

Untersuchungen zur Regulation der Biofilmbildung bei Staphylokokken

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

vorgelegt von

Hans-Marcus Kränzler

aus Heilbronn

Würzburg, April 2006

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:.....

- | | |
|---------------|---------------------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Jürgen Kreft |
| 3. Gutachter: | Priv.-Doz. Dr. Wilma Ziebuhr |

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

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, April 2006

Hans-M. Kränzler

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die am Gelingen diese Arbeit beteiligt waren!

Ganz besonders danke ich...

Frau Dr. Wilma Ziebuhr für das Betreuen und Korrigieren dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker für die Aufnahme in das European Graduate College „Gene Regulation in and by Microbial Pathogens“, sowie für die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Kreft für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Yair Aharonowitz, Dr. Ilya Borovok, Amos und Tzili für die erfolgreiche Kooperation, ihre stete Diskussionsbereitschaft sowie die schöne Zeit in Tel Aviv.

Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister und Markus Schiller für die Durchführung der HPLC-Analysen.

Allen Kollegen des Instituts, insbesondere der AG Staph und allen Mitgliedern des European Graduate College.

Meinen Freunden Lars, Artur, Benni, Daniel und Thorsten für ihre Freundschaft.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Hans und Renate Kränzler für ihre Unterstützung.

Katja dafür, dass sie mehr als eine Kollegin ist.

Inhaltsangabe

1. Zusammenfassung	1
1.1. Summary.....	3
2. Einleitung.....	5
2.1. Der Genus <i>Staphylococcus</i>	5
2.2. Infektionen durch Staphylokokken.....	5
2.3. Biofilmbildung bei Staphylokokken.....	7
2.4. Streptogramin-Antibiotika.....	13
2.5. Subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen und ihre klinische Relevanz	16
2.6. Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
3. Material und Methoden.....	19
3.1. Materialien.....	19
3.1.1. Geräte	19
3.1.2. Chemikalien.....	20
3.1.3. Laborkits.....	20
3.1.4. Enzyme	21
3.1.5. Größenstandards für Gelelektrophoresen	21
3.1.6. DNA-Mikroarrays	22
3.1.7. Bakterienstämme	22
3.1.8. Medien.....	23
3.1.9. Lösungen und Puffer	24
3.1.10. Oligonukleotide	27
3.1.11. Antibiotika.....	29

3.2.	Methoden.....	30
3.2.1.	Biofilmnachweis in Polystyren-Mikrotiterplatten.....	30
3.2.2.	Erstellen von Wachstumskurven.....	30
3.2.3.	Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit (MHK).....	31
3.2.4.	Speziesbestimmung mit dem API-Staph-System.....	31
3.2.5.	Bestimmung der Mutationsfrequenz bei Staphylokokken.....	31
3.2.6.	Kultivieren von Staphylokokken unter anaeroben Bedingungen.....	32
3.2.7.	Isolierung von chromosomaler DNA aus Staphylokokken.....	33
3.2.8.	Phagentransduktion in <i>Staphylococcus aureus</i>	34
3.2.9.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
3.2.10.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	36
3.2.11.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel.....	36
3.2.12.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
3.2.13.	Sequenzierung von DNA.....	37
3.2.14.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Staphylokokken.....	38
3.2.15.	Überprüfung der RNA-Integrität.....	39
3.2.16.	Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA.....	39
3.2.17.	Hybridisierung von Mikroarrays.....	40
3.2.18.	Reverse Transcription (cDNA-Synthese) für quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	42
3.2.19.	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	43
3.2.20.	Bestimmen der intrazellulären ppGpp und GTP Konzentration.....	43

4. Ergebnisse..... 45

4.1.	Einfluss subinhibitorischer Synercid [®] -Konzentrationen auf das Wachstum und die Biofilmbildung von Staphylokokken.....	45
4.1.1.	Das Wachstum von Staphylokokken unter Einfluss von Synercid [®]	45
4.1.2.	Analyse der Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i>	47
4.1.3.	Analyse der Biofilmbildung von <i>S. aureus</i>	49

4.1.4.	Zusammenfassung 4.1	51
4.2.	Einfluss subinhibitorischer Synercid [®] -Konzentrationen auf das Transkriptom von Staphylokokken	52
4.2.1.	Transkriptionsanalysen bei <i>S. epidermidis</i>	52
4.2.2.	Transkriptionsanalysen bei <i>S. aureus</i>	61
4.2.3.	Zusammenfassung 4.2	69
4.3.	Nukleotid-Stoffwechsel und seine Rolle bei der Biofilmbildung von Staphylokokken	70
4.3.1.	Einfluss von extrazellulären Nukleotiden auf die Biofilmbildung von Staphylokokken	70
4.3.2.	Einfluss von Synercid [®] auf die Konzentration von intrazellulärem Guanosin-3`-5`-bisphosphat und Guanosintriphosphat (GTP).....	72
4.3.3.	Zusammenfassung 4.4	74
4.4.	Analyse der Frequenz von Punktmutationen bei <i>S. aureus</i> MA12	75
4.4.1.	Zusammenfassung 4.3	77
4.5.	Charakterisierung des ArcR-Regulons von <i>S. aureus</i>	78
4.5.1.	Wachstumsanalysen	79
4.5.2.	Biofilmbildung	81
4.5.3.	Transkriptionsanalysen.....	82
4.5.4.	Zusammenfassung 4.5	87

5. Diskussion **88**

5.1.	Das Wachstum von Staphylokokken unter Einfluss subinhibitorischer Synercid [®] -Konzentrationen	89
5.2.	Synercid [®] und seine Wirkung auf die Biofilmbildung von Staphylokokken.....	90
5.3.	Einfluss subinhibitorischer Synercid [®] -Konzentrationen auf die Transkription von <i>Staphylococcus epidermidis</i>	93
5.4.	Synercid [®] führt in <i>S. epidermidis</i> 567 durch Erhöhen der Konzentration an Zwischenprodukten des Purin-Stoffwechsels zu dessen verringerter Aktivität	95

5.5.	Der Abbau von Guanosin-3',5'-Bisphosphat (ppGpp) vermittelt eine verstärkte Bildung ribosomaler Proteine und führt zu einer erhöhten Konzentration an Metaboliten des Purin-Stoffwechsels	98
5.6.	Transporter, das YycGF Zweikomponenten-System und SsaA – mögliche Faktoren für die Biofilmbildung bei <i>S. epidermidis</i>	99
5.7.	Hypothese zur Synercid®-induzierten Biofilmbildung bei <i>S. epidermidis</i> 567	101
5.8.	Einfluss von subinhibitorischen Synercid®-Konzentrationen auf das Transkriptom von <i>S. aureus</i> MA12	103
5.9.	Bei <i>S. aureus</i> MA12 handelt es sich möglicherweise um einen Mutatorstamm	106
5.10.	Das ArcR-Regulon von <i>S. aureus</i>	107
5.11.	Ausblick	109
6.	Literatur	111
7.	Anhang	130
7.1.	<i>S. epidermidis</i> 567 Expressionsdaten	130
7.2.	<i>S. aureus</i> MA12 Expressionsdaten	147
8.	Lebenslauf	163
9.	Publikationsliste	164

1. Zusammenfassung

Staphylokokken sind in erster Linie Saprophyten, welche die Haut und Schleimhäute des Menschen besiedeln und dort eine wichtige Rolle für das Gleichgewicht der gesunden Mikroflora spielen. Gleichzeitig haben sie sich aber auch zu den häufigsten Verursachern nosokomialer Infektionen entwickelt. Vor allem *S. aureus* und *S. epidermidis* verursachen Erkrankungen, die von leichten Haut- und Wundinfektionen bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen wie Pneumonien, Sepsis oder Endokarditis reichen. Infektionen durch *S. epidermidis* treten dabei meist in Verbindung mit Fremdkörpern wie Kathetersystemen, künstlichen Gelenken und Herzklappen auf. In diesem Zusammenhang scheint vor allem die Fähigkeit, einen Biofilm auf diesen Fremdkörpern bilden zu können eine große Rolle für die Pathogenese zu spielen. Die Therapie von Staphylokokken-Infektionen wird zunehmend durch die ausgeprägte Antibiotikaresistenz dieser Erreger erschwert, die sich mittlerweile auch auf Reserveantibiotika wie Daptomycin, Synercid[®] (Quinupristin/Dalfopristin) oder Linezolid erstreckt. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass subinhibitorische Konzentrationen des Streptogramin-Antibiotikums Synercid[®] die Biofilmbildung in *S. epidermidis* induzieren. Darüber hinaus mehren sich die Hinweise auch bei anderen Bakterien, dass geringe Antibiotika-Konzentrationen, wie sie in natürlichen Habitaten wie zum Beispiel im Boden vorkommen, wichtige Signale bei der Kommunikation von Bakterien untereinander darstellen und möglicherweise eine Funktion bei der Modulation des Metabolismus im Kampf um Nährstoffe ausüben.

In dieser Promotionsarbeit sollte daher exemplarisch, mit Hilfe der erst seit kurzem zur Verfügung stehenden DNA-Mikroarray-Technik, der Effekt von subinhibitorischen Synercid[®]-Konzentrationen auf die globale Genexpression von *S. epidermidis* und *S. aureus* analysiert werden. Dabei stand vor allem die Wirkung auf die Biofilmbildung und die Identifikation neuer, an der Biofilmbildung beteiligter Komponenten im Mittelpunkt. Die Ergebnisse zeigen, dass subinhibitorische Synercid[®]-Konzentrationen bei *S. aureus*, im Gegensatz zu *S. epidermidis*, zu einer reduzierten Biofilmbildung führen. Bei beiden Arten ist jedoch die unterschiedliche Biofilmbildung durch eine ausgeprägte Veränderung der allgemeinen Genexpression begleitet. Vor allem war eine starke Induktion von Genen zu beobachten, die für Proteine des Translationsapparates kodieren. Außerdem waren Gene des Nukleotid-Stoffwechsels, der Aminosäure-Synthese und des Kohlenstoff-Metabolismus unterschiedlich reguliert. Des Weiteren konnte mit Hilfe von HPLC-Analysen sowohl bei *S. epidermidis* als auch bei *S. aureus* eine reduzierte Konzentration des Signalmoleküls

Guanosin-3`-5`-bisphosphat (ppGpp) festgestellt werden. ppGpp spielt vor allem bei der Kontrolle und Anpassung des Stoffwechsels an Wachstumsbedingungen, wie zum Beispiel das Nährstoffangebot, eine wichtige Rolle. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Inaktivierung der ribosomalen Proteine durch Synercid[®] die reduzierte ppGpp-Konzentration bedingt, was zu einer verstärkten Bildung ribosomaler Proteine führt und zum anderen den Zellstoffwechsel in einer Weise beeinflusst, der eine vermehrte extrazelluläre Polysaccharid-Synthese und damit Biofilmbildung ermöglicht.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beinhaltet die Charakterisierung des ArcR-Regulons in *S. aureus*. Bei ArcR handelt es sich um ein kürzlich in *S. aureus* identifiziertes putatives CRP/FNR ähnliches Protein, das den Transkriptionsaktivator des *arcABDCR*-Operons darstellt. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass *E. coli*, *P. aeruginosa* und *B. subtilis* über Proteine der FNR/CRP-Proteinfamilie verfügen, die beim Umstellen von aeroben auf anaerobe Bedingungen eine wichtige regulatorische Rolle spielen. Daher wurde vermutet, dass ArcR, als möglicher Sauerstoffsensoren bei der Biofilmbildung eine Rolle spielen könnte. Des Weiteren wurde durch die Transkriptionsanalysen bei *S. epidermidis* und *S. aureus* gezeigt, dass Gene des *arcABDCR*-Operons unter dem Einfluss von Synercid[®], also Biofilm-induzierenden bzw. reprimierenden Bedingungen, unterschiedlich exprimiert sind. Es konnte allerdings in dieser Arbeit keine Rolle des ArcR bei der Biofilmbildung bzw. eine Beeinflussung anderer Gene als dem *arcABDCR*-Operon nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Daten, dass die unterschiedliche Beeinflussung der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* und *S. aureus* sehr wahrscheinlich durch verschiedene Regulationswege des *ica*-Operons und/oder unterschiedliche katabolische Fähigkeiten bedingt werden. Die Ergebnisse belegen weiterhin, dass die Wirkung von Antibiotika weit über deren bekannte inhibitorische Effekte hinausgeht und vor allem den Stoffwechsel der Bakterien dramatisch beeinflusst. Die Konsequenzen dieser Befunde sowohl für das Verständnis von mikrobiologischen Konsortien in Ökosystemen als auch für die Anwendung von Antibiotika in der Medizin sind noch nicht abzusehen, bieten jedoch eine interessante Grundlage für weitere experimentelle Arbeiten.

1.1. Summary

Staphylococci are common inhabitants of the human skin and mucosal membranes, as well as the most prevalent causes of nosocomial infections. The infections mainly caused by *S. aureus* and *S. epidermidis* range from mild skin infections to life-threatening infections, like pneumonia, bacteremia or endocarditis. Especially *S. epidermidis* is the primary pathogen involved in medical device associated infections. In this context, the ability to form a biofilm seems to be crucial. The prevalent antibiotic resistances of Staphylococci poses an increasing challenge to medicine in recent years. The remaining effective antibiotics to treat staphylococci infections are last resort antibiotics, such as daptomycin, Synercid[®] and linezolid. However, staphylococci isolates with intermediate and high resistances towards these antibiotics have already been reported. There are several lines of evidence that, beside their killing activity, antibiotics have a modulating effect on the metabolism of bacteria when applied in low concentrations. Hence, the impact of this natural compounds on bacteria have to be analysed in more detail in order to provide insights into their mode of action and how bacteria respond to these compounds.

Former studies showed, that biofilm formation of staphylococci is influenced by environmental factors, such as temperature, osmolytic stress and the availability of glucose or oxygen, as well as by subinhibitory concentrations of antibiotics. In this context it was shown, that low concentrations of tetracycline, erythromycin and Synercid[®] induce biofilm formation of *S. epidermidis*. The aim of this study was to investigate the effect of subinhibitory concentrations of Synercid[®] on biofilm formation and global gene expression of *S. epidermidis* and *S. aureus*. For this purpose DNA microarrays were used to identify and characterise the mechanisms by which Synercid[®] alters biofilm formation. Furthermore, this studies should lead to the identification of new factors involved in biofilm formation of staphylococci.

The data presented here, demonstrate that subinhibitory concentrations of Synercid[®] reduce biofilm formation in *S. aureus*, while inducing it in *S. epidermidis*. The altered biofilm formation is accompanied by a strong impact on the overall gene expression of both species. Especially the expression of genes encoding proteins of the translational apparatus were increased. In addition, genes encoding proteins of the nucleotide metabolism, amino acid biosynthesis and carbohydrate utilisation were affected. Furthermore, HPLC analyses revealed a decreased concentration of the small nucleotide signal molecule guanosine-3`-5`-bisphosphate (ppGpp) in *S. aureus* and *S. epidermidis* under the influence of Synercid[®].

ppGpp is involved in the control and adaptation of cellular metabolism to changing growth conditions. We hypothesise that the reduced concentrations of ppGpp is due to the inactivation of ribosomal proteins, as a result of Synercid[®] binding, and mediates on the one hand the increased production of proteins of the translation apparatus and on the other hand effects the cellular metabolism in a way that enable the cells to produce more extracellular polysaccharides resulting finally in an enhanced biofilm formation.

Additionally, the ArcR regulon of *S. aureus* has been characterised in this study. ArcR is a putative Crp/Fnr protein that activates the transcription of the *arcABCDR* operon. Recent studies showed that members of the Fnr/Crp protein family are involved in the adaptation from aerobic to anaerobic conditions in *E. coli*, *P. aeruginosa* and *B. subtilis*. Therefore it was speculated, that ArcR, as a potential oxygen sensor, is involved in biofilm formation of staphylococci. Furthermore, the transcription analyses revealed a changed expression of the *arcABCDR* operon under the influence of Synercid[®]. However, we were neither able to detect an involvement of ArcR in biofilm formation, nor a regulating effect of ArcR on other genes beside the *arcABCDR* operon.

In summary, the data presented here show that the differential effect of Synercid[®] on biofilm formation of *S. epidermidis* and *S. aureus* is most likely due to a differential regulation of the *ica* operon and/or different catabolic abilities. Moreover the data suggest that the effect of antibiotics is more than the sole interaction with a target structure, but influence gene expression and metabolism of bacteria more globally. The consequences of these findings for the comprehension of the interplay in microbial communities as well as for the clinical use of antibiotics is far from being understood. However, the results of this work might provide an interesting basis for future experimental work elucidating these interferences.

