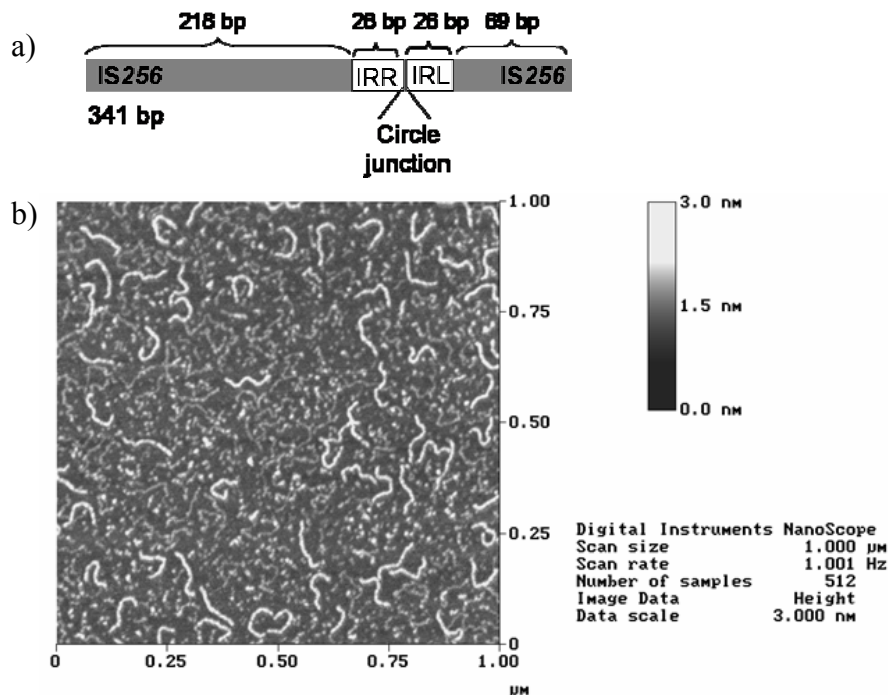


Abb. 5.30 Atomic force Mikroskopie linearer DNA. a) Schematische Darstellung des zur AFM eingesetzten PCR-Fragments. b) AFM-Aufnahme von 341 bp IR_L - IR_R -junction PCR-Fragmenten.

Zum Nachweis der Proteinbindung wurde die DNA mit gereinigter CBP-Transposase in einem molaren Verhältnis von 1:30 unter gleichen Bedingungen wie beim EMSA inkubiert. Allerdings wurde kein Poly[d(I-C)] zugesetzt, da mittels AFM nicht zwischen verschiedenen Nukleinsäurefragmenten unterschieden werden kann. Nach der Inkubation wurde das Protein-DNA-Gemisch in verschiedenen Verdünnungen visualisiert. Als Kontrolle diente DNA in Puffer ohne Protein und reiner Puffer ohne DNA oder Protein.

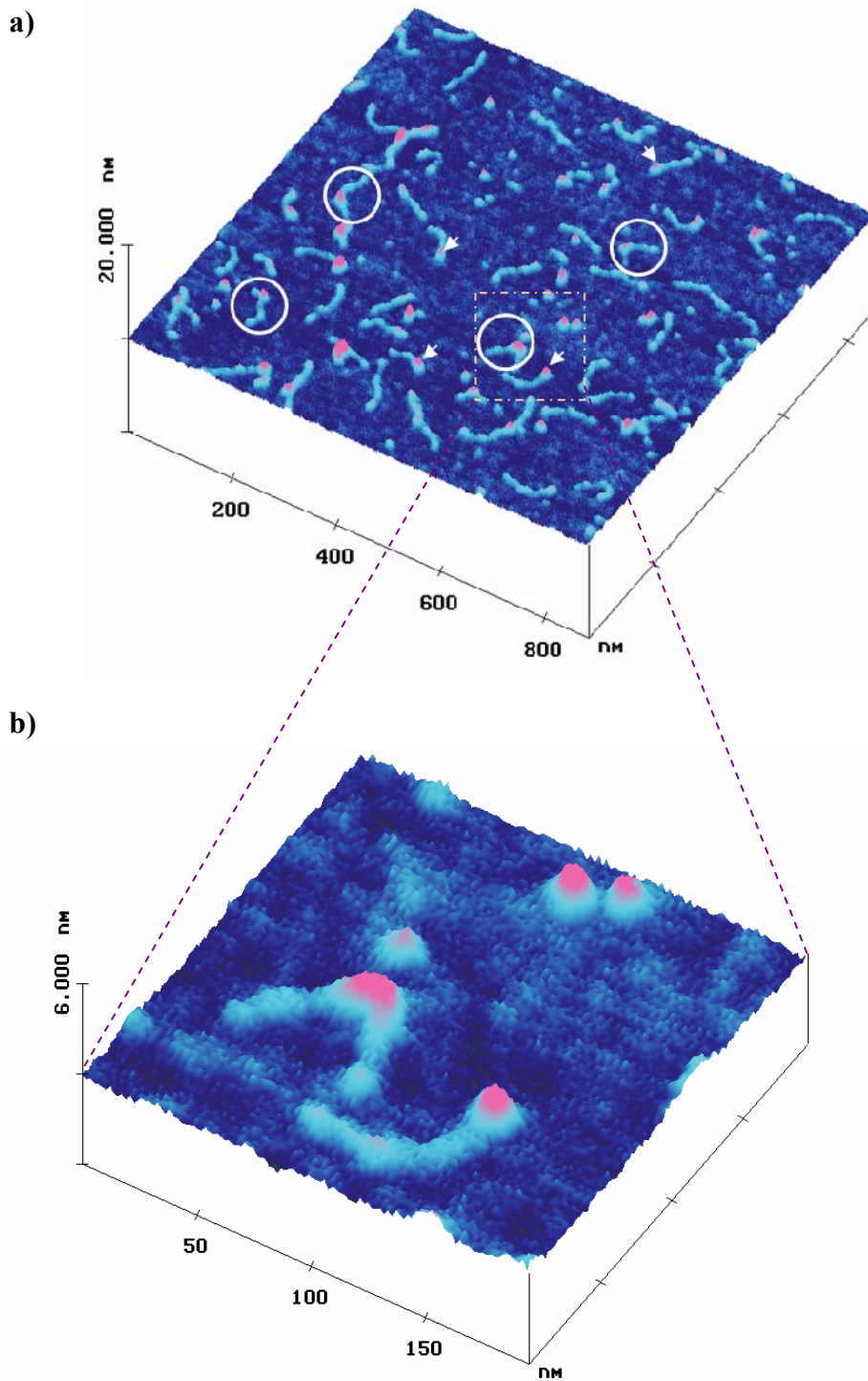


Abb. 5.31: AFM-Aufnahmen nach Inkubation des 341 bp DNA-Fragments mit CBP-Transposase .a) Scanfläche 900×900 nm. Weiße Kreise markieren eine Proteinbindung im inneren Teil des DNA-Fragments, kleine Pfeile zeigen Beispiele für terminal gebundene Transposase. b) Vergrößerter Ausschnitt. Scanfläche 200×200 nm.

Von der geeigneten Verdünnung (1 ng / μ l DNA, 7,5 ng / μ l Protein) wurden 16 repräsentative Aufnahmen gespeichert und ausgewertet. Dabei zeigte sich zunächst, dass die DNA unter diesen Bedingungen kompakter als in ultrareinem Wasser war.

Ungebundene PCR-Fragmente waren 109 ± 11 nm lang ($n=52$), mit Protein assoziierte DNA maß durchschnittlich 89 ± 10 nm ($n = 152$). Die Messwerte wichen nicht signifikant von einer Normalverteilung ab (Chi-Quadrat = 2,29, FG = 2, $p < 0,01$ bzw. Chi-Quadrat = 2,33, FG = 3, $p < 0,01$). Die Bindung von CPB-Transposase erfolgte zum einen an den Enden des DNA-Fragments, zum anderen aber auch im inneren Bereich der DNA (Abb. 5.31). Die Anzahl der DNA-Fragmente mit terminal gebundenem Protein überstieg dabei die Anzahl der „mittig“ gebundenen Fragmente um den Faktor 2,5. Dieses lässt sich vermutlich auf das Fehlen von Kompetitor-DNA zum Absättigen unspezifischer Bindungen zurückführen.

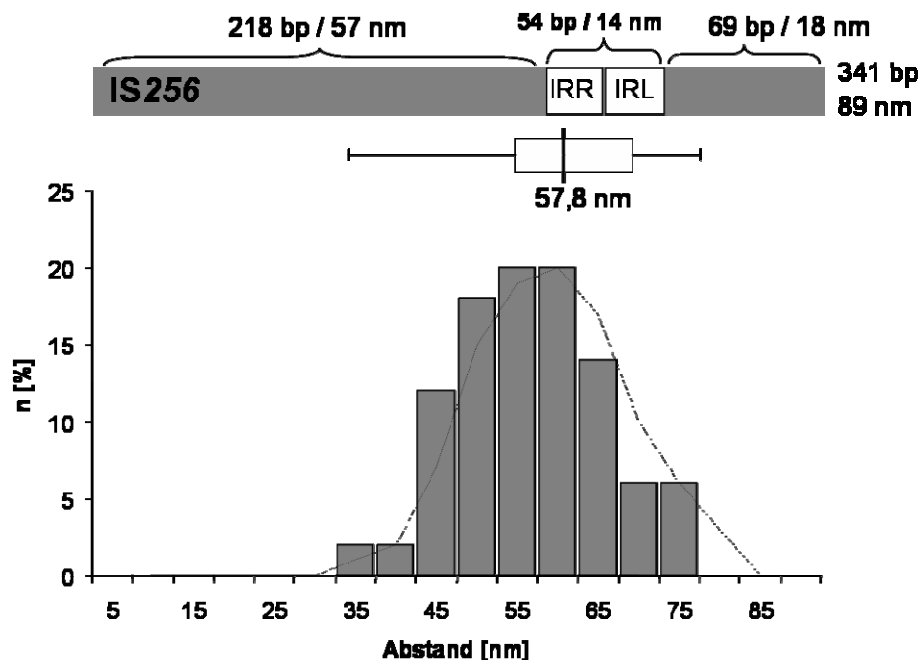


Abb. 5.32: Messungen der Distanz zwischen innerer CBP-Transposase-Bindungsstelle und DNA-Ende. Für das Diagramm wurden die aus der Auswertung von AFM-Aufnahmen gewonnenen Messwerte in 5 nm Schritten gruppiert und ihr Anteil in % der Stichprobengröße ($n = 50$) gegen den gemessenen Abstand zum DNA-Ende in nm aufgetragen. Die gestrichelte Linie stellt den gleitenden Durchschnitt der Messwerte dar. Über dem Diagramm wurde maßstabsgetreu das verwendete DNA-Fragment mit IR_R und IR_L und den entsprechenden Größen in bp und nm dargestellt. Zwischen Diagramm und DNA-Fragment wurde der Median (schwarzer senkrechter Balken) mit dem 1. und 3. Quartil (weiße Kästchen) sowie Minimal- und Maximalwert (waagerechte Balken) maßstabsgetreu markiert.

Um die Lage der gebundenen CBP-Transposase am inneren Bereich der DNA zu bestimmen, wurden 50 einzeln liegende DNA-Moleküle ausgemessen. Dabei wurde die Länge des DNA-Strangs immer ausgehend vom längeren Ende bis zur Mitte des vom Protein bedeckten Bereichs ermittelt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 5.32 dargestellt. Die Messwerte wurden in Schritten von je 5 nm gruppiert und ihre Verteilung

auf dem 89 nm DNA-Strang gegen die Anzahl der in der Gruppe enthaltenen Messwerte in % aufgetragen. Da die Verteilung der Werte signifikant von einer Normalverteilung abwich (Chi-Quadrat = 12,98, FG = 2, $p < 0,01$), wurde statt eines Mittelwertes der Median_{Abstand der Proteinbindungsstelle zum DNA-Ende} mit 57,8 nm ermittelt. Das 1. und das 3. Quartil (25 % der Messwerte ober- bzw. unterhalb des Medians) lagen bei 51,8 nm bzw. 65 nm. Rechnet man die Messwerte von nm in bp um, so befindet sich der Median bei 221 bp. Unter Berücksichtigung der Werte für das 1. und 3. Quartil bedeutet dies, dass die gemessenen Bindungsstellen im Bereich des IR_R und teilweise des IR_L liegen (Abb. 5.32). Die Größe des insgesamt vom Protein überdeckten Bereiches wurde nicht ermittelt, da hierfür die Auflösung der AFM-Aufnahmen zu gering war und somit zu große Messfehler entstanden wären.

5.3.3.4 Expression verkürzter CBP-Transposasederivate

Da für Transposasen der gesamten IS256 Familie die DNA-Bindungsdomäne bislang unbekannt war, sollte als nächstes die für DNA-Bindung verantwortliche Proteinregion der IS256 Transposase charakterisiert werden. Dazu wurden drei um jeweils 30 Aminosäuren überlappende verkürzte Derivate des Proteins mittels Fusion mit dem CBP-Tag exprimiert, um anschließend ihr DNA-Bindungsverhalten im EMSA zu untersuchen. Derivat I umfasste die ersten N-terminalen 130 Aminosäuren der Transposase, Derivat II die Aminosäuren 100 bis 230 und Derivat III Aminosäuren 200 bis 390. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Primer „LIC1“ und „LIC5 Tnp130r“ (Fragment I, 415 bp), „LIC3 Tnp100f“ und „LIC6 Tnp230r“ (Fragment II, 415 bp) sowie „LIC2“ und „LIC4 Tnp200f“ (Fragment III, 611 bp) mit Pfx-Polymerase amplifiziert, anschließend wie in 5.3.2.1 beschrieben in pCAL-n-FLAG ligiert und schließlich in *E. coli* Rosetta transformiert.

Expression und Reinigung aller Derivate erfolgten generell wie unter 5.3.2.2, mit Ausnahme von Derivat I, bei dem es bei Expression bei 30 °C zu einer starken Bildung von unlöslichen *inclusion bodies* kam. Deshalb wurde in diesem Fall bei 18 °C für 4 h induziert, da unter diesen Bedingungen ein ausreichend großer Anteil an löslichem Transposasederivat I gebildet wurde. Das berechnete MW der gereinigten CBP-Transposasederivate betrug 49,7 kDa (CBP-Tnp_{D167A}), 40 kDa (CBP-Tnp_{Aa1-310}), 19,3 kDa

(CBP-Tnp_{Aa1-130}), 18,8 kDa (CBP-Tnp_{Aa100-230}) bzw. 26,3 kDa (CBP-Tnp_{Aa200-390}) (Abb. 5.33).

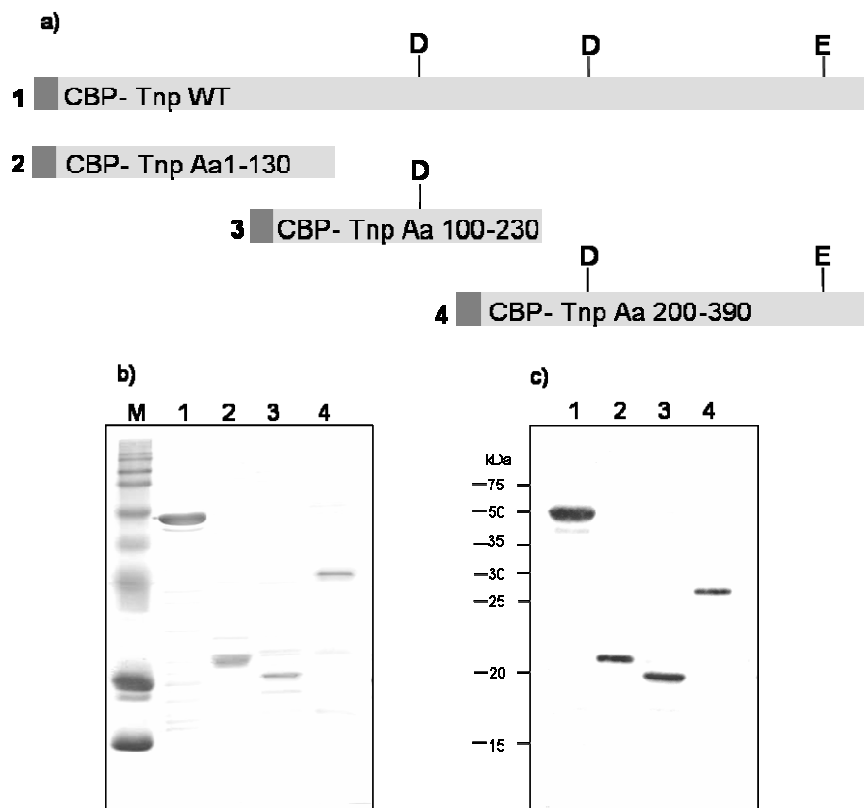


Abb. 5.33: Expression und Reinigung verschiedener IS256-Transposasederivate. a) Schematische Darstellung der exprimierten Proteinderivate. Dunkelgraues Kästchen = CBP-Tag. D,D,E = Katalytische Triade. 1 = WT-Tnp. 2 = Tnp-Derivat I, 3 = Tnp-Derivat II, 4 = Tnp-Derivat III. b) Coomassiegefärbtes 15 % PAGE der gereinigten Derivate. c) Western-Blot mit Anti-FLAG Antikörper. M = Marker. 1 = CBP-Tnp WT. 2 = CBP-Tnp_{Aa1-130}. 3 = CBP-Tnp_{Aa100-230}. 4 = CBP-Tnp_{Aa200-390}.

5.3.3.5 Bindung der verkürzten CBP-Transposasederivate an die *inverted repeats*

Die gereinigten Transposasederivate I - III wurden im nächsten Schritt hinsichtlich ihres DNA-Bindungsvermögens untersucht. Als DNA diente das IR_R-Fragment, die Bedingungen entsprachen der WT CBP-Transposase. Zur DNA wurden jeweils 200 nM, 500 nM bzw. 1000 nM Protein zugesetzt. Inkubation und elektrophoretische Auftrennung erfolgten wie für die WT CBP-Transposase.

Wie aus Abb. 5.34 ersichtlich, banden Derivat I (Aa1-130) und II (Aa100-230) bereits ab der niedrigsten eingesetzten Konzentration (200 nM) an das DNA-Fragment. Dabei zeigte Derivat I im Gegensatz zu Derivat II neben einer Hauptbande noch eine schwächere

Nebenbande. Für das Derivat III (Aa 200-390), die C-terminale Hälfte der Transposase, war dagegen auch bei hoher Proteinkonzentration keine Bindung an die DNA nachweisbar (Abb. 5.34).

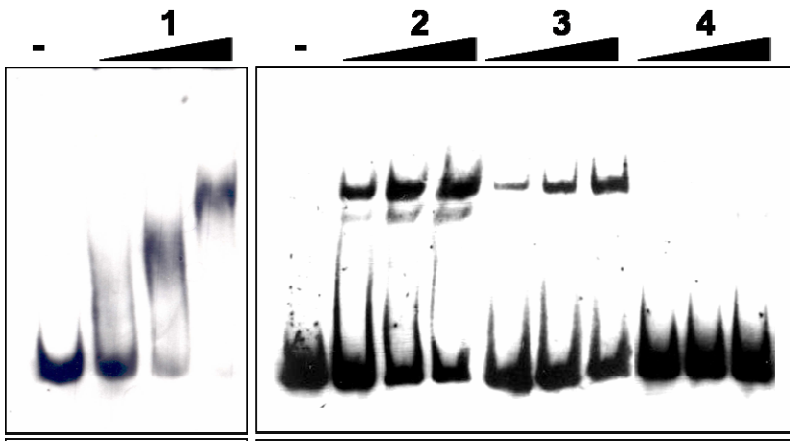


Abb. 5.34: Bindung von CBP-WT-Tnp und verkürzten Transposasederivaten an IR_R . DIG-markierte DNA wurde mit 200, 500, 1000 nM Protein (jeweils über dem Blot vermerkt) inkubiert und im Anschluss in einem 6%igen 0,5 x TBE-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als unspezifischer Kompetitor diente Poly[d(I-C)]. 1 = WT CBP-Transposase, 2 = CBP-Tnp_{Aa1-130}, 3 = CBP-Tnp_{Aa100-230}, 3 = CBP-Tnp_{Aa 200-390}.

5.3.3.6 Expression von CBP-Transposasederivaten mit Einzelaminosäureaustausch

Wie die EMSA-Experimente mit überlappenden IS256 Transposasederivaten zeigten, konnten nur das C-terminale Derivat_{Aa200-390} nicht an die *inverted repeats* binden. Den beiden anderen Derivaten, die zur DNA-Bindung in der Lage waren, waren Aminosäuren 100-130 gemein. Deshalb wurde dieser Bereich des Proteins nun genauer analysiert. Laut Sekundärstrukturvorhersage liegen hier zwei α -Helices, $\alpha 3$ und $\alpha 4$, durch einen kurzen *turn* getrennt, nebeneinander (Abb. 5.19). Der pI von $\alpha 3$ ist mit 5,96 schwach sauer, während der pI von $\alpha 4$ mit 8,7 basisch ist. Der „Grand average of hydropathicity“ (GRAVY) klassifiziert Helix $\alpha 3$ mit 0,831 als hydrophob und Helix $\alpha 4$ mit -0,373 als hydrophil (Kyte und Doolittle, 1982).

Im Sequenzvergleich mit 14 weiteren Transposasen der IS256 Familie konnten im Bereich von Aa 100 bis 127 (bezogen auf IS256) mehrere konservierte Reste identifiziert werden, so in $\alpha 3$ Leucin auf Position 103 und Tyrosin auf Position 111, im Bereich des *turns* Glycin auf Position 114 sowie am Beginn von $\alpha 4$ Threonin und Serin auf Position 117 bzw. 118

(Abb. 5.35). Alle verglichenen Transposasen weisen in diesem Bereich laut PSIPRED eine ähnliche Sekundärstruktur wie IS256 auf, wobei die zweite Helix generell stärker polar ist

(7 von 11 Resten), während die erste Helix mehr hydrophobe Aminosäuren aufweist (7-10 von 13 Resten).

	*****	CCC	*****
IS256	KALMASMLEMYVS	GVS	TRKVS KIVEEL
IS1132	TELDDMIISLYAG	GMT	VRDIQHHLATT
IS1164	RALTSVVATCYLL	GVS	TRRMEKLVDTL
IS1191	DHLEEMVIKLYQT	GVT	TREIRDIIERM
IS1201	DVLENMI IKLYSK	GVT	TREIADLIEKM
IS1245	QCLFAVVMEAYLH	GTS	TRKVDDL VKAL
IS1310	DNLETTVIQLYTK	GIT	TAEIAELIENM
IS1311	QCLFAVVMEAYLH	GTS	TRKVDDL VKAL
IS1395	RALTSVVATCYLL	GVS	TRRMERLVETL
IS1414	TGMDNQILSLYAK	GMT	TREIAAAFKEK
IS1542	KALLASMLEMYVS	GVS	TRKVS KIVEEL
IS16	KALIAAMIEMVIS	GVS	TRKVTKTVELL
IS1601	SALITVVADCYLA	GVS	TRRMDKLVKTL
IS2606	TDVDEVVLSLYAR	GLT	TGEISAHFAHI
IS1081	RALTSVVATCYLL	GVS	TRRMERLVETL
Consensus	pxLxxhhhphYhx	Gpp	TRphpphpph

Abb. 5.35: Sequenzvergleich von Aa 100-127 (bezogen auf IS256-Sequenz) von Transposasen der IS256 Familie. Oberste Zeile: * = α -helikale Bereiche, c = random coiled. Sequenzvergleich: Konservierte Reste = blau, ähnliche Reste = türkis. Consensussequenz: variable Aminosäuren = x, hydrophobe Aminosäuren = h, polare Aminosäuren = p. Hydrophobe Aminosäuren sind zusätzlich rot und polare Reste blau gekennzeichnet.

Um die Bedeutung der vorhergesagten Sekundärstruktur für die Bindung der IS256 Transposase an die IRs zu untersuchen, wurden verschiedene Reste durch Punktmutationen ausgetauscht (Tabelle 5.6). In Helix α 3 betraf das die konservierten Reste L103 und Y111, die durch Prolin bzw. Alanin ersetzt wurden. Weiterhin wurde das konservierte G114 des *turns* gegen Tryptophan ausgetauscht. Schließlich wurden die konservierten Reste aus der zweiten Helix α 4, T117 und R118, jeweils durch Alanin ersetzt. Außerdem wurde L127 gegen die helixbrechende Aminosäure Prolin ausgetauscht.