2. Einleitung

2.1. Der Genus *Staphylococcus*

Staphylokokken sind Gram-positive, fakultativ anaerobe und unbewegliche Kokken mit einem Durchmesser von circa 0,8 – 1µm. Sie sind nicht sporenbildend und ihr Genom weist einen GC-Gehalt von 30 – 35% auf. Bisher zählten Staphylokokken zur Familie der Micrococcaceae, werden aber seit kurzem der Familie der *Staphylococcaceae* zugeordnet (1). Die meisten Arten sind Besiedler der Haut und der Schleimhäute von Säugetieren und Vögeln. Die Gattung wird in die Koagulase-positive Spezies *S. aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) unterteilt. Des Weiteren kann zwischen Novobiocin-resistenten und -empfindlichen KNS unterschieden werden. Für den Menschen relevant sind neben *S. aureus*, die Koagulase-negativen Staphylokokken *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* und *S. schleiferi*. Bis in die 80iger Jahre des letzten Jahrhunderts galt *S. aureus*, ein häufiger Verursacher von Wundinfektionen, als einziger humanpathogener Vertreter der Gattung. Seit einigen Jahren haben sich allerdings KNS, insbesondere *S. epidermidis*, als häufige Verursacher von nosokomialen Infektionskrankheiten etabliert (18, 86).

2.2. Infektionen durch Staphylokokken

Die Koagulase-negativen Staphylokokken stellen einen wesentlichen Bestandteil der menschlichen Haut- und Schleimhautflora dar, welche bei immunkompetenten Menschen ein nur geringes pathogenes Potential besitzen (85). Obwohl bereits 1967 von Pulverer und Halswick (140) gezeigt wurde, dass KNS verschiedene Infektionen verursachen können, wurden sie lange nur als Kontaminanten von klinischen Isolaten betrachtet. Heute wird einigen KNS, wie *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* und *S. haemolyticus*, eine wichtige Rolle als opportunistische Humanpathogene zugesprochen (79). Dies scheint vor allem mit der zunehmenden Zahl immunsupprimierter Patienten und der vermehrten Verwendung von Metallen und Kunststoffen in der modernen Medizin zusammenzuhängen. Besonders Infektionen durch *S. epidermidis* treten in Verbindung mit Fremdkörpern wie Kathetersystemen, künstlichen Gelenken und Herzklappen auf (86, 145).

Bis heute wurden nur sehr wenige Pathogenitätsfaktoren bei *S. epidermidis* identifiziert (70). Da Biofilm-positive Stämme häufiger bei Infektionen auftreten als Biofilm-negative (187), scheint die Pathogenität von *S. epidermidis* vor allem durch die Fähigkeit Biofilme bilden zu können bedingt zu sein. Dies konnte durch In-vivo-Versuche bei Ratten und Mäusen bestätigt werden (146, 147).

S. aureus ist zum einen, wie *S. epidermidis*, ein normaler Bestandteil der Haut- und Schleimhautflora von 20 – 30% aller Menschen und zum anderen ein bedeutendes Pathogen. Die von *S. aureus* verursachten Infektionen reichen von leichten Haut- und Wundinfektionen über Blutvergiftung und Lungenentzündung bis hin zu schweren Infektionen der inneren Organe (101). Die Virulenz von *S. aureus* wird durch die Kombination einer Vielzahl verschiedener Komponenten der Zelloberfläche sowie extrazellulärer Proteinen und Toxinen verursacht (75, 139). Bisher wurden insgesamt über 40 verschiedene virulenzassoziierte, extrazelluläre und oberflächenassoziierte Proteine identifiziert. Im Gegensatz zu *S. epidermidis* scheint die Biofilmbildung für die Pathogenität von *S. aureus* nur eine geringe Rolle zu spielen.

Die unter Staphylokokken stark verbreiteten Antibiotikaresistenzen haben die Medizin in den letzten Jahren vor immer größere Herausforderungen gestellt. Heute weisen bereits 21% der in deutschen Krankenhäusern isolierten *S. aureus* Stämme eine Resistenz gegen Methicillin auf (94). Weltweit gehören Methicillin-resistente Staphylokokken zu den häufigsten Verursachern von nosokomialen Infektionen (24, 86, 145). Ihre Resistenz wird durch die veränderte Form des Penicillinbindepoteins 2, dem PBP2' oder PBP2a, vermittelt. Dieses wird von *mecA* kodiert, das innerhalb einer als *mec*-DNA bezeichnete, 30-50kb großen Region lokalisiert ist. Diese wurde bisher ausschließlich bei Methicillin-resistenten Staphylokokken nachgewiesen (67) und ist Bestandteil eines mobilen genetischen Elements, welches als *Staphylococcal-chromosome-mec* (SCC*mec*) bezeichnet wird (76, 82). Bis heute wurden fünf SCC*mec*-Haupttypen beschrieben (4, 68, 77). Dabei ist besonders besorgniserregend, dass viele MRSA-Stämme über zusätzliche Resistenzen gegen zahlreiche weitere Stoffklassen von Antibiotika verfügen (68).

Zur Therapie von Infektionen, die durch resistente Staphylokokken verursacht werden, wird seit über 30 Jahren Vancomycin verwendet. Allerdings wurden schon vor einigen Jahren die ersten Vancomycin-resistenten MRSA Stämme bei Patienten isoliert (2, 66, 67, 126). Deren Resistenz wird entweder durch eine stark verdickte Zellwand (59, 165), oder durch das *vanA*-Gen aus Enterokokken (2, 126) vermittelt. Vancomycin-resistente MRSA Stämme stellen eine besonders große Bedrohung dar, da nur wenige Antibiotika zur Verfügung stehen, gegen die diese Stämme noch empfindlich sind (3). Daher müssen immer häufiger Reserveantibiotika wie Linezolid, Synercid[®] oder Daptomycin (23, 102) für eine Therapie verwendet werden. Dies hat dazu geführt, dass auch hier bereits bestimmte Stämme Resistenzen gegen diese Antibiotika entwickelt haben (65, 83, 113, 173). Dadurch wird zum einen verdeutlicht wie schnell Staphylokokken Resistenzen entwickeln können (80, 138), und zum anderen wie dringend notwendig die Entwicklung neuer Antibiotika geworden ist. Des Weiteren scheint es unerlässlich den Einfluss von Antibiotika auf die Bakterien genauer zu untersuchen, da es immer mehr Hinweise darauf gibt, dass Antibiotika bereits in subinhibitorischen Konzentrationen einen großen Einfluss auf die Genexpression und den Metabolismus von Bakterien ausüben (57, 58, 64, 96, 130, 150, 155, 159, 186). Außerdem könnten dadurch die Mechanismen, welche zu der schnellen Resistenzentwicklung bei Staphylokokken führen, identifiziert werden. Dass der Einfluss eines Antibiotikums auf die Genexpression möglicherweise für eine Therapie hinderlich sein kann, verdeutlicht eine Arbeit von S. Rachid *et al.* In dieser wurde gezeigt, dass Antibiotika, wie zum Beispiel das Reserveantibiotikum Synercid[®], in subinhibitorischen Konzentrationen die Biofilmbildung von *S. epidermidis* induzieren kann (142).

2.3. Biofilmbildung bei Staphylokokken

Als Biofilm bezeichnet man eine auf einer Oberfläche haftende Bakterienkolonie, die in eine selbst gebildete extrazelluläre Matrix eingebettet ist (35). In der Medizin spielen Biofilme eine besondere Rolle, da die mit ihnen assoziierte Bakterien besonders tolerant gegenüber Antibiotika und Desinfektionsmittel sind. Zudem stellt ein Biofilm einen guten Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes dar (15, 22, 42, 111, 131, 154). Diese Eigenschaften tragen dazu bei, dass Infektionen mit biofilmbildenden Bakterien häufig nur sehr schwer zu therapieren sind.

Staphylokokken können auf fast allen, in der modernen Medizin verwendeten Materialien einen Biofilm bilden (55). Dieser besteht aus mehreren kompakten Zellschichten, die von einer extrazellulären Matrix, die häufig aus einem Polysaccharid besteht, umhüllt sind (115). Bei der Biofilmbildung kann man zwei Phasen unterscheiden (Abb. 2.1.): Die schnelle primäre Adhäsion einzelner Zellen an eine Oberfläche und die darauf folgende Proliferation und Akkumulation zu einem mehrschichtigen Biofilm (103).

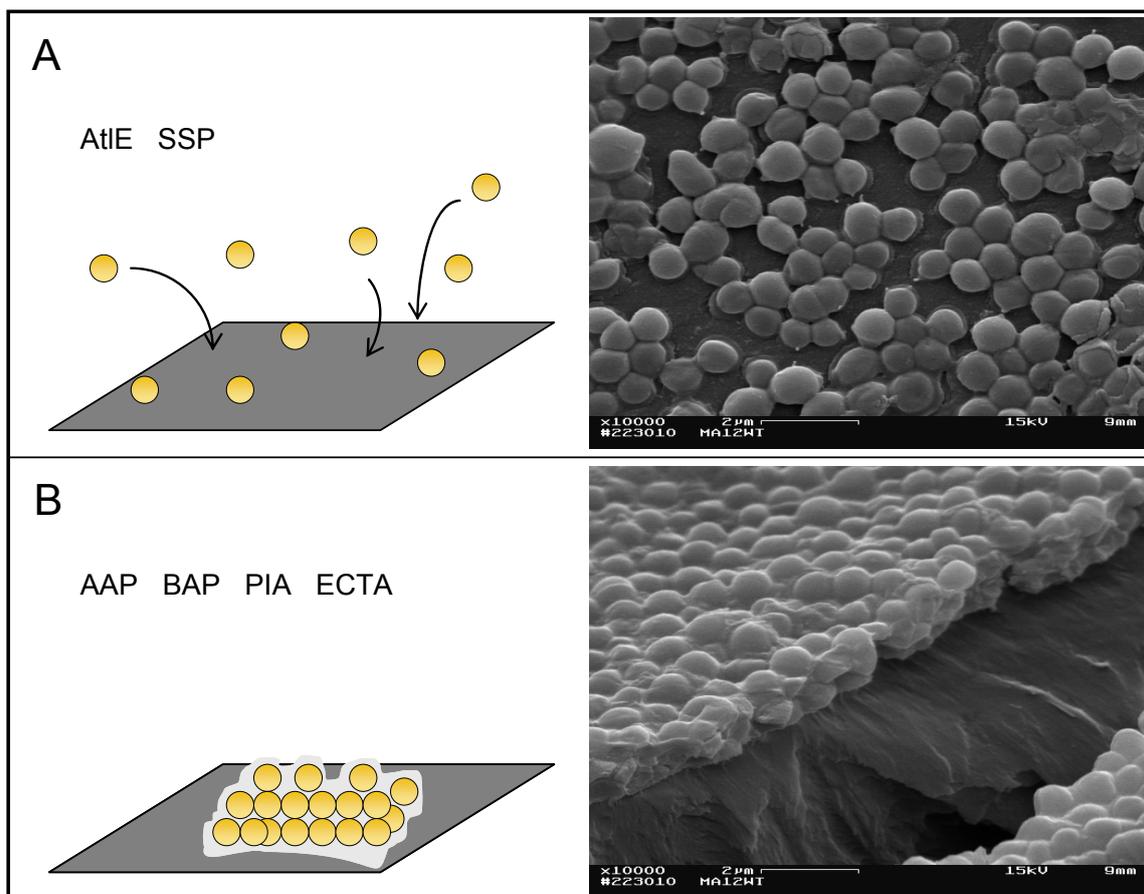


Abb. 2.1: Die zwei Phasen der Biofilmbildung von Staphylokokken. **A)** Primäre Adhäsion einzelner Zellen an eine Oberfläche als schematische Darstellung und REM-Aufnahme von *S. aureus*. Daran beteiligte Proteine sind das *autolysin Protein* AtIE sowie die *staphylococcal surface* Proteine SSP-1 und SSP-2. **B)** Schematische Darstellung und REM eines mehrschichtigen Biofilms von *S. aureus*. Bei der Bildung des Biofilms spielen das *accumulation associated protein* AAP, das *biofilm associated protein* BAP, sowie das *polysaccharide intercellular adhesin* PIA und extrazelluläre Teichonsäuren (ETCA) eine zentrale Rolle.

Bei der primären Adhäsion spielen sowohl unspezifische Faktoren, wie Ladung und Oberflächenhydrophobizität, als auch spezifische, wie zum Beispiel oberflächenassoziierte Proteine und Umwelt- bzw. Wirtsfaktoren, eine Rolle. Bisher konnte den Proteinen *staphylococcal surface protein* SSP-1 und -2 sowie dem *autolysin protein* AtlE eine Beteiligung bei diesem ersten Schritt der Biofilmbildung nachgewiesen werden (61, 103, 167, 178). Die Gene, welche für die Proteine SSP-1 und -2 kodieren, konnten allerdings bis heute nicht identifiziert werden. Mit Hilfe von Proteinen und Polysacchariden, kommt es im zweiten Schritt, zur Ausbildung des mehrschichtigen Biofilms (54). Als Proteine wurden in diesem Zusammenhang bisher das *accumulation associated protein* Aap und das *biofilm associated protein* Bap beschrieben (32, 61, 72).

Bei dem Aap handelt es sich um ein 140kD Protein, das sowohl zellwandassoziiert als auch extrazellulär auftritt. Die Mutation des Aap führt bei Staphylokokken zu einem Defekt in der Akkumulation auf Glas- und Plastikoberflächen (61, 72). Beim dem *S. epidermidis* Stamm RP62A konnte gezeigt werden, dass Aap sowohl bei planktonischen wie auch biofilmbildenden Bakterien in der Zellwand vorhanden ist. Allerdings wurde es bisher nur bei biofilmbildenden Staphylokokken auch extrazellulär nachgewiesen (72, 161). Außerdem konnte durch spezifische Antikörper gegen das Aap die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* RP62A abgeschwächt, und somit dessen Rolle bei der Biofilmbildung bestätigt werden (161). Bap, ein Zellwand assoziiertes Protein von *S. aureus*, ist sowohl beim Anheften an Oberflächen als auch bei der Akkumulation zu einem Biofilm beteiligt (32). Das *bap* wurde bisher in 5% der von Rindern isolierten *S. aureus* Stämmen, aber in noch keinem Humanisolat gefunden (54). Alle Stämme, die über Bap verfügen zeichnen sich durch eine besonders starke Adhäsion und Biofilmbildung aus. In einem Infektionsversuch mit Mäusen wurde gezeigt, dass Bap die Entwicklung chronischer Infektionen fördert (32). Bei *S. epidermidis* konnte ein zum Bap homologes Protein identifiziert werden, dass ebenfalls an der Biofilmbildung beteiligt ist. Dieses wurde als *Bap homologue protein* (Bhp) (17) bzw. SesD bezeichnet (49). Weder bei Aap noch bei Bap bzw. Bhp konnte die genaue Funktion bisher geklärt werden. Es wird angenommen, dass beide Proteine eine Rolle bei der interzellulären Adhäsion spielen, was möglicherweise durch die Assoziation der Proteine mit dem *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA), einer Komponente der extrazellulären Matrix, vermittelt wird (17).

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Von G. D. Christensen konnte das Schleim assoziierte Antigen SSA isoliert werden (28). Dieses wurde allerdings erst später von D. Mack genauer charakterisiert und als *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA) bezeichnet (5, 105). Demnach handelt es sich bei PIA um ein lineares, β -1,6-verknüpftes Glukosaminoglykan, das zum einen an der Hämagglutination von Erythrozyten beteiligt ist (40, 107) und zum anderen die Adhärenz der Bakterien untereinander vermittelt (106). In der Regel scheint die extrazelluläre Matrix nach heutigem Kenntnisstand neben Proteinen hauptsächlich aus zwei Kohlenstoffkomponenten, dem *extracellular teichoic acid* (EC TA) und dem *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA), deren Verhältnis in Abhängigkeit zu den Wachstumsbedingungen variiert (148), zu bestehen. Es kürzlich wurde die extrazelluläre Matrix von klinischen *S. epidermidis*, *S. warneri* und *S. lugdunensis* Stämmen analysiert, bei denen kein PIA sondern ausschließlich Teichonsäuren (TA) und Proteine enthalten waren (90). Dies deutet entgegen der bisherigen Annahme, dass PIA essentiell für die Biofilmbildung bei Staphylokokken ist (105), darauf hin dass es auch PIA unabhängige Mechanismen gibt. Damit übereinstimmend wurden zwei PIA unabhängige Mechanismen der Biofilmbildung bei Staphylokokken identifiziert. Rhode *et al.* konnten zeigen, dass *S. epidermidis* einen Biofilm über ein verkürztes AAP-Protein bilden kann (144). Des Weiteren wurde bei einer *S. aureus arlRS*-Mutante gezeigt, dass diese unter bestimmten Wachstumsbedingungen einen verstärkten, PIA-unabhängigen Biofilm bildet (168). Dennoch scheint aber der PIA-abhängige Biofilm der gängigste Mechanismus der Biofilmbildung bei Staphylokokken zu sein.

Die Synthese des PIA ist direkt mit der Expression des *intercellular-adhesin* Operon (*ica*-Operon) verbunden. Dieses besteht aus den vier Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* (Abb.2.2.) (48, 62, 103). Bei *IcaA* handelt es sich um ein Transmembranprotein mit einer Acetylglukosaminyl-Transferase-Aktivität, die durch Koexpression mit *icaD* optimiert werden kann. Daher wird vermutet, dass es sich bei *IcaD* um ein Chaperon handelt, welches zum einen die Faltung und Insertion von *IcaA* in die Membran vermittelt und zum anderen eine Verbindung zwischen *IcaA* und *IcaC* herstellt. Bei *IcaC* handelt es sich um ein hydrophobes integrales Membranprotein, das möglicherweise die Translokation des PIA über die Zellmembran vermittelt (48, 54). Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten des *IcaB* zu *NodB* von *Rhizobium*, das eine Deacetylase darstellt, wurde angenommen, dass das von *icaB* kodierte Protein extrazellulär eine Deacetylierungsreaktion katalysiert (81). Diese wurde

schließlich durch eine Arbeit von C. Vuong *et al.* bestätigt, in der gezeigt wurde, dass PIA in einer IcaB-Mutante von *S. epidermidis* nicht deacetyliert wird (181). Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Mutante in einem In-vivo-Versuch mit Mäusen weniger virulent war als der WT. Dies lässt darauf schließen, dass die enzymatische Modifizierung für die Virulenz selbst eine Rolle spielt.

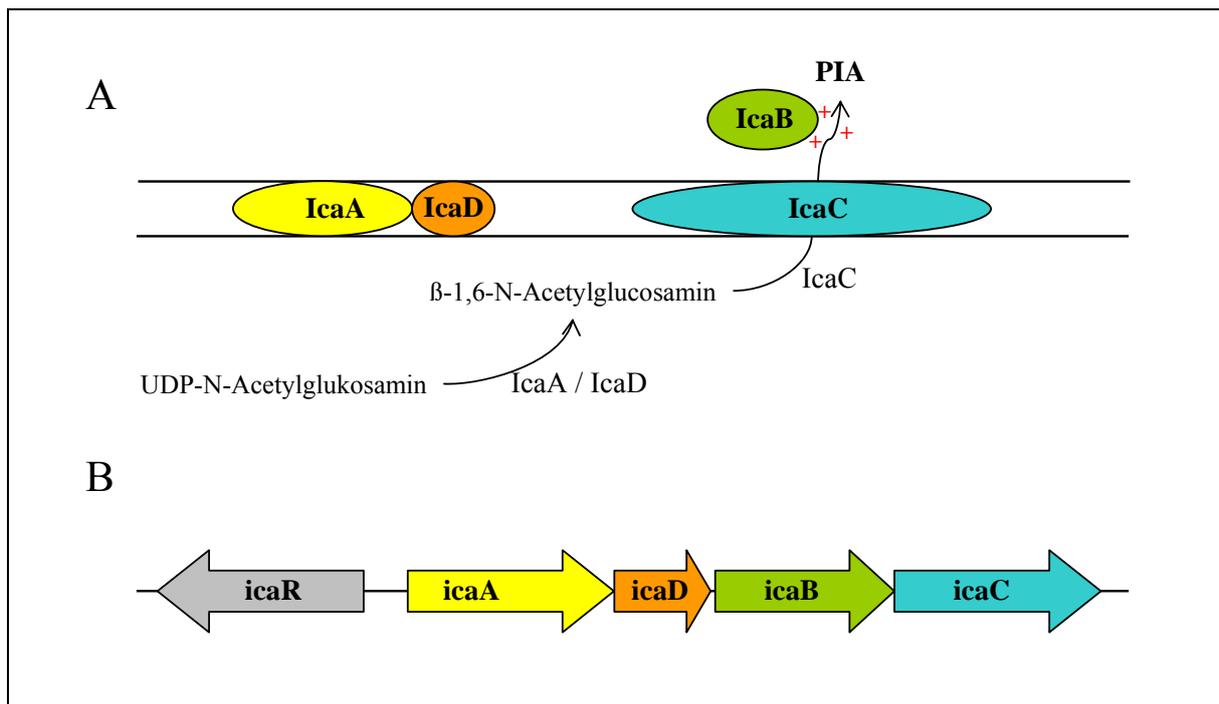


Abb. 2.2: **A)** Schema der PIA-Biosynthese. IcaA und IcaD synthetisieren β -1-6-verknüpfte Oligomere aus UDP-N-Acetylglucosamin; IcaC transportiert diese über die Membran und verknüpft sie zu langen Oligomeren aus bis zu 130 Einheiten; IcaB katalysiert extrazellulär die Deacetylierung von PIA, wodurch positive Ladungen eingefügt werden. **B)** Struktur des *ica*-Operons von Staphylokokken einschließlich dem *icaR*, welches den Repressor des Operons kodiert.

Die Regulation der Biofilmbildung ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es wurden allerdings schon eine Reihe von Regulatoren, welche die Biofilmbildung beeinflussen, identifiziert (54, 104). Zu diesen gehören vor allem IcaR, SigB und SarA (Abb. 2.3). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die Biofilmbildung, je nach Wachstumsbedingungen, über verschiedene Regulationswege induziert werden kann (87, 88). Außerdem ist bekannt, dass die Biofilmbildung von Staphylokokken über eine Vielzahl von Umweltfaktoren, wie

Osmolarität, Ethanol, Glukose, Verfügbarkeit von Sauerstoff, Temperatur sowie von Antibiotika beeinflusst wird (30, 31, 33, 142). Eine Reihe von Daten deuten aber darauf hin, dass Glukose weniger die *ica*-Expression induziert, sondern vielmehr als Substrat für die PIA-Synthese benötigt wird (33, 180). In diesem Zusammenhang wurde von S. Dobinsky die Hypothese aufgestellt, dass durch einen Mangel an Vorläufermolekülen und/oder Energie es nicht zur Bildung des PIA kommt, auch wenn alle Enzyme für dessen Synthese gebildet werden (33).

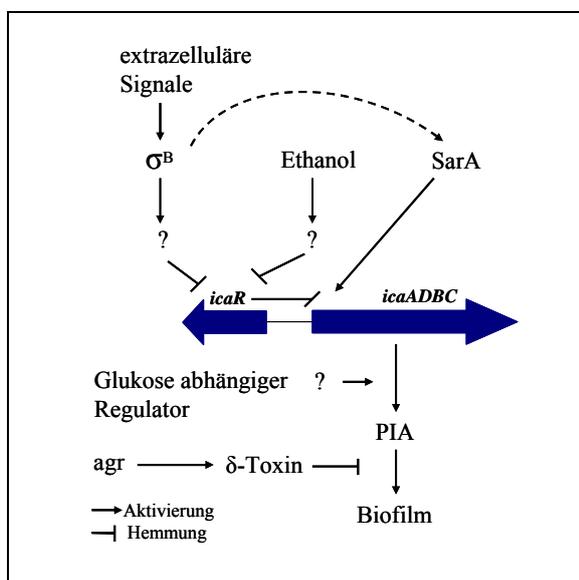


Abb. 2.3: Regulationsschema der *ica*-Expression und PIA-Synthese in Staphylokokken. (Nach Tormo *et al.* (171).

Bei *S. epidermidis* wurde der Effekt von Umweltsignalen auf die Transkription des *ica*-Operons direkt durch die Fusion des *ica*-Promotors mit dem *lacZ* Gen von *E. coli* untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass hohe Temperaturen, osmotischer Stress sowie subinhibitorische Konzentrationen von Tetracyclin, Erythromycin und Synercid[®] die *ica*-Promotoraktivität erhöhen (141, 142). Es konnte aber bisher nicht geklärt werden, über welchen Mechanismus es jeweils zu der Induktion der Biofilmbildung kommt. Man kann vermuten, dass bei manchen dieser Umweltsignale eine generelle Stressantwort zur Induktion der Biofilmbildung führt. Allerdings scheint dies im Falle des Antibiotika-induzierten Biofilms nicht sehr wahrscheinlich, da man dies bisher nur bei Tetracyclin, Erythromycin und Synercid[®], nicht aber bei anderen Translationsinhibitoren feststellen konnte (142).

Synercid® ist eines der wenigen noch verfügbaren Reserveantibiotika gegen multiresistente Staphylokokken, welches *in vitro* eine besonders starke Induktion der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* verursacht (142). Daher ist es auch von Interesse klinische Situationen, bei welchen geringe Konzentrationen des Antibiotikums eventuell die Biofilmbildung verstärken könnten, zu untersuchen.

2.4. Streptogramin-Antibiotika

Streptogramin-Antibiotika sind Verbindungen, die von *Streptomyces pristinaespiralis* gebildet werden. Die Familie besteht aus mehrere Klassen von Antibiotika. Dazu gehören Mikamycine, Pristinamycine, Oestreomycine und Virginamycine (29). Streptogramine werden in zwei Untergruppen, Typ-A und B, unterteilt. Beide strukturell nicht verwandten Typen werden gleichzeitig vom selben Bakterium, in einem Verhältnis von circa 70:30, gebildet (134). Sie binden, ebenso wie Makrolide, Lincosamide und Thiopeptide, an die 50S Untereinheit der Ribosomen wodurch sie die Protein-Translation inhibieren. Für sich allein wirken Streptogramine beider Typen bakteriostatisch. Eine Besonderheit von Streptograminen ist, dass sie in Kombination synergistisch und dadurch bakterizid wirken (177).

Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, binden Typ-A Streptogramine an dem Peptidyl-Transferasezentrum von Ribosomen, wodurch die Bindung von tRNA-Molekülen verhindert wird. Außerdem kommt es zu Konformationsänderungen der Untereinheiten, was die Aktivität der Typ-B Streptogramine bis zu 100fach erhöht. Typ-B Streptogramine verhindern die Verlängerung von Peptidketten, so dass ein Ribosom, wenn überhaupt, nur sehr kurze Polypeptidketten synthetisieren kann (177).

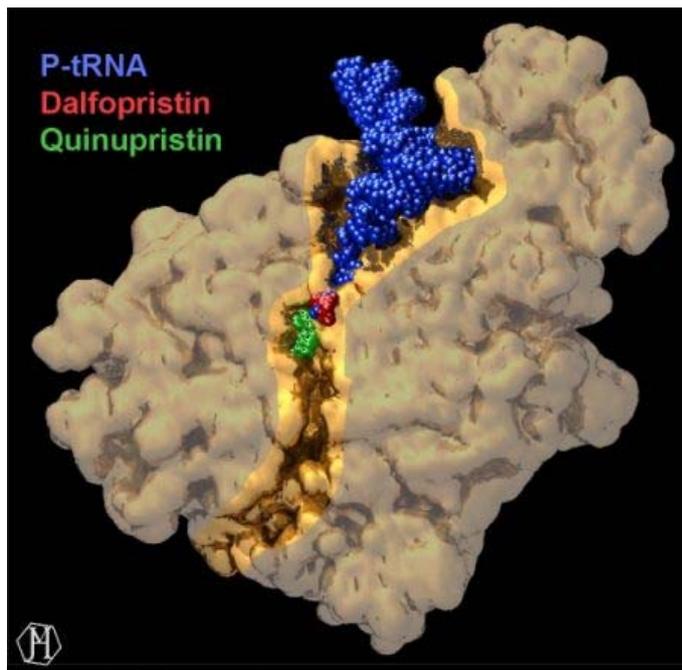


Abb. 2.4: Oberflächen-Darstellung einer „aufgeschnittenen“ 50S ribosomalen Untereinheit. Die Streptogramin Antibiotika Dalfopristin und Quinupristin binden am Eingang und oberen Ende des ribosomalen Tunnels. Um den Einfluss von Dalfopristin auf die korrekte Bindung der Peptidyl-tRNA (P-tRNA) zu verdeutlichen wurde das Modell einer P-tRNA gedockt. Ein Überlappen der Moleküle ist eindeutig erkennbar. Nach Mukhtar *et al.* (122).

Obwohl Streptogramine bereits 1950 entdeckt wurden, kamen sie in der Humanmedizin lange Zeit kaum zum Einsatz. Erst das Auftreten von Antibiotika-resistenten Bakterien, vor allem der Vancomycin-resistenten Enterokokken, in den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts hat das Interesse von Pharmaunternehmen an Streptograminen geweckt (122). Dies hat unter anderem zur Entwicklung der semisynthetischen Streptogramine Dalfopristin (Typ-A) und Quinupristin (Typ-B), aus Pristinamycin IA bzw. IIA geführt (Abb.2.5). Durch die Kombination beider in einem Verhältnis von 7:3 entstand das Antibiotikum Synercid[®], welches 1999 in den USA als Medikament gegen Vancomycin-resistente *Enterococcus faecium* sowie gegen *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* zugelassen wurde (63).

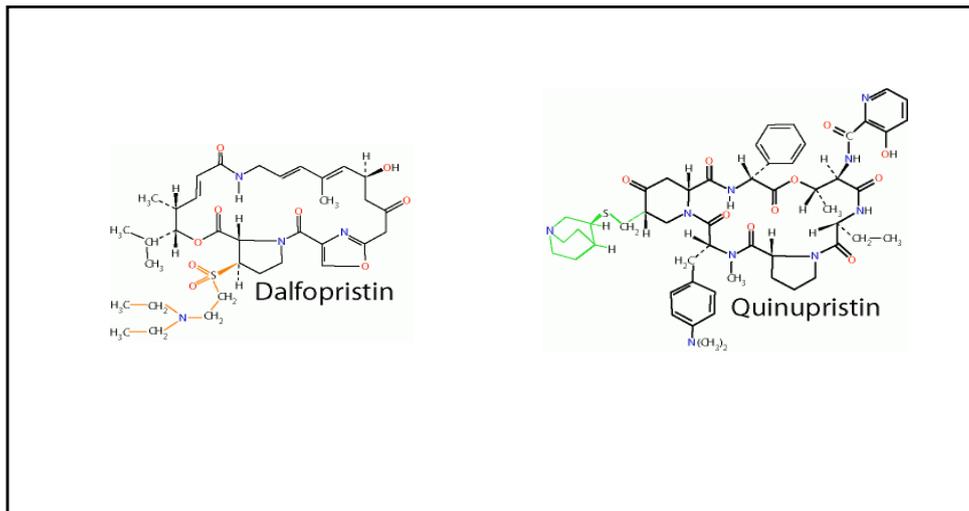


Abb. 2.5: Strukturformel der semisynthetischen Streptogramine Dalfopristin und Quinupristin. Die Unterschiede zu Pristinamycin sind in orange bzw. grün dargestellt.

Nähere Untersuchungen haben ergeben, dass Synercid[®] gegen die meisten Gram-positiven Bakterien, wie Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken, einschließlich multiresistenter Stämme, wirksam ist (16). *Enterococcus faecalis* ist allerdings, vermutlich durch die Efflux-Pumpe Lsa, resistent gegen Synercid[®] (157). Außerdem sind auch Gram-negative Bakterien, wie *Moraxella catarrhalis*, *Legionella ssp.*, *Mycoplasma ssp.*, *Neisseria ssp.* und *Haemophilus influenzae* gegen die Kombination aus Dalfopristin und Quinupristin empfindlich (23, 157). Dieses außergewöhnlich breite Spektrum macht Synercid[®] zu einem sehr potenten Reserveantibiotikum gegen lebensbedrohliche Infektionen mit multiresistenten Bakterien.

Man geht davon aus, dass durch den synergistischen Effekt zweier strukturell nicht verwandter Komponenten (Dalfopristin und Quinupristin), die Entstehung von Resistenzen bedeutend erschwert ist (84). Es wurden aber bereits Bakterien mit einer Unempfindlichkeit gegen eine der beiden Komponenten beschrieben (Tab. 2.1). Die Entwicklung dieser Resistenzen könnte mit dem starken Einsatz von Streptograminen, vor allem Virginiamycin, in der Landwirtschaft zusammenhängen (60). Resistenzen gegen Quinupristin entstehen zum einen durch die Methylierung der 23S rRNA durch Angehörige der Erythromycinresistenz-Methylase (*erm*) Gen-Klasse und zum Anderen durch die Linearisierung des Hexadepsipeptidrings durch eine spezifische Lyase (98, 100).