Tabelle 5.6: Aminosäureaustausch im putativen DNA-Bindungsmotiv der IS256 Transposase.

Wildtyp	Position	Austausch	Primer	Veränderung der Eigenschaften
Leucin	103	Prolin	„L103P for“ / „L103P rev“	Helix-brechend
Tyrosin	111	Alanin	„Y111A for“ / „Y111A rev“	Polar \rightarrow apolar
Glycin	114	Tryptophan	„G114W for“ / „G114W rev“	Klein \rightarrow groß
Threonin	117	Alanin	„T117A for“ / „T117A rev“	Polar \rightarrow apolar
Arginin	118	Alanin	„R118A for“ / „R118A rev“	Polar \rightarrow apolar
Leucin	127	Prolin	„L127P for“ / „L127P rev“	Helix-brechend

Die Mutationen wurden durch rekombinante Elongase-PCR mit überlappenden Primern und pCAL-n-*tnp* als *template* (Tabelle 5.6) sowie anschließende Transformation in *E. coli* DH5 α eingeführt. Nach Überprüfung der Mutation mittels Sequenzierung wurden die entsprechenden Plasmide in *E. coli* Rosetta transformiert. Die Induktion der Expression und Reinigung der mutierten CBP-Transposasederivate erfolgte wie unter 5.3.2 beschrieben.

5.3.3.7 Bindung der CBP-Transposasederivate mit Aminosäureaustausch an IR_R

Die mutierten Transposasederivate wurden nun hinsichtlich ihres DNA-Bindungsverhaltens im EMSA untersucht. Als DNA diente das IR_R-Fragment. Die Proteinkonzentrationen und Inkubationsbedingungen wurden wie zuvor für die CBP-Transposase (WT) gewählt. Die verschiedenen *gelshifts* erbrachten folgenden Resultate (Abb. 5.36): Der Aminosäureaustausch L103→P führte zu keiner Veränderung der DNA-Bindung. Ein *shift* der DNA war ab Zugabe von 200 nM Protein nachweisbar. Ein Aminosäureaustausch von Y111→A und G114→W hingegen bewirkte einen Verlust des DNA-Bindungsvermögens. Bei Mutation von T117→A und R118→A trat nur noch eine schwache Bindung ab 800 nM auf. Der Aminosäureaustausch L127→P veränderte die DNA-Bindung nicht; ab 200 nM eingesetzter Proteinmenge kam es zu einem *shift* der DNA.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass strukturverändernde Mutationen im inneren Bereich von $\alpha 3$ (Y111), $\alpha 4$ (T117, R118) sowie innerhalb des dazwischen liegenden *turns* eine Bindung der IS256 CBP-Transposase an IR_R verhindern. Die Bedeutung der Proteinregion Aa 100-127 als potentielle DNA-Bindungsdomäne der IS256 Transposase wird damit untermauert.

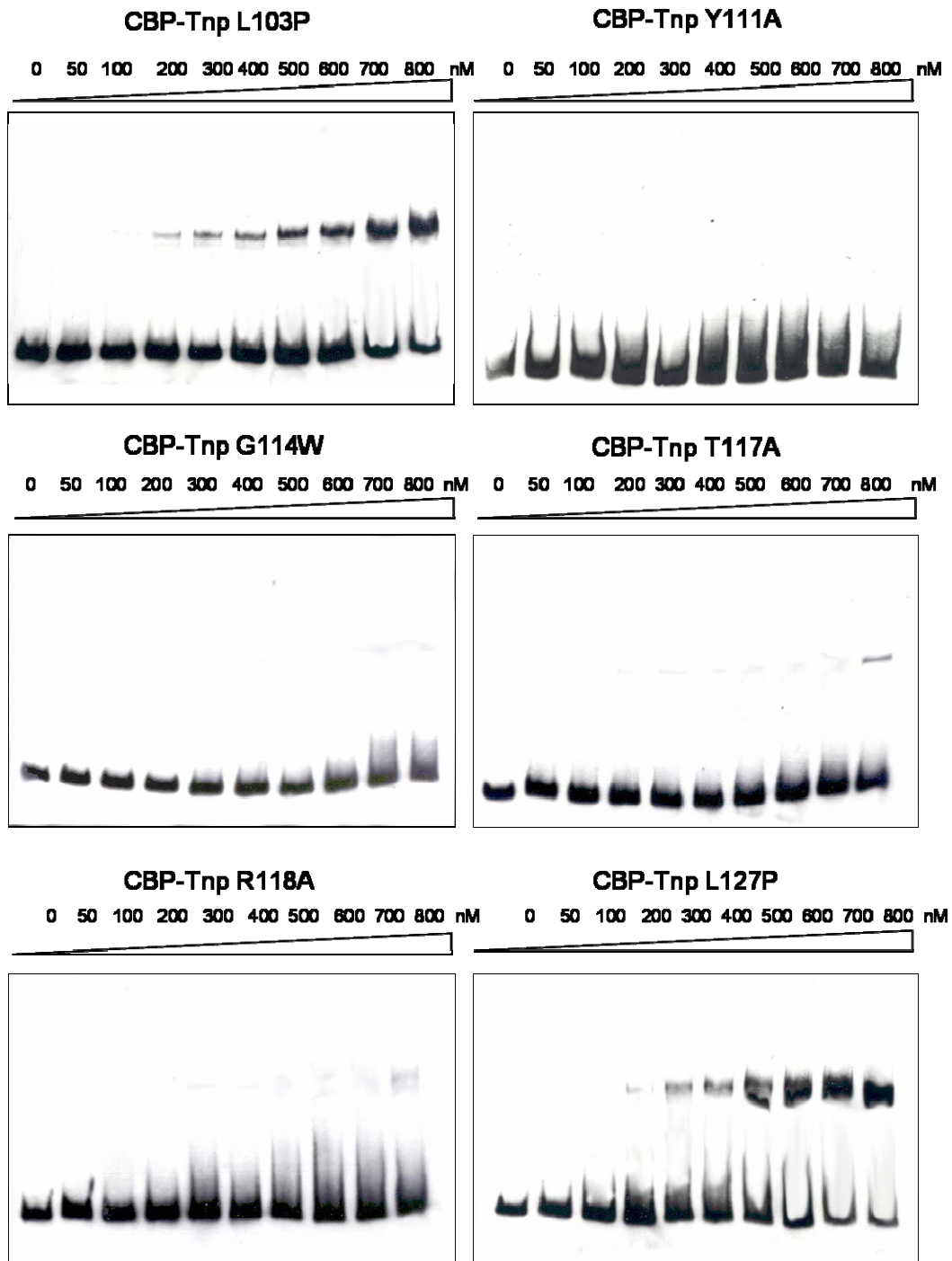


Abb. 5.36: EMSA der CBP-Transposasederivate L103P, Y111A, G114W, T117A, R118A und L127P mit IR_R PCR-Fragment. Die Auftrennung erfolgte im sechsprozentigen 0,5 x TBE-Acrylamidgel bei 150 V nach vorheriger Inkubation für 20 min bei RT. Über dem jeweiligen Blot ist das verwendete Protein mit entsprechendem Aminosäureaustausch und den eingesetzten Konzentrationen vermerkt.

5.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Charakterisierung der IS256 Transposase

1. Die 45,7 kDa IS256 Transposase ist laut Sekundärstrukturvorhersage ein vorwiegend α -helikales Protein mit 11 kurzen β -Faltblattbereichen, u.a. im Bereich der katalytischen Triade D₁₆₇D₂₃₃E₃₄₁.
2. Per *in silico* Analyse konnte kein DNA-Bindungsmotiv detektiert werden.
3. Die IS256 Transposase wurde heterolog überexprimiert und mittels eines N-terminalen *Calmodulin binding tag* (CBP) gereinigt.
4. Der *tag* ließ sich proteolytisch nicht effektiv entfernen. *In vivo* war die CBP-Transposase jedoch auch mit *tag* aktiv (Nachweis extrachromosomaler IS256-Zirkel). Deshalb wurde für weitere *in vitro* Experimente CBP-Transposase verwendet.
5. Im *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) band die CBP-Transposase spezifisch an IR_L bzw. IR_R DNA-Fragmente. Die Bindung an den linken *inverted repeat* erfolgte ab 400 nM CBP-Transposase, die Bindung an den rechten *inverted repeat* ab 200 nM.
6. Durch Atomic Force Mikroskopie ließ sich die Bindung der CBP-Transposase an die *inverted repeats* innerhalb eines *circle junction* DNA-Fragments visualisieren.
7. Deletionen innerhalb der DNA-Sequenz des linken und rechten *inverted repeats* und anschließende EMSA-Experimente demonstrierten, dass die Transposase den inneren Bereich der *inverted repeats* erkennt und bindet.
8. Um die DNA-Bindungsdomäne der IS256 Transposase zu beschreiben, wurden drei um je 30 Aminosäuren überlappende Transposasefragmente exprimiert und gereinigt. Fragment_{Aa1-130} und Fragment_{Aa100-230} waren beide in der Lage, an die IR_R DNA zu binden. Das C-terminale Fragment_{Aa200-390} band hingegen nicht an die DNA.
9. Der überlappende Bereich von Fragment I und II (Aa 100-130) umfasst zwei α -Helices, getrennt durch einen kurzen *turn*. Während Helix 1 hydrophob ist, weist Helix 2 hydrophile Eigenschaften und einen basischen pI auf.
10. Durch Punktmutationen wurden im Bereich Aa 100-130 sechs konservierte Aminosäuren ausgetauscht und der Effekt im EMSA überprüft. Austausch von L103 und L127 gegen den Helixbrecher Prolin hatte keinen Effekt auf das Bindungsverhalten. Die Mutationen Y111→A, G114→W, T117→A und R118→A hingegen führten zu einer stark abgeschwächten Bindung bzw. zum Verlust des Bindungsvermögens.

6. DISKUSSION

6.1. Präzise Exzision von IS256

Staphylokokken haben sich in den letzten Jahren als dominante Erreger nosokomialer Infektionen etabliert. Diese erstaunliche Anpassung an eine neue ökologische Nische beruht bei *S. epidermidis* vor allem auf drei Faktoren: (i) der Fähigkeit, Biofilme auf abiotischen Oberflächen auszubilden, (ii) dem Erwerb multipler Antibiotikaresistenzen und (iii) einer hohen genotypischen Variabilität. Ein interessantes Beispiel dieser genotypischen Flexibilität ist die in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe für *S. epidermidis* beschriebene Phasenvariation der Biofilmbildung durch reversible Insertion von IS256 in das *ica* Operon (Ziebuhr *et al.*, 1999). Unter Phasenvariation versteht man einen Prozess, der zur Entstehung zweier Subpopulationen innerhalb eines Klons führt, von denen eine Subpopulation eine fehlende oder verringerte Expression des phasenvariablen Gens aufweist („Aus“), während die andere Subpopulation das Gen (bzw. die Gene) voll exprimiert („An“). Ein weiteres Charakteristikum der Phasenvariation ist zudem, dass „An“- und „Aus“-Phänotyp reversibel sind (Woude, 2006).

Im Falle der Phasenvariation der Biofilmbildung in *S. epidermidis* erfolgt der Wechsel vom „An“ (Expression des *ica* Operons, PIA-Synthese und damit biofilmpositiver Phänotyp) zum „Aus“ in ca. 30 % der Fälle durch Insertion von IS256 in das *ica* Operon, vor allem in *icaA* und *icaC* (Ziebuhr *et al.*, 1999). Dabei flankieren typischerweise 8 bp *target site* Duplikationen die Insertionsstelle. Die Reversion vom „Aus“ (keine oder unvollständige Expression des *ica* Operons, keine PIA-Synthese und damit biofilmnegativer Phänotyp) zum „An“ kann nur nach präziser Exzision des IS-Elements inklusive der *target site* Duplikation aus dem *ica* Operon erfolgen. Vor Beginn dieser Arbeit war dazu lediglich bekannt, dass die Rate der präzisen Exzision mit $< 10^{-8}$ pro Generation und Zelle bedeutend niedriger als die IS256-Insertionsrate mit ca. 10^{-6} pro Generation und Zelle ist (Ziebuhr *et al.*, 1999). Der zugrunde liegende Mechanismus der präzisen Exzision wurde hier erstmals näher untersucht, um damit zum Verständnis der Phasenvariation in *S. epidermidis* beizutragen.

Zunächst wurde die präzise Exzision qualitativ analysiert. Dazu wurden in einem IS256-freien, *ica*-positiven Stammhintergrund (*S. epidermidis* CSF41498) Mutanten mit einer Insertion von IS256 in *icaC* konstruiert. Die Mutanten besaßen das intakte IS-Element

(CSF41498-1) bzw. eine Kopie mit inaktiver Transposase (CSF41498-2). Durch wiederholte Passage der biofilmbnegativen Mutanten konnten biofilmpositive Revertanten isoliert werden, die hinsichtlich präziser Exzision von IS256 überprüft wurden. In beiden Mutanten wurden dabei mit geringer Frequenz Varianten nachgewiesen, deren *icaC*-Sequenz vollständig wiederhergestellt war. Neue IS256-Insertionen in anderen chromosomalen Regionen wurden nicht detektiert. Dieses Experiment belegte deutlich, dass die präzise Exzision – im Gegensatz zur Insertion von IS256 – ein Transposase-unabhängiger Prozess ist.

IS256 kann Transposase-abhängig zirkuläre Intermediate bilden, bei denen linkes und rechtes IS-Ende durch eine kurze Nukleotidfolge aus benachbarter Sequenz, meistens fünf bis sechs Basenpaare, verbunden sind (Loessner *et al.*, 2002; Prudhomme *et al.*, 2002). Ebenso können aber auch Versionen auftreten, bei denen ein Ende des IS-Elementes verkürzt wurde (Loessner *et al.*, 2002). Da diese IS-Zirkel höchstwahrscheinlich Transpositionsintermediate darstellen, deuten diese Ergebnisse auf eine relativ unpräzise Strangtransfer-Reaktion hin. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit könnte die *circle junction* jedoch exakt die 8 bp der *target site* Duplikation umfassen und damit eine präzise Exzision ermöglichen. Allerdings zeigen Untersuchungen an IS911, das ebenfalls über ein zirkuläres Intermediat transponiert, dass IS911 eine Variante des replikativen Transpositionsweges nutzt, der auch als „*Copy and paste*“ bezeichnet wird. Dabei wird ein DNA-Strang ausgeschnitten und durch wirtseigene Enzyme zum Doppelstrang aufgefüllt, während der zweite Strang in die Donor-DNA inseriert bleibt (Duval-Valentin *et al.*, 2004). Möglicherweise nutzt IS256 einen ähnlichen Transpositionsmechanismus, so dass bei einer Neuinsertion die Ausgangskopie in der Donor-Sequenz erhalten bleibt. Dies würde gleichzeitig erklären, warum in den biofilmpositiven Revertanten niemals Neuinsertionen beobachtet wurden.

Da die Transposase nicht für die präzise Exzision verantwortlich ist, muss ein wirtseigener Mechanismus zur Herstellung der Ausgangssequenz und zum Verlust des IS-Elements führen. Die Ursachen dieses Rekombinationsereignisses wurden deshalb näher untersucht. Rekombination kann in drei Formen untergliedert werden:

1. Homologe Rekombination zwischen ausgedehnten Sequenzhomologien (Anderson und Roth, 1977; Anderson und Roth, 1981).
2. Ortsspezifische Rekombination zwischen kurzen homologen Nukleotidsequenzen.

3. Illegitime Rekombination ohne oder mit nur sehr kurzen Homologien zwischen den rekombinierenden Molekülen (Ehrlich *et al.*, 1993).

Zunächst wurde untersucht, ob die Rekombination auf Sequenzhomologien beruht. Homologe Bereiche, die Ausgangspunkt für ein Rekombinationsereignis sein könnten, sind lediglich die die IS256 Sequenz flankierenden 8 bp *target site* Duplikationen. Durch Einführung einer Deletion in die rechte *target site* Duplikation wurde diese Mikrohomologie weitgehend aufgehoben. In anschließenden Reversionsversuchen konnten keine Varianten isoliert werden, bei denen präzise Exzision von IS256 erfolgt war. Dieses Ergebnis schließt nicht aus, dass eventuell dennoch präzise Exzision möglich war, jedoch nicht detektiert wurde. Es legt aber nahe, dass die Exzision zumindest deutlich seltener oder gar nicht mehr erfolgt. Demzufolge müssen die Mikrohomologien eine wichtige Voraussetzung für die Exzision darstellen.

Für genauere, quantitative Aussagen zur präzisen Exzision erwies sich der beschriebene experimentelle Ansatz als ungeeignet. Der Hauptnachteil lag dabei in der Anreicherung von biofilmpositiven Revertanten durch Passage in Gewebekulturflaschen. Dies verhinderte zum einen die Ermittlung der Exzisionsfrequenz, da die genaue Bestimmung der Generationszahl unmöglich war. Zum anderen wurden zuverlässige Aussagen durch den Umstand erschwert, dass in allen Versuchen stets Biofilm gebildet wurde, der aber nur in wenigen Fällen auf Wiederherstellung des *ica* Operons beruhte. Damit stieg der experimentelle Aufwand zur Detektion der präzisen Exzision beträchtlich, da zahlreiche biofilmpositive Kolonien durch PCR hinsichtlich eines Exzisionsereignisses getestet werden mussten. Es wurde deshalb ein weiteres System entwickelt, das die einfache Quantifizierung der präzisen Exzision ermöglichte. Dieses System beruhte auf einer künstlichen Insertion von IS256 (inklusive 8 bp *target site* Duplikation) in die *spc*-Sequenz und erlaubte eine schnellere und effektivere Selektion von Revertanten durch Wachstum auf spectinomycinhaltigem Festmedium.

Da die Integration der Konstrukte ins Chromosom von *S. epidermidis* aus ungeklärten Gründen fehlschlug, wurde zuerst überprüft, ob der zur präzisen Exzision führende Mechanismus in *S. epidermidis* auch auf Plasmidebene wirksam ist. Die Versuche mit intakter IS256-Sequenz (pTH1) zeigten, dass auch im Plasmidsystem Revertanten detektiert werden konnten. Deshalb wurde dieses System zum Vergleich der

Exzisionsraten verschiedener IS256-Derivate verwendet. Zunächst wurden die Ergebnisse des ersten experimentellen Ansatzes bestätigt, dass die Exzision Transposase-unabhängig erfolgt. Darüber hinaus wurde durch gezielte Deletionen in einer *target site* Duplikation gezeigt, dass schon ab einer Verkürzung der Mikrohomologien um zwei Basenpaare die Wahrscheinlichkeit eines Exzisionsereignisses auf unter 10^{-13} pro Generation und Zelle sinkt. Auch die Abhängigkeit vom Abstand der Mikrohomologien wurde mit einem weiteren Konstrukt (pTH2) überprüft. Interessanterweise stieg die Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision bei Verkürzung der Distanz zwischen den *target site* Duplikationen auf ca. 200 bp etwa um das Vierfache.

Insgesamt zeigten die Versuche, dass die präzise Exzision ein sehr seltenes, transposaseunabhängiges Ereignis ist (mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 10^{-11} pro Generation und Zelle im Plasmidsystem). Präzise Exzision wurde sowohl chromosomal als auch auf Plasmidebene detektiert und war unabhängig von der Sequenz der Mikrohomologien, die sich in den beiden verwendeten experimentellen Ansätzen unterschieden. Präzise Exzision war von der Integrität der *target site* Duplikationen abhängig und fand häufiger statt, wenn der Abstand zwischen den Mikrohomologien sank.

Welche Form der Rekombination könnte der präzisen Exzision zugrunde liegen? Verschiedene Beobachtungen sprechen gegen den Mechanismus der homologen Rekombination. So wurde beispielsweise für *E. coli* demonstriert, dass RecA-abhängige Rekombination zwischen Tandem *repeats* erst ab Sequenzhomologien von ca. 300 bp erfolgt (Bi und Liu, 1994). Darüber hinaus ist die typische Frequenz homologer Rekombination mit ca. 10^{-4} weitaus höher als die in dieser Arbeit berechneten Wahrscheinlichkeiten (Lovett, 2004). Auch die Beobachtung, dass eine Verkürzung des Abstands zwischen den Mikrohomologien zu einem Anstieg der Exzisionsrate führt, steht im Widerspruch zur homologen Rekombination, da hier mit zunehmender Distanz zwischen den homologen Sequenzen die Wahrscheinlichkeit der Rekombination ansteigt.

Die zweite Form der Rekombination, ortsspezifische Rekombination, kann die Beobachtungen zur präzisen Exzision von IS256 ebenfalls nicht ausreichend erklären. Zum einen beruht ortsspezifische Rekombination auf der Aktivität spezialisierter Enzyme, wie Integrasen oder Transposasen. Hier wurde jedoch gezeigt, dass die Transposase nicht in die präzise Exzision involviert ist. Zum anderen benötigen diese Enzyme definierte

Erkennungssequenzen zur Prozessierung der DNA. In dieser Arbeit konnte präzise Exzision allerdings bei zwei distinkten Mikrohomologiesequenzen (*target site* Duplikation in *icaC* bzw. *spc*) nachgewiesen werden.

Der dritte Modus der Rekombination, die illegitime oder auch RecA-unabhängige Rekombination, beschränkt sich nicht auf spezifische Sequenzen oder Sequenzduplikationen und kann deshalb in jeder Region des Genoms auftreten. In Modellsystemen wurden zwei Klassen der illegitimen Rekombination beschrieben. Während die eine Klasse Fehler von DNA-schneidenden und -ligierenden Enzymen wie Topoisomerasen, sequenzspezifischen DNasen etc. umfasst, beinhaltet die zweite Klasse Rekombination zwischen kurzen homologen Bereichen, die nicht spezifisch von oben genannten Enzymen erkannt werden (Ehrlich *et al.*, 1993). Als Hauptursache derartiger Rekombinationsereignisse wird die Fehlpaarung zwischen neu synthetisierter DNA und alternativen komplementären Sequenzen in räumlicher Nähe angesehen. Dieser Vorgang kann zu Deletionen oder auch Duplikationen führen und wird allgemein als *replicational slippage* bezeichnet. Die Fehlpaarungen können dabei nur wenige Nukleotide, aber auch einige hundert Basenpaare umfassen (Lovett, 2004).

Mit dem Modell des *replicational slippage* (Abb. 6.1) können die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur präzisen Exzision vollständig erklärt werden. Die *target site* Duplikationen dienen dabei als Mikrohomologien, die – transposaseunabhängig- einen *slippage* Prozess verursachen können. In *E. coli* wurde *replicational slippage* ab einer *repeat*-Länge von 8 bp nachgewiesen (Farabaugh *et al.*, 1978; Albertini *et al.*, 1982), wobei schon kleine Sequenzunterschiede die Deletionseffizienz um mehrere Zehnerpotenzen reduzieren können (Lovett und Feschenko, 1996). Ähnliches scheint auch für *S. epidermidis* zuzutreffen, da acht homologe Basenpaare für die präzise Exzision ausreichen, schon die Deletion von 2 bp die Exzisionsrate jedoch um mindestens zwei Zehnerpotenzen verringerte. Damit liegen die *target site* Duplikationen an der unteren Grenze der notwendigen Mikrohomologien, was gleichzeitig die geringe Wahrscheinlichkeit der präzisen Exzision von ca. 10^{-11} pro Generation und Zelle erklären könnte. *Replicational slippage* zwischen mehreren 100 bp hingegen kann mit Frequenzen von 10^{-5} bis 10^{-4} pro Generation und Zelle auftreten (Dianov *et al.*, 1991; Lovett *et al.*, 1994).

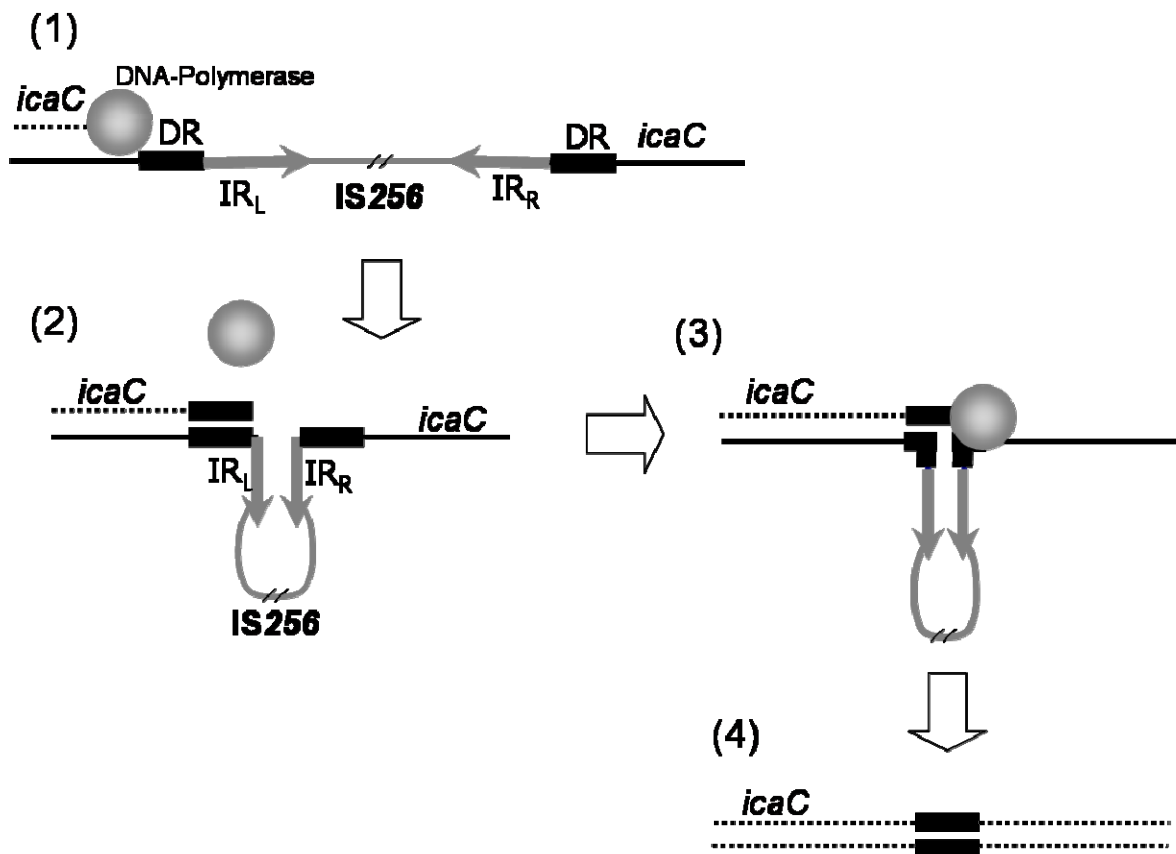


Abb. 6.1: Modell des replicational slippage. (1) Während der Replikation ist die Strangpaarung räumlich begrenzt aufgehoben. DR = direct repeat (8 bp target site Duplikation). IR = inverted repeat. (2) Die direct repeats werden durch Ausbildung einer Sekundärstruktur zwischen den inverted repeats in räumliche Nähe gebracht. (3) Transiente Fehlpaarung zwischen den direct repeats von Tochterstrang und Elternstrang. Die DNA-Polymerase „rutscht“ über die Fehlpaarung. (4) Nach Replikation des neusynthetisierten Strangs ist das IS-Element inklusive einer target site Duplikation deletiert und die *icaC*-Sequenz wiederhergestellt. Modifiziert nach Lovett (2004).

Neben der Länge der *repeats* ist die Wahrscheinlichkeit des *replicational slippage* abhängig von der Distanz zwischen den homologen Bereichen und steigt mit geringer werdendem Abstand exponentiell an (Bi und Liu, 1994; Chedin *et al.*, 1994). Die obere Grenze wird mit ca. 10 kB angegeben (Lovett, 2004). Der Abstand zwischen den *target site* Duplikationen von IS256 befindet sich mit ca. 1,3 kB somit im Rahmen dieser Spanne. Eine Verringerung der Distanz auf ca. 170 bp erhöhte die Rate der präzisen Exzision um das Dreifache. Auch dieses Ergebnis stimmt mit dem Modell des *replicational slippage* überein. Weiterhin ist bekannt, dass die *slippage*-Frequenz durch in der Nähe der Mikrohomologien befindliche *inverted repeats* stark erhöht werden kann (Sinden *et al.*, 1991). Die Ursache hierfür liegt in der Ausbildung einer Haarnadelstruktur zwischen den *inverted repeats*, die einerseits räumlich entfernt liegende *direct repeats* in engere Nähe bringen kann, andererseits die DNA-Replikation blockieren kann, so dass der neu

synthetisierte Strang fehlpaaren kann (Lovett, 2004). Die den Mikrohomologien benachbarten *inverted repeats* von IS256 könnten also zur präzisen Exzision beitragen.

Auch bei anderen Transposons bzw. IS-Elementen wurde präzise Exzision beschrieben, so für Tn5 oder Tn10 (Foster *et al.*, 1981; Collins *et al.*, 1982). Für Tn10 wurde aufgrund detaillierter Daten eine ebenfalls auf *replicational slippage* beruhende Exzision vorgeschlagen (Ehrlich *et al.*, 1993).

Es bleibt anzumerken, dass zwischen der Replikation des Chromosoms und des in dieser Arbeit verwendeten Plasmidsystems erhebliche Unterschiede bestehen. Die Serie der pTH-Vektoren trägt einen pE194-basierten *ori* (Brückner, 1997). Die Plasmide replizieren nach dem *rolling circle* Mechanismus (Dempsey *et al.*, 1995). Die Deletionsrate durch *replicational slippage* ist auf derartigen Vektoren erhöht (Janniére *et al.*, 1990). Vermutlich erleichtert das einzelsträngige Replikationsintermediat die Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen zwischen *inverted repeats*. Damit ist es möglich, dass die in dieser Arbeit berechneten Wahrscheinlichkeiten der präzisen Exzision im Plasmidhintergrund die Verhältnisse der chromosomalen Exzision nicht adäquat widerspiegeln und die tatsächliche Frequenz der präzisen Exzision im Chromosom geringer ist. Dennoch erlauben die Daten einen Vergleich der verschiedenen Konstrukte untereinander.

Weiterführende Experimente sollten auf eine Integration der Konstrukte ins Chromosom von *S. epidermidis* abzielen. Darüber hinaus erscheint die Bestätigung der Ergebnisse in einem *recA*⁻-Hintergrund sinnvoll. Interessante Einblicke in die Rolle der *inverted repeats* könnten außerdem durch ihre vollständige oder teilweise Deletion gewonnen werden. Auch die Auswirkungen einer Ausdehnung der Mikrohomologien auf die Exzisionsrate wären zu prüfen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Phasenvariation der Biofilmbildung in *Staphylococcus epidermidis* durch zwei distinkte Prozesse entsteht: (a) Transposition von IS256 und (b) Transposase-unabhängige präzise Exzision, wahrscheinlich durch *replicational slippage*. Die Frequenz dieser zwei Prozesse unterscheidet sich dabei dramatisch um mindestens fünf Zehnerpotenzen. Es ist aber nicht klar, ob sich die Häufigkeit beider Ereignisse eventuell in Abhängigkeit von wechselnden Umweltbedingungen verändern kann. Hinzu kommt, dass *Staphylococcus epidermidis* offenbar in der Lage ist, die geringe Reversionsrate zum *ica*-positiven Phänotyp durch

einen Wechsel zu einem anderen Typ der Biofilmbildung zu kompensieren. Dieser alternative Biofilm wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls näher charakterisiert; die Ergebnisse werden unter 6.2 diskutiert.

6.2. Phasenvariation durch alternative Biofilmbildung

Im Gegensatz zu *S. aureus*, der unter den Staphylokokken das größte Virulenzpotential besitzt und über eine beträchtliche Anzahl von Virulenzfaktoren, z.B. Superantigen-Toxine, Hämolsine, Adhäsine und degradative Enzyme verfügt (Götz, 2004), sind für *S. epidermidis* nur wenige Virulenzfaktoren bekannt, unter denen die Fähigkeit zur Biofilmbildung eine zentrale Stellung einnimmt. Die extrazelluläre Matrix des Biofilms besteht hauptsächlich aus PIA (*Polysaccharide Intercellular Adhesin*), aber auch aus anderen Komponenten wie z.B. extrazellulären Teichonsäuren und Proteinen (Mack *et al.*, 1999; Hussain *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 2005; Sadovskaya *et al.*, 2005; Sadovskaya *et al.*, 2006).

Während der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur präzisen Exzision von IS256 aus dem *icaC*-Gen wurden bei der Suche nach biofilmpositiven Revertanten häufig Varianten nachgewiesen, die biofilmpositiv waren, aber gleichzeitig noch eine Kopie von IS256 in *icaC* besaßen. Dabei handelte es sich nicht um ein Einzelphänomen, sondern die biofilmpositiven, *icaC::IS256* positiven Varianten wurden regelmäßig und schon nach kurzer Zeit nachgewiesen. Offensichtlich hatten diese Varianten die Fähigkeit zu einer alternativen, PIA-unabhängigen Biofilmbildung erlangt. Makroskopisch zeigte der Biofilm des WT und der *icaC::IS256* Varianten nur geringfügig Unterschiede. Auf Kongorotagar erschienen die Kolonien schwarz-metallisch mit unregelmäßiger Oberfläche. Im Adhäsionsassay variierte die Stärke des Biofilms zwar zwischen verschiedenen Varianten, einige erreichten jedoch das Niveau des Wildtyps. Als einziger Unterschied fiel auf, dass die Varianten in Schüttelkultur an der hydrophilen Oberfläche des Glaskolbens keinen Biofilm an der Übergangslinie von Medium zu Luft ausbildeten wie der WT. Mikroskopisch wurden *S. epidermidis* CSF41498 WT, die biofilmmegative, PIA-negative Mutante CSF41498-1 (*icaC::IS256*) und eine biofilmpositive, PIA-negative Variante von CSF41498-1 mittels *Atomic force* Mikroskopie analysiert. Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie werden die Bakterien bei dieser Methode minimal manipuliert, so dass auch Oberflächenstrukturen oder lose mit den Bakterien assoziiertes Material erhalten

bleiben. Die AFM-Aufnahmen des WT zeigten, dass die Zellen von einer fädigen Matrix umgeben waren. Diese fädige Matrix fehlte nicht nur in der isogenen PIA-negativen Mutante CSF41498-1, sondern auch in der biofilmpositiven, PIA-negativen Revertante von CSF41498-1. Da die fädige Matrix sowohl bei Anzucht auf Agarplatten als auch bei Anzucht als Biofilm in Gewebekulturflaschen nachweisbar war, lässt sich ausschließen, dass es sich um noch an den Zellen haftende Agarreste handelte. In diesem Falle hätten die fädigen Strukturen zudem in CSF41498-1 und der biofilmpositiven Revertante von CSF41498-1 ebenfalls sichtbar sein müssen. Daher kann man davon ausgehen, dass die fädige Matrix aus PIA besteht. Derartige Strukturen sind bereits in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *S. epidermidis* aus zwei älteren Publikationen erkennbar, wurden dort jedoch nicht kommentiert bzw. als Proteinstruktur interpretiert, da PIA zum damaligen Zeitpunkt noch nicht identifiziert war (Sanford *et al.*, 1995; Veenstra *et al.*, 1996).

PIA ist aus β -1-6-verknüpften N-Acetylglukosaminresten zusammengesetzt. Es handelt sich ähnlich wie bei Zellulose oder Chitin um ein unverzweigtes Homoglykan mit einer Kettenlänge von mindestens 130 Monomeren. Allerdings führt die β -1-6-Bindung im Gegensatz zur β -1-4-Bindung der Zellulose zu einer flexibleren Gesamtstruktur des Polysaccharids (Mack *et al.*, 1996). Eine Interaktion mehrerer PIA-Moleküle in der Art von Zellulose-Mikrofibrillen ist bisher unbekannt. Die in dieser Arbeit gemessenen Stränge der fädigen Matrix befinden sich jedoch mit 20 bis 30 nm im Durchmesser ungefähr in derselben Größenordnung wie bakterielle Zellulose-Mikrofibrillen mit einem Durchmesser von 1 bis 25 nm (Ross *et al.*, 1991), so dass eine derartige Zusammenlagerung mehrerer PIA-Einzelstränge denkbar wäre. Das Umeinanderwinden mehrerer PIA-Einzelstränge könnte auch die beobachteten Knotenpunkte und Verzweigungen erklären, die zu einer netzartigen Gesamtstruktur führen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre die Assoziation von PIA-Molekülen mit z.B. extrazellulären Proteinen. Eine solche Assoziation von zwei Oberflächenproteinen, SSP-1 und SSP-2, mit „fimbrienartigen Strukturen“, die von der Zelloberfläche von *S. epidermidis* auszugehen scheinen, wurde bereits demonstriert (Veenstra *et al.*, 1996). Die Rolle dieser Proteine für die Biofilmbildung ist jedoch unklar, zumal SSP1 und SSP2 auf genetischer Ebene bisher nicht charakterisiert wurden.

In den AFM-Aufnahmen der PIA-negativen, biofilmbnegativen Mutante CSF41498-1 erschien die Zelloberfläche relativ „glatt“. Es befand sich nur wenig extrazelluläre, polymorphe Substanz an den Zellen bzw. in ihrer Nähe. Fädige Strukturen traten nicht auf. Demgegenüber wies die PIA-negative, biofilmpositive Revertante von CSF41498-1 einen völlig anderen Phänotyp auf: Die Zelloberfläche wirkte wie „verklebt“ von einer Substanz, die aus globulären Einheiten zusammengesetzt war. Dies erschwerte unter anderem die Darstellung von Einzelzellen, da die Zellen stark aneinander hafteten und zum Teil unter der extrazellulären Matrix nur schwer zu erkennen waren. Auch in *ica*-negativen, biofilmpositiven Isolaten von *S. xylosus* wurde die extrazelluläre Matrix kürzlich als amorphe Substanz beschrieben (Planchon *et al.*, 2006). Adhärenzassays mit Proteinase K bzw. NaIO₄-Behandlung zeigten, dass die Matrix des alternativen Biofilms von CSF41498-1 im Gegensatz zum WT auf extrazellulären Proteinen basierte. Daher wurde vermutet, dass die im AFM beobachtete polymorphe Matrix aus einem oder mehreren solcher extrazellulärer bzw. zellwandgebundener Proteine besteht, welche eine erhöhte interzelluläre Adhäsion bewirken. Ein Vergleich der zellwandgebundenen Proteine von Wildtyp, Mutante und biofilmpositiven Revertanten ergab allerdings keinen Hinweis auf eine verstärkte Expression bestimmter Proteine in biofilmpositiven Varianten von CSF41498-1.

Aus früheren Veröffentlichungen waren bereits zwei Proteine bekannt, die in *ica*-negativen *Staphylococcus* Isolaten an der interzellulären Adhäsion beteiligt sind (Hussain *et al.*, 1997; Cucarella *et al.*, 2001; Rohde *et al.*, 2005). Die Expression dieser beiden Proteine in *S. epidermidis*, Aap und Bhp, wurde deshalb sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene überprüft. Aap ist ein 220 kDa großes Protein mit einer Signalsequenz, einem LPXTG-Motiv und einer C-terminalen *repeat* Region, das proteolytisch zu einem 140 kDa Fragment prozessiert werden muss, um Aktivität zu erlangen (Hussain *et al.*, 1997; Rohde *et al.*, 2005). In seiner Primärstruktur ähnelt Aap den *S. aureus* Oberflächenproteinen SasG und Pls. Die sogenannte B Region von Aap besteht aus 128 Aminosäuren langen *repeats*, deren Anzahl variieren kann (Bowden *et al.*, 2005). So zeigte ein Sequenzvergleich von Aap aus *S. epidermidis* Stamm RP62A, Stamm ATCC 12228 und Stamm 1579 beträchtliche stammspezifische Unterschiede, mit um bis zu 40 % verkürzten Aminosäuresequenzen des Aap aus ATCC 12228 und 1579 im Vergleich zu RP62A. Interessanterweise wurde kürzlich beschrieben, dass Aap mehrere so genannter G5-Domänen besitzt. Die G5-Domäne wurde als Erkennungsdomäne für N-Acetylglukosamin

postuliert und könnte somit für die Bindung von Aap an PIA verantwortlich sein (Bateman *et al.*, 2005). Allerdings kann Aap auch ohne Expression von PIA Biofilmbildung vermitteln (Rohde *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurde die Expression von *aap* in CSF41498-1 und biofilmpositiven Varianten PV A und PV C von CSF41498-1 verglichen. Im Northern Blot war die Transkriptmenge in PV A und insbesondere in PV C gegenüber CSF41498-1 deutlich erhöht. Dabei war die Expression in der logarithmischen Wachstumsphase stärker als in der stationären Phase. Bowden *et al.* (2005) demonstrierten im Gegensatz dazu eine stärkere Induktion in der stationären Phase. Die Zeitpunkte der Probenahme wurden in dieser Arbeit allerdings anders gewählt, nämlich OD_{600nm} 1,5 (logarithmisch) und OD_{600nm} 4,2 (stationär) anstelle von OD_{600nm} 0,7 und 2,3 bei Bowden *et al.* (2005). Es ist daher zu vermuten, dass die Induktion von *aap* am stärksten in der späten logarithmischen bzw. frühen stationären Phase erfolgt und das Expressionsniveau in der späteren stationären Phase wieder etwas absinkt. Den Unterschieden könnte aber auch eine stammspezifische Regulation zu Grunde liegen. Im Western Blot war Aap auch in Proben aus 15 h gewachsenen stationären Kulturen nachweisbar. Die erhöhte Expression von Aap in PV A und PV C konnte dabei auf Proteinebene bestätigt werden. Auch mittels Immunofluoreszenzmikroskopie wurde die verstärkte Expression von Aap in PV A und PV C gegenüber dem WT demonstriert.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die verstärkte Expression von *aap* in PV A und PV C im Zusammenhang mit der Ausbildung des proteinogenen Biofilms steht, wie dies für *S. epidermidis* 5179 von Rohde *et al.* (2005) kürzlich ebenfalls demonstriert wurde. Für ein weiteres Protein, das *Bap homologous protein* (Bhp), wurde ebenfalls eine Beteiligung an der Biofilmbildung postuliert (Bowden *et al.*, 2005). Bap (*biofilm associated protein*) ist in *S. aureus* sowohl an der primären Adhäsion als auch an der akkumulativen Phase der Biofilmbildung beteiligt (Cucarella *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalyse von *bhp* zeigte, dass *bhp* - im Gegensatz zu *aap* - in der stationären Phase etwas stärker induziert war als in der exponentiellen Wachstumsphase. Auch dieses Ergebnis stimmt nicht mit den Beobachtungen von Bowden *et al.* (2005) überein, die die stärkste *bhp*-Expression in der logarithmischen Wachstumsphase registrierten. Da sich die Ergebnisse dieser Arbeit auf die Transkriptionsebene beziehen, während Bowden *et al.* (2005) Proteinmengen vergleichen, könnten die beobachteten Unterschiede zum einen

wiederum auf verschobenen Probenahmezeitpunkten oder stammspezifischer Regulation basieren, zum anderen aber auch in einer wachstumsphasenabhängig variablen Stabilität des *bhp*-Transkripts oder des Proteins selbst begründet sein. Im Western Blot konnte in dieser Arbeit für Bhp keine Bande passender Größe detektiert werden. Dies könnte an mangelnder Spezifität des Antikörpers oder Proteolyse von Bhp in der stationären Phase liegen. Die RNA-Analysen demonstrieren jedoch, dass *bhp* in PV A und PV C schwächer exprimiert wird als im WT. Dieses Resultat legt nahe, dass eine erhöhte Expression von *bhp* nicht für den Phänotyp von PV A und PV C verantwortlich ist. Diese Annahme wird durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe von I. Lasa unterstützt, die zeigten, dass die Inaktivierung von *bhp* in zwei klinischen *S. epidermidis* Isolaten die Biofilmbildung nicht beeinflusste (Lasa und Penades, 2006). Untersuchungen des *S. aureus* Bap ergaben, dass in Bap-negativen Mutanten auch die Synthese von PIA verringert ist, während bei Komplementation von Bap die Menge an detektierbarem PIA ansteigt (Cucarella *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass Bap und PIA gemeinsam an der Ausbildung von interzellulären Kontakten beteiligt sind (Cucarella *et al.*, 2001). Die Rolle des *Bap homologous protein* von *S. epidermidis* für die Biofilmbildung ist jedoch weiterhin unklar.

Die durchgeführten Adhärenzassays unter verschiedenen Wachstumsbedingungen demonstrierten klar, dass der proteinogene Biofilm einer anderen Regulation unterliegt als der PIA-abhängige Biofilm. Besonders auffällig war, dass Zusatz von 4 % NaCl bei PV A und PV C zur völligen Inhibition der Biofilmbildung führt, während im WT die Biofilmbildung unter diesen Bedingungen verstärkt wird. Ethanol hingegen wirkte auch in PV A und PV C induzierend auf die Biofilmbildung.

Die Regulation der Biofilmbildung sowohl in *S. aureus* als auch in *S. epidermidis* ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Abb. 6.2 fasst den bisherigen Kenntnisstand zur Regulation der Biofilmbildung zusammen. Die meisten Daten für *S. epidermidis* liegen dabei bislang zu IcaR, dem Repressor des *ica* Operons, sowie zu dem alternativen Sigmafaktor SigB vor. Die Expression von *icaR* selbst wird durch SigB reprimiert (Knobloch *et al.*, 2004). Interessanterweise wird SigB in *S. aureus* durch Hitzeschock, hohe Salzkonzentrationen, alkalischen Stress und Zusatz von MnCl₂ aktiviert, jedoch nicht durch Ethanol wie bei *B. subtilis* (Pane-Farre *et al.*, 2006). Zusatz von NaCl führt so beispielsweise im WT zur Aktivierung von SigB, was wiederum eine Repression von *icaR* und damit gleichzeitig eine Derepression des *ica*-Operons zur Folge hat – es

kommt zu verstärkter Biofilmbildung. Da SigB als Sigmafaktor aktivierend auf die Genexpression wirkt, kann man davon ausgehen, dass es sich bei der Repression von *icaR* um einen indirekten Effekt handelt.

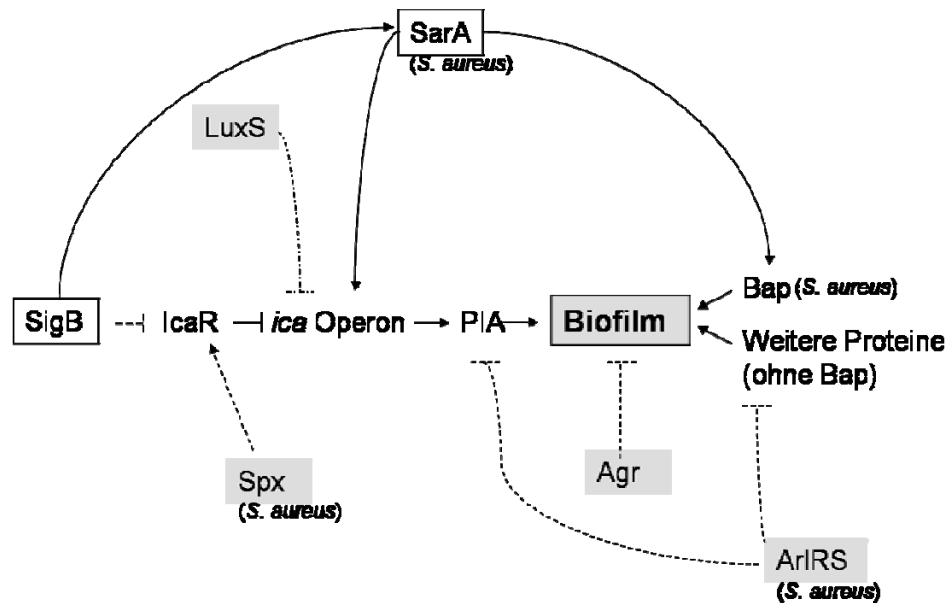


Abb. 6.2: Übersicht über identifizierte Regulatoren der Biofilmbildung in *S. epidermidis* / *S. aureus*. Pfeile: Induktion; Linien mit Querbalken: Repression. Durchgezogene Linie: direkte Regulation; gestrichelte Linie: indirekte Regulation. Grau hinterlegt: Repressor der Biofilmbildung; schwarzer Rahmen: Aktivator der Biofilmbildung. (Fournier und Hooper, 2000; Beenken *et al.*, 2003; Valle *et al.*, 2003; Conlon *et al.*, 2004; Knobloch *et al.*, 2004; Toledo-Arana *et al.*, 2005; Tormo *et al.*, 2005; Trottonda *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2006; Pamp *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006)

Deletion von *rsbU*, dem positiven Regulator von SigB, führt in *S. epidermidis* zu einem biofilmnegativen Phänotyp in TSB und TSB + 4 % NaCl (Knobloch *et al.*, 2004). Mutationen in *rsbU* können auch spontan entstehen, z.B. durch Insertion von IS256. In diesen Spontanmutanten kann die Biofilmbildung nur durch Ethanol, aber nicht durch Salz induziert werden, die Expression des *ica* Operons und PIA-Synthese sind reduziert (Conlon *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ethanol eine SigB-unabhängige Induktion der Biofilmbildung verursacht. Der verantwortliche Regulator konnte bislang jedoch nicht identifiziert werden. NaCl beeinflusst die Biofilmbildung hingegen eindeutig über einen SigB-abhängigen Regulationsweg. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Regulation des proteinogenen Biofilms zeigen ein ähnliches Verhalten in PV A und PV C: Biofilmbildung wird durch Ethanol induziert, durch Salz hingegen reprimiert. Dies deutet darauf hin, dass der proteinogene Biofilm nicht über SigB induziert wird, sondern vermutlich über einen anderen Regulationsweg.