Dalfopristin-Resistenzen können durch enzymatische Inaktivierung des Streptogramins entstehen und die Wirksamkeit von Synercid[®] dramatisch reduzieren. Diese Inaktivierung erfolgt durch Virginiamycin-Acetyltransferasen (83). Des Weiteren wurde von B. Malbruny gezeigt, dass bei *Staphylococcus aureus* Mutationen im ribosomalen Protein L22 zur Unempfindlichkeit gegen Synercid[®] führen, indem Konformationsänderungen der Untereinheit und somit der synergistische Effekt der beiden Komponenten verhindert wird (113).

Streptogramin Gruppe	Gene	Resistenzmechanismus
Typ-A (Dalfopristin)	<i>vgaA, vgaB</i>	ATP-Bindeprotein
	<i>vatA, vatB, vatC</i>	Acetyltransferase
Typ-B (Quinupristin)	<i>msrA, msrB</i>	ATP-Bindeprotein
	<i>vgbA, vgbB</i>	Lyase
	<i>ermA, ermB, ermC</i>	rRNA-Methylase

Tab. 2.1 : Gene die bei Staphylokokken Resistenzen gegen Streptogramine vermitteln (65).

2.5. Subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen und ihre klinische Relevanz

Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze produzieren eine Vielzahl von organischen Molekülen mit verschiedensten biologischen Aktivitäten, deren natürliche Funktionen noch weitestgehend unbekannt sind (53). Von diesen Molekülen sind Antibiotika die am besten untersucht und ihre Verwendung für die Therapie von Infektionskrankheiten hat die Medizin seit 1940 revolutioniert. Es wird allgemein angenommen, dass die meisten dieser Moleküle mit antibiotischer Aktivität eine wichtige Rolle beim Konkurrenzkampf zwischen Mikroorganismen spielen. Allerdings besitzen einige Antibiotika noch weitere biologische Aktivitäten und es wird vermutet, dass sie in geringen Konzentrationen eventuell auch als Signale zum Modulieren des Metabolismus von Bakterien dienen (132, 183).

In der Medizin spielen subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen eine wichtige Rolle, da es während einer Therapie immer wieder zum Abfallen der Konzentrationen im Körper kommt. Dies hängt vor allem von der Pharmakokinetik des Antibiotikums ab (119). Darunter versteht man dessen Eigenschaften bezüglich Adsorption, Verteilung, Abbau und Inaktivierung In-vivo. Diese Eigenschaften unterscheiden sich vor allem bei Antibiotika verschiedener Klassen, allerdings kann es auch innerhalb einer Klasse durchaus Unterschiede bezüglich der Kinetik geben (158). Bei einer Therapie versucht man bereits diese Faktoren, die sich allerdings nur schwer bestimmen lassen, zu berücksichtigen. In Tierversuchen wurde die Kinetik von Antibiotika schon relativ gut untersucht, allerdings ist man beim Menschen auf die Untersuchung von Blut bzw. Serum, Urin und möglicherweise einzelnen Gewebeprobe beschränkt. Außerdem stimmen Konzentrationen, wie sie zum Beispiel während einer Therapie im Serum bestimmt werden, möglicherweise nicht mit denen am Infektionsherd überein (21). Wie stark sich die Konzentration eines Antibiotikums im Serum von der im Gewebe unterscheidet, hängt vor allem von dessen Eigenschaften bezüglich der Diffusion durch Gewebe, zellulärer Transportmechanismen, Fettlöslichkeit und der Bindung an Proteine ab (119).

Es konnte bereits bei einer Reihe von Bakterien gezeigt werden, dass Antibiotika wie Clindamycin oder Methicillin in subinhibitorischen Konzentrationen die Bildung von Virulenzfaktoren, wie das Alpha-Toxin von *S. aureus*, zum Teil stark beeinflussen (57, 58, 64, 96, 130, 150, 155, 159, 186). Des Weiteren ist bekannt, dass unter anderem subinhibitorische Konzentrationen des Reserveantibiotikums Synercid[®] die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* induzieren (142). Da man während einer Therapie das Absinken der Konzentration des Antibiotikums unter die minimale Hemmkonzentration (MHK) vermutlich nicht verhindern kann, ist es umso wichtiger, den Einfluss solcher Konzentrationen auf die Bakterien genauer zu untersuchen. Durch Techniken wie DNA-Mikroarrays und 2D-Gelelektrophorese hat man mittlerweile Werkzeuge zur Hand, die es ermöglichen, den Einfluss von Antibiotika auf die Transkription und Translation von Bakterien auf einer globalen Ebene zu untersuchen.

2.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Staphylokokken stellen durch ihre Fähigkeit einen Biofilm bilden zu können und ihre ausgeprägte Antibiotikaresistenz ein großes medizinisches Problem dar. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Biofilmbildung bei Staphylokokken durch eine Vielzahl von Faktoren wie Osmolarität, Ethanol, Glucose, Verfügbarkeit von Sauerstoff, Temperatur sowie von Antibiotika beeinflusst wird (30, 31, 33, 142). Des Weiteren häufen sich die Anzeichen, dass Antibiotika bereits in sehr geringen, so genannten subinhibitorischen Konzentrationen, einen starken Effekt auf Bakterien ausüben.

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, mit Hilfe der erst seit kurzem zur Verfügung stehenden DNA-Mikroarray-Technik den Effekt von subinhibitorischen Synercid[®]-Konzentrationen auf die Genexpression bei *S. epidermidis* und *S. aureus* zu analysieren. Dabei stand vor allem die Wirkung auf die Biofilmbildung im Mittelpunkt. Es sollten die Mechanismen, über die Synercid[®] die Biofilmbildung bei Staphylokokken beeinflusst identifiziert und charakterisiert werden. Des Weiteren sollten die Untersuchungen helfen, neue an der Biofilmbildung beteiligte Komponenten zu identifizieren.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit galt der Charakterisierung des ArcR-Regulons. Bei ArcR handelt es sich um ein erst kürzlich identifiziertes FNR/CRP-ähnliches Protein, das als möglicher Sauerstoffsensoren und Regulator bei der Regulation bzw. Bildung des Biofilms bei Staphylokokken eine Rolle spielen könnte.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Analysewaage	Chyo, JI180
Autoklav	Teknomara Integra Biosciences
Brutschrank	Memmert TV 40b
Eismaschine	Scotsman AF-20
Feinwaage	Chyo
Grobwaage	Chyo, MP3000
HPLC	
Kühlzentrifuge	Beckmann J2-21 und Heraeus Megafuge 13R
Lyophilisierungsgerät	Lyovac GT2-E, Merck, Darmstadt
Mikroarray-Hybridisierungskammer	SciHYBChamber, Scienion AG Berlin
Mikroarray Scanner	GenePix 4000B; Axon Instruments
Netzgeräte	Biorad und Consort E455
PCR Thermocycler	Eppendorf Techne Progene
pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	Pharmacia Ultraspec 3000
Phosphoimager	Typhoon, Amersham Biosciences
Pipetten	Eppendorf Research 10; 100; 1000
Schüttelinkubator	Bühler W55 swip
Schütteltisch	GLW L-40
Sequenzierer	ABI-Sequenzierer, PerkinElmer

Speedvac-Concentrator	UNIVAPO 150H
Sterile Werkbank	Nunc
Thermoblock	Liebisch Thermoblock
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415C
Ultrazentrifuge	Sorvall OTD-75
UV-Transilluminator	UVP inc. Biometra
Vortexgerät	GLW
Wasserbad	Köttermann GFL 1083

3.1.2. Chemikalien

Alle für diese Arbeit benötigten Chemikalien wurden von den Firmen Bayer, Boehringer, Gibco BRL, Fluka, Merck, Sigma und Roth bezogen.

3.1.3. Laborkits

Folgende Laborkits wurden für die Arbeit verwendet:

ECL TM	Amersham
RNAprotect Bacteria Reagent	QIAGEN
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
PCR Purification Kit	QIAGEN
IQ TM SYBR [®] Green Supermix	BioRad
RNA 6000 Pico LabChip [®] Kit	Agilent Technologies

3.1.4. Enzyme

Folgenden Enzyme wurden bei der Arbeit verwendet:

RNase-free DNase I	Roche
Lysostaphin	Sigma
Superscript III Reverse Transcriptase	Invitrogen
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (NEB)
T4-DNA Ligase	NEB
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen
Proteinase K	Sigma
Antarctic Phosphatase	NEB
RNase A	Roche

3.1.5. Größenstandards für Gelelektrophoresen

Um die Größe von aufgetrennten DNA oder RNA Molekülen in Agarosegelen zu bestimmen, wurden folgende Größenstandards verwendet:

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas): 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3,5 kb, 3 kb, 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp (Abb.3.1 A).

High-Range RNA-Ladder (MBI Fermentas): 6 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 500 bp, 200 bp (Abb.3.1.B).

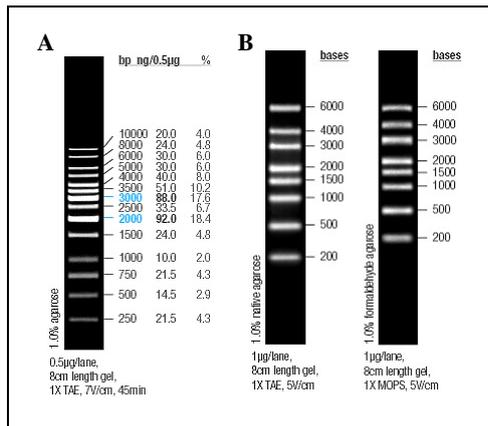


Abb.3.1: Bandenmuster der verwendeten Größenmarker. **A)** Gene Ruler 1kb DNA Ladder **B)** High-Range RNA-Ladder

3.1.6. DNA-Mikroarrays

SciTracer *S. aureus* full-genome

Scienion AG, Berlin

SciTracer *S. epidermidis* full-genome

Scienion AG, Berlin

3.1.7. Bakterienstämme

Tab. 3.1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Stamm	Charakterisierung	Referenz
<i>S. epidermidis</i> RP62A	<i>icaADBC</i> -positiv; IS256-positiv,	ATCC35984
<i>S. epidermidis</i> 567	klinisches Isolat <i>icaADBC</i> -positiv	(142)
<i>S. aureus</i> MA12	klinisches Isolat, <i>icaADBC</i> -positiv	(130)
<i>S. aureus</i> MA12-2	<i>S. aureus</i> MA12 <i>sigB</i> -Mutante	(141)
<i>S. aureus</i> 8325	NCTC 8325	Stammsammlung
<i>S. aureus</i> 8325-4	RN4220, Restriktionsmutante, mit 11bp Deletion im Gen <i>rsbU</i>	Stammsammlung
<i>S. aureus</i> SH-1000	Derivat von 8325-4, mit intaktem <i>rsbU</i>	Y. Aharonowitz, Tel Aviv, Israel
<i>S. aureus</i> SH-1000 $\Delta arcR$	<i>arcR</i> -Deletionsmutante von <i>S. aureus</i> SH-1000; Km ^r	Y. Aharonowitz, Tel Aviv, Israel
<i>S. aureus</i> COL	MRSA, hohe homogene Methicillin-Resistenz, Tetrazyklin-Resistenzplasmid	F.Götz, Tübingen, Deutschland
<i>S. aureus</i> COL $\Delta arcR$	<i>arcR</i> -Deletionsmutante von <i>S. aureus</i> COL; Km ^r	diese Arbeit

3.1.8. Medien

Brain Heart Infusion (BHI)

Oxoid	37 g
_{dest} H ₂ O ad	1000 ml

B-Medium

Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
_{dest} H ₂ O ad	1000 ml

Luria-Bertani (LB)

Pepton aus Casein	10 g
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
_{dest} H ₂ O ad	1000 ml

Müller Hinton Broth (MH)

Oxoid	21 g
_{dest} H ₂ O ad	1000 ml

Trypticase Soy Broth (TSB)

Becton Dickinson	27,5 g
_{dest} H ₂ O ad	1000 ml

Trypticase Soy Broth ohne Dextrose (TSB⁻)

Becton Dickinson	27,5 g
_{dest} H ₂ O ad	1000 ml

3.1.9. Lösungen und Puffer

Für die Enzyme wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet. Alle selbst angesetzten Lösungen und Puffer sind im Folgenden beschrieben.

DEPC-Wasser

DEPC	2,5 ml
_{dest} H ₂ O	2,5 l

Das DEPC wird mit dem _{dest}H₂O gemischt, über Nacht bei 37°C inkubiert und abschließend autoklaviert.

EDTA (0,5 M)

EDTA	93,1 g
_{dest} H ₂ O	350 ml
(pH mit 10 N NaOH auf 8,0 einstellen)	
_{dest} H ₂ O	ad 500 ml

HPLC Puffer1:

7 mM KH ₂ PO ₄
(pH mit H ₃ PO ₄ auf 4 einstellen)

HPLC Puffer2

0,5 mM KH ₂ PO ₄
0,5 mM Na ₂ SO ₄
(pH mit KOH auf 5,4 einstellen)

NaAc (3 M)

5 M NaAc	60 ml
Eisessig	40 ml

PBS (10 x)

NaCl	40 g
Na ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	6,25 g
KCl	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
destH ₂ O	ad 1000 m

RNA Loading-Puffer (5 x)

Formamid	3084 µl
Glycerin (86 %)	2 ml
Formaldehyd (37 %)	720 µl
MOPS (10 x)	4 ml
EDTA (0,5 M)	80 µl
Bromphenolblau	16 µl
DEPC-Wasser	ad 10 ml

SSC (20 x)

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M

SDS (10 %)

Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10 g

 destH_2O ad 1000 ml**TAE (50 x)**

Tris 242 g

Eisessig 57,1 ml

0,5 M EDTA 100 ml

 destH_2O ad 1000 ml**TBE (10 x)**

Tris 108 g

Borsäure 55 g

0,5 M EDTA 50 ml

 destH_2O ad 1000 ml**TE**

Tris/HCl 10 mM

EDTA 1 mM

Tris/HCl (1 M)

Tris 60,57 g

 destH_2O 450 ml

(pH mit HCl auf 7,5 einstellen)

 destH_2O ad 500 ml

3.1.10. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-ARK und MWG-Biotech bezogen. Die für die einzelnen Arbeiten verwendeten Oligos sind in den Tabellen 3.2 – 3.4 aufgelistet.

Tab. 3.2: Oligonukleotide die für *S. epidermidis* qRT-PCR verwendet wurden.

Name	Oligonukleotid-Sequenz
<i>rrsA</i> -for	5'-CCTTATGATTTGGGCTACACAC
<i>rrsA</i> -rev	5'-CCAGCTTCATATAGTCGAGTTG
<i>rplA</i> -for	5'-ATGACCAACAAATCCGTGGTG
<i>rplA</i> -rev	5'-CACCCATCATATCAGGTGTAG
<i>rpsD</i> -for	5'-GCTCGTACACGTCGTCAAGCA
<i>rpsD</i> -rev	5'-TTTCAGCTGGTAACTCGCTAC
<i>opuCA</i> -for	5'-AATCGCTTGATTCAGGATCGT
<i>opuCA</i> -rev	5'-TGTAGACATCCCTTTGCATGG
<i>purR</i> -for	5'-GCTGAGAATTCTAATGTCCTCG
<i>purR</i> -rev	5'-AAATTCTTGGTTGTACTCGTCG
<i>purQ</i> -for	5'-TTAAATCAGGTGTTGATGCAGC
<i>purQ</i> -rev	5'-TAATAATCGGAGCAACACTTGC
<i>argB</i> -for	5'-TTAATTAGGAGACATGCACACG
<i>argB</i> -rev	5'-TAGGTTGTTTCTTAGTTGCTGC
<i>RNAIII</i> -for	5'-ACGTAACACTGAGTCCAAGGA
<i>RNAIII</i> -rev	5'-TGAAAAATTTGCTTAATCTAGT
<i>yycF</i> -for	5'-ACGCCGTCATTATTCACAACCAG
<i>yycF</i> -rev	5'-TGGAATAGCTCGAATTCACGATCG
<i>yycG</i> -for	5'-TGAAATCGGTGAACTCGCAC
<i>yycG</i> -rev	5'-TGTCGCAAGAATACCATCGCT
<i>yycH</i> -for	5'-ACAATACTGGTGTCCCAAC
<i>yycH</i> -rev	5'-CTCGTATGTGCCTGGGATGG
SERP2065-for	5'-ATTCGTCTGATGAAACCACGC
SERP2065-rev	5'-GCAATCTGTTAGGGCTGTACA
SERP2246-for	5'-ATTCGTCTGATGAAACCACGCA
SERP2246-rev	5'-GCAATCTGTTAGGGCTGTACAC

Tab. 3.3: Oligonukleotide die für *S. aureus* qRT-PCR verwendet wurden.