Ein weiterer, essentieller positiver Regulator der Biofilmbildung in *S. epidermidis* und *S. aureus* ist SarA (Valle *et al.*, 2003; Tormo *et al.*, 2005). SarA bindet im Promotorbereich von *icaA* und beeinflusst außerdem in *S. aureus* die Expression von ca. 100 weiteren Genen, darunter vielen Virulenzfaktoren (Dunman *et al.*, 2001). Wie bereits für *rsbU* beschrieben, können SarA-defiziente, biofilmnegative Varianten von *S. epidermidis* durch spontane Insertion von IS256 in *sarA* entstehen (Conlon *et al.*, 2004). Zusatz von NaCl oder Ethanol zum Medium aktivierte die *ica*-Expression in einer *sarA::IS256* Variante, allerdings führte lediglich Ethanol zu einer verstärkten Biofilmbildung. In Hinblick auf die in dieser Arbeit beobachtete Induktion des Proteinbiofilms durch Ethanol könnte das bedeuten, dass andere, PIA-unabhängige Mechanismen zu einer verstärkten Biofilmbildung in der *sarA::IS256* Variante beitragen, die über einen anderen Regulator als SigB und SarA aktiviert werden.

Auch das Zwei-Komponenten-System ArlRS beeinflusst die Biofilmbildung in *S. aureus*. So zeigten Toledo-Arana *et al.* (2005), dass ArlRS-defiziente Mutanten einen PIA-unabhängigen Biofilm entwickeln. Die Mutanten wiesen sowohl eine erhöhte primäre Adhärenz als auch eine erhöhte PIA-Expression auf; die Akkumulation des Biofilms war jedoch unabhängig von der PIA-Expression. ArlRS beeinflusst in *S. aureus* die Expression von ca. 114 Genen (Liang *et al.*, 2005). Besonders auffällig ist die Repression extrazellulärer Proteasen in ArlRS-defizienten Mutanten (Fournier und Hooper, 2000). Diese Repression könnte zu einer Akkumulation von zellwandassoziierten Proteinen führen, was eventuell die primäre Adhärenz und die interzelluläre Adhäsion verstärken würde. Zur Funktion dieses Zwei-Komponenten-Systems in *S. epidermidis* liegen bislang keine Untersuchungen vor. Es wäre aber denkbar, dass eine veränderte Expression von ArlRS in PV A und PV C zur Bildung eines PIA-unabhängigen Biofilm führt. Diese Vermutung bedarf jedoch experimenteller Überprüfung. Auch der Einfluss von Agr, LuxS und Spx auf die Biofilmbildung insgesamt sollte noch detaillierter untersucht werden.

Die starke Repression der Biofilmbildung durch Salz in PV A und PV C lässt sich nach dem aktuellen Kenntnisstand nicht klar einordnen. In vielen *Staphylococcus*-Spezies hat Salz einen positiven Effekt auf die Biofilmbildung (Moretro *et al.*, 2003). Osmotischer Stress durch Salzzugabe kann dabei nicht nur als Stimulus für bestimmte Regulatoren dienen, sondern auch direkten Einfluss durch die Maskierung von Oberflächenladungen ausüben. Wenn die interzelluläre Adhäsion oder die primäre Adhäsion auf Interaktionen

geladener Moleküle beruhen, könnten diese Prozesse durch Salz eingeschränkt werden. Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ist dies jedoch unwahrscheinlich, da der proteinogene Biofilm nur an hydrophoben und nicht an hydrophilen Oberflächen (wie z.B. Glas) beobachtet wurde. Vielmehr erscheint die Rolle von osmotischem Stress als Stimulus eines bisher unbekanntem Regulators wahrscheinlicher. Ein interessanter Kandidat ist hier der Regulator Rbf aus *S. aureus*, ein Transkriptionsregulator aus der AraC/XylS-Familie, von dem auch ein Homolog in *S. epidermidis* existiert. Kürzlich wurde demonstriert, dass Inaktivierung von *rbf* in *S. aureus* zu einem biofilmnegativen Phänotyp führt, der nicht auf reduzierter Expression von PIA beruht (Lim *et al.*, 2004). Weiterhin wurde in selbiger Arbeit gezeigt, dass Rbf die Biofilmbildung in Abhängigkeit von Glukose und Salz (1,6 % bis 5,6 %) induziert, jedoch nicht in Abhängigkeit von Ethanol. Im Rbf-defizienten Stamm war die Expression eines 190 kDa Proteins reprimiert. Bei diesem Protein handelt es sich vermutlich um Aap. Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf einen neuen Regulationsweg hin, der besondere Bedeutung für die Ausbildung des proteinogenen Biofilms haben könnte. Die vorliegenden Daten beziehen sich jedoch nur auf *S. aureus*. Zur Regulation der an der Biofilmbildung beteiligten Proteine in *S. epidermidis*, speziell Aap, liegen zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine veröffentlichten Daten vor.

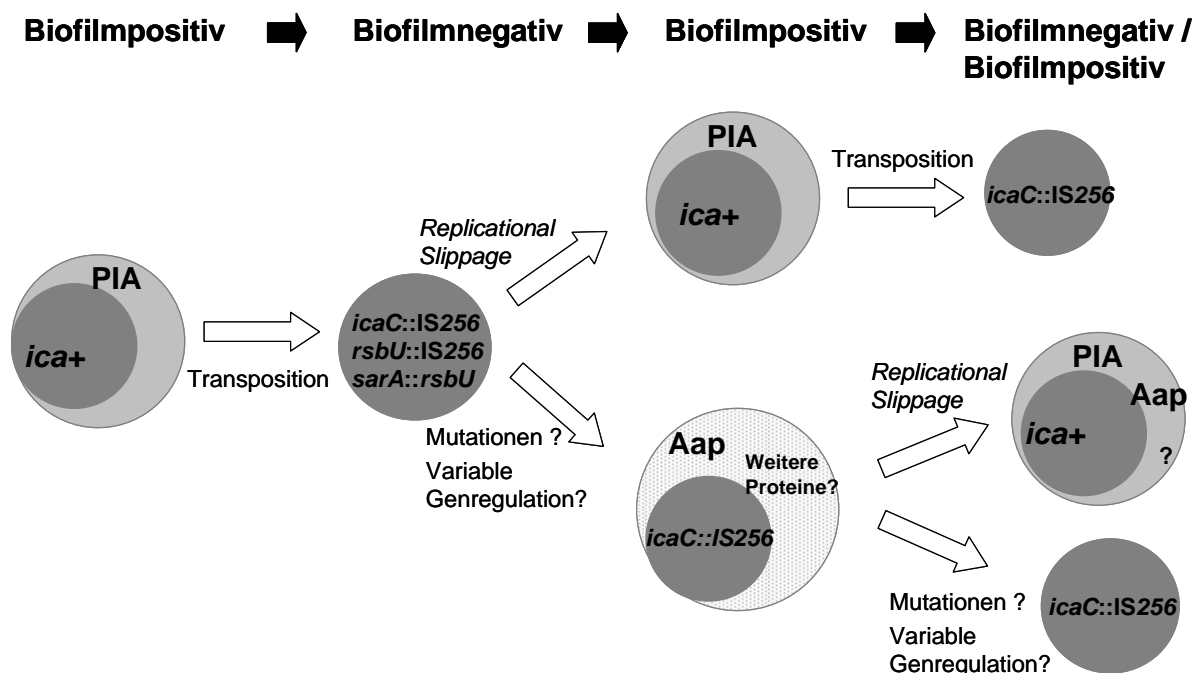


Abb. 6.3: Modell der Phasenvariation der Biofilmbildung von *S. epidermidis*.

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass die Expression von Aap im proteinogenen Biofilm von *S. epidermidis* CSF41498-1/PV verstärkt wird. Die Beteiligung weiterer Proteine an der Biofilmbildung konnte nicht nachgewiesen werden, wird aber vermutet. Transkriptomanalysen (Vergleich CSF41498 WT vs. PV bzw. CSF41498-1 vs. PV) könnten hier Hinweise auf weitere Komponenten und eventuell auch auf beteiligte Regulatoren geben.

Phasenvarianten, die proteinogene Biofilme ausbildeten, entstanden in den durchgeführten Versuchen zur präzisen Exzision von IS256 aus *icaC* spontan und mit großer Häufigkeit. Das Modell zur Phasenvariation der Biofilmbildung bedarf deshalb einer Erweiterung (Abb. 6.3). So können biofilmmegative IS256-Insertionsmutanten einerseits durch präzise Exzision via *replicational slippage* zu einem biofilmpositiven Phänotyp revertieren. Dies ist jedoch ein seltenes Ereignis mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 10^{-11} pro Generation und Zelle. Der überwiegende Anteil der Phasenvarianten entsteht durch einen *switch* zu proteinogenem Biofilm, dessen zugrunde liegender molekularer Mechanismus noch aufzuklären ist. Durch präzise Exzision von IS256 können diese Phasenvarianten ebenfalls die Fähigkeit zur PIA-Synthese zurückerlangen. Durch weitere Insertionsereignisse können andererseits neue, biofilmmegative Varianten entstehen.

6.3. Charakterisierung der IS256 Transposase

Seit Beginn der Genomsequenzierungsprojekte Anfang der neunziger Jahre ist die Zahl der bekannten transposablen Elemente sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten rasant gewachsen. Allein die Anzahl analysierter bakterieller Insertionssequenzen (IS) stieg in nur zehn Jahren von ca. 50 auf über 600 an (Mahillon und Chandler, 1998). Die außerordentliche Verbreitung und Diversität transposabler Elemente in allen Phyla des Lebens weist darauf hin, dass es sich hierbei nicht nur um für die Organismen selbst wertlose „*selfish elements*“ handelt, sondern dass transposable Elemente als Triebkräfte der Evolution einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung und Anpassung der Arten geleistet haben. So haben transposable Elemente unter anderem zur Entwicklung tausender humaner Proteine beigetragen (Britten, 2006). In diesem Zusammenhang gewinnt die Frage nach den molekularen Mechanismen der Transposition zunehmend an Bedeutung. Bakterielle IS-Elemente stellen dabei einen vergleichsweise einfachen Typ dar, aber schon hier

existieren differenzierte Wege des Strangtransfers, der Auflösung von Transpositionsintermediaten etc.

IS256 ist namensgebend für eine Gruppe von IS-Elementen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit bezüglich ihrer genetischen Organisation (Anordnung der Leserahmen), ihrer Transposasen, der terminalen IRs sowie der entstehenden *Target site* Duplikationen als IS256 Familie zusammengefasst werden. Obwohl sie mit bisher 56 bekannten IS-Elementen aus einer Vielzahl von Bakterienarten zur Zeit die viertgrößte IS-Familie darstellt, ist über den Transpositionsmechanismus innerhalb dieser Familie bisher wenig bekannt (Mahillon und Chandler, 1998). Erwähnenswert ist die Zugehörigkeit eines eukaryotischen Homologs, des autonomen Mutator-Elementes MuDR aus *Zea mays*, zur IS256 Familie (Eisen *et al.*, 1994). Das Insertionselement IS256 aus Enterokokken und Staphylokokken transponiert über einen im Detail noch ungeklärten Mechanismus via ein zirkuläres extrachromosomales Intermediat (Loessner *et al.*, 2002). Um zum Verständnis des Transpositionsmechanismus von IS256 beizutragen, wurden in dieser Arbeit die ersten Schritte der Transposition, DNA-Erkennung und -bindung, näher untersucht.

Der spezifische Kontakt zwischen der Transposase und den Enden ihres mobilen Elementes ist eine elementare Voraussetzung für die nachfolgende Transpositionsreaktion (Derbyshire *et al.*, 1987). Den meisten bislang untersuchten DDE-Transposasen ist eine ähnliche Domänenstruktur gemeinsam: Die katalytische Domäne befindet sich im C-Terminus und die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität im N-Terminus. Die Ursache für diese Anordnung könnte die direkte Interaktion des neusynthetisierten Proteins mit seiner Zielsequenz sein, so dass Expression und Aktivität direkt gekoppelt werden (Mahillon und Chandler, 1998). Diese Hypothese wird durch Daten unterstützt, die eine Inhibition der N-terminalen DNA-Bindung durch die Anwesenheit des C-Terminus beschreiben, z.B. in IS50 und IS10 (Jain und Kleckner, 1993; Weinreich *et al.*, 1994). Dabei scheint der C-Terminus die DNA-bindende Domäne zu verdecken. Dies könnte die beobachtete höhere Aktivität einiger Transposasen *in cis* erklären.

Transposasen binden DNA vermutlich zumeist als Multimere (Haren *et al.*, 1999). So wurde z.B. für IS911 ein Leucin-Zipper als Oligomerisierungsmotiv identifiziert (Haren *et al.*, 2000). Auch die Tn5 Transposase (Abb. 6.4), neben der Mu Transposase die einzige

Transposase mit aufgeklärter Tertiärstruktur, bindet als Dimer an ihre DNA-Erkennungssequenz (Steiniger-White *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2005).



Abb. 6.4: Kristallstruktur der Tn5 Transposase als Dimer im postsynaptischen Komplex mit DNA. Die N-terminale DNA-Bindungsdomäne ist gelb dargestellt, die katalytische Domäne grün, und die für Protein-Protein-Interaktionen verantwortliche C-terminale Domäne in hellblau. Aus Steiniger-White *et al.*, 2004.

Dem experimentellen Teil ging zunächst eine *in silico* Analyse der IS256 Transposase (Tnp) voraus. Das DDE-Motiv der katalytischen Domäne befindet sich wie bei den meisten untersuchten Transposasen in der C-terminalen Hälfte des Proteins. Weiterhin wurden einige innerhalb der IS256 Familie konservierte Aminosäurereste in der katalytischen Domäne identifiziert. Neben einer Sekundärstrukturvorhersage wurde vor allem nach potentiellen DNA-Bindungsmotiven, wie *Helix-turn-helix*, Leucin-Zipper oder Zinkfinger, gesucht. Solche Motive sind für andere IS-Elemente bereits beschrieben worden und wurden nicht selten mittels spezieller Suchalgorithmen vorhergesagt. Besonders häufig tritt ein *Helix-turn-helix*-Motiv im Zentrum der DNA-Bindungsdomäne sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Elementen auf (Haren *et al.*, 1999), so z.B. bei IS911, Tn7, IS30 und IS1 (Flores *et al.*, 1990; Nagy *et al.*, 2004; Rousseau *et al.*, 2004; Ton-Hoang *et al.*, 2004). Für die IS256 Transposase konnte jedoch mittels Sequenzanalyse kein solches Motiv identifiziert werden, auch nicht für 15 andere Mitglieder der IS256 Familie. Weitere Erkenntnisse über die DNA-Bindung durch IS256 Transposase mussten also durch einen experimentellen Ansatz gewonnen werden.

Zunächst wurde die IS256 Transposase als Fusionsprotein mit einem *Calmodulin-binding-tag* (CBP) heterolog exprimiert und anschließend gereinigt. Die Proteaseschnittstelle am N-terminalen *tag* erwies sich dabei als räumlich unzugänglich, da sich der *tag* nicht effektiv abspalten ließ, unabhängig von der verwendeten Protease. Diese Beobachtung

macht es zugleich unwahrscheinlich, dass sich das DNA-Erkennungsmotiv selbst am äußersten N-Terminus befindet: Die DNA-Bindungsdomäne muss mit der DNA interagieren und kann deshalb nicht im Inneren des Proteins verborgen liegen. Mittels eines Zwei-Plasmid-Systems wurde *in vivo* die Aktivität des CBP-Tnp Fusionsproteins getestet. Das Protein war funktional, da es nach Induktion der Proteinexpression zur Bildung extrachromosomaler IS256-Zirkel kam. Folglich kann ausgeschlossen werden, dass die Fusion mit dem N-terminalen *tag* eine drastische Konformationsänderung bewirkte, die zu einem Funktionsverlust geführt hätte.

Die spezifische Bindung der CBP-Transposase an die *inverted repeats* konnte durch EMSA Experimente mit IR_L und IR_R enthaltenden Sequenzen nachgewiesen werden. Die Bindung an IR_R erfolgte ab Zugabe von 200 nM CBP-Transposase. Vergleicht man die benötigte Konzentration mit anderen DNA-bindenden Proteinen, erscheint diese zunächst relativ hoch. So ist beispielsweise die spezifische Bindung von gereinigtem SarR an DNA bei Konzentrationen ab 20 nM nachweisbar (Manna und Cheung, 2006). Allerdings sind die in Gelshiftexperimenten eingesetzten Proteinkonzentrationen anderer Transposasen im Vergleich zur IS256 Transposase z.T. ähnlich: So bindet gereinigte IS1 Transposase ab ca. 180 nM (Ton-Hoang *et al.*, 2004), OrfAB von IS911 schon ab 110 nM (Haren *et al.*, 1998). Dieses Phänomen wird unter anderem damit begründet, dass die Evolution von Transposasen- im Gegensatz zu anderen Proteinen- nicht auf eine möglichst hohe Aktivität abzielt, da dies das Überleben des „Wirts“ und damit des transposablen Elements selbst gefährden würde (Reznikoff, 2003). Somit sind Transposasen *per se* relativ inaktive Proteine. Zieht man zusätzlich in Betracht, dass die Aktivität der IS256 CBP-Transposase durch den Reinigungsprozess oder die Anwesenheit des CBP-tags vermindert sein kann, liegen die eingesetzten Proteinkonzentrationen in einem angemessenen Bereich.

Interessanterweise unterschieden sich die für den Nachweis der Bindung benötigten Proteinkonzentrationen zwischen IR_L und IR_R. Zur Bindung des IR_L waren mindestens 400 nM CBP-Transposase erforderlich. Vorhergehende Sequenzanalysen der *circle junctions* von IS256-Zirkeln zeigten, dass der Angriff des gegenüberliegenden IS-Endes sowohl von IR_L als auch von IR_R ausgehen kann (Loessner *et al.*, 2002). In der Dissertation von I. Loessner (2002) wurden die *circle junctions* sowohl vollständiger IS256-Zirkel als auch verkürzter Varianten aus *E. coli* sowie *S. aureus* und *S. epidermidis* sequenziert, wobei insgesamt fünfmal IR_R den IR_L attackierte, während es sich dreimal umgekehrt verhielt;

einmal war die Zuordnung nicht möglich. Im Gegensatz dazu postulierten Prudhomme *et al.* (2002), dass stets IR_L den IR_R attackiert. Die Anzahl der analysierten *circle junctions* war jedoch mit n = 5 sehr niedrig. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass in der zitierten Arbeit ein artifizielles Plasmidsystem in *E. coli* genutzt wurde, das nicht einer natürlichen IS256-Insertion, wie bei I. Loessner (2002) verwendet, entspricht. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen *in vitro* Daten belegen klar, dass die IS256 CBP-Transposase an beide *inverted repeats* binden kann, aber offensichtlich eine leichte Präferenz für IR_R besitzt. Ob sich diese Präferenz in einem häufigeren Angriff des IR_L durch den IR_R *in vivo* niederschlägt, wäre durch weitere Sequenzierungen von *circle junctions* und statistische Analyse der Ergebnisse zu überprüfen.

Um die Bindungsstelle der IS256 Transposase an den *inverted repeats* näher einzugrenzen, wurden spezifische Deletionen in IR_L und IR_R eingeführt (Abb 6.5). Dabei wurden zunächst die terminalen 2 bp deletiert, die sich zwischen IR_L und IR_R unterscheiden. Dieser Sequenzunterschied ist ein Charakteristikum von IS256 und stellt eine Ausnahme unter IS-Elementen dar, da zumeist die zwei oder drei distalen Basenpaare in beiden *inverted repeats* identisch sind (Siguier *et al.*, 2006). Die Deletion der terminalen Basenpaare hatte weder bei IR_L noch bei IR_R Einfluss auf die Bindung der IS256 CBP-Transposase. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass die IS256 Transposase nicht am äußersten Terminus des IS-Elementes bindet. Auch in Bindungsstudien anderer Transposasen, wie z.B. für Tn5 oder IS911, wurde demonstriert, dass die Bindung der Transposase an die DNA im inneren Teil der *inverted repeats* erfolgt, während die proximalen Basenpaare für die nachfolgende Strangtransferreaktion von Bedeutung sind (Zhou und Reznikoff, 1997; Normand *et al.*, 2001).



Abb. 6.5: Schematische Darstellung der *inverted repeats*. Dunkle Kästchen zeigen für die Transposasebindung erforderliche Nulkeotide, helle Kästchen für die Bindung notwendige Nukleotide.

Da die Transposase sowohl an IR_L als auch IR_R band, wurde vermutet, dass die in beiden *inverted repeats* identischen Basenpaare eine Rolle bei der DNA-Erkennung und –Bindung spielen. Die innere Sequenz von IR_L und IR_R lässt sich in zwei Regionen untergliedern, die

in beiden *inverted repeats* identisch sind. In diese Regionen wurden wiederum Deletionen von 3 bis 9 bp eingefügt und das Bindungsvermögen der CBP-Transposase getestet (vgl. Abb.5.26-5.29). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Deletion von 6 bp im äußeren der beiden identischen Bereiche die Bindung der Transposase fast vollständig verhinderte. Aber auch die Deletion in der inneren identischen Region von IR_L und IR_R verminderte die Transposase-Bindung, hob sie jedoch nicht vollständig auf. Bemerkenswert ist hierbei, dass eine Deletion von 9 bp in IR_R keinen stärkeren Einfluss auf die Bindung hatte als die Deletion von 3 bp in IR_L. Die Resultate sind ein erster Hinweis darauf, dass auch die IS256 Transposase spezifische DNA-Sequenzen im inneren Bereich der *inverted repeats* erkennt. Die beiden konservierten Bereiche innerhalb des *inverted repeats* sind in ihrer Sequenz nicht identisch und sind durch einen variablen DNA-Bereich von 7 nt getrennt. Tn5 Transposase bindet an bp 6-9 sowie bp 13-19 innerhalb der 19 bp langen *inverted repeats* (Jilk *et al.*, 1996). IS911 Transposase bindet in einem Abstand von 14 bp zum Terminus des IS-Elements über einen Bereich von ca. 23 – 31 bp (Normand *et al.*, 2001). Auch die IS256-Transposase scheint diesem Schema zu folgen. Um die Bindungsstelle genauer zu charakterisieren, wären jedoch weiterführende biochemische Experimente wie z.B. *DNaseI-protection assays* bzw. *Footprints* nötig. Da jede Technik in ihrer Aussagekraft bestimmte Limitationen aufweist, wäre eine Kombination mehrerer experimenteller Ansätze, u.a. das Einbringen weiterer gezielter Punktmutationen im Bereich der *inverted repeats*, sinnvoll.