Name	Oligonukleotid Sequenz
<i>asp23</i> -for	5`-TTCATTGGCAAATGCGGTTG
<i>asp23</i> -rev	5`-TAATAGAGCCACCAGCCCTC
<i>capD</i> -for	5`-TGGTCAAGCAGGTTCAATGC
<i>capD</i> -rev	5`-TGCCCACCTTCTGCTAATGC
<i>ftsZ</i> -for	5`-CGCTATCAACACAGACGGTCA
<i>ftsZ</i> -rev	5`-CCGAATCCAGTGCTACCAGAT
<i>gap</i> -for	5`-CGACTTAACAGATGACGACA
<i>gap</i> -rev	5`-GTGCAGTATATGACATTTTCG
<i>glmM(femD)</i> -for	5`-GCTGCTTCAACCATGACACGA
<i>glmM(femD)</i> -rev	5`-CAATTGGTGCAGAAGTGATGC
<i>gyrA</i> -for	5`-GCCAATGGAGCATCAGGTATA
<i>gyrA</i> -rev	5`-GGATTTTCAGTACGACGATCAT
<i>icaA</i> -for	5`-GCCAACGCACTCAATCAAG
<i>icaA</i> -rev	5`-CTACTGCTGCGTTTAATAATCC
<i>L4 (rplD)</i> -for	5`-CGATGCAGTATTCGGTATTG
<i>L4 (rplD)</i> -rev	5`-AAACCTTGAGCAGTTGTCCAC
<i>L11 (rplK)</i> -for	5`-GGTAAAGCGAATCCAGCACC
<i>L11 (rplK)</i> -rev	5`-TACTACGTGCAGTACCTTCG
<i>L16 (rplP)</i> -for	5`-TATCGTCGTCAACATCGTCC
<i>L16 (rplP)</i> -rev	5`-ACTGGAAGTTTGTGACTTGC
<i>purA</i> -for	5`-GGTAATCGGTAACGGTGTGC
<i>purA</i> -rev	5`-TCAGTAGGGAATGGACCATCA
<i>purC</i> -for	5`-TGAAGTTACTGCTGGAAACG
<i>purC</i> -rev	5`-AGCAATTTAACATGGTCATCC
<i>S2 (rpsB)</i> -for	5`-TCACTTCGGTCACCAAACAC
<i>S2 (rpsB)</i> -rev	5`-CGCCTTGTTGACCTTCTAAG
SA2103 -for	5`-GACTGCTCACTAGGAATGAAG
SA2103 -rev	5`-GTAGCTGTTGTGTATGTAGCT
SA2433 -for	5`-CCGCACAGTTCGCAATGA
SA2433 -rev	5`-CCTTGATAGTCGTCAGGTGC
<i>scdA</i> -for	5`-GCGGTGGACAAGTAAGTATAG
<i>scdA</i> -rev	5`-CGTACCACATGCCTCTATCGG
<i>tpi</i> -for	5`-CACCAATTATAGCTGGTAACT
<i>tpi</i> -rev	5`-CACTACCACCATATTGAATAC
TRAP -for	5`-CCCGACCCATCAACTATTC
TRAP -rev	5`-CTTGAATGTTGTCCGCTTGAA
<i>vraS</i> -for	5`-CGTGTACCTGAATCTGGC
<i>vraS</i> -rev	5`-GCGTTCAATGGAAGGCG

Tab. 3.4 : Oligonukleotide die zur Überprüfung der *S. aureus arcR*-Deletionsmutante verwendet wurden.

Name	Oligonukleotid Sequenz
<i>arcR</i> -for	5'-TCAGACATTATACGAAAGGCC
<i>arcR</i> -rev	5'-TTGATCGTATCCTACTGTCTG
<i>Km</i> -for	5'-GATGCTATGGCTGGAAGG
<i>Km</i> -rev	5'-GACGCAGAAGGCAATGTC

3.1.11. Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tab. 3.5 : In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration
Clindamycin	1 mg/ml in H ₂ O
Erythromycin	1 mg/ml in EtOH
Gentamycin	1 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin	1 mg/ml in H ₂ O
Rifampicin	100 mg/ml in 70% EtOH
Synercid [®]	1 mg/ml in H ₂ O
Tetracyclin	1 mg/ml in H ₂ O

3.2. Methoden

3.2.1. Biofilmnachweis in Polystyren-Mikrotiterplatten

Bakterien aus einer Übernachtskultur werden 1/50 mit frischem Medium (plus den jeweiligen Zusätzen) verdünnt, davon jeweils 200 µl in eine Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenzellkulturplatte (Cellstar, 96 well Gewebekulturplatten mit flachen Boden; Greiner Bio-One, Essen, Deutschland) (jeweils x 8) pipettiert und schließlich für 20 bis 24 h bei entsprechender Temperatur (normalerweise 37°C) inkubiert. Als Negativkontrolle wird das jeweilige, nicht beimpfte Medium verwendet. Danach wird das Medium aus den Vertiefungen entfernt und diese dreimal mit 1 x PBS (pH 7) gewaschen. Die noch in den Vertiefungen haftenden Bakterien werden auf einem Heizblock bei 60°C für 30 – 60 min getrocknet und anschließend mit je 150 µl einer gesättigten wässrigen Kristallviolettlösung für 5 min gefärbt. Das überschüssige Kristallviolett wird unter fließendem Wasser abgewaschen und durch Klopfen der Platten auf ein Papiertuch das restliche Wasser aus den Vertiefungen entfernt. Abschließend löst man den gefärbten Biofilm in 150 µl 90 – 100 % EtOH, mischt die acht Ansätze einer Platte und bestimmt die optische Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge von 470 nm. Wird der Test mit Bakterien durchgeführt, die unter den jeweiligen Bedingungen einen besonders starken Biofilm bilden, der in EtOH nicht vollständig gelöst werden kann, wird die optische Dichte für jede einzelne Vertiefung mit Hilfe eines ELISA Readers bestimmt und anschließend der Mittelwert gebildet.

Es sollten immer nur die Werte einer Platte direkt miteinander verglichen werden. Ansonsten sollten, um große Abweichungen zu vermeiden, relative Werte verwendet werden. Diese werden pro Platte, durch den Vergleich von Test- und Standardbedingungen gebildet.

3.2.2. Erstellen von Wachstumskurven

Für die Erstellung von Wachstumskurven mischt man Bakterien einer Übernachtskultur 1:25 mit frischem Medium und inkubiert diese bei entsprechender Temperatur und einer Schüttelfrequenz von normalerweise 220 rpm. In definierten Zeitintervallen werden Proben der Kultur entnommen und deren optische Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt.

3.2.3. Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit (MHK)

Die Bakterien werden in 20 ml Müller-Hinton-Medium mit 5% NaCl angeimpft und 4 h bei 37°C angezogen. Anschließend stellt man die Kultur mit frischem Medium auf den McFarland-Standard 0,5 ein und verdünnt danach 1:200. Gleichzeitig wird eine Antibiotika-Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 256 µg/ml bis 0,250 µg/ml hergestellt. 0,5 ml der Antibiotikaverdünnung werden mit 0,5 ml des vorbereiteten Inokulums beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Als Kontrolle beimpft man 0,5 ml Medium ohne Antibiotikum. Als minimale Hemmkonzentration (MHK) gibt man die niedrigste Antibiotikakonzentration an, bei der das Bakterienwachstum noch inhibiert war.

3.2.4. Speziesbestimmung mit dem API-Staph-System

Der API-Staph-Test (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) besteht aus einer Kombination von verschiedenen Substraten, welche es ermöglicht das biochemische Profil von Bakterien zu erstellen. Das Ergebnis wird in einem numerischen Kode zusammengefasst, aus dem man in einem Analyse-Profil-Index die Spezies ermitteln kann. Die Durchführung kann dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll entnommen werden.

3.2.5. Bestimmung der Mutationsfrequenz bei Staphylokokken

Eine endogene Antibiotikaresistenz entsteht normalerweise durch Mutationen, die meist entweder die Aufnahme oder direkt das Zielmolekül des Antibiotikums betreffen. Um die Frequenz von Punktmutationen bei Bakterien zu bestimmen, macht man sich zunutze, dass eine Resistenz gegen das Antibiotikum Rifampicin durch Punktmutationen im Gen *rpoB*, das die DNA-abhängige RNA-Polymerase kodiert, entsteht. Somit kann man anhand der Häufigkeit, mit der eine Resistenz gegen Rifampicin bei einem Stamm entsteht auf die Häufigkeit von Punktmutationen schließen.

Für die Bestimmung der Mutationsfrequenz, pro Zelle und Generation, löst man eine Bakterienkolonie in 45 ml sterilem 1 x PBS. Um die Bakterienanzahl in dieser Lösung zu bestimmen, werden 100 µl auf LB-Agarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und ausgezählt. Für die Übernachtskultur, in der die Mutationshäufigkeit bestimmt werden soll, impft man 50 ml LB-Medium mit 100 µl der Bakterienlösung an. Von verschiedenen Verdünnungsstufen der Übernachtskultur werden jeweils 100 µl auf Müller-Hinton-

Agarplatten mit und ohne Rifampicin (10 µg/ml) ausplattiert, die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend die Einzelkolonien ausgezählt. Um die Häufigkeit der Punktmutationen (P) pro Zelle und Generation zu bestimmen, verwendet man folgende Formeln (44), wobei N der Gesamtzahl der Bakterien in der Kultur entspricht; N_0 die Anzahl der Bakterien im Inokulum darstellt; n die Anzahl der stattgefundenen Teilungen angibt und x der Anzahl der Rifampicin resistenten Kolonien durch die Gesamtzahl der ausplattierten Bakterien entspricht.

Die Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen (n) in der Übernachtskultur berechnet sich:

$$n = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2}$$

Die Mutationsfrequenz (P) pro Zelle und Generation errechnet sich dann aus:

$$P = 1 - \sqrt[n]{1 - x}$$

3.2.6. Kultivieren von Staphylokokken unter anaeroben Bedingungen

3.2.6.1. Schüttelkultur

Das Medium für eine anaerobe Bakterienkultur, wird nach dem Autoklavieren 5 min mit Stickstoff begast, mit L-Cystein versetzt (5,7 mM Endkonzentration) und sterilfiltriert. Direkt nach dem Filtrieren pipettiert man 75 ml Medium in eine 100 ml Serumflasche und verschließt diese luftdicht mit einem Gummipfropfen. Um den restlichen Sauerstoff aus den Flaschen zu verdrängen werden zwei Kanülen durch den Pfropf gestochen und über eine für 1,5 min Stickstoff eingeleitet. Der im Medium vorhandene Sauerstoff wird durch Oxidation des L-Cysteins verbraucht. Das so vorbereitete Medium wird mit 1 ml einer aeroben Übernachtskultur beimpft und unter Schütteln bei der entsprechenden Temperatur bis zur gewünschten optischen Dichte angezogen. Um diese zu bestimmen, entnimmt man mit Hilfe einer Kanüle Proben, wobei darauf geachtet werden muss, dass durch den entstehenden

Unterdruck in der Flasche kein Sauerstoff eingesaugt wird. Gegebenfalls kann der Druck durch Zugabe von Stickstoff ausgeglichen werden.

3.2.6.2. Plattenkultur

Um Bakterien anaerob auf Agarplatten zu kultivieren, werden Bakterien auf einer entsprechenden Agarplatte ausgestrichen und zusammen mit den Anaerocult[®] A Reagenzien (Merck, Darmstadt, Deutschland) in einen Anaerobiertopf gestellt und bei entsprechender Temperatur inkubiert. Die genaue Durchführung kann dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll entnommen werden.

3.2.7. Isolierung von chromosomaler DNA aus Staphylokokken

Die Bakterien werden über Nacht bei 37°C in 4 ml LB-Medium + 1 % Glycerin angezogen, 2 ml der Kultur bei 8000 rpm für 5 min zentrifugiert und danach das Pellet mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend resuspendiert man die Bakterien in 100 µl 10 mM Tris/HCl + 25 % Saccharose (pH 7,5), mischt mit 15 µl 0,5 M EDTA (pH 8) sowie 10 µl Lysostaphin (2 mg/ml) und inkubiert schließlich bei 37°C (10 – 20 min). Sobald der Ansatz viskös ist, werden 375 µl TE-Puffer, 225 µl 10 % SDS und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und 30 min bei 55°C inkubiert. Danach fügt man dem Ansatz 150 µl 5 M Natriumperchlorat sowie 0,5 Volumenanteile (ca. 450 µl) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zu und inkubiert mindestens für 1,5 h unter kräftigem Schütteln. Anschließend den Ansatz für 10 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren, den Überstand vorsichtig abnehmen und auf 2 Reaktionsgefäße (1,5 ml) verteilen. Die DNA wird mit doppeltem Volumen 100 % EtOH gefällt und 10 min zentrifugiert (14000 rpm, RT). Der Alkohol wird entfernt und das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen. Nach Trocknen der DNA wird diese in 50 µl Tris/HCl (pH 8,5) aufgenommen und vor Gebrauch mindestens 12 h bei 4°C gelagert.

3.2.8. Phagentransduktion in *Staphylococcus aureus*

3.2.8.1. Herstellung des Phagenlysats

Zur Herstellung des Phagenlysats wird der Donor-Stamm (der Stamm der die zu transduzierende DNA enthält) in 20 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen und anschließend der Kultur 100 µl 1 M CaCl₂ zugefügt (5 mM Endkonzentration). Währenddessen verdünnt man den Phagen 85 in Phagenpuffer (LB-Medium mit 5 mM CaCl₂) (10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴). 300 µl der Bakterienkultur werden mit jeweils 100 µl der Verdünnungen des Phagenlysats gemischt und für 3 h bei RT inkubiert. Danach wird der Ansatz mit 4 ml 55°C LB-Soft-Agar gemischt, auf Blut-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen überschichtet man den Soft-Agar mit 2 ml Phagenpuffer und kratzt ihn mit einem sterilen Spatel von den Blut-Agarplatten. Der gelöste Soft-Agar wird in einem 15 ml Greinerröhrchen kurz geschüttelt, für 10 min bei 4°C und 9000 rpm zentrifugiert und schließlich der Überstand mit einem 0,45 µm Millipore-Filter filtriert. Das Phagenlysats kann bei 4°C in Glasröhrchen für einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

3.2.8.2. Transduktion

Der Empfänger-Stamm wird in 10 ml LB-Medium in einem 100 ml Kolben über Nacht bei 37°C angezogen und anschließend der Übernachtskultur 100 µl 1 M CaCl₂ zugefügt (5 mM Endkonzentration). Währenddessen wird das Phagenlysats aus 3.2.8.1 in Phagenpuffer (LB-Medium + 5 mM CaCl₂) verdünnt (10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴). 300 µl der Bakterienkultur mischt man mit jeweils 100 µl der Verdünnungen des Phagenlysats und inkubiert 15 min bei RT. Danach wird der Bakterien-Phagen-Ansatz mit 4 ml 55°C LB-Soft-Agar + 20 mM Natriumcitrat gemischt und auf Blut-Agarplatten ausplattiert. Die Platten werden bei 37°C inkubiert. Nach 36 – 48 h sollten die ersten Kolonien sichtbar werden. Diese werden gepickt, zur ersten Kontrolle auf Selektiv-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Klone die auf Selektivplatten gewachsen sind, werden mittels PCR auf die korrekte Insertion hin überprüft.

3.2.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur In-vitro-Amplifizierung von DNA. Durch mehrfache Wiederholungen von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Auffüllreaktion ausgehend von zwei zueinander weisenden Oligonukleotiden, wird die zwischen den Primern liegende Sequenz exponentiell vermehrt. Als Ausgangsmaterial (Template-DNA) dient entweder gereinigte chromosomale DNA oder Plasmid-DNA. Ein PCR-Standardansatz setzt sich wie folgt zusammen:

10 x PCR-Puffer	5 µl
dNTP-Mix (20 mM)	2 µl
Oligonukleotid 1 (100 pmol/µl)	1 µl
Oligonukleotid 2 (100 pmol/µl)	1 µl
Template DNA	1 µl
Taq-Polymerase	1-2 µl
H ₂ O	ad 50 µl

In Abhängigkeit von der eingesetzten Polymerase und dem dazugehörigen PCR-Puffer müssen eventuell noch 1 -2 µl MgCl₂ (50 mM) zugesetzt werden. Der Ansatz wird auf Eis pipettiert, gut vermischt und kurz abzentrifugiert. Die Reaktion wird im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

„first delay“	2 min	95°C
1. Denaturierung	30 sec	95°C
2. Primer-Hybridisierung	15-30 sec	40-60°C
3. Auffüllreaktion	30sec – 3 min	72°C
„last delay“	3 min	72°C

Die Temperatur für die Primer-Hybridisierung hängt von der Schmelztemperatur (MT) des Oligonukleotids ab. Diese wurde unter Verwendung der Fast-PCR Software bestimmt. Die Zeit für die Auffüllreaktion hängt zum einen von der zu amplifizierenden Fragmentlänge und zum anderen von der verwendeten Polymerase (siehe vom Hersteller mitgelieferte Angaben) ab. Es werden in der Regel 30 Reaktionszyklen durchlaufen.