Wie bereits erwähnt, bildet IS256 *in vivo* extrachromosomale Zirkel, in denen die Enden des IS-Elementes häufig durch eine Brücke von wenigen Nukleotiden benachbarter Sequenz verbunden sind (Loessner, 2002) (Abb. 6.6). Die Zirkel besitzen keinen *origin of replication* und würden so während der Zellteilung allmählich verloren gehen. Um im Genom erhalten zu bleiben, müssen sie erneut ins Chromosom integrieren. Diese Integration wurde bereits für IS911 demonstriert (Ton-Hoang *et al.*, 1998; Ton-Hoang *et al.*, 1999). Die Zirkel stellen danach ein Transpositionsintermediat dar, das relinearisiert und wieder an neuer Stelle integriert werden kann. Der Transpositionsmechanismus wird hier als „*Copy and paste*“ bezeichnet, eine Synthese aus „*Cut and paste*“ (konservativ) und „*Copy*“ (replikativ) (Duval-Valentin *et al.*, 2004). Auch andere Elemente der IS3-Familie scheinen via extrachromosomale Zirkel zu transponieren (Mahillon und Chandler, 1998). Die Rolle der IS-Zirkel für die Transposition von IS256 ist noch ungeklärt. Es lässt sich jedoch vermuten, dass sie ebenso wie in der IS3-Familie als Intermediate der Transposition

dienen. Im Falle einer Transposase-abhängigen Reaktion wäre hierbei der erste Schritt wiederum die Bindung an die *inverted repeats* innerhalb des Zirkels, gefolgt von Strangprozessierung und Strangtransfer.

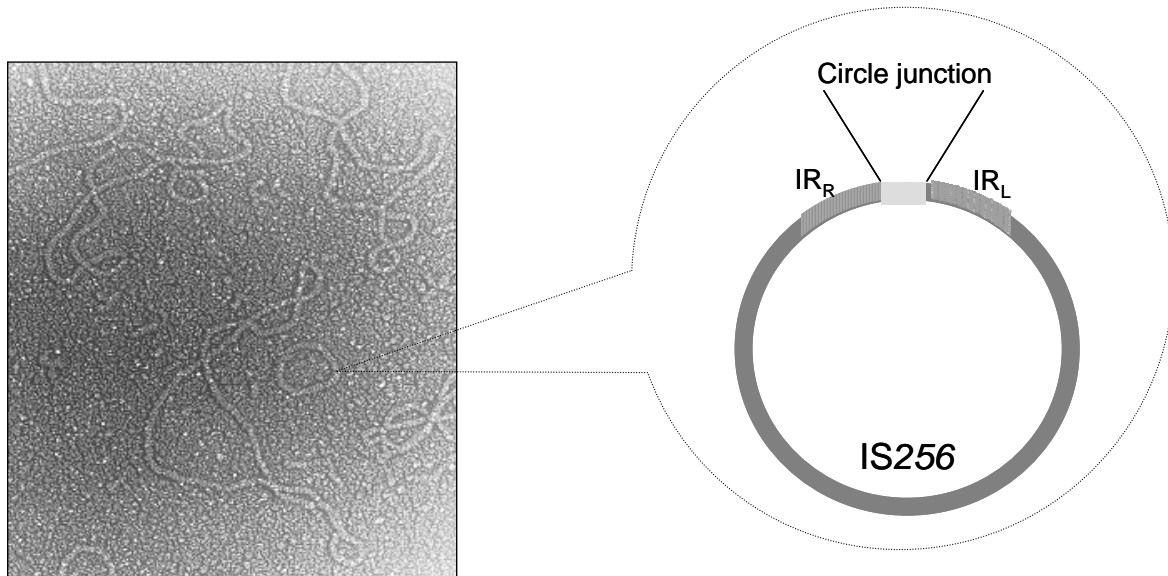


Abb. 6.6: Zirkuläre Intermediate von IS256. Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Donorplasmide (9,3 kb) sowie ein zirkuläres Intermediat (ca. 1,3 kb) (unveröffentlichte Daten). Rechts ist die Struktur eines IS256 Zirkels schematisch dargestellt.

In dieser Arbeit wurde mittels *Atomic force* Mikroskopie die Bindung der IS256 CBP-Transposase an die *inverted repeats*, verbunden durch die *circle junction*, untersucht. Diese Technik bietet den Vorteil, dass man die Bindungsstelle an der DNA direkt visualisieren kann. So lässt sich zwischen unspezifischen Bindungen an die DNA-Enden und spezifischen Bindungen direkt unterscheiden. Ein Nachteil der *Atomic force* Mikroskopie ist der hohe zeitliche Aufwand der Bildaufnahme und die empirische Bestimmung geeigneter Protein- und DNA-Konzentrationen, was die Anzahl der auswertbaren Aufnahmen limitierte.

Als DNA-Substrat diente ein lineares, die *circle junction* sowie die benachbarten *inverted repeats* enthaltendes PCR-Fragment, das mit und ohne Zusatz von CBP-Transposase analysiert wurde. In ultrareinem Wasser entsprach die gemessene Länge ungebundener DNA-Fragmente mit 129 ± 7 nm annähernd der berechneten theoretischen Länge ($341 \text{ bp} \times 0,34 \text{ nm / bp} = 116 \text{ nm}$). In *Binding buffer* waren die DNA-Fragmente etwas kompakter. Dies ist auf die im Puffer enthaltenen Salze zurückzuführen, da mit steigender Salzkonzentration auch bei linearer DNA eine Formation ähnlich zum *supercoiling* von *covalently closed circular* DNA entstehen kann (Vollenweider *et al.*, 1976). Von CBP-

Transposase gebundene DNA erwies sich als nochmals deutlich kompakter. Dieser Umstand könnte auf einer Konformationsänderung durch die Transposasebindung beruhen. Auffällig war darüber hinaus, dass gebundene DNA-Stränge häufiger in einer gekrümmten Form vorlagen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die IS256 Transposase ähnlich wie die Tn5 Transposase (Jilk *et al.*, 1996) bei ihrer Bindung eine Krümmung des DNA-Moleküls bewirken könnte. Diese Eigenschaft könnte damit eine wichtige Rolle beim nachfolgenden Strangtransfer spielen, da hier beide IS-Enden in räumliche Nähe zueinander gebracht werden müssen.

Die Bindungsstelle der CBP-Transposase war variabel. Eine Bindung an die äußersten Enden des DNA-Strangs erfolgte häufiger als in der Mitte des Moleküls. Da es technisch schwierig ist, in AFM-Experimenten unspezifische Kompetitor-DNA einzusetzen (die DNA könnte visuell nicht ohne weiteres von der spezifischen DNA unterschieden werden), könnte die Bindung an die Enden der DNA-Fragmente mit derartigen unspezifischen Mechanismen erklärt werden. Diese unspezifische Endbindung wurde bereits für andere DNA-bindende Proteine mit *Atomic force* Mikroskopie demonstriert, beispielsweise für MutS (Yang *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde kürzlich unspezifische DNA-Bindung und deren Effekt auf die Lokalisierung der spezifischen Zielsequenzen durch die Tn5 Transposase näher charakterisiert (Steiniger *et al.*, 2006).

Aus der Positionsbestimmung der inneren Bindungsstelle wurde eine rechtsschiefe Verteilung mit einem Median um 58 nm / 221 bp ermittelt. Der Median entsprach somit einer Bindungsstelle im Bereich des IR_R. Insgesamt lagen ca. 50 % aller Messwerte im Bereich von IR_L bzw. IR_R. Damit konnte gezeigt werden, dass die IS256 Transposase auch innerhalb der Struktur von *circle junctions* die *inverted repeats* erkennen und binden kann. Bei der Interpretation der Daten muss jedoch die Messgenauigkeit berücksichtigt werden, die bei ungebundener DNA zu einer Standardabweichung von ca. 10 % führte. Eine genauere Eingrenzung der bevorzugten Bindungsstelle ließ sich deshalb aus den hier gewonnenen Ergebnissen nicht ableiten. Von Interesse wäre neben der Bindungsstelle auch die Bindungsform von CBP-Transposase als Monomer, Dimer oder Oligomer. Die Arbeit an der unteren Auflösungsgrenze des AFM brachte allerdings Unschärfen und daraus resultierende Messungenauigkeiten mit sich, so dass zu diesem Punkt keine zuverlässigen Aussagen getroffen werden konnten.

Ein Schwerpunkt der *in vitro* Studien mit gereinigter IS256 CBP-Transposase lag auf der Charakterisierung der DNA-Bindungsdomäne. Da auf bioinformatischem Weg kein DNA-Bindungsmotiv vorhergesagt werden konnte, wurde zuerst durch EMSA Experimente mit überlappenden Transposasefragmenten die Position der Bindungsdomäne eingegrenzt. Während das C-terminale Ende (Aa 200-390) umfassende Transposasederivat nicht mehr an die DNA binden konnte, wurde für die beiden N-terminalen Fragmente (Aa 1-130 sowie Aa 100-230) eine Bindung demonstriert. Diese Beobachtung ist durch zwei Hypothesen zu erklären: (a) Das Bindungsmotiv liegt genau im überlappenden Bereich zwischen Aa 100-130 oder (b) es existieren mehrere DNA-Bindungsdomänen, von denen sich mindestens eine auf Derivat 1 und mindestens eine auf Derivat 2 befindet.

In dieser Arbeit wurde die erste Hypothese (ein DNA-Bindungsmotiv befindet sich zwischen Aa 100 und 130) geprüft und der beiden Derivaten gemeinsame Bereich näher analysiert. Aminosäure 100 bis 127 bilden laut Sekundärstrukturvorhersage zwei α -Helices, α_3 und α_4 , getrennt durch einen kurzen *linker* von drei Aminosäuren (vergleiche Abb. 5.19). Auffällig sind die unterschiedlichen Eigenschaften der Helices: Während der pI der N-terminalen Helix schwach sauer ist und der GRAVY-Index im hydrophoben Bereich liegt, weist die carboxyterminale Helix einen basischen pI auf und ist hydrophil. Diese Merkmale erinnern stark an die Eigenschaften von *Helix-turn-helix* (HTH) Motiven, dem wohl meist verbreiteten DNA-Bindungsmotiv bei Prokaryoten (Huffman und Brennan, 2002). Bei diesem Motiv kann man die C-terminale so genannte Erkennungshelix, die spezifisch in der großen Furche der DNA bindet und deshalb hydrophilen Charakter gepaart mit einem basischen pI hat, von der N-terminalen Helix unterscheiden, die stabilisierend auf die DNA-Bindung wirkt und eher hydrophob ist. Die beiden Helices werden durch einen scharfen *turn* voneinander getrennt, so dass sie einen Winkel von 120° bilden. Normalerweise wird eine dritte N-terminale Helix zur Stabilisierung des Motivs benötigt (Aravind *et al.*, 2005).

Ausgehend von Sequenz- und Strukturvergleichen bekannter HTH-Motive wurden folgende Charakteristika des Motivs definiert (Brennan und Matthews, 1989):

1. Aa 9 sollte Glycin sein. Diese Aminosäure befindet sich im *turn*.
2. Aa 4 und 15 sollten ungeladen sein, da sie sich im inneren, nicht exponierten Teil der Helices befinden.

3. Aa 3 bis 8 sowie 15 bis 20 sollten kein Prolin sein, da es sich um α -helikale Bereiche handelt.
4. Aa 5 sollte nicht β -verzweigt sein, da sie zwischen den zwei Helices „eingeklemmt“ ist.

Aa 106 bis 127 der IS256 Transposase erfüllen alle genannten Kriterien bis auf eines – an Position 4 befindet sich ein Glutamatrest. Abweichungen an einzelnen Positionen sind jedoch nicht ungewöhnlich (Brennan und Matthews, 1989). So wird auch im beschriebenen HTH1-Motiv der IS30 Transposase Position 4 von einem Glutamatrest eingenommen (Nagy *et al.*, 2004). Auch CysB, ein HTH-Transkriptionsregulator aus *E. coli*, besitzt beispielsweise statt des Glycins an Position 9 im *turn* die aromatische Aminosäure Tyrosin, gefolgt von der polaren Aminosäure Threonin (Lochowska *et al.*, 2004), was im Widerspruch zu dem aus Strukturanalysen postulierten „shs“-Muster des *turns* („*small-hydrophob-small*“) steht (Aravind *et al.*, 2005). Der *turn* zwischen den beiden Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ der IS256 Transposase, Glycin-Valin-Serin, erfüllt diese Prämisse hingegen perfekt. Er gehört damit zur Gruppe der α GBB α -*turns* (Wintjens und Rooman, 1996).

Der Sequenzvergleich mit 14 weiteren Transposasen der IS256 Familie zeigte, dass die vorhergesagte Sekundärstruktur dieser Region konserviert ist, wobei stets die N-terminale Helix hydrophobe und die C-terminale hydrophile Eigenschaften aufwies. Darüber hinaus wurden mehrere konservierte Reste identifiziert. Unter der Annahme, dass diesen Aminosäureresten besondere Bedeutung für die Struktur des potentiellen DNA-Bindungsmotivs zukommt, wurden sechs Aminosäureaustausch-Mutationen vorgenommen. So wurden Leucin103 und Leucin127, beide stark konserviert und jeweils am äußeren Rand von $\alpha 3$ bzw. $\alpha 4$ gelegen, gegen Prolin ausgetauscht, das helixbrechende Eigenschaften hat. Anschließende EMSA Experimente mit den gereinigten CBP-Transposasederivaten zeigten jedoch, dass diese Mutationen keinen Einfluss auf die Bindung an die *inverted repeats* hatten. Somit befindet sich das eigentliche DNA-Bindemotiv vermutlich nicht im Bereich dieser Reste. Über die Rolle von Leucin103 und 127 für die Funktion der IS256 Transposase ist keine Aussage möglich.

Darüber hinaus wurde in $\alpha 3$ die polare, aromatische Aminosäure Tyrosin111 gegen das apolare Alanin ausgetauscht. Tyrosin111 war innerhalb der IS256 Familie hoch

konserviert. Der Austausch führte zu einem totalen Verlust des DNA-Bindungsvermögens, was auf eine wichtige Rolle dieses Aminosäurerestes innerhalb des DNA-Bindungsmotivs hinweist. Ähnliche Effekte wurden bereits für Mutationen in HTH-Motiven anderer Transposasen beschrieben. So wurde bei Aminosäureaustauschen in der N-terminalen Helix des potentiellen HTH-Motivs der *IS1* Transposase die DNA-Bindung ebenfalls vollständig aufgehoben (Ohta *et al.*, 2004; Ton-Hoang *et al.*, 2004). Gleiches gilt für einen Aminosäureaustausch in OrfAB von *IS911* (Rousseau *et al.*, 2004). Auch der Austausch des hoch konservierten Glycin114 im *turn* zwischen den Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ gegen das aromatische Tryptophan verhinderte die DNA-Bindung vollständig. Höchstwahrscheinlich wird durch die Mutation der Winkel zwischen den Helices so verändert, dass ein Funktionsverlust die Folge ist. Tyrosin111 und Glycin114 haben somit eine essentielle, wahrscheinlich strukturgebende Funktion für das DNA-Bindemotiv der *IS256* Transposase.

Schließlich wurden zwei ebenfalls hoch konservierte, polare Aminosäuren der potentiellen „Erkennungshelix“ $\alpha 4$, Threonin117 und Serin118, jeweils gegen das apolare Alanin ausgetauscht. Interessanterweise bewirkte dies keinen völligen Verlust des DNA-Bindungsvermögens. Stattdessen wurde die Bindung stark abgeschwächt und war erst ab Proteinkonzentrationen von 800 nM detektierbar. Die Laufhöhe des DNA-Proteinkomplexes veränderte sich dabei nicht. Dies weist darauf hin, dass die Struktur des potentiellen DNA-Bindungsmotivs durch diese Mutationen nicht vollständig aufgehoben wurde, sondern dass es vielmehr zu einer Destabilisierung der DNA-Bindung kam. Eine molekulare Ursache dafür könnten fehlende Wasserstoffbrücken zwischen der DNA und den polaren Aminosäureresten Threonin und Serin sein. Die für andere Transposasen beschriebenen Effekte von Mutationen in der Erkennungshelix sind vielfältig – sie können von einer Abschwächung der Bindung über eine Änderung des Bindungsmusters bis zum völligen Verlust des Bindungsvermögens reichen (Nagy *et al.*, 2004; Ohta *et al.*, 2004; Rousseau *et al.*, 2004). Die konservierten Reste 117 und 118 scheinen somit keine Schlüsselrolle in der DNA-Proteininteraktion zu spielen. Viel versprechende andere Kandidaten wären hierfür die basischen Aminosäurereste Lysin119 und Lysin121. Bei der DNA-Erkennung sind aber v.a. synergetische Effekte wichtig, da die Interaktion auf etwa 20 meistens sehr schwachen Bindungen (Wasserstoffbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen, Ionenbindungen) zwischen Protein und DNA basiert.

Die *in vitro* Experimente mit CBP-Transposasederivaten bestätigen die Bedeutung des N-Terminus und v.a. der Region Aa 104-126 für die DNA-Bindung. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird ein HTH-Motiv, bestehend aus $\alpha 3$ und $\alpha 4$, als DNA-Bindungsmotiv der IS256 Transposase postuliert. Andererseits bleiben noch Fragen offen, die weiterführender Untersuchungen bedürften:

- a) Wo liegen die genauen Grenzen des postulierten HTH-Motivs und welche Funktion haben die konservierten Reste Leucin103 und Leucin127?
- b) Welche weiteren strukturellen Elemente sind an der DNA-Bindung beteiligt? – So fehlt laut Sekundärstrukturvorhersage bei der IS256 Transposase die schon erwähnte dritte N-terminale Helix, die in anderen HTH-Motiven strukturstabilisierend wirkt (Aravind *et al.*, 2005). Stattdessen befinden sich in diesem Bereich 3 kurze β -Faltblätter.
- c) Existiert eventuell noch mindestens ein weiteres DNA-Bindungsmotive? Dies könnte durch EMSA-Studien mit weiteren verkürzten Transposasederivaten untersucht werden. Die Beobachtung, dass sich bei einem Aminosäureaustausch zwischen Aa 104 und 126 der IS256 Transposase das Bindungsmuster nicht ändert, sondern – je nach Mutation - das Bindungsvermögen vollständig verloren geht, macht weitere DNA-Bindungsmotive jedoch unwahrscheinlich. Andererseits besitzt beispielsweise die IS30 Transposase zwei HTH-Motive, von denen sich eines am äußersten N-Terminus, das andere hingegen zwischen Aa 77 und 97 befindet (Nagy *et al.*, 2004).
- d) Worauf beruht die mittels AFM detektierte unspezifische DNA-Bindung durch die IS256 Transposase?

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente mit gereinigter IS256 CBP-Transposase demonstrieren erstmals für ein prokaryotisches Mitglied der IS256 Familie die spezifische Bindung an die *inverted repeats*. Des Weiteren konnte die für die Erkennung notwendige DNA-Sequenz auf den inneren Bereich der IRs eingegrenzt werden und die Möglichkeit zur Bindung (und damit eventuell auch Prozessierung) an die IRs innerhalb der *circle junctions* nachgewiesen werden. Durch die nähere Charakterisierung eines DNA-Bindemotivs zwischen Aa 100 und 130 wurde ein HTH-Motiv als DNA-Erkennungsmotiv vorgeschlagen, das aufgrund von Sequenzvergleichen potentiell Bedeutung für weitere Elemente der IS256 Familie haben könnte. Ein nächster Schritt in der Analyse der IS256 Transposition wäre nun die Aufklärung der molekularen

Mechanismen von Strangprozessierung und -transfer unter Berücksichtigung beteiligter Wirtsenzyme.

6.4. Fazit und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu Struktur und Funktion der IS256 Transposase zeigen Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zu bisher charakterisierten bakteriellen Transposasen auf. Dabei kann ein besseres Verständnis des Transpositionsmechanismus von IS256 wesentlich dazu beitragen, die Funktionsweise dieser Insertionssequenz sowie des Transposons Tn4001 *in vivo* besser zu verstehen. Durch seine hohe Transpositionsaktivität spielt IS256 eine bedeutende Rolle für die genotypische und phänotypische Variabilität von Staphylokokken, vor allem bei klinischen Isolaten. Vermutlich erfasst die Beschreibung der durch IS256 verursachten Phasenvariation nur einen Bruchteil der durch Transposition im Genom entstehenden Veränderungen. Allerdings offenbart schon dieses Beispiel bei detaillierter Analyse eine große Komplexität, wobei sich Insertion bzw. Exzision von IS256, basierend auf unterschiedlichen molekularen Mechanismen, und der Wechsel zu einer alternativen Biofilmbildung gegenüberstehen. Der Wechsel zu einem Protein-vermittelten Biofilm widerlegt zudem das seit Jahren bestehende Dogma, dass Biofilmbildung in *S. epidermidis* vor allem von der Synthese von PIA abhängig ist. Darüber hinaus weist dieser Wechsel auf die Bedeutung des Biofilms als zentrale Überlebensstrategie für *S. epidermidis* hin.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Albertini, A. M., M. Hofer, M. P. Calos and J. H. Miller (1982).** "On the formation of spontaneous deletions: The importance of short sequence homologies in the generation of large deletions." *Cell* **29**(2): 319-328.
- Anderson, R. P. and J. R. Roth (1977).** "Tandem Genetic Duplications in Phage and Bacteria." *Annual Review of Microbiology* **31**(1): 473-505.
- Anderson, P. and J. Roth (1981).** "Spontaneous tandem genetic duplications in *Salmonella typhimurium* arise by unequal recombination between rRNA (rrn) cistrons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(5): 3113-7.
- Aravind, L., V. Anantharaman, S. Balaji, M. M. Babu and L. M. Iyer (2005).** "The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond." *FEMS Microbiology Reviews Bacterial Genomics* **29**(2): 231-262.
- Bateman, A., M. T. G. Holden and C. Yeats (2005).** "The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation." *Bioinformatics* **21**(8): 1301-1303.
- Beenken, K. E., J. S. Blevins and M. S. Smeltzer (2003).** "Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* Limits Biofilm Formation." *Infect. Immun.* **71**(7): 4206-4211.
- Bhasin, A., I. Y. Goryshin and W. S. Reznikoff (1999).** "Hairpin formation in Tn5 transposition." *J Biol Chem* **274**(52): 37021-9.
- Bi, X. and L. F. Liu (1994).** "recA-independent and recA-dependent Intramolecular Plasmid Recombination : Differential Homology Requirement and Distance Effect." *Journal of Molecular Biology* **235**(2): 414-423.
- Binnig, G., C. F. Quate, et al. (1986).** "Atomic force microscopy." *Phys. Rev. Lett.* **56**: 930-933.
- Bornberg-Bauer, E., E. Rivals and M. Vingron (1998).** "Computational Approaches to Identify Leucine Zippers." *Nucleic Acids Res* **26**(11): 2740-2746.
- Bowden, M. G., W. Chen, J. Singvall, Y. Xu, S. J. Peacock, V. Valtulina, P. Speziale and M. Hook (2005).** "Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*." *Microbiology* **151**(5): 1453-1464.
- Bowden, M. G., L. Visai, C. M. Longshaw, K. T. Holland, P. Speziale and M. Hook (2002).** "Is the GehD Lipase from *Staphylococcus epidermidis* a Collagen Binding Adhesin?." *J. Biol. Chem.* **277**(45): 43017-43023.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*(72): 248-54.
- Brennan, R. and B. Matthews (1989).** "The helix-turn-helix DNA binding motif." *J. Biol. Chem.* **264**(4): 1903-1906.
- Britten, R. (2006).** "Transposable elements have contributed to thousands of human proteins." *PNAS* **103**(6): 1798-1803.
- Brückner, R. (1997).** "Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*." *FEMS Microbiol Lett* **151**: 1-8.
- Byrne, M. E., D. A. Rouch and R. A. Skurray (1989).** "Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon *Tn4001*." *Gene* **81**(2): 361-367.
- Chedin, F., E. Dervyn, R. Dervyn, S. D. Ehrlich and P. Noirot (1994).** "Frequency of deletion formation decreases exponentially with distance between short direct repeats." *Mol Microbiol* **12**(4): 561-9.