3.2.10. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde der „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Dieser eignet sich zur Aufreinigung von Fragmenten ab einer Größe von > 40 bp. Alle benötigten Puffer sowie die Ionenaustausch-Säulen sind im Kit enthalten. Die Durchführung kann dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll entnommen werden.

3.2.11. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Zur Analyse von DNA wird diese in Abhängigkeit ihrer Größe in 1 – 4 % Agarosegelen in 1 x TAE bei 6 V cm^{-1} elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele werden anschließend in Ethidiumbromid (10 mg/ml) gefärbt, mit $\text{dest-H}_2\text{O}$ gewaschen und unter einem UV-Transilluminator fotografiert.

3.2.12. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „PCR-Purification Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Alle benötigten Puffer sowie die Ionenaustausch-Säulen sind im Kit enthalten. Die Durchführung kann dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll entnommen werden.

3.2.13. Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung wurde der ABI-Sequenzierer von Perkin Elmer verwendet. Hierbei bedient man sich der Methode einer zyklischen Sequenzierung, wobei durch Verwenden des „ABI PRISM[®] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits“ Fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide während einer PCR-Amplifikation durch eine modifizierte Polymerase eingebaut werden, was zum Kettenabbruch führt.

3.2.13.1. Sequenzierungsansatz

Die Sequenzierung mit den Farbstoff-markierten Nukleotiden findet in einem Ansatz statt.

Terminator Ready Reaction Mix	4 µl
Template-DNA	1-4 µl
Primer (50 pmol/µl)	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Die anschließende PCR-Amplifikation wird im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

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

Es werden 25 Reaktionszyklen durchlaufen. Anschließend wird der Ansatz auf 4°C abgekühlt.

3.2.13.2. Reinigung der Sequenzierreaktion

Um die nicht eingebauten Nukleotide sowie die Enzyme zu entfernen, muss die DNA gereinigt werden. Dazu mischt man 90 µl H₂O und 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,6) mit dem Sequenzieransatz. Durch Zugabe von 250 µl 100 % EtOH wird die DNA gefällt. Anschließend zentrifugiert man bei RT für 15 min und wäscht das Pellet mit 70 % EtOH. Das getrocknete Pellet wird schließlich in 25 µl TSR resuspendiert, durch Inkubation bei 90°C für 2 min denaturiert und mit dem ABI-Sequenzierer aufgetrennt.

3.2.14. Isolierung von Gesamt-RNA aus Staphylokokken

Die Gesamt-RNA aus Staphylokokken wurde mit Hilfe des „RNeasy Mini-Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Dafür impft man mit einer Übernacktkultur 25 ml frisches Medium an. Die Größe des Inokulums hängt sowohl von dem verwendeten Stamm, dem Medium sowie den Wachstumsbedingungen ab. Die Bakterien werden unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen bis zur gewünschten optischen Dichte angezogen, in einem Verhältnis von 1 zu 2 mit „RNAprotect Bacteria Reagent“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) versetzt, gut geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend zentrifugiert man die Bakterien 10 min bei 5000 rpm und verwirft der Überstand. Das Pellet wird für mindestens eine Nacht und maximal 2 Wochen bei -20°C gelagert.

Zur Isolation der RNA resuspendiert man das Pellet in 1,5 ml RLT-Puffer und überführt es in „Lysing Matrix E“ Röhrchen (Q-BIOgene, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Um die Zellen aufzubrechen, werden die Bakterien bei Stufe 6,5 für 2 x 30 sec in der FastPrep Maschine Savant BIO101 (Q-BIOgene, Heidelberg, Deutschland) geschüttelt und danach direkt auf Eis gekühlt. Anschließend wird das Röhrchen für 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand mit dem gleichen Volumen 100% EtOH (circa 1 ml) gemischt. Das Lysat überführt man zur Aufreinigung auf eine RNeasy Mini Säule, zentrifugiert für 15 sec bei 10000 rpm und verwirft den Durchfluss. Die Säule wird einmal mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, wobei immer bei 10000 rpm für 30 sec zentrifugiert, und der Durchfluss verworfen wird. Anschließend wird die Säule 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert um die Membran völlig von dem im RPE-Puffer enthaltenen EtOH zu befreien. Zur Eluierung der RNA überführt man die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß und trägt 40 µl RNase-freies Wasser auf die Membran auf. Nach kurzer Inkubation (1 – 2 min) bei RT wird für 1 min bei maximaler

Geschwindigkeit zentrifugiert. Um die Menge der eluierten RNA zu erhöhen, wiederholt man diesen Schritt mit dem ersten Eluat.

Um die RNA völlig von DNA zu befreien, wird diese unter Verwendung der „RNase-free DNase“ (Merck, Darmstadt, Deutschland) abgebaut. Man mischt hierfür das 40 µl RNA-Eluat mit jeweils 5 µl DNase und One-Phor-All Puffer Plus (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) und inkubiert für 1 h bei 37°C. Anschließend reinigt man die RNA mit Hilfe des „RNeasy Mini-Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) entsprechend dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll auf.

3.2.15. Überprüfung der RNA-Integrität

Zur Analyse der RNA-Integrität wurde das „RNA 6000 Pico LabChip® Kit“ (Agilent Technologies) verwendet. Dabei handelt es sich um ein äußerst sensitives System, welches einem ermöglicht, bereits geringen Abbau von RNA zu detektieren. Die Durchführung kann dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll entnommen werden.

Alternativ kann man die RNA-Integrität mittels elektrophoretischer Auftrennung und anschließender Färbung mit SYBR-Green II (Sigma, Hamburg, Deutschland) überprüfen.

3.2.16. Elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Gesamt-RNA verwendet man 1,2 %ige Agarose/ Formaldehyd-Gele. Dafür werden zunächst 4,2 g Agarose in 304,5 ml DEPC-Wasser aufgeköcht, auf circa 60°C abgekühlt, mit 16,2 ml 37 % Formaldehyd und 35 ml 10 x MOPS-Puffer gemischt und in die Gießvorrichtung gegossen. Nach dem Abkühlen wird das Gel mit 1 x MOPS-Laufpuffer überschichtet.

Vor dem Beladen des Gels, mischt man die RNA mit 5 x Loadingbuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl und denaturiert bei 55°C für 10 min. Die RNA-Proben werden bei 6 V cm⁻¹ für 3 h aufgetrennt. Anschließend wäscht man das Gel für 30 min in DEPC-Wasser, färbt in SYBR-Green II und scannt mit einem Phosphoimager (Typhoon 4600, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland).

3.2.17. Hybridisierung von Mikroarrays

3.2.17.1. Sondensynthese

Zur Herstellung der Sonden wird RNA in cDNA, mit parallelem Einbau von Cy3- bzw. Cy5-markierten dCTP-Nukleotiden (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland), umgeschrieben. Hierfür mischt man 10 µg der DNase-behandelten Gesamt-RNA mit 100 ng Random-Hexamer Primern (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 10 µl und inkubiert für 10 min bei 70°C. Anschließend wird der Primer-RNA Ansatz auf Eis abgekühlt und mit 10 µl Markierungsmix gemischt und kurz abzentrifugiert. Die cDNA-Synthese wird durch Inkubation bei 25°C für 10 min und anschließend bei 48°C für 90 min durchgeführt, wobei nach 60 min zusätzlich 1 µl Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) zugefügt wird. Um die Reaktion zu Beenden und die RNA zu beseitigen wird dem Ansatz 2 µl 2 M NaOH zugefügt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Abschließend neutralisiert man den Ansatz durch Zugabe von 12,5 µl Tris-HCl (pH 7,5).

<u>Markierungsmix:</u>	5 x Puffer.....	4 µl
	DTT.....	2 µl
	5 mM dNTPs (dATP;dGTP;dTTP).....	1 µl
	2 mM dCTP.....	1 µl
	Cy3 / Cy5-dCTP.....	1 µl
	Superscript III (200 U/µl).....	1 µl

Um die Cy-markierten cDNA-Sonden von Enzymen und nicht eingebauten Nukleotiden zu befreien, werden sie mit Hilfe des „PCR-Purification Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) aufgereinigt, wobei nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll verfahren wird.

Zur Überprüfung der cDNA-Sonden, trennt man diese mittels Gelelektrophorese auf einem 2% Agarosegel auf und scannt bei den entsprechenden Wellenlängen mit einem Phosphoimager (Typhoon 4600, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland). Das Bandenmuster der Sonden sollte aus mehreren klar zu unterscheidenden Banden unterschiedlicher Größe bestehen. Eine eventuelle Verunreinigung mit freien Nukleotiden erkennt man anhand einer „Wolke“ am unteren Rand des Agarosegels. Wird eine Verunreinigung der Sonden mit freien Nukleotiden festgestellt, sollte eine erneute Aufreinigung erfolgen. Abschließend reduziert man das Volumen der Sonden mit Hilfe einer SpeedVac auf circa 5 µl.

3.2.17.2. Hybridisierung und waschen

Die Hybridisierung der Mikroarrays wurde entsprechend dem von der Scienion AG (Berlin) empfohlenen Protokoll für 3 Tage bei einer Temperatur von 49°C und unter Lichtausschluss in einem Wasserbad hybridisiert. Anschließend werden die Arrays für jeweils 5 min bei RT in den Puffern I und II und abschließend 30 sec, in dem auf 49°C vorgewärmten, Puffer III gewaschen und schließlich durch Zentrifugation bei 800 rpm für 5 min getrocknet.

<u>Waschpuffer:</u>	Puffer I:	2 x SSC; 0,2% SDS	(RT; 5 min)
	Puffer II:	0,2 x SSC	(RT; 5 min)
	Puffer III:	0,05 x SSC	(40°C; 30 sec)

3.2.17.3. Scannen und auswerten

Die hybridisierten Mikroarrays wurden mit einem GenePix 4000B Mikroarray Scanner (Axon Instruments) und der dazugehörigen GenePix Pro 4.0-Software (Axon) eingelesen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das detektierte Signal in beiden Kanälen gleich stark ist (Ratio von 1). Wenn erforderlich kann dies durch entsprechende Veränderung der Detektorsensitivität (PMT Gain) erreicht werden.

Für die Auswertung der Arrays werden der Median der Spotintensitäten sowie die lokalen Hintergründe der jeweiligen Spots von jedem Kanal verwendet. Es werden ausschließlich Signale berücksichtigt, die mindestens 1,5mal so stark wie der lokale

Hintergrund sind. Außerdem werden nur Daten verwendet, wenn für beide Spots eines Features „detektierbare“ Signale gemessen werden konnten. Mit den Signalen, die diese Kriterien erfüllen, wird zunächst pro Spot das Verhältnis (Ratio) der beiden hybridisierten Sonden berechnet. Mit den beiden Ratios eines Features wird schließlich ein Mittelwert gebildet, mit dem die Daten unterschiedlicher Arrays verglichen werden. Es werden die Gene als unterschiedlich reguliert angesehen, deren Ratio höchstens 0,5 oder mindestens 2 beträgt. Um signifikante Daten zu erhalten, sollten mindestens 3, nach Möglichkeit aber 5 unabhängige Experimente durchgeführt werden.

3.2.18. Reverse Transcription (cDNA-Synthese) für quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Für die Synthese von cDNA aus RNA werden 2 µg der DNase-behandelten Gesamt-RNA mit 500 ng Random-Hexamer Primern (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend kühlt man den Primer-RNA Ansatz auf Eis ab und fügt 10 µl Reaktionsmix zu. Die cDNA-Synthese wird durch Inkubation bei 25°C für 15 min und anschließend bei 49°C für 60 min durchgeführt. Die Reaktion wird, durch Inkubation bei 70°C für 15 min und der damit verbundenen Inaktivierung des Enzyms, gestoppt.

<u>Reaktionsmix:</u>	5 x Puffer.....	4 µl
	DTT (0,1 M).....	2 µl
	dNTPs (20 mM).....	1 µl
	Superscript III (200 U/µl).....	2 µl
	H ₂ O Rnase-free.....	1 µl

3.2.19. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Für die Real-Time PCR wurden das “MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System” (BIO-RAD, München, Deutschland) und der “iQTM SYBR Green Supermix” (BIO-RAD, München, Deutschland) verwendet. In der Regel wurden 0,5 µl cDNA und 500 nm Primer in einem Ansatz von 25 µl verwendet. Die Datenanalyse wurde nach der von Pfaffl (137) beschriebenen Methode durchgeführt.

3.2.20. Bestimmen der intrazellulären ppGpp und GTP Konzentration

3.2.20.1. Isolation von Nukleotiden aus Staphylokokken

Für die Isolation von ppGpp und GTP werden Bakterien einer Übernachtskultur 1/50 in frischem Medium verdünnt und die Bakterien unter den jeweiligen Wachstumsbedingungen bis zu der gewünschten optischen Dichte angezogen. 100 ml dieser Kultur werden bei 4°C und 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien mit 50 ml kaltem LiChrosolv[®] Wasser (Merck) gewaschen. Anschließend lysiert man die Bakterien durch Inkubation in 25 ml eiskalter 0,1 M Ameisensäure für circa 1 h bei 4°C. Die Lysate werden zentrifugiert (6000 rpm, 4°C) und der Überstand durch Filtration mit einem Nitrocellulose Filter (25µm Porengröße) von Bakterienrückständen befreit. Das Filtrat wie auch die Pellets werden gefriergetrocknet, das Gewicht der getrockneten Zellmasse bestimmt und das Filtrat bei -80°C eingefroren. Das gefrorene Filtrat wird erst direkt vor der HPLC Analyse in 500 µl LiChrosolv[®] Wasser (Merck) gelöst. Bis auf kleinere Veränderungen entspricht diese der von Greenway und England (56) publizierten Methode.

3.2.20.2. Quantitative Analyse von ppGpp und GTP mittels HPLC

Um die intrazelluläre Konzentration von ppGpp und GTP mit Hilfe von HPLC zu bestimmen, wurde entsprechend dem von Takahashi et al. publiziertem Protokoll (162) eine Partisil SAX-10 Säule (4.6 x 250 mm, Whatman, Dassel, Germany) und ein Zwei-Puffer System verwendet. Dabei wird nach einer Äquilibration der Säule für 90 min mit Puffer 1 diese mit der Probe beladen (Injektionsvolumen: 20 µl; Injektionsgeschwindigkeit: 1 ml/min). Der Puffergradient ist dabei so eingestellt, dass innerhalb von 20 min ein Übergang von 100% Puffer 1 auf 100% Puffer 2 erreicht wird. Nach einer 30 min Elution mit 100% Puffer 2 kann das ppGpp bei einer Laufzeit von ca. 39 min und GTP bei einer Laufzeit von ca. 26 min

detektiert und mit Hilfe eines Diode-Array Detektors durch das spezifische UV Spektrum identifiziert werden.

Zur Quantifizierung der Nukleotide werden mit jeder Probe drei HPLC Analysen durchgeführt. Aus den jeweils bei 254 nm gemessenen Werten wird der Mittelwert für jede Probe bestimmt und die Konzentration des ppGpp mit Hilfe eines Standards (TriLink BioTechnologies, San Diego, USA; tebu-bio GmbH, Offenbach, Germany) berechnet. Die Konzentration der Nukleotide wird im Verhältnis zum Gewicht der gefriergetrockneten Bakterien, aus denen das ppGpp und das GTP isoliert wurden (siehe 3.2.20.1), dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss subinhibitorischer Synercid®-Konzentrationen auf das Wachstum und die Biofilmbildung von Staphylokokken

4.1.1. Das Wachstum von Staphylokokken unter Einfluss von Synercid®

Um festzustellen welchen Einfluss Synercid® in geringen Konzentrationen auf das Wachstum von Staphylokokken hat, wurden, wie unter 3.2.2 beschrieben, Wachstumsanalysen mit den Stämmen *S. epidermidis* 567 und *S. aureus* MA12 durchgeführt. Dabei wurde TSB- und B-Medium mit verschiedenen subinhibitorischen Konzentrationen des Antibiotikums verwendet.

Diese Analysen zeigen, dass Synercid® bereits in sehr geringer Konzentration das Wachstum von *S. epidermidis* 567 beeinflusst (Abb.4.1). In TSB-Medium war ab einer Antibiotikakonzentration von 60 ng/ml ein Abflachen der Wachstumskurve zu beobachten ohne aber die maximal erreichte optische Dichte (OD_{550nm}) von $\sim 2,2$ zu verringern. Konzentrationen von über 60 ng/ml führten neben dem starken Abflachen der Wachstumskurve zu einer zunehmenden Reduzierung der maximal erreichten OD_{550nm} . Bei einer Konzentration von 90 ng/ml betrug die maximale OD_{550nm} ~ 2 , und bei 120 ng/ml erreichte *S. epidermidis* 567 nur noch eine maximale OD_{550nm} von $\sim 1,5$. In B-Medium wurde bereits ab einer Konzentration von 30 ng/ml ein Abflachen der Wachstumskurve beobachtet. Allerdings wurde, wie bereits in TSB-Medium, eine Reduzierung der maximal erreichten optischen Dichte erst ab einer Konzentration von 90 ng/ml festgestellt. Diese war in B-Medium (~ 2) generell geringer als in TSB-Medium.

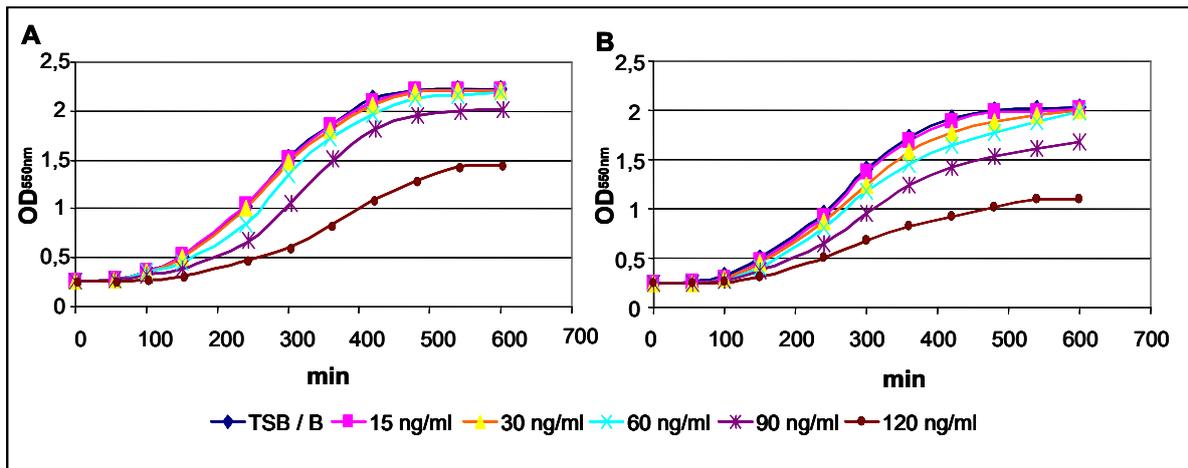


Abb. 4.1: Wachstumskurven von *S. epidermidis* 567 in A) TSB- und B) B̄-Medium unter Einfluss verschiedener subinhibitorischer Synercid® Konzentrationen.

Bei *S. aureus* MA12 war der zu beobachtende Effekt auf das Wachstum bedeutend schwächerer als bei *S. epidermidis*. In Abbildung 4.2 sind die Wachstumskurven von *S. aureus* MA12 in TSB- und B̄-Medium mit verschiedenen subinhibitorischen Konzentrationen von Synercid® dargestellt. In TSB-Medium konnte ab einer Konzentration von 90 ng/ml Synercid® ein leichtes Abflachen der Wachstumskurve beobachtet werden, wobei die maximal erreichte OD_{550nm} nur geringfügig reduziert war. Diese lag sowohl in TSB ohne Antibiotikum als auch mit 60 ng/ml bei circa 2,6. Bei 90 ng/ml erreichte *S. aureus* MA12 noch eine OD_{550nm} von ~2,5 und bei 120 ng/ml noch ~2,4 (Abb.4.2 A).

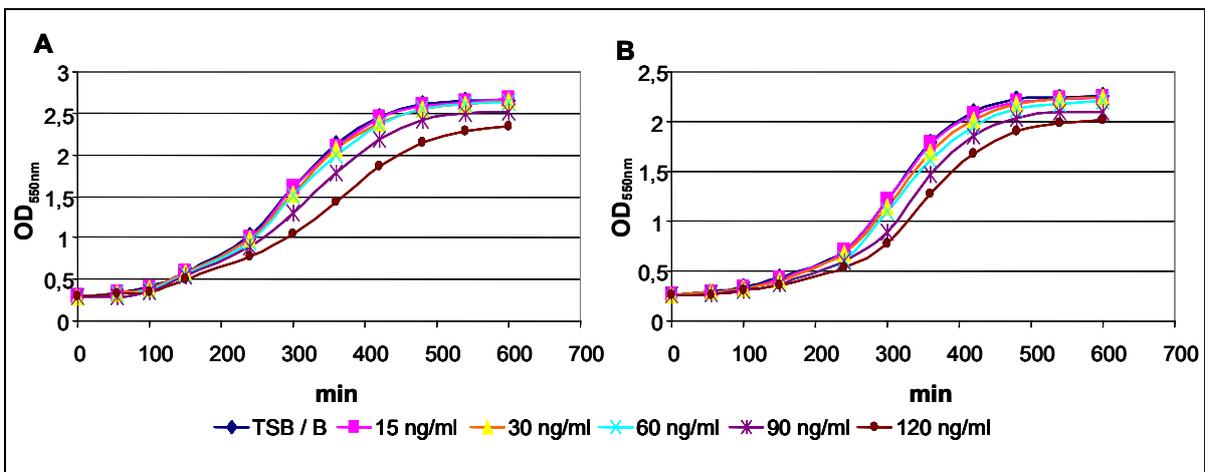


Abb. 4.2: Wachstumskurven von *S. aureus* MA12 in A) TSB- und B) B̄-Medium unter Einfluss verschiedener subinhibitorischer Synercid® Konzentrationen.

In B⁻-Medium war bereits ab einer Konzentration von 30 ng/ml ein leichtes Abflachen der Wachstumskurve zu beobachten (Abb. 4.2 B). Eine Reduzierung der maximal erreichten OD₅₅₀ wurde allerdings erst ab einer Synercid[®]-Konzentration von 90 ng/ml beobachtet. Bis zu einer Konzentration von 60 ng/ml betrug die maximale OD_{550nm} ~2,3, bei 90 ng/ml ~2,1 und bei 120 ng/ml nur noch ~2.

4.1.2. Analyse der Biofilmbildung von *S. epidermidis*

Um den Effekt subinhibitorischer Konzentrationen von Synercid[®] auf die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* zu analysieren, wurden Biofilmtests mit Polystyren-Mikrotiterplatten durchgeführt. Dabei wurde die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 567 unter verschiedenen subinhibitorischen Synercid[®]-Konzentrationen in verschiedenen Medien getestet. Da für die Synthese des Polysaccharid-Intrazellulären-Adhäsins (PIA) Glukose vermutlich ein wichtiges Substrat darstellt, wurden glukosehaltige Medien für die Biofilmtests verwendet. Um den Effekt von Glukose auf die Biofilmbildung zu verdeutlichen, wurde in Abbildung 4.3 die Biofilmbildung in TSB- und B⁻-Medium jeweils ohne und mit jeweils 0,25% Glukose dargestellt. In Medien ohne Glukose konnte nur ein sehr schwacher Biofilm gemessen und kein Effekt von Synercid[®] auf diesen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte aber in den Medien mit Glukose bereits ab einer Konzentration von 30 ng/ml Synercid[®] eine starke Induktion der Biofilmbildung beobachtet werden (Abb.4.3). Dieser Effekt konnte durch Erhöhen der Konzentration bis zu 90 ng/ml noch verstärkt werden. Ab einer Konzentration von über 90 ng/ml Synercid[®] wurde allerdings ein Rückgang des Biofilm-induzierenden Effekts beobachtet, bis schließlich bei 120 ng/ml, im Vergleich zu Bedingungen ohne das Antibiotikum, *S. epidermidis* 567 nur noch einen leicht verstärkten Biofilm bildete, was durch die bei diesen Konzentrationen einsetzende Wachstumsinhibition zu erklären ist. Des Weiteren wurde beobachtet, dass in den verschiedenen Medien zwar ein unterschiedlich starker Biofilm gebildet wurde, der Biofilm-induzierende Effekt des Antibiotikums aber immer ungefähr gleich stark war. So wurde der stärkste Biofilm in TSB-Medium gemessen (OD_{490nm} ~1,1), während in B⁻-Medium mit 0,25%igem Glukosezusatz deutlich weniger Biofilm gebildet wurde (OD_{490nm} ~0,89). In beiden getesteten Medien wurde unter einer Konzentration 60 ng/ml Synercid[®] ein circa 3mal stärkerer Biofilm als ohne das Antibiotikum gebildet (Abb. 4.3).

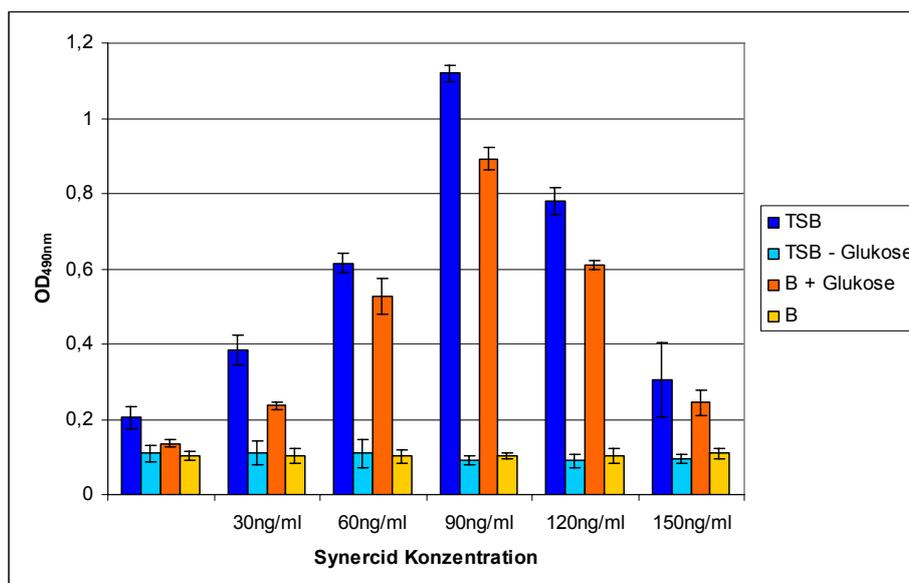


Abb. 4.3: Biofilmbildung von *S. epidermidis* 567 in TSB, TSB ohne Glukose, B⁻-Medium mit Glukose und B⁻-Medium, unter verschiedenen subinhibitorischen Synercid[®]-Konzentrationen.

In älteren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass außer durch Synercid[®] die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* auch durch Erythromycin und Tetracyclin induziert werden kann (142). Wohingegen unter dem Einfluss anderer Antibiotika, wie zum Beispiel Oxacillin, Chloramphenicol und Vancomycin, kein Effekt auf die Biofilmbildung festgestellt werden konnte. Da es sich bei Synercid[®], Tetracyclin und Erythromycin um Antibiotika handelt, welche die Synthese von Proteinen inhibieren, wurde der Effekt weiterer Translationsinhibitoren auf die Biofilmbildung untersucht. Dafür wurden, wie bereits mit Synercid[®], Biofilmtests mit *S. epidermidis* 567 unter Einfluss subinhibitorischer Konzentrationen von Kanamycin, Gentamycin, Clindamycin, sowie Erythromycin und Tetracyclin in TSB-Medium durchgeführt (Abb. 4.4). Dabei konnte unter Einfluss von Erythromycin und Clindamycin eine leichte Induktion der Biofilmbildung beobachtet werden, wobei Kanamycin, Gentamycin und Tetracyclin keinen signifikanten Effekt auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 567 ausübten. Wie bei Synercid[®] war der induzierende Effekt von Erythromycin bei Konzentrationen von 30 bis 90 ng/ml zu beobachten, wobei unter 90 ng/ml der stärkste Biofilm gebildet wurde. Clindamycin zeigt, unter den gewählten Bedingungen, ausschließlich bei Konzentrationen von 30 bis 60 ng/ml einen induzierenden Effekt auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 567. Bei Konzentrationen von 90 ng/ml übte

Clindamycin keinen messbaren Effekt auf die Biofilmbildung aus. Bei allen verwendeten Antibiotika liegen die hier verwendeten Konzentrationen, wie bereits bei Synercid[®], weit unter den für den Stamm ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen von circa 0,1 – 0,2 µg/ml.

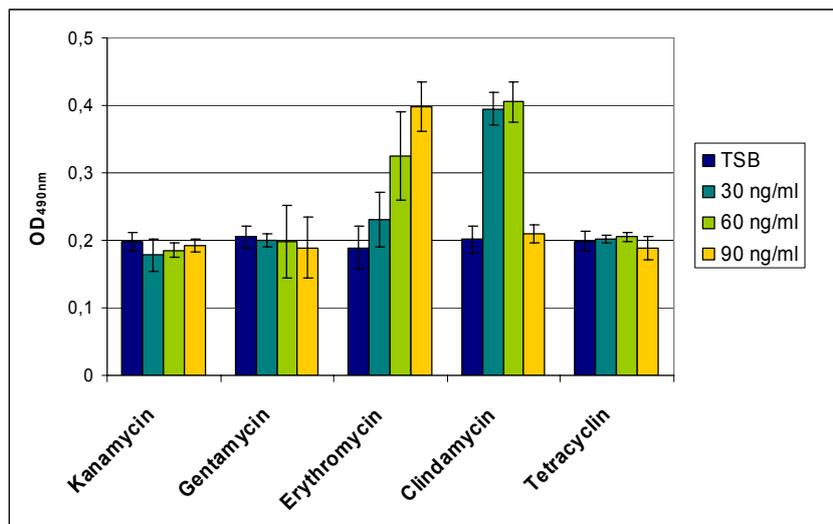


Abb. 4.4: Biofilmbildung von *S. epidermidis* 567 in TSB-Medium unter dem Einfluss verschiedenen subinhibitorischen Konzentrationen von Kanamycin, Gentamycin, Clindamycin sowie Tetracyclin.

4.1.3. Analyse der Biofilmbildung von *S. aureus*

Wie bereits mit *S. epidermidis* wurden auch mit *S. aureus* Adhärenzassays zur Analyse der Biofilmbildung unter Einfluss von Synercid[®] durchgeführt. Dafür wurden die Stämme MA12, dessen SigB-Mutante MA12-2, sowie die Laborstämme SH-1000 und 8325-4 verwendet. Wegen der stark unterschiedlichen Biofilmbildung der verschiedenen Stämme wurde in Abbildung 4.5 die relative Biofilmbildung unter Einfluss verschiedener subinhibitorischer Synercid[®]-Konzentrationen in TSB dargestellt. Bei allen getesteten Stämmen war bereits ab einer Konzentration von 30 ng/ml, im Gegensatz zu *S. epidermidis* 567, ein starker Rückgang der Biofilmbildung zu beobachten. Dieser Effekt konnte bei dem Stamm MA12 durch Erhöhen der Konzentration auf bis zu 90 ng/ml noch verstärkt werden, wohingegen bei den Stämmen MA12-2 und 8325-4 keine weitere signifikante Reduktion zu beobachten war. Die

stärkste Reduktion war bei dem Stamm SH-1000 zu beobachten. Allerdings bildet dieser generell nur einen sehr schwachen Biofilm. Dies hatte zur Folge, dass der unter dem Einfluss von Synercid[®] reduzierte Biofilm fast nicht mehr gemessen werden konnte. Außerdem waren beim Stamm MA12 zum Teil große Unterschiede in der Stärke des gebildeten Biofilms und bei 2 von insgesamt 8 Tests sogar eine durch Synercid[®] leicht induzierte Biofilmbildung zu beobachten.

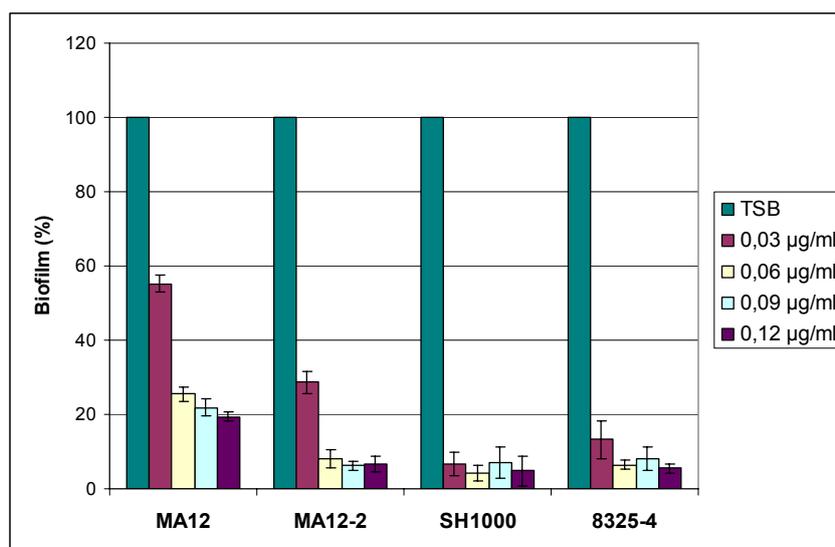


Abb. 4.5: Relative Biofilmbildung verschiedener *S. aureus* Stämme in TSB-Medium unter dem Einfluss verschiedener Synercid[®]-Konzentrationen.