- Chicurel, M. (2000).** "Bacterial biofilms and infections. Slimebusters." *Nature* **408**(6810): 284-6.
- Cho, S.-H., K. Naber, J. Hacker and W. Ziebuhr (2002).** "Detection of the *icaADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections." *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**(6): 570-575.
- Collins, J., G. Volckaert and P. Nevers (1982).** "Precise and nearly-precise excision of the symmetrical inverted repeats of Tn 5; common features of *recA*-independent deletion events in *Escherichia coli*." *Gene* **19**(1): 139-146.
- Conlon, K. M., H. Humphreys and J. P. O'Gara (2002).** "*icaR* Encodes a Transcriptional Repressor Involved in Environmental Regulation of *ica* Operon Expression and Biofilm Formation in *Staphylococcus epidermidis*." *J. Bacteriol.* **184**(16): 4400-4408.
- Conlon, K. M., H. Humphreys and J. P. O'Gara (2004).** "Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*." *J Bacteriol* **186**(18): 6208-19.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart and E. P. Greenberg (1999).** "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections." *Science* **284**(5418): 1318-22.
- Couto, I., S. W. Wu, A. Tomasz and H. de Lencastre (2003).** "Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue." *J Bacteriol* **185**(2): 645-53.
- Craig, N. L. (1996).** "Transposon Tn7." *Curr Top Microbiol Immunol* **204**: 27-48.
- Cramton, S. E., M. Ulrich, F. Gotz and G. Doring (2001).** "Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*." *Infect Immun* **69**(6): 4079-85.
- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa and J. R. Penades (2001).** "Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation." *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.
- Davis, S. L., S. Gurusiddappa, K. W. McCrea, S. Perkins and M. Hook (2001).** "SdrG, a fibrinogen-binding bacterial adhesin of the microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules subfamily from *Staphylococcus epidermidis*, targets the thrombin cleavage site in the Beta chain." *J Biol Chem* **276**(30): 27799-805.
- Deighton, M. and R. Borland (1993).** "Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation." *Infect Immun* **61**(10): 4473-9.
- Dempsey, L. A., A. C. Zhao and S. A. Khan (1995).** "Localization of the start sites of lagging-strand replication of rolling-circle plasmids from gram-positive bacteria." *Mol Microbiol* **15**(4): 679-87.
- Deplano, A., M. Vanechoutte, G. Verschraegen and M. Struelens (1997).** "Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms." *J. Clin. Microbiol.* **35**(10): 2580-2587.
- Derbyshire, K. M., L. Hwang and N. D. F. Grindley (1987).** "Genetic Analysis of the Interaction of the Insertion Sequence IS903 Transposase with Its Terminal Inverted Repeats." *PNAS* **84**(22): 8049-8053.
- Dianov, G. L., A. V. Kuzminov, A. V. Mazin and R. I. Salganik (1991).** "Molecular mechanisms of deletion formation in *Escherichia coli* plasmids." *Molecular Genetics and Genomics* **228**(1 - 2): 153-159.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel and J. Hacker (2004).** "Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms." *Nat Rev Micro* **2**(5): 414-424.
- Dodd, I. B. and J. B. Egan (1990).** "Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences." *Nucl. Acids Res.* **18**(17): 5019-5026.

- Dunman, P. M., E. Murphy, S. Haney, D. Palacios, G. Tucker-Kellogg, S. Wu, E. L. Brown, R. J. Zagursky, D. Shlaes and S. J. Projan (2001).** "Transcription Profiling-Based Identification of *Staphylococcus aureus* Genes Regulated by the agr and/or sarA Loci." *J. Bacteriol.* **183**(24): 7341-7353.
- Duval-Valentin, G., B. Marty-Cointin and M. Chandler (2004).** "Requirement of IS911 replication before integration defines a new bacterial transposition pathway." *Embo J* **23**(19): 3897-906.
- Ehrlich, S. D., H. Bierne, E. d'Alencon, D. Vilette, M. Petranovic, P. Noirot and B. Michel (1993).** "Mechanisms of illegitimate recombination." *Gene* **135**(1-2): 161-6.
- Eisen, J. A., M. I. Benito and V. Walbot (1994).** "Sequence similarity of putative transposases links the maize Mutator autonomous element and a group of bacterial insertion sequences." *Nucl. Acids Res.* **22**(13): 2634-2636.
- Farabaugh, P. J., U. Schmeissner, M. Hofer and J. H. Miller (1978).** "Genetic studies of the lac repressor , : VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the lacI gene of *Escherichia coli*." *Journal of Molecular Biology* **126**(4): 847-863.
- Flores, C., M. I. Qadri and C. Lichtenstein (1990).** "DNA sequence analysis of five genes; *tnsA*, *B*, *C*, *D* and *E*, required for Tn7 transposition." *Nucleic Acids Res* **18**(4): 901-11.
- Foster, T. J., V. Lundblad, S. Hanley-Way, S. M. Halling and N. Kleckner (1981).** "Three Tn10-associated excision events: Relationship to transposition and role of direct and inverted repeats." *Cell* **23**(1): 215-227.
- Fotiadis, D., S. Scheuring, et al. (2002).** "Imaging and manipulation of biological structures with the AFM." *Micron* **33**(4): 385-397.
- Fournier, B. and D. C. Hooper (2000).** "A New Two-Component Regulatory System Involved in Adhesion, Autolysis, and Extracellular Proteolytic Activity of *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* **182**(14): 3955-3964.
- Frebourg, N. B., S. Lefebvre, S. Baert and J. F. Lemeland (2000).** "PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains." *J Clin Microbiol* **38**(2): 877-80.
- Gerke, C., A. Kraft, R. Sussmuth, O. Schweitzer and F. Gotz (1998).** "Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin." *J. Biol. Chem.* **273**(29): 18586-18593.
- Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. DeBoy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson and C. M. Fraser (2005a).** "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**(7): 2426-2438.
- Gillespie, M. T., B. R. Lyon, L. J. Messerotti and R. A. Skurray (1987).** "Chromosome- and plasmid-mediated gentamicin resistance in *Staphylococcus aureus* encoded by Tn4001." *J Med Microbiol* **24**(2): 139-144.
- Götz, F. (2004).** "Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines." *Current Opinion in Microbiology* **7**(5): 477-487.
- Hacker, J. and J. B. Kaper (2000).** "Pathogenicity islands and the evolution of microbes." *Annual Review of Microbiology* **54**(1): 641-679.

- Hacker, J. and E. Carniel (2001).** "Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: A Darwinian view of the evolution of microbes." *EMBO Reports* **2**(5): 376-381.
- Hanssen, A.-M., G. Kjeldsen and J. U. E. Sollid (2004).** "Local Variants of Staphylococcal Cassette Chromosome mec in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci: Evidence of Horizontal Gene Transfer?." *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(1): 285-296.
- Haren, L., P. Polard, B. Ton-Hoang and M. Chandler (1998).** "Multiple oligomerisation domains in the IS911 transposase: a leucine zipper motif is essential for activity." *J Mol Biol* **283**(1): 29-41.
- Haren, L., B. Ton-Hoang and M. Chandler (1999).** "Integrating DNA: transposases and retroviral integrases." *Annu Rev Microbiol* **53**: 245-81.
- Haren, L., C. Normand, P. Polard, R. Alazard and M. Chandler (2000).** "IS911 transposition is regulated by protein-protein interactions via a leucine zipper motif." *J Mol Biol* **296**(3): 757-68.
- Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack and F. Gotz (1996).** "Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*." *Mol Microbiol* **20**(5): 1083-91.
- Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters and F. Götz (1997).** "Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface." *Mol Microbiol* **24**: 1013-1024.
- Heilmann, C., G. Thumm, G. S. Chhatwal, J. Hartleib, A. Uekotter and G. Peters (2003).** "Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*." *Microbiology* **149**: 2768-2778.
- Herrmann, M., P. E. Vaudaux, D. Pittet, R. Auckenthaler, P. D. Lew, F. Schumacher-Perdreau, G. Peters and F. A. Waldvogel (1988).** "Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material." *J Infect Dis* **158**(4): 693-701.
- Huffman, J. L. and R. G. Brennan (2002).** "Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif." *Current Opinion in Structural Biology* **12**(1): 98-106.
- Hussain, M., J. G. Hastings and P. J. White (1991).** "Isolation and composition of the extracellular slime made by coagulase-negative staphylococci in a chemically defined medium." *J Infect Dis* **163**(3): 534-41.
- Hussain, M., J. G. Hastings and P. J. White (1992).** "Comparison of cell-wall teichoic acid with high-molecular-weight extracellular slime material from *Staphylococcus epidermidis*." *J Med Microbiol* **37**(6): 368-75.
- Hussain, M., C. Heilmann, G. Peters and M. Herrmann (2001).** "Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin." *Microb Pathog* **31**(6): 261-70.
- Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Perdreau-Remington and G. Peters (1997).** "A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces." *Infect Immun* **65**(2): 519-24.
- Jain, C. and N. Kleckner (1993).** "Preferential cis action of IS10 transposase depends upon its mode of synthesis." *Mol Microbiol* **9**(2): 249-60.
- Janniere, L., C. Bruand and S. D. Ehrlich (1990).** "Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors." *Gene* **87**(1): 53-61.
- Jilk, R., D. York and W. Reznikoff (1996).** "The organization of the outside end of transposon Tn5." *J. Bacteriol.* **178**(6): 1671-1679.

- Katayama, Y., D. A. Robinson, M. C. Enright and H. F. Chambers (2005).** "Genetic Background Affects Stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*." *J. Clin. Microbiol.* **43**(5): 2380-2383.
- Kennedy, A. K., A. Guhathakurta, N. Kleckner and D. B. Haniford (1998).** "Tn10 transposition via a DNA hairpin intermediate." *Cell* **95**(1): 125-34.
- Kleckner, N., R. M. Chalmers, D. Kwon, J. Sakai and S. Bolland (1996).** "Tn10 and IS10 transposition and chromosome rearrangements: mechanism and regulation in vivo and in vitro." *Curr Top Microbiol Immunol* **204**: 49-82.
- Knobloch, J. K., K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H. H. Feucht and D. Mack (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**(8): 2624-33.
- Knobloch, J. K., S. Jager, M. A. Horstkotte, H. Rohde and D. Mack (2004).** "RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene *icaR*." *Infect Immun* **72**(7): 3838-48.
- Kogan, G., I. Sadovskaya, P. Chaignon, A. Chokr and S. Jabbouri (2006).** "Biofilms of clinical strains of *Staphylococcus* that do not contain polysaccharide intercellular adhesin." *FEMS Microbiol Lett* **255**(1): 11-6.
- Kong, K.-F., C. Vuong and M. Otto (2006).** "Staphylococcus quorum sensing in biofilm formation and infection." *International Journal of Medical Microbiology Quorum sensing in human pathogens* **296**(2-3): 133-139.
- Kozitskaya, S., S.-H. Cho, K. Dietrich, R. Marre, K. Naber and W. Ziebuhr (2004).** "The Bacterial Insertion Sequence Element IS256 Occurs Preferentially in Nosocomial *Staphylococcus epidermidis* Isolates: Association with Biofilm Formation and Resistance to Aminoglycosides" *Infect. Immun.* **72**(2): 1210-1215.
- Kozitskaya, S., M. E. Olson, P. D. Fey, W. Witte, K. Ohlsen and W. Ziebuhr (2005).** "Clonal Analysis of *Staphylococcus epidermidis* Isolates Carrying or Lacking Biofilm-Mediating Genes by Multilocus Sequence Typing." *J. Clin. Microbiol.* **43**(9): 4751-4757.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982).** "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *Journal of Molecular Biology* **157**(1): 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**: 680-685.
- Lane, D. J. (1991).** 16S/ 23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. E. S. a. M. Goodfellow. New York, N.Y., John Wiley and Sons: 115-175.
- Lasa, I. and J. R. Penades (2006).** "Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation." *Research in Microbiology* **157**(2): 99-107.
- Liang, X., L. Zheng, C. Landwehr, D. Lunsford, D. Holmes and Y. Ji (2005).** "Global Regulation of Gene Expression by ArlRS, a Two-Component Signal Transduction Regulatory System of *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* **187**(15): 5486-a-5492.
- Lim, Y., M. Jana, T. T. Luong and C. Y. Lee (2004).** "Control of Glucose- and NaCl-Induced Biofilm Formation by rbf in *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* **186**(3): 722-729.
- Lochowska, A., R. Iwanicka-Nowicka, J. Zaim, M. Witkowska-Zimny, K. Bolewska and M. M. Hryniewicz (2004).** "Identification of activating region (AR) of *Escherichia coli* LysR-type transcription factor CysB and CysB contact site on RNA polymerase alpha subunit at the *cysP* promoter." *Molecular Microbiology* **53**(3): 791-806.

- Loessner, I. (2002).** Die Rolle des bakteriellen Insertionselements IS256 bei der Modulation der Biofilmbildung in *Staphylococcus epidermidis*. Dissertation. Institut für Molekulare Infektionsbiologie. Würzburg, Bayerische Julius-Maximilian-Universität.
- Loessner, I., K. Dietrich, D. Dittrich, J. Hacker and W. Ziebuhr (2002).** "Transposase-Dependent Formation of Circular IS256 Derivatives in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* **184**(17): 4709-4714.
- Lovett, S. T., T. J. Gluckman, P. J. Simon, V. A. Sutter, Jr. and P. T. Drapkin (1994).** "Recombination between repeats in *Escherichia coli* by a recA-independent, proximity-sensitive mechanism." *Mol Gen Genet* **245**(3): 294-300.
- Lovett, S. T. and V. V. Feschenko (1996).** "Stabilization of diverged tandem repeats by mismatch repair: Evidence for deletion formation via a misaligned replication intermediate." *PNAS* **93**(14): 7120-7124.
- Lovett, S. T. (2004).** "Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences." *Mol Microbiol* **52**(5): 1243-53.
- Lyon, B. R., M. T. Gillespie, M. E. Byrne, J. W. May and R. A. Skurray (1987a).** "Plasmid-mediated resistance to gentamicin in *Staphylococcus aureus*: the involvement of a transposon." *J Med Microbiol* **23**(2): 101-10.
- Lyon, B. R., M. T. Gillespie and R. A. Skurray (1987b).** "Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in *Staphylococcus aureus*." *J Gen Microbiol* **133**(11): 3031-8.
- Lyubchenko, Y. L. (1997).** DNA, RNA and Nucleoprotein Complexes Immobilized on AP-mica for imaging with AFM. Fourth International Workshop: STM-AFM-SNoM: New Nanotools for Molecular Biology, Noisy Le Grand, France, Foundation Fourmentin-Guilbert.
- Mack, D., N. Siemssen and R. Laufs (1992).** "Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion." *Infect Immun* **60**(5): 2048-57.
- Mack, D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann and R. Laufs (1994).** "Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin." *Infect Immun* **62**(8): 3244-53.
- Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge and R. Laufs (1996).** "The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis." *J. Bacteriol.* **178**(1): 175-183.
- Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. H. Feucht, H. A. Elsner, R. Laufs and M. E. Rupp (1999).** "Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination." *Infect Immun* **67**(2): 1004-8.
- Mack, D., P. Becker, I. Chatterjee, S. Dobinsky, J. K.-M. Knobloch, G. Peters, H. Rohde and M. Herrmann (2004).** "Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses." *International Journal of Medical Microbiology* **294**(2-3): 203-212.
- Mahillon, J. and M. Chandler (1998).** "Insertion sequences." *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(3): 725-74.
- Mahillon, J., C. Leonard and M. Chandler (1999).** "IS elements as constituents of bacterial genomes." *Res Microbiol* **150**(9-10): 675-87.

- Maki, H. and K. Murakami (1997).** "Formation of potent hybrid promoters of the mutant *ilm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* **179**(22): 6944-8.
- Manna, A. C. and A. L. Cheung (2006).** "Transcriptional regulation of the *agr* locus and the identification of DNA binding residues of the global regulatory protein SarR in *Staphylococcus aureus*." *Molecular Microbiology* **60**(5): 1289-1301.
- McClintock, B. (1951).** "Chromosome organization and genic expression." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **16**: 13-47.
- McGuffin, L., K. Bryson and D. Jones (2000).** "The PSIPRED protein structure prediction server." *Bioinformatics*. **16**: 404-405.
- McKenney, D., J. Hübner, E. Muller, Y. Wang, D. A. Goldmann and G. B. Pier (1998).** "The *ica* Locus of *Staphylococcus epidermidis* Encodes Production of the Capsular Polysaccharide/Adhesin." *Infect. Immun.* **66**(10): 4711-4720.
- Mongkolrattanothai, K., S. Boyle, T. V. Murphy and R. S. Daum (2004).** "Novel Non-*mecA*-Containing Staphylococcal Chromosomal Cassette Composite Island Containing *pbp4* and *tagF* Genes in a Commensal Staphylococcal Species: a Possible Reservoir for Antibiotic Resistance Islands in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(5): 1823-1836.
- Moretro, T., L. Hermansen, A. L. Holck, M. S. Sidhu, K. Rudi and S. Langsrud (2003).** "Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among Staphylococci from Food and Food Processing Environments." *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(9): 5648-5655.
- Nagy, Z., M. Szabo, M. Chandler and F. Olsz (2004).** "Analysis of the N-terminal DNA binding domain of the IS30 transposase." *Mol Microbiol* **54**(2): 478-88.
- Nilsson, M., L. Frykberg, J. I. Flock, L. Pei, M. Lindberg and B. Guss (1998).** "A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*." *Infect Immun* **66**(6): 2666-73.
- Normand, C., G. Duval-Valentin, L. Haren and M. Chandler (2001).** "The terminal inverted repeats of IS911: requirements for synaptic complex assembly and activity." *J Mol Biol* **308**(5): 853-71.
- Ohlsen, K., M. Eckart, C. Hüttinger and W. Ziebuhr (2006).** Pathogenic Staphylococci: Lessons from Comparative Genomics. Pathogenomics. J. Hacker and U. Dobrindt. Weinheim, Wiley-VCH Verlag: 175-210.
- Ohta, S., E. Yoshimura and E. Ohtsubo (2004).** "Involvement of two domains with helix-turn-helix and zinc finger motifs in the binding of IS1 transposase to terminal inverted repeats." *Molecular Microbiology* **53**(1): 193-202.
- Pamp, S. J., D. Frees, S. Engelmann, M. Hecker and H. Ingmer (2006).** "Spx Is a Global Effector Impacting Stress Tolerance and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* **188**(13): 4861-4870.
- Pane-Farre, J., B. Jonas, K. Forstner, S. Engelmann and M. Hecker (2006).** "The [sigma]B regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation." *International Journal of Medical Microbiology* **In press, corrected proof**.
- Park, P. W., J. Rosenbloom, W. R. Abrams and R. P. Mecham (1996).** "Molecular cloning and expression of the gene for elastin-binding protein (*ebpS*) in *Staphylococcus aureus*." *J Biol Chem* **271**(26): 15803-9.
- Planchon, S., B. Gaillard-Martinié, E. Dordet-Frisoni, M. N. Bellon-Fontaine, S. Leroy, J. Labadie, M. Hebraud and R. Talon (2006).** "Formation of biofilm by *Staphylococcus xylosus*." *International Journal of Food Microbiology* **109**(1-2): 88-96.
- Polard, P. and M. Chandler (1995).** "An in vivo transposase-catalyzed single-stranded DNA circularization reaction." *Genes Dev* **9**(22): 2846-58.

- Polard, P., B. Ton-Hoang, L. Haren, M. Betermier, R. Walczak and M. Chandler (1996).** "IS911-mediated transpositional recombination in vitro." *J Mol Biol* **264**(1): 68-81.
- Prudhomme, M., C. Turlan, J. P. Claverys and M. Chandler (2002).** "Diversity of Tn4001 transposition products: the flanking IS256 elements can form tandem dimers and IS circles." *J Bacteriol* **184**(2): 433-43.
- Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker and W. Ziebuhr (2000a).** "Alternative Transcription Factor sigma B Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate." *J. Bacteriol.* **182**(23): 6824-6826.
- Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker and W. Ziebuhr (2000b).** "Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*." *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(12): 3357-3363.
- Reznikoff, W. S. (1993).** "The Tn5 transposon." *Annu Rev Microbiol* **47**: 945-63.
- Reznikoff, W. S. (2003).** "Tn5 as a model for understanding DNA transposition." *Mol Microbiol* **47**(5): 1199-206.
- Rice, P., R. Craigie and D. R. Davies (1996).** "Retroviral integrases and their cousins." *Current Opinion in Structural Biology* **6**(1): 76-83.
- Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann and D. Mack (2005).** "Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases." *Mol Microbiol* **55**(6): 1883-95.
- Ross, P., R. Mayer and M. Benziman (1991).** "Cellulose biosynthesis and function in bacteria." *Microbiol Rev* **55**(1): 35-58.
- Rousseau, P., E. Gueguen, G. Duval-Valentin and M. Chandler (2004).** "The helix-turn-helix motif of bacterial insertion sequence IS911 transposase is required for DNA binding." *Nucleic Acids Res* **32**(4): 1335-44.
- Rupp, M. E., J. Han and S. Gatermann (1995).** "Hemagglutination by *Staphylococcus aureus* strains responsible for human bacteremia or bovine mastitis." *Med Microbiol Immunol (Berl)* **184**(1): 33-6.
- Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht and D. Mack (1999a).** "Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model." *Infect Immun* **67**(5): 2627-32.
- Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey and D. Mack (1999b).** "Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model." *Infect Immun* **67**(5): 2656-9.
- Rupp, M. E., P. D. Fey, C. Heilmann and F. Gotz (2001).** "Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model." *J Infect Dis* **183**(7): 1038-42.
- Sadovskaya, I., E. Vinogradov, S. Flahaut, G. Kogan and S. Jabbouri (2005).** "Extracellular Carbohydrate-Containing Polymers of a Model Biofilm-Producing Strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A." *Infect. Immun.* **73**(5): 3007-3017.
- Sadovskaya, I., P. Chaignon, G. Kogan, A. Chokr, E. Vinogradov and S. Jabbouri (2006).** "Carbohydrate-containing components of biofilms produced in vitro by

- some staphylococcal strains related to orthopaedic prosthesis infections." *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **47**(1): 75-82.
- Sambrook, J., J. Fritsch, et al. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold spring harbour laboratory.
- Sanford, B. A., V. L. Thomas, S. J. Mattingly, M. A. Ramsay and M. M. Miller (1995).** "Lectin-biotin assay for slime present in in situ biofilm produced by *Staphylococcus epidermidis* using transmission electron microscopy (TEM)." *J Ind Microbiol* **15**(3): 156-161.
- Siguier, P., J. Perochon, L. Lestrade, J. Mahillon and M. Chandler (2006).** "ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences." *Nucl. Acids Res.* **34** (suppl_1): D32-36.
- Sinden, R. R., G. Zheng, R. G. Brankamp and K. N. Allen (1991).** "On the Deletion of Inverted Repeated DNA in *Escherichia coli*: Effects of Length, Thermal Stability, and Cruciform Formation in Vivo." *Genetics* **129**(4): 991-1005.
- Steiniger, M., C. D. Adams, J. F. Marko and W. S. Reznikoff (2006).** "Defining characteristics of Tn5 Transposase non-specific DNA binding." *Nucl. Acids Res.* **34**(9): 2820-2832.
- Steiniger-White, M., I. Rayment and W. S. Reznikoff (2004).** "Structure/function insights into Tn5 transposition." *Current Opinion in Structural Biology* **14**(1): 50-57.
- Sun, D., M. A. Accavitti and J. D. Bryers (2005).** "Inhibition of Biofilm Formation by Monoclonal Antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A Accumulation-Associated Protein." *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**(1): 93-100.
- Toledo-Arana, A., N. Merino, M. Vergara-Irigaray, M. Debarbouille, J. R. Penades and I. Lasa (2005).** "*Staphylococcus aureus* Develops an Alternative, *ica*-Independent Biofilm in the Absence of the *arlRS* Two-Component System." *J. Bacteriol.* **187**(15): 5318-a-5329.
- Ton-Hoang, B., M. Betermier, P. Polard and M. Chandler (1997).** "Assembly of a strong promoter following IS911 circularization and the role of circles in transposition." *Embo J* **16**(11): 3357-71.
- Ton-Hoang, B., P. Polard and M. Chandler (1998).** "Efficient transposition of IS911 circles in vitro." *Embo J* **17**(4): 1169-81.
- Ton-Hoang, B., P. Polard, L. Haren, C. Turlan and M. Chandler (1999).** "IS911 transposon circles give rise to linear forms that can undergo integration in vitro." *Mol Microbiol* **32**(3): 617-27.
- Ton-Hoang, B., C. Turlan and M. Chandler (2004).** "Functional domains of the IS1 transposase: analysis in vivo and in vitro." *Mol Microbiol* **53**(5): 1529-43.
- Tormo, M. A., M. Marti, J. Valle, A. C. Manna, A. L. Cheung, I. Lasa and J. R. Penades (2005a).** "SarA Is an Essential Positive Regulator of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Development." *J. Bacteriol.* **187**(7): 2348-2356.
- Tormo, M. A., E. Knecht, F. Gotz, I. Lasa and J. R. Penades (2005b).** "Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?" *Microbiology* **151**(Pt 7): 2465-75.
- Trotonda, M. P., A. C. Manna, A. L. Cheung, I. Lasa and J. R. Penades (2005).** "SarA Positively Controls Bap-Dependent Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* **187**(16): 5790-5798.
- Turlan, C. and M. Chandler (2000).** "Playing second fiddle: second-strand processing and liberation of transposable elements from donor DNA." *Trends in Microbiology* **8**(6): 268-274.
- Vacheethasanee, K., J. S. Temenoff, J. M. Higashi, A. Gary, J. M. Anderson, R. Bayston and R. E. Marchant (1998).** "Bacterial surface properties of clinically

- isolated *Staphylococcus epidermidis* strains determine adhesion on polyethylene." J Biomed Mater Res **42**(3): 425-32.
- Valle, J., A. Toledo-Arana, C. Berasain, J.-M. Ghigo, B. Amorena, J. R. Penades and I. Lasa (2003).** "SarA and not SigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*." Molecular Microbiology **48**(4): 1075-1087.
- Veenstra, G. J. C., F. F. M. Cremers, H. van Dijk and A. Fler (1996).** "Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*." J Bacteriol **178**(2): 537-541.
- Vollenweider, H. J., T. Koller, J. Parello and J. M. Sogo (1976).** "Superstructure of linear duplex DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(11): 4125-9.
- Vuong, C. and M. Otto (2002).** "*Staphylococcus epidermidis* infections." Microbes and Infection **4**(4): 481-489.
- Vuong, C., C. Gerke, G. Somerville, E. Fischer and M. Otto (2003).** "Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*." Journal of infectious diseases **188**: 706-718.
- Vuong, C., M. Durr, A. B. Carmody, A. Peschel, S. J. Klebanoff and M. Otto (2004a).** "Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins." Cellular Microbiology **6**(8): 753-759.
- Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F. R. DeLeo and M. Otto (2004b).** "A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence." J. Biol. Chem. **279**(52): 54881-54886.
- Vuong, C., S. Kocianova, Y. Yao, A. B. Carmody and M. Otto (2004c).** "Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo." J Infect Dis **190**(8): 1498-505.
- Wang, X., J. F. Preston III, et al. (2004).** "The *pgaABCD* Locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation." J Bacteriol **186**(9): 2724-2734.
- Weinreich, M. D., L. Mahnke-Braam and W. S. Reznikoff (1994).** "A functional analysis of the Tn5 transposase. Identification of domains required for DNA binding and multimerization." J Mol Biol **241**(2): 166-77.
- Wielders, C., M. Vriens, S. Brisse, L. de Graaf-Miltenburg, A. Troelstra, A. Fler, F. Schmitz, J. Verhoef and A. Fluit (2001).** "Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*." The Lancet **357**(9269): 1674-1675.
- Williams, R. J., S. P. Nair, B. Henderson, K. T. Holland and J. M. Ward (2002).** "Expression of the *S. aureus hysA* gene in *S. carnosus* from a modified *E. coli*-staphylococcal shuttle vector." Plasmid **47**(3): 241-5.
- Wintjens, R. and M. Rooman (1996).** "Structural Classification of HTH DNA-binding Domains and Protein - DNA Interaction Modes." Journal of Molecular Biology **262**(2): 294-313.
- Wisplinghoff, H., A. E. Rosato, M. C. Enright, M. Noto, W. Craig and G. L. Archer (2003).** "Related Clones Containing SCCmec Type IV Predominate among Clinically Significant *Staphylococcus epidermidis* Isolates." Antimicrob. Agents Chemother. **47**(11): 3574-3579.
- Wolf, E., P. S. Kim and B. Berger (1997).** "'MultiCoil: A Program for Predicting Two- and Three-Stranded Coiled Coils.'" Protein Science **6**: 1179-1189.
- Woude, M. W. (2006).** "Re-examining the role and random nature of phase variation." FEMS Microbiology Letters **254**(2): 190-197.

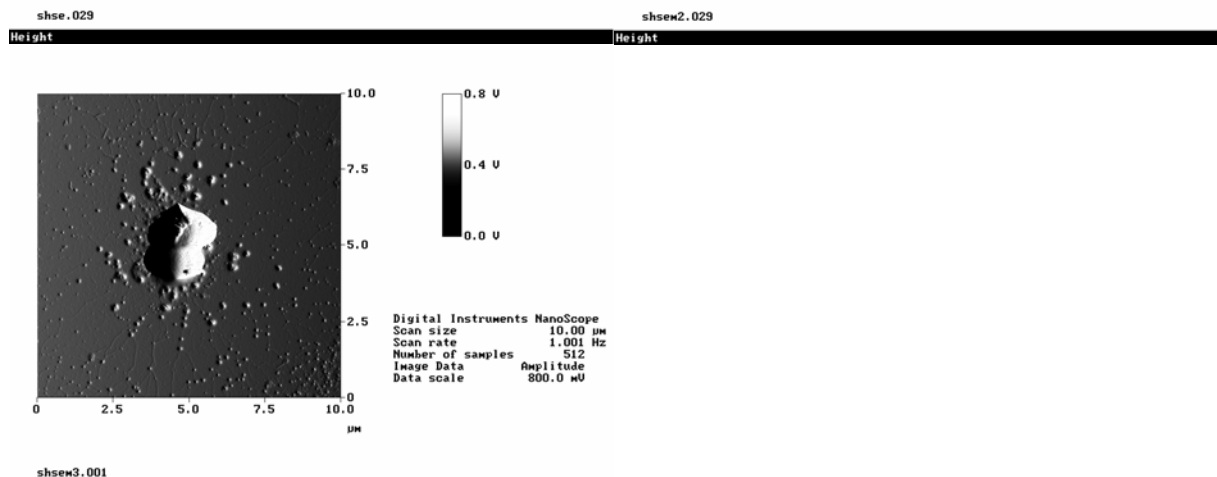
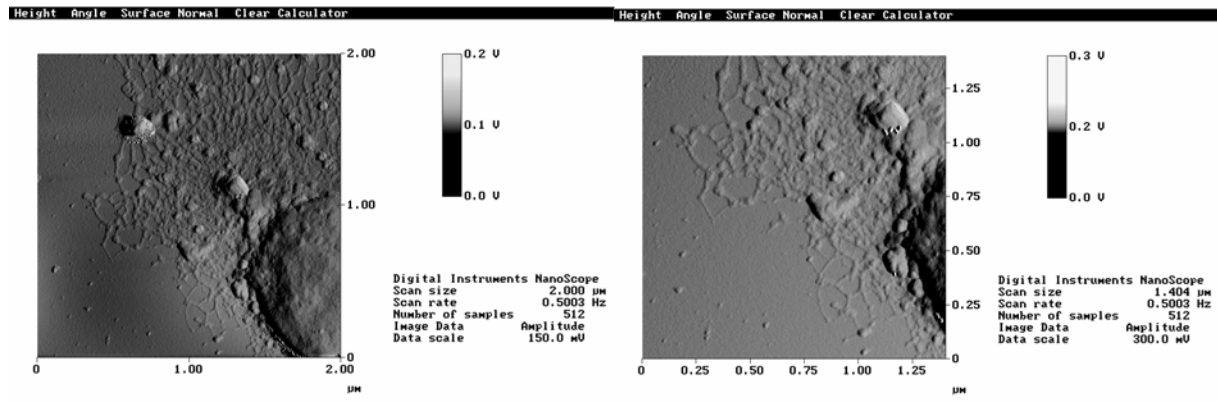
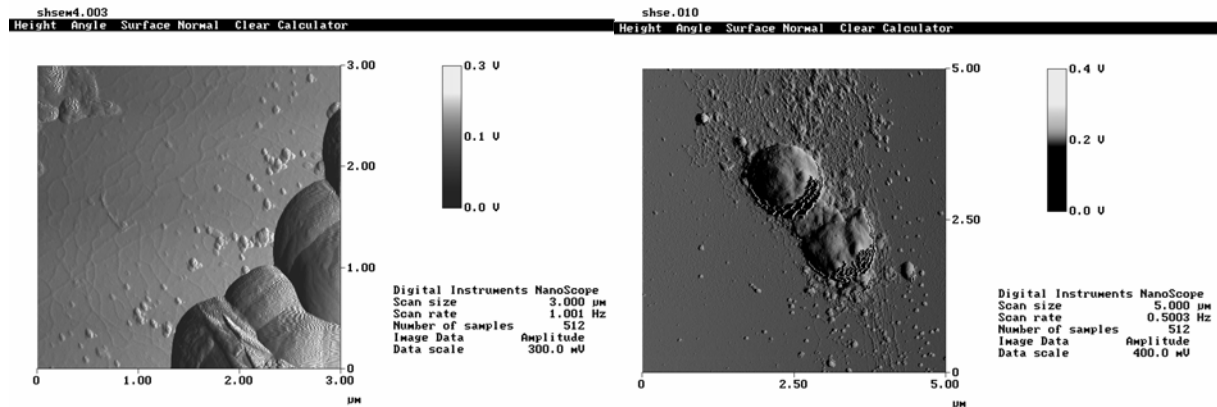
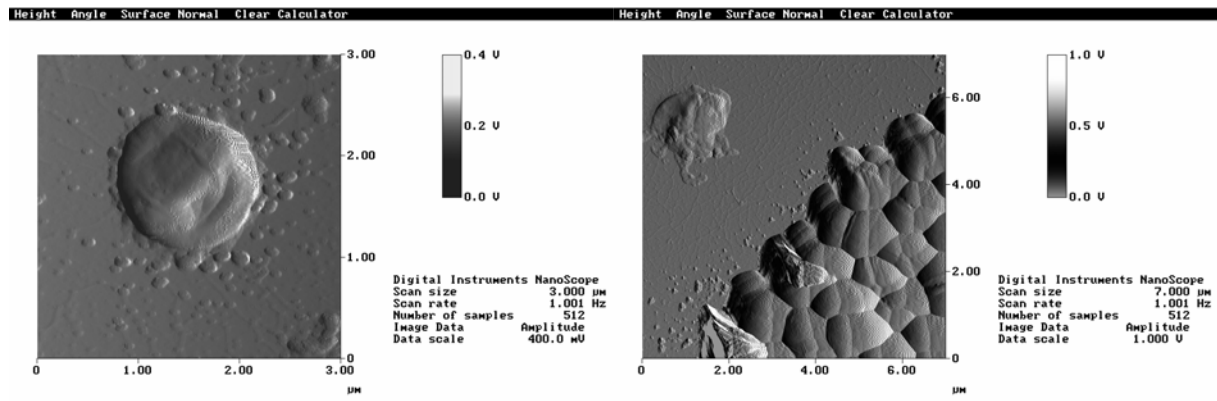
- Xu, L., H. Li, C. Vuong, V. Vadyvaloo, J. Wang, Y. Yao, M. Otto and Q. Gao (2006).** "Role of the *luxS* Quorum-Sensing System in Biofilm Formation and Virulence of *Staphylococcus epidermidis*." *Infect. Immun.* **74**(1): 488-496.
- Yang, Y., L. E. Sass, C. Du, P. Hsieh and D. A. Erie (2005).** "Determination of protein-DNA binding constants and specificities from statistical analyses of single molecules: MutS-DNA interactions." *Nucl. Acids Res.* **33**(13): 4322-4334.
- Yu, J., M. N. Montelius, M. Paulsson, I. Gouda, O. Larm, L. Montelius and A. Ljungh (1994).** "Adhesion of coagulase-negative staphylococci and adsorption of plasma proteins to heparinized polymer surfaces." *Biomaterials* **15**(10): 805-14.
- Yuan, J. F., D. R. Beniac, G. Chaconas and F. P. Ottensmeyer (2005).** "3D reconstruction of the Mu transposase and the Type 1 transpososome: a structural framework for Mu DNA transposition." *Genes Dev.* **19**(7): 840-852.
- Zhang, Y. Q., R. S.X., H. L. Li, Y. X. Wang, G. Fu, J. Yang, Z. Q. Qin, Y. G. Miao, W. Y. Wang, R. S. Chen, Y. Shen, Z. Chen, Z. H. Yuan, G. P. Zhao, D. Qu, A. Danchin and Y. M. Wen (2003).** "Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228)." *Mol Microbiol* **49**: 1577-1593.
- Zhou, M. and W. S. Reznikoff (1997).** "Tn5 transposase mutants that alter DNA binding specificity." *J Mol Biol* **271**(3): 362-73.
- Ziebuhr, W., C. Heilmann, F. Gotz, P. Meyer, K. Wilms, E. Straube and J. Hacker (1997).** "Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates." *Infect Immun* **65**(3): 890-6.
- Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Lossner, F. Gotz and J. Hacker (1999a).** "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." *Molecular Microbiology* **32**(2): 345-356.
- Ziebuhr, W., K. Ohlsen, H. Karch, T. Korhonen and J. Hacker (1999b).** "Evolution of bacterial pathogenesis." *Cellular and Molecular life sciences* **56**: 719-728.
- Ziebuhr, W., K. Dietrich, M. Trautmann and M. Wilhelm (2000a).** "Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis." *International Journal of Medical Microbiology* **290**: 115-120.
- Ziebuhr, W., I. Loessner, S. Rachid, K. Dietrich, F. Götz and J. Hacker (2000b).** "Modulation of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. Analysis of genetic mechanisms." *Adv Exp Med Biol* **485**: 151-7.
- Ziebuhr, W., I. Loessner, V. Krimmer and J. Hacker (2001).** "Methods to detect and analyze phenotypic variation in biofilm-forming Staphylococci." *Methods Enzymol* **336**: 195-205.

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(v/v)	Volumen pro Volumen	KRA	Kongorot-Agar
(w/v)	Masse pro Volumen	l	Liter
°C	Grad Celsius	LB	Luria-Bertani
µg	Mikrogramm	M	Molar
µl	Mikroliter	mA	Milliampere
µm	Mikrometer	mg	Milligramm
1D-SDS-PAGE	eindimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	min	Minute
A	Adenin	ml	Milliliter
A. bidest.	zweifach destilliertes Wasser	mm	Millimeter
A. dest.	einfach destilliertes Wasser	mM	Millimolar
Aa	Aminosäure	MOPS	Morpholinopropansulfon-säure
Abb.	Abbildung	mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>	MW	Molekulargewicht
Amp	Ampicillin	ng	Nanogramm
APS	Ammoniumperoxiddisulfat	nm	Nanometer
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	nt	Nukleotide
A _{x nm}	Absorption bei x nm	OD	Optische Dichte
bp	Basenpaare	ORF	<i>open reading frame</i>
BSA	Bovines Serum Albumin	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
C	Cytosin	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxy-spiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl-phosphat	PV	Phasenvariante
cfu	Koloniebildende Einheiten	RNA	Ribonukleinsäure
cm	Centimeter	RNase	Ribonuklease
Cm	Chloramphenicol	rpm	<i>rounds per minute</i>
dCTP	2'-desoxy-Cytidin-5'-triphosphat	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
DECP	Diethylpyrocarbonat	RT	Raumtemperatur
DIG	Digoxigenin	s	Sekunde
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
DNase	Desoxyribonuklease	<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
DR	<i>Direct repeat</i>	spec	Spectinomycin
DTT	Dithiothreitol	SSC	<i>Standard Saline Citrate</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	T	Thymidin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TAE	Tris-Acetat-EDTA
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
EtOH	Ethanol	Tet	Tetrazyklin
g	Gramm	Tnp	Transposase
G	Guanin	TPE	Tris-Phosphorsäure-EDTA
h	Stunde	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
IAA	Isoamylalkohol	TSB	<i>Trypticase-Soy-Broth</i>
IR	<i>inverted repeat</i>	Tween 20	Polyoxyethylensorbitan
IS	Insertionssequenz	u	Unit
kb	Kilobasen	U	Uracil
kDa	Kilodalton	ÜN	über Nacht
Km	Kanamycin	ÜNK	Übernachtkultur
		UV	Ultraviolett
		V	Volt
		WT	Wildtyp

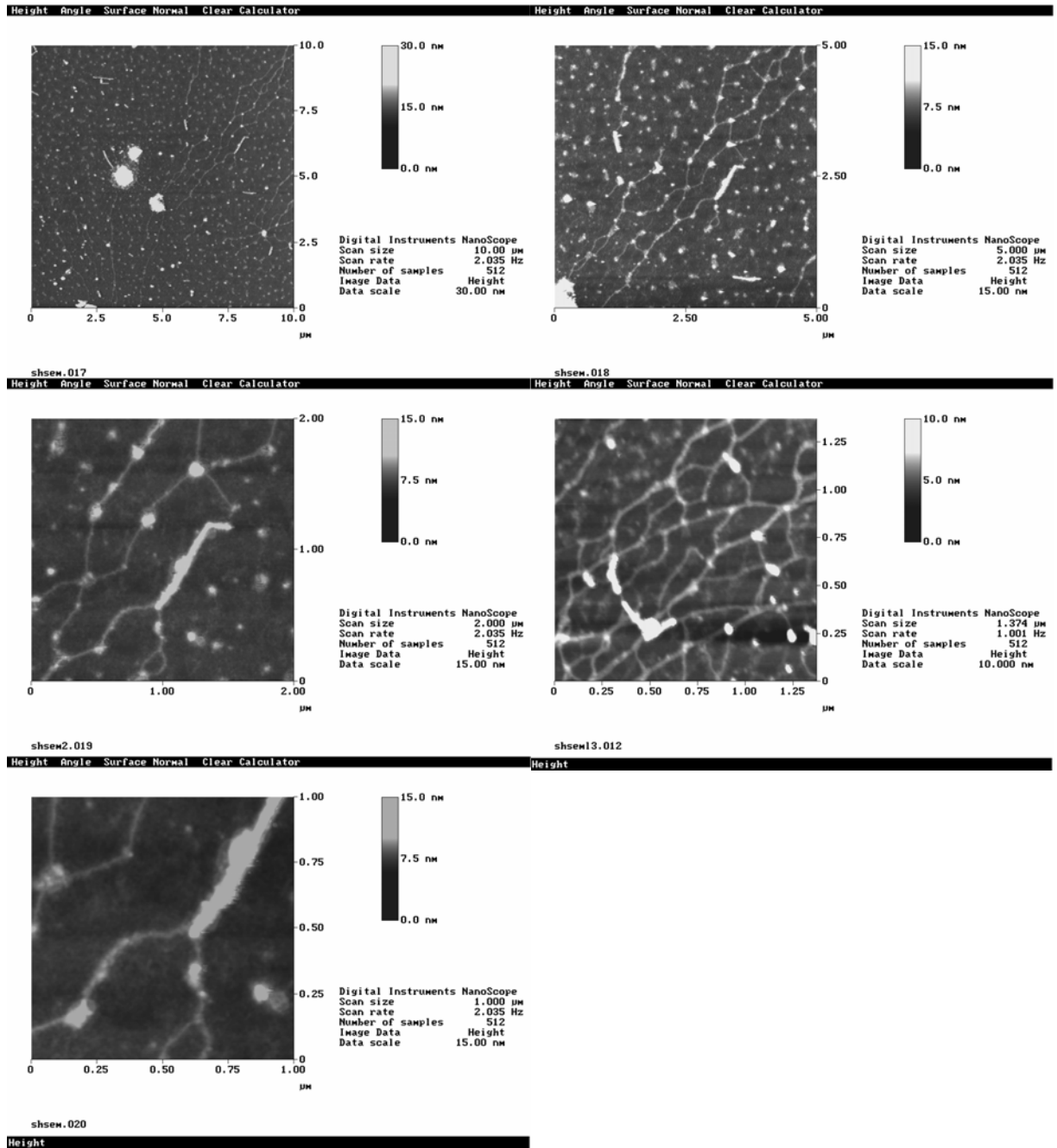
II. ATOMIC FORCE MIKROSKOPIE

S. epidermidis CSF414981 WT

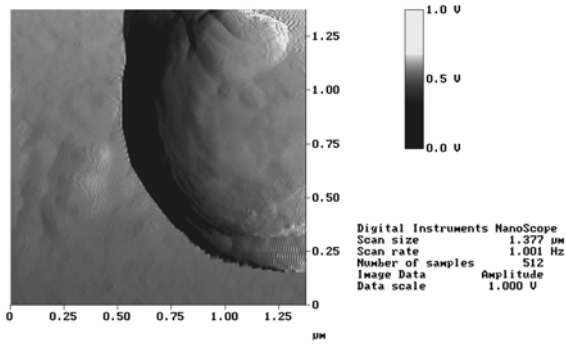


shsem3.001

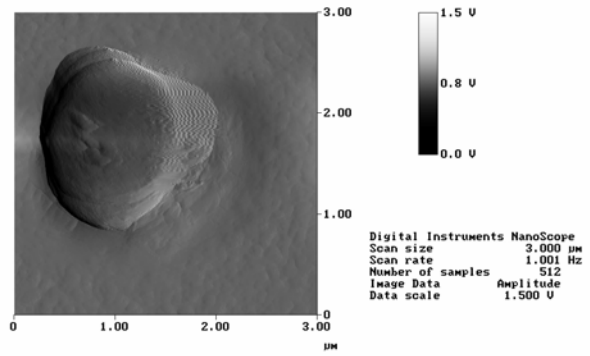
S. epidermidis CSF414981 WT



S. epidermidis CSF41498-1

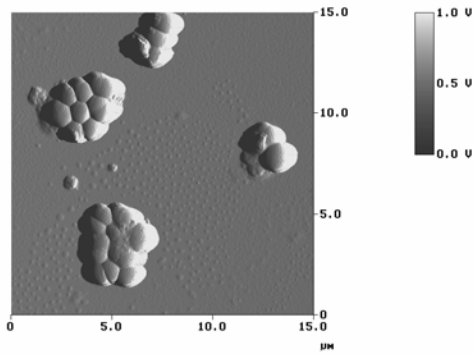


shsew3.005

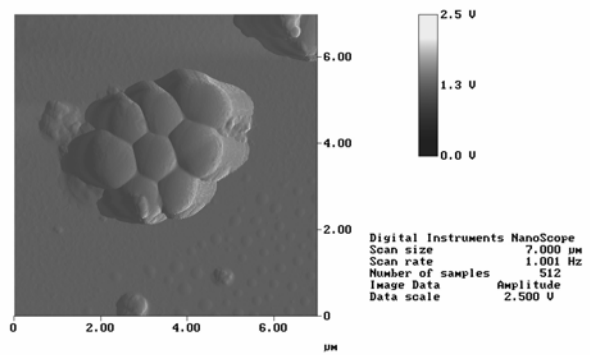


shsew2.004

Height Angle Surface Normal Clear Calculator

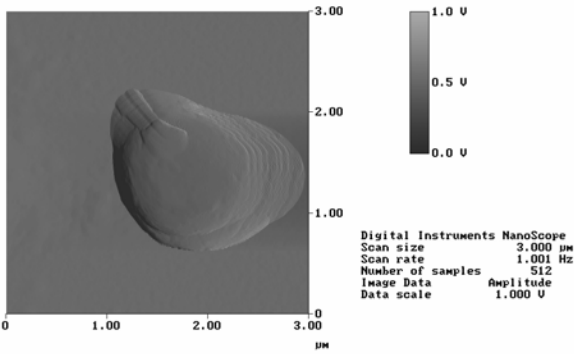


Height Angle Surface Normal Clear Calculator



shsew2.008

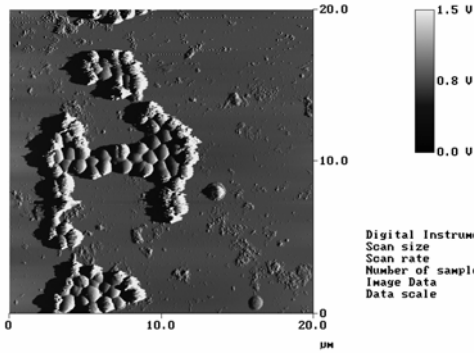
Height Angle Surface Normal Clear Calculator



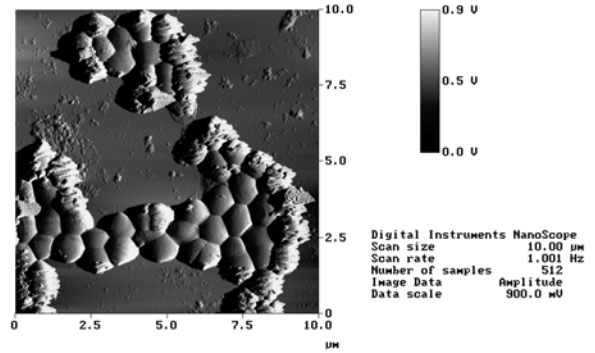
shsew1.006

Height

S. epidermidis CSF41498-1 PV1



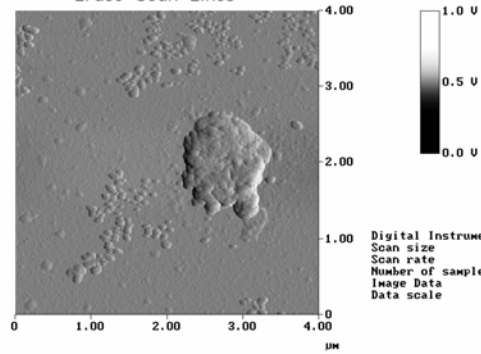
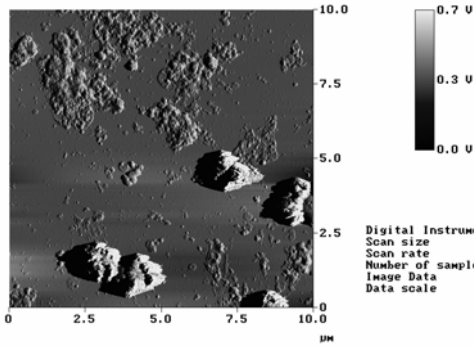
csfvx1



csfvx2

Add Delete Move Hide Clear Execute Undo

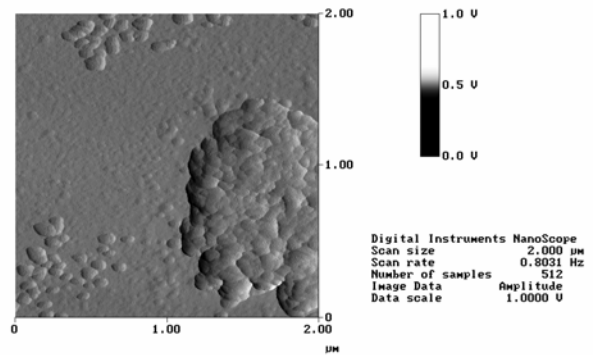
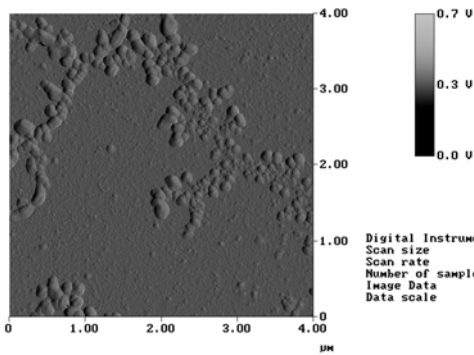
Erase Scan Lines



shsew1.032

Height Angle Surface Normal Clear Calculator

Add

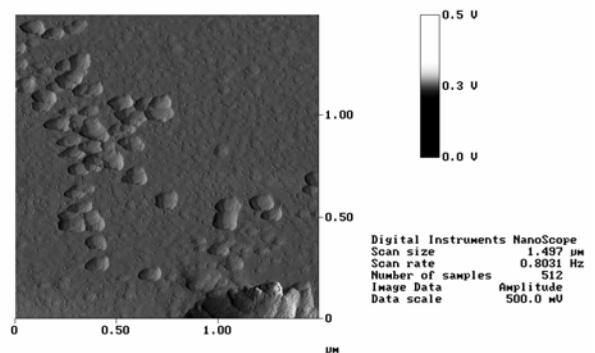
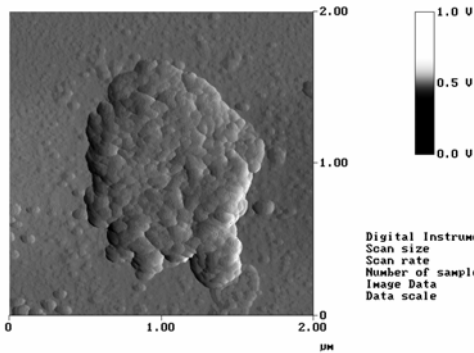


shsew1.026

shsew1.033

Height

Height



shsew2.034

shse.037

Height

Height

	250	260	270	280	290	300	310	320	
Tnp IS256	IGTTKGDRE	IIGFMIQSGE	S--EETWTF	FHYLKERGLQ	G-TELVISDA	HKGLVSARK	SFTNVSWORC	QVHFLRNIFT	264
IS1132	VEVDMDGKH	ILGLWIADNE	G--ASFVASF	CADIANRQVQ	D-AFIVCCDG	LKGLPEAVEA	TWPNMSVQTC	IVHILIRANR	267
IS1164	VEVNADGYRE	ILGLDVTSAE	D--GAGWTF	FRGLVARGLS	G-VRLVTSDA	HAGLVAALGA	TLPGASWORC	RTHYSVNLMA	264
IS1166	IGVRADGRKE	LVALTDGFRE	S--TESWADL	LRSRRRCMT	A-PVLAVGDS	ALGFWKALRE	VFPDTREORC	WFHKOANVLA	277
IS1191	LGHTPBGQA	VLGYEIAPNE	N--NASWSTL	LDRKQNOGQ	Q-VSLVVTDG	FKGLEEITNQ	AYPLAKQORC	LVIHSRNLSA	259
IS1201	IGTKPNCHK	VIDYCIAPNE	N--IEVWTEL	LQSMKSRGL	Q-VELFLSDG	VVGKMTALAK	TYPOAHFORC	LIVHVMRNICA	259
IS1245	TVGAADCRRE	VLGFVEVDSE	D--GAFWTF	LRSLSKRCLA	G-VQLVISDA	HAGLRSALDA	VLIGAAWORC	RVEHFLRNVLA	263
IS285	IGTRPDGTR	VLNYQVAPTE	S--TGIWTEL	LGTHIKQGVK	D-VLLFVADG	LVGLDEGLNR	HFPKAKRORC	LIVHVRNLIN	259
IS1310	IGTRPDGTR	VLNYQVAPTE	S--TGIWTEL	LGTHIKQGVK	D-VLLFVADG	LVGLDEGLNR	HFPKAKRORC	LIVHVRNLIN	259
IS1311	TVVAVDCRRE	VLGFVDVDS	D--GAFWTF	LRSKTRGRLS	G-VQLVISDA	HTGLRSALDA	ILIGASWORC	RVEHFLRNVLA	263
IS1354	LEVRADGRKE	LVAIKSMGGE	S--AEAARTV	LDDIKRGLR	R-PEFLIVDG	APGLDKATAV	VWDGVPVORC	TVHKHRLNIA	286
IS1356	LEVRADGRKE	VLGLWIEQTE	G--AKFWLRV	VNEIKRGLR	D-ILLIIVDG	LKCFPEALNT	VFPATRGORC	IVHILIRNSLD	271
IS1395	TVNAEDYRE	ILGVQVSSPE	D--GTAWLAF	FRDVALALS	G-VALVTNDA	HPGLVPAIGA	TLPGAAWORC	RTHYANMLMA	264
IS1408	TVNAEDYRE	ILGVQVSSPE	D--GTAWLAF	FRDVALALS	G-VALVTNDA	HPGLVPAIGA	TLPGAAWORC	RTHYANMLMA	264
IS1413	IGVKKPDSKE	RVAIGDGYRE	T--KASWLEL	LLDLKKGCLK	AGPRLAVGDS	AMGFWAALRE	VFPATRGORC	WFHMKGNVLN	272
IS406	VELEASCKRR	VLGCEVATSE	A--EINWRRF	LESILARGLK	G-VTLIADG	HAGLKAARRA	VLPSPVWORC	QFHLQONAGA	263
IS6120	LEVRADGRKE	LVAITDGYRE	S--AESWADL	LRCCKRRGMT	A-PVLAIGDG	ALGFWKAVRE	VFPATKORC	WFHKOANVLA	278
IS1414	IGTRPDGTR	VLGMWLAENE	G--AKFWLRV	VNEIKRGLR	D-ILLIIVDG	LKCFPEALNT	VFPATRGORC	IVHILIRNSLD	271
IS1490	IGVTPBGKKE	RVAIGDGYRE	S--KASWLEL	LLDLKKGCLK	AGPRLAVGDS	AMGFWAALRE	VFPATRGORC	WFHMKGNVLN	272
IS1511	TVNAEDYRE	ILGIDVTTTE	D--GAGWTF	LRSITARGLS	G-VRLVTSDA	HAGLVAALGA	TLPGASWORC	RTHYANMLMA	264
IS1542	IGTTEGDRD	IIGFMIQNEE	S--DDTWSIF	FHYLKERGLQ	G-TELLISDA	HKGLVSARK	SFTNVSWORC	QVHFLRNIFT	264
IS16	IGLDSGRRT	ILGFDVQDGE	S--EDNDWTV	FQSFVORGLF	G-VKLVISDA	HKGLVKARK	NFLGASWORC	QAHFLRNIFD	265
IS1601	TEVNGDGHRE	VLGMRVVTSE	T--GPAWNEF	FADLVARGLA	G-VRLVTSDA	HAGLREATAA	NLPGAAWORC	RTHYANMLMA	265
IS2606	VEVDLASHRD	VLGMWAGEGD	GESAKYWLAV	LTEBKRGVLA	D-IFFLVCDG	LKGLPDSVSA	VFPATVQTC	IVHILIRGTFR	300
IS1081	TVNAEDYRE	ILGIQVTSAE	D--GAGWTF	FRDVALALS	G-VALVTNDA	HAGLVAALGA	TLPAAAWORC	RTHYANMLMA	264
IS1407	TVNAEDYRE	ILGVQVTSAE	D--GAGWTF	FRDVALALS	G-VALVTNDA	HPGLVPAIGA	TLPGATWORC	RTHYANMLMA	264
IS1632	IGTTPBGKKE	LIGFQVGVRE	S--VQSWREL	LIDRORGLR	MAPQLAIGDG	ALGFWKALDE	AFPTRGORC	WCHKAVSNVLD	82

	330	340	350	360	370	380	390	400	
Tnp IS256	TIP-KKNSKS	FREAVKGLFK	FTDINLAREA	KNRLIHDIYD	QPKYSKACAS	LDDGFEDAFO	YTVQ-GNSHN	RLKSTNLIER	342
IS1132	WVS-YQDRK	VSSALREVYT	APTEDTARA	LD-AFEASEL	GRKYPQSVK	WRDAWDRFVP	FLOFPPAARR	VIYTNLSIES	345
IS1164	VTP-KSSWP	VKTLHLSVYD	QPDADSVHAA	YDRI IDALT-	-EKLPKVADH	LDAARSDLLA	ETAPFPQIWK	QIWSNQPOR	341
IS1166	ALP-KSAHP	ATAAMREIYN	AEDIDKAQVA	IKAFEVDYD-	-AKYPKAVAK	IVDDADVLLA	EYRMPAEHWI	HLRITNPIER	354
IS1191	KVK-RADRTV	ILEQFKTIYR	AENLEMAVQI	LE-NFIAE-W	KPKYRKMES	LENTD-NLLT	EYQEPYQIWH	SIYSTNPIES	335
IS1201	KVR-VEDREA	IMNEFKQIHQ	QANKAAAVDV	LH-AFYAK-W	DKSYNHVIRN	LKDIEPDLV	EYNPKQIRA	SIYSTNPIES	336
IS1245	QVP-KGSARE	VAAAI RTVEA	QPDAEHVREQ	LDTIAGMLG-	-RQFPKVVETM	LREAAADITA	EADFPVAHWK	KIWTNPIER	340
IS285	KVR-VKDRKA	VINDFKQVHW	AANREAAELK	LN-EFANN-W	HRTYPKLIKD	LLKMP-NLLT	EMDEPPAIRQ	SLYSTNLIEN	335
IS1310	KVR-VKDRKA	VINDFKQVHW	AANREAAELK	LN-EFANN-W	HRTYPKLIKD	LLKMP-NLLT	EMDEPPAIRQ	SLYSTNLIEN	335
IS1311	QVP-KGSARE	VAAAI RTVEA	QPDAEHVREQ	LDTIAGMLG-	-RQLPKVVETM	LREAAADITA	EADFPVHLHW	KIWTNPIER	340
IS1354	HAP-ERLHEE	TADYNDMIY	ATPPEEIAAR	RKAFIRKWR-	-LKHRAVADS	LEEAGDRLFT	BARMPQIWR	SLRITNAIER	363
IS1356	FAS-WKDRKS	VAAALKEVYR	APSAREAAVA	LD-AFDTSPW	GTKYPPIAAL	WRRADQVIP	EYAFAPDIRK	IVYTTNAIES	349
IS1395	ATP-KSSWP	VRTLHLSVFD	QPDAESVVAQ	YDRVLDALS-	-DKLPKVEPH	LDAADPDLA	ETAPFPQIWR	QIWSNQPOR	341
IS1408	ITP-KSSWP	VRTLHLSVFD	QPDAESVVAQ	YDRVLDALS-	-DKLPKVAEH	LDAARDELLA	ETAPFPQIWR	QIWSNQPOR	341
IS1413	ALP-KSQKGR	AKADMOSIWM	AATRAEAHAA	FDRFVSIYA-	-AKYPKATET	LKKDRDLSLA	EYRMPAEHWQ	HLRITNPIER	349
IS406	LTRQEARPT	VAAQMARIFN	APDRTEAERL	LKAALTLWC-	-KEHPKLAEW	AETAIPESLT	VFDEPAARIH	HLRITNPIER	341
IS6120	ALP-KSAHPS	ALAAIKETYN	AEDIDKAQIA	VKAFEADFG-	-AKYPKAVAK	ITDDLVDLLE	EYKYPAEHWI	HLRITNPIES	355
IS1414	FVS-WKDYKA	VTRDLKAIYQ	APTEEAGQQA	LE-AFAAA-W	DSRYPQISRS	WQANWPNLAT	EYAFAPDIRK	IVYTTNAIES	340
IS1490	AMP-KSLQGR	AKADLQAIWM	AATRADAYAA	FDRFVAIHA-	-AKYPKATDT	LKKDRDLSLA	EYRMPAEHWQ	HLRITNPIER	349
IS1511	ITP-KSSWP	VRTLHLSVFD	QPDAGSVAAQ	YDRIDALDA-	-DKLPKVADH	LEDTRADLLA	ETAPFPQIWR	QIWSNQPOR	339
IS1542	SIP-KKNSKP	FREAVKALFK	FTDIELARTA	KNALVGEYID	QPKYTKACEI	LDNGFEDAFO	YTVI-GNSHN	RLKSTNLLER	342
IS16	KLP-KKVSDD	VKDELKSIFF	ASELELTRER	KEHFLKEYGC	DSKLSAACDI	LENGFEDAIO	ILSPENIRN	RIRITNPIER	344
IS1601	ICP-KSMWPA	VKAMLHVSVD	QPDAPAVAAQ	FDRLIDVVT-	-DKLPVADH	LATAREDILLA	ETAPFPQIWR	QIWSNQPOR	342
IS2606	YPG-RQHHTA	IARALKPIYT	AVNAAAAAEA	LD-AFDTE-W	GHRYPAAIRL	WRTAWNEFIP	BLDXDTEIRK	VICSTNAIES	377
IS1081	ATP-KPSWP	VRTLHLSVYD	QPDAESVVAQ	YDRVLDALT-	-DKLPVAEH	LDTARTDLA	ETAPFPQIWR	QIWSNQPOR	341
IS1407	VTP-KSSWP	VRTLHLSVFD	QPDAESVVAQ	YDRVLDALT-	-DKLPVAEH	LDTARDELLA	ETAPFPQIWR	QIWSNQPOR	341
IS1632	KVA-KSVQGP	MKNDLRNIYL	APHRAEAETA	IDVFVEKYH-	-VKYGRAVEC	LKDRHALLA	EYRMPAEHWI	HLRSSNPIES	159

	410	420	430	440	450	460	470	480	
Tnp IS256	LNQEVRRREK	IIRIFPNQTS	ANRLIGAVLM	DLHDEWIYSS	-----	-----	-----	-----	390
IS1132	LNAELKATR	NRGQFPNDTA	ALKTLWLMIC	NIEDKRAAQR	AKKAKRAIEC	NGYIEGAKAT	GWKQAINQLA	VAYPDRFADY	425
IS1164	LNKEIRRRTD	VVGIFPDRTA	LIRLVGAALA	EQHDEWIEG-	-----	-----	-----	-----	403
IS1166	TFATVRLRTK	VTKGPGRSAA	GIAMAYKLID	AAQARWRAVN	-----	-----	-----	-----	417
IS1191	LNKEIKRQTK	KKVLPFNEEA	LERYLVTLFE	DYNFQKNQR-	-----	-----	-----	-----	391
IS1201	FNNVIKRRVK	PKAEFPTEQS	LDTFIGIQAM	SYQ-----	-----	-----	-----	-----	369
IS1245	LNKEIKRRTD	VVGVPNPAA	LLRLAGSVLV	EAHDEWQVAD	-----	-----	-----	-----	403
IS285	FNKHLKRTTH	RKEQFPTEDS	LDRFLVSQFN	AYNEKSLKR-	-----	-----	-----	-----	391
IS1310	FNKHLKRTTH	RKEQFPTEDS	LDRFLVSQFN	AYNEKSLKR-	-----	-----	-----	-----	391
IS1311	LNKEIKRRTD	VVGVPNPAA	LLRLAGSVLV	EAHDEWQVAD	-----	-----	-----	-----	404
IS1354	LHEEFKRRIK	TQTVLPSADT	AAMFWALLA	SGQISMRKVD	G-----	-----	-----	-----	421
IS1356	LHMQLRKIIK	ARGHFPDEA	ALKLILWALR	NVVAKWTGS-	-----	-----	-----	-----	410
IS1395	LNKEIRRRTD	VVGIFPDRAS	IIRLVGAVLA	EQHDEWIEG-	-----	-----	-----	-----	404
IS1408	LNKEIRRRTD	VVGIFPDRAA	IIRLVGAVLA	EQHDEWIEG-	-----	-----	-----	-----	404
IS1413	TFATVRRHRT	RTRNCVSRPT	FLGLAFKLIE	EAEKTRWRIN	-----	-----	-----	-----	412
IS406	INRELRRRT	VASIFPNPDS	CLRLVSALLA	ELDDEWMTG-	-----	-----	-----	-----	388
IS6120	TFATVRLRTK	VTKGPGRSAA	GLAMAYKLID	AAARWRAVN	-----	-----	-----	-----	418
IS1414	LNSVIRHAIK	KRKVFPTDDS	VKKVVWLAIQ	SASRKWTMP-	-----	-----	-----	-----	401
IS1490	TFATVRRHRT	RTRNCVSRPT	FLGLAFKLIE	EAEKTRWRIN	-----	-----	-----	-----	412
IS1511	---VICSPRD	---GVFDRHE	VLR---SQVLR	AGHAYLQLS-	-----	-----	-----	-----	395
IS1542	LNQEVRRREK	IIRIFPNRTS	ANRLIGAVLM	DLHDEWLSST	-----	-----	-----	-----	390
IS16	LNKEIRRRER	VIRIFPNINS	ITRIIGTLLM	EKDETWLASP	-----	-----	-----	-----	395
IS1601	LNKEIRRRTD	AVGIFPNRDA	IVRLVGAVLA	EQNDEWAEQ-	-----	-----	-----	-----	405
IS2606	LNARYRAAIR	ARGHFPTEQS	ALKCLYLVTR	SLEPDTGTGQK	RW-----	-----	-----	-----	441
IS1081	LNREVRRTD	VVGIFPDRAS	IIRLVGAVLA	EQHDEWIEG-	-----	-----	-----	-----	404
IS1407	LNREVRRTD	VVGIFPDRTA	IIRLVGAVLA	EQHDEWIEG-	-----	-----	-----	-----	404
IS1632	VFATVRRHRTV	RTKGSLSQQT	AKLMVFKLID	AAKTRWRRLK	-----	-----	-----	-----	219

	490	500	
Tnp IS256
IS1132	L-----	-----	- 390
IS1164	GTEEVTPALT	A-----	- 426
IS1166	IDISP---A	EPDESSETEV A	- 414
IS1191	-----	-----	- 434
IS1201	-----	-----	- 391
IS1245	PTAALTA---	-----	- 369
IS285	-----	-----	- 410
IS1310	-----	-----	- 391
IS1311	VPAAITA---	-----	- 391
IS1354	-----	-----	- 411
IS1356	I-----	-----	- 421
IS1395	QQTNTTPALT	A-----	- 411
IS1408	PRPATTPALT	A-----	- 415
IS1413	RPVQQ-----	-----ILA A	- 415
IS406	-----	-----	- 421
IS6120	TDITPPTSPS	DGGQHAGTEV A	- 388
IS1414	F-----	-----	- 439
IS1490	RPDQQ-----	-----KLA A	- 402
IS1511	GPFSVTTTLR	-----	- 421
IS1542	-----	-----	- 405
IS16	-----	-----	- 390
IS1601	G-ANDMPALT	A-----	- 395
IS2606	ETT-----	-----	- 415
IS1081	QQTNTTPALT	T-----	- 444
IS1407	HQPTTTPALT	A-----	- 415
IS1632	IPNTE-----	-----SHA A	- 415
			- 228

PUBLIKATIONEN

Mäder, U., S. Hennig, M. Hecker and G. Homuth (2004). "Transcriptional Organization and Posttranscriptional Regulation of the *Bacillus subtilis* Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis Genes" *J. Bacteriol.* **186**(8): 2240-2252.

Ziebuhr, W., S. Hennig, M. Eckart, H. Kranzler, C. Batzilla and S. Kozitskaya (2006). „Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen.” *International Journal of Antimicrobial Agents*. Im Druck.

Hennig, S., S. N. Wai and W. Ziebuhr. „Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate.” Eingereicht.

Hennig, S. and W. Ziebuhr. “A transposase-independent mechanism gives rise to precise excision of IS256 in *Staphylococcus epidermidis*.” In Vorbereitung.

Hennig, S. and W. Ziebuhr. „Characterization of the DNA-binding domain of IS256 transposase.” In Vorbereitung.

TAGUNGSBEITRÄGE

Hennig, S., I. Löbner, D. Dittrich, K. Dietrich, J. Hacker and W. Ziebuhr (2003). „IS256 and its role in phenotypic and genotypic variability in pathogenic *Staphylococcus epidermidis*“. Posterpräsentation der Summerschool des EGK 587/9, Umeå, Schweden.

Hennig, S. and W. Ziebuhr (2004). “Precise excision of the insertion sequence IS256 from the chromosome of *Staphylococcus epidermidis*.” Posterpräsentation der Summerschool des EGK 587/9, Würzburg.

Hennig, S., I. Löbner, K. Dietrich and W. Ziebuhr (2004). „IS256 and its role in phenotypic and genotypic variability in pathogenic *Staphylococcus epidermidis*”. Posterpräsentation der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Braunschweig.

Hennig, S. and W. Ziebuhr (2005). „Analysis of staphylococcal IS256 transposase activity *in vivo* and *in vitro*”. Posterpräsentation der Summerschool des EGK 587/9, Umeå, Schweden.

Hennig, S. and W. Ziebuhr (2005). „IS256 and its impact on genome flexibility in pathogenic *Staphylococcus epidermidis*”. Kurzvortrag auf der Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Göttingen.

Hennig, S., B. E. Uhlin and W. Ziebuhr (2006). „Phase variation in biofilm formation of pathogenic *Staphylococcus epidermidis*”. Posterpräsentation des Minisymposiums der Fachgruppe Mikrobielle Pathogenität der DGHM, Bad Urach.

LEBENS LAUF

Susanne Hennig

geb. am 28.04.1976 in Rostock

Schul Ausbildung

1982 – 1990 Polytechnische Oberschule in Rostock

1990 – 1994 Gymnasium in Rostock

07/1994 Abitur

Studium

WS 1995 – SS 1997 Grundstudium Diplom-Biologie,
Ernst-Moritz Arndt Universität Greifswald

WS 1997 – SS 1998 Hauptstudium Diplom-Biologie in Greifswald

WS 1998 – SS 1999 Biologiestudium Uppsala Universitet, Schweden

WS 1999 – WS 2000/01 Hauptstudium Diplom-Biologie in Greifswald

05/2001 - 03/2002 Diplomarbeit am Lehrstuhl von Prof. Dr. Hecker unter
Anleitung von Dr. Georg Homuth
Titel der Arbeit:
„Untersuchungen zur mRNA-Stabilität bei *Bacillus subtilis*“

03/2002 Abschluss: Diplom-Biologin
Gesamtnote: Sehr gut

04/2002 - 07/2002 wissenschaftliche Tätigkeit am Lehrstuhl von Prof. Dr.
Hecker

seit 08/2002 Anfertigung der Dissertation am Institut für Molekulare
Infektionsbiologie der Universität Würzburg am Lehrstuhl
von Prof. Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker, unter Anleitung von
PD Dr. Wilma Ziebuhr

Würzburg, im August 2006