4.1.4. Zusammenfassung 4.1

Die hier beschriebenen Wachstumsanalysen sowie die Adhärenzassays haben gezeigt, dass:

- 1. das Wachstum von *S. epidermidis* und *S. aureus* bereits durch Synercid®-Konzentrationen weit unter der jeweiligen MHK beeinflusst wird.**
- 2. subinhibitorische Konzentrationen von Synercid® die Biofilmbildung von *S. epidermidis* induzieren und von *S. aureus* reprimieren.**
- 3. die Biofilmbildung von *S. epidermidis* außerdem durch subinhibitorische Konzentrationen von Erythromycin und Clindamycin induziert wird, wohingegen unter dem Einfluss von subinhibitorischen Konzentrationen von Tetracyclin, Gentamycin und Kanamycin kein Einfluss auf die Biofilmbildung festgestellt werden konnte.**

4.2. Einfluss subinhibitorischer Synercid®-Konzentrationen auf das Transkriptom von Staphylokokken

Um den Einfluss subinhibitorischer Konzentrationen von Synercid® auf die Genexpression bei Staphylokokken zu untersuchen wurden Mikroarray-Experimente durchgeführt. Die dafür verwendeten Spezies-spezifischen DNA-Mikroarrays (Scienion AG, Berlin) basieren auf dem Genom von *S. epidermidis* RP62A (49) bzw. *S. aureus* N315 (95) und repräsentieren jeweils circa 90% der in den Genomen vorhandenen Gene. Für die Analysen wurde *S. epidermidis* 567 und *S. aureus* MA12 in B⁻-Medium + 60 ng/ml Synercid® bei 37°C bis zu einer OD_{550nm} von ~1 angezogen. Bei diesen Versuchen wurde B⁻-Medium ohne Glukose verwendet, da *S. epidermidis* 567 in Anwesenheit von Glukose und Synercid® in den Schüttelkulturen durch die verstärkte Bildung eines Biofilms stark verklumpen, wodurch die Isolation von RNA in ausreichender Menge und Qualität stark erschwert wird. Außerdem ist bekannt, dass Staphylokokken in einem Biofilm eine veränderte Genexpression aufweisen, die typisch für diese Wachstumsform ist. Da in diesem Fall ausschließlich die der Synercid®-induzierte Umstellung der Genexpression untersucht werden sollte, nicht aber der metabolische Zustand „Biofilm“, wurde in diesen Experimenten die Bildung des Biofilms durch Weglassen des Substrates für die PIA-Synthese unterbunden. Als Standard wurde das Transkriptom von Bakterien, die unter Kontrollbedingungen (B⁻-Medium ohne Synercid®) gewachsen waren, verwendet. Die Isolierung der Gesamt-RNA, das Herstellen der cDNA-Sonden sowie die Hybridisierung der Arrays wurden wie unter 3.2.17 beschrieben durchgeführt.

4.2.1. Transkriptionsanalysen bei *S. epidermidis*

Um Gene, deren Expression unter dem Einfluss von Synercid® unterschiedlich reguliert ist, zu identifizieren, wurden Mikroarray-Experimente durchgeführt. Dabei wurde für jede Hybridisierung frisch isolierte RNA verwendet. Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und biologische Schwankungen zu minimieren, wurden nur Transkriptome von Bakterien, die aus derselben Einzelkolonie stammten, miteinander verglichen. Das experimentelle Vorgehen ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Um Signalunterschiede durch unterschiedliche Effizienzen im Einbau der beiden Cy-markierten Nukleotide in die cDNA zu kompensieren, wurde bei der Markierung der jeweiligen cDNA abwechselnd das Cy3- und Cy5-markierte Nukleotid verwendet (Dye Switch).

cDNA-Sonden	Array #1	Array #2	Array #3	Array #4	Array #5	Array #6
Cy3 (532nm)	Kontrolle	Synercid	Kontrolle	Synercid	Kontrolle	Synercid
Cy5 (635nm)	Synercid	Kontrolle	Synercid	Kontrolle	Synercid	Kontrolle

Tab. 4.1: Zusammenfassung des experimentellen Versuchsaufbau zur Analyse des Einflusses von Synercid® auf das Transkriptom von *S. epidermidis* 567. Es wurden sechs verschiedene Hybridisierungen durchgeführt (#1-#6), wobei jede ein unabhängiges biologisches Experiment darstellt.

Auf jedem Array ist ein Gen (ORF) durch jeweils zwei Spots, die einem so genannten Feature entsprechen, repräsentiert. In Tabelle 4.2 ist die Anzahl der detektierbaren Features pro Hybridisierung zusammengefasst. Als detektierbar wurden ausschließlich Spots gewertet, bei denen ein Signal, das mindestens zweimal so stark wie das lokale Hintergrundsignal war, gemessen werden konnte. Ein Feature, und somit ein Gen, wurde immer nur dann gewertet, wenn beide Spots dieses Features als detektiert gewertet werden konnten.

cDNA-Sonden	Array #1		Array #2		Array #3		Array #4		Array #5		Array #6	
	detektierte Features	Prozent										
Cy3	903	43,3%	1519	73,2%	1416	68,2%	1554	74,9%	977	47,1%	1454	69,6%
Cy5	848	40,8%	1556	75,0%	1518	73,1%	1551	74,7%	1240	59,7%	1591	76,7%
Beide	705	33,9%	1469	70,8%	1350	65,0%	1467	70,7%	955	46,0%	1401	67,5%

Tab. 4.2: Anzahl der detektierbaren Signale pro Hybridisierung. Die Reihen zeigen an, in welchem Kanal ein Signal gemessen werden konnte. In den Spalten sind die Gesamtzahlen sowie die Prozente der detektierbaren Features pro Array aufgelistet.

Die Verwendung des RP62A-basierten *S. epidermidis*-Mikroarrays für die Transkriptionsanalyse des Stammes *S. epidermidis* 567 ergab konstante Gesamthybridisierungsraten von unter 70%. Genauere Analysen der Daten zeigten, dass für 15,5% (~320) der auf dem Array vertretenen Gene bei keiner der Hybridisierungen ein Signal gemessen werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass diese Gene (Anhang; Tab. 7.3) nicht im Genom von *S. epidermidis* 567 vorhanden sind. Somit lassen die relativ niedrigen prozentualen Hybridisierungswerte auf Sequenzunterschiede der Stämme RP62A und 567 schließen. Da nicht genügend Mikroarrays zur Verfügung standen, konnte leider keine Genomanalyse (DNA-DNA-Hybridisierung) durchgeführt werden, um dies genauer zu

verifizieren. Durch Ausschluss dieser Gene konnten, außer für den Array #1, der eine inakzeptable Hybridisierungsqualität aufweist, Effizienzen von 75 - 85% berechnet werden, wie sie bei guten Hybridisierungen zu erwarten sind. Array #1 wurde in den anschließenden Auswertungen nicht berücksichtigt.

Für alle Features mit detektierbarem Signal wurde, wie unter 3.2.17 beschrieben, das Verhältnis von Test- (mit Synercid[®]) zu Kontrollbedingung berechnet. Bei den von einem Mikroarray erhaltenen Daten wurden alle Gene mit einem Verhältnis von ≥ 2 bzw. $\leq 0,5$ als unterschiedlich reguliert betrachtet. Als signifikant unterschiedlich reguliert galten Gene, von denen mindestens 4 der insgesamt 5 Einzeldaten als unterschiedlich reguliert gewertet wurden und deren Daten eine Varianz von $< 0,1$ aufwiesen. Insgesamt konnten 235 (11,3 %) signifikant unterschiedlich regulierte Gene identifiziert werden. Davon war bei 147 (7,1 %) Genen die Expression unter dem Einfluss von Synercid[®] induziert und bei 88 Genen (4,2 %) reprimiert.

In Abbildung 4.6 wurden alle unter dem Einfluss von 60 ng/ml Synercid[®] signifikant unterschiedlich regulierten Gene nach ihrer Funktion in Kategorien unterteilt. Die Gruppen, welche die meisten der unterschiedlich exprimierten Gene enthielten, waren die der Translation (n=45), Transportsysteme (n=32), sowie des Kohlenstoff-Metabolismus (n=20) und des Aminosäure-Stoffwechsels (n=17). 41 Gene, die entweder keiner Kategorie eindeutig zugordnet werden konnten oder deren Kategorien nur einzelne Gene enthielt, wurden in der Gruppe „Andere“ zusammengefasst. Außerdem wurden 35 hypothetische Gene als unterschiedlich reguliert identifiziert. Sämtliche Einzeldaten sind im Anhang (Tabellen 7.1 und 7.2) aufgelistet.

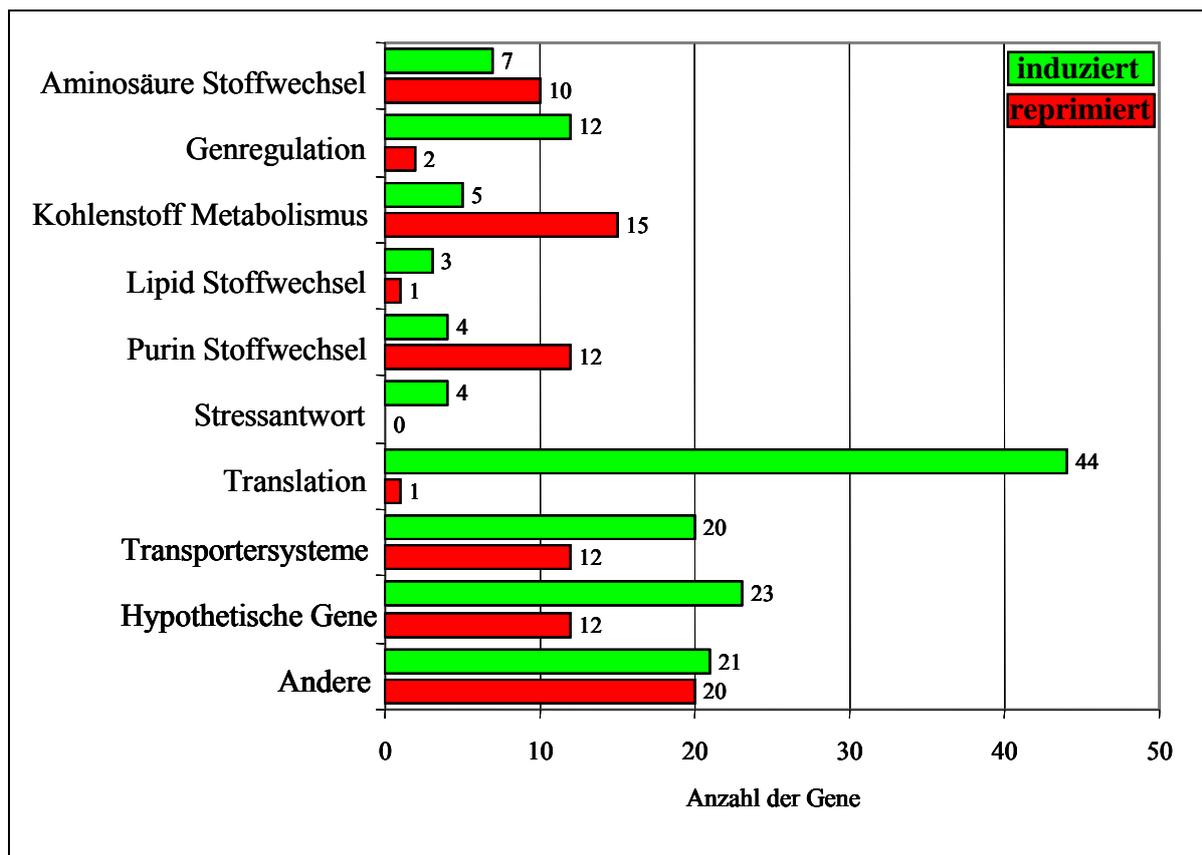


Abb. 4.6: Funktionale Gruppen von Genen, die unter dem Einfluss von 60 ng/ml Synercid[®], in *S. epidermidis* 567 signifikant unterschiedlich reguliert waren. Die Balken zeigen die Anzahl der Gene pro Gruppe an.

4.2.1.1. Translation

In dieser Gruppe wurden alle Gene zusammengefasst, die für ein Protein des Translationsapparates kodieren und unter dem Einfluss von Synercid[®] unterschiedlich reguliert waren. Sie enthält 44 Genen die für 36 ribosomale Proteine (dies entspricht ~42% aller in *S. epidermidis* identifizierten, für ribosomale Proteine kodierenden Gene), einen Elongations-, einen Initiationsfaktor, sowie fünf tRNA-Synthetasen und eine tRNA-Ribosyltransferase kodieren. Außer *pheS*, *ileS*, *aspS*, *alaS* und *valS*, die tRNA-Synthetasen kodieren (Ratio von 0,3 bis 0,49), waren alle Gene dieser Gruppe unter dem Einfluss von Synercid[®] im Vergleich zur Kontrollbedingung verstärkt exprimiert. Die stärkste Induktion konnte bei den Genen *rplK* (Ratio: 4,027) und *rplJ* (Ratio: 3,979), die beide Proteine der 50S ribosomalen Untereinheit kodieren, sowie für das *rpsN-2* (Ratio: 5,265), welches das S14 Protein der 30S Untereinheit kodiert, gemessen werden.

4.2.1.2. Metabolismus

Ungefähr 22% aller bei *S. epidermidis* 567 unter dem Einfluss subinhibitorischer Konzentrationen von Synercid[®] unterschiedlich exprimierten Gene kodieren für Proteine, die im Stoffwechsel eine Rolle spielen. Wobei vor allem Gene des Aminosäure-, Kohlenstoff-, Lipid- und Purin-Stoffwechsels unterschiedlich reguliert waren. Circa 73% der insgesamt 56 Gene dieser Gruppe waren unter dem Einfluss von Synercid[®] schwächer und 27% stärker exprimiert. Besonders auffällig war die stark abgeschwächte Expression (Ratio: 0,129 bis 0,324) von 7 der insgesamt 11 Gene des *purED*-Operons (*purEKCSQLFMNHD*). Dieses kodiert alle Enzyme, die für die Synthese von Inosinmonophosphat (IMP) aus 5-Phosphoribosyl-Diphosphat (PRPP) benötigt werden und somit eine zentrale Rolle im Purin-Stoffwechsel spielen (Abb. 4.7). Außerdem konnte das Gen *purB*, das eine Adenylosuccinat-Lyase kodiert und ebenfalls eine wichtige Rolle in diesem Stoffwechselweg spielt, als reprimiert identifiziert werden. Die Gene *apt* und *adk*, die eine Adenin-Phosphoryltransferase bzw. Adenylat-Kinase kodieren, waren die einzigen, deren Proteine eine Funktion im Purin-Stoffwechsel haben und unter dem Einfluss von Synercid[®] verstärkt exprimiert wurden.

Von den Genen, deren Proteine eine Rolle im Kohlenstoff-Metabolismus spielen, zeigten SERP0216 (Hexulose-6-phosphat-Synthase), SERP0244 (Oxidoreduktase der aldo/keto-Familie), SERP2083 (putative Sorbitol-Dehydrogenase), die alle induziert waren, sowie die *ppdK* (Pyruvatphosphat-Kinase), welche gehemmt war, die am stärksten veränderte Expression im Vergleich zur Kontrollbedingung. Viele Gene dieser Gruppe kodieren Proteine, welche direkt mit der Synthese oder Degradation von Pyruvat verbunden sind. Die Gene, welche die Proteine PdhC und PdhD kodieren waren unter dem Einfluss von Synercid[®] reprimiert (Ratio: 0,456 bzw. 0,495). Diese Proteine katalysieren die Synthese von Acetyl-CoA aus Pyruvat. Außerdem waren die Gene *ldh* und *ppdK*, die eine Lactat-Dehydrogenase bzw. eine Phosphat-Dikinase kodieren, reprimiert. Das einzige Pyruvat-umwandelnde Enzym dessen Gen unter Einfluss von Synercid[®] als induziert identifiziert werden konnte, war eine Pyruvat-Oxidase. Diese wird von dem bisher noch nicht weiter charakterisierten Gen SERP2115 kodiert und katalysiert die Synthese von Acetyl-Phosphat aus Pyruvat.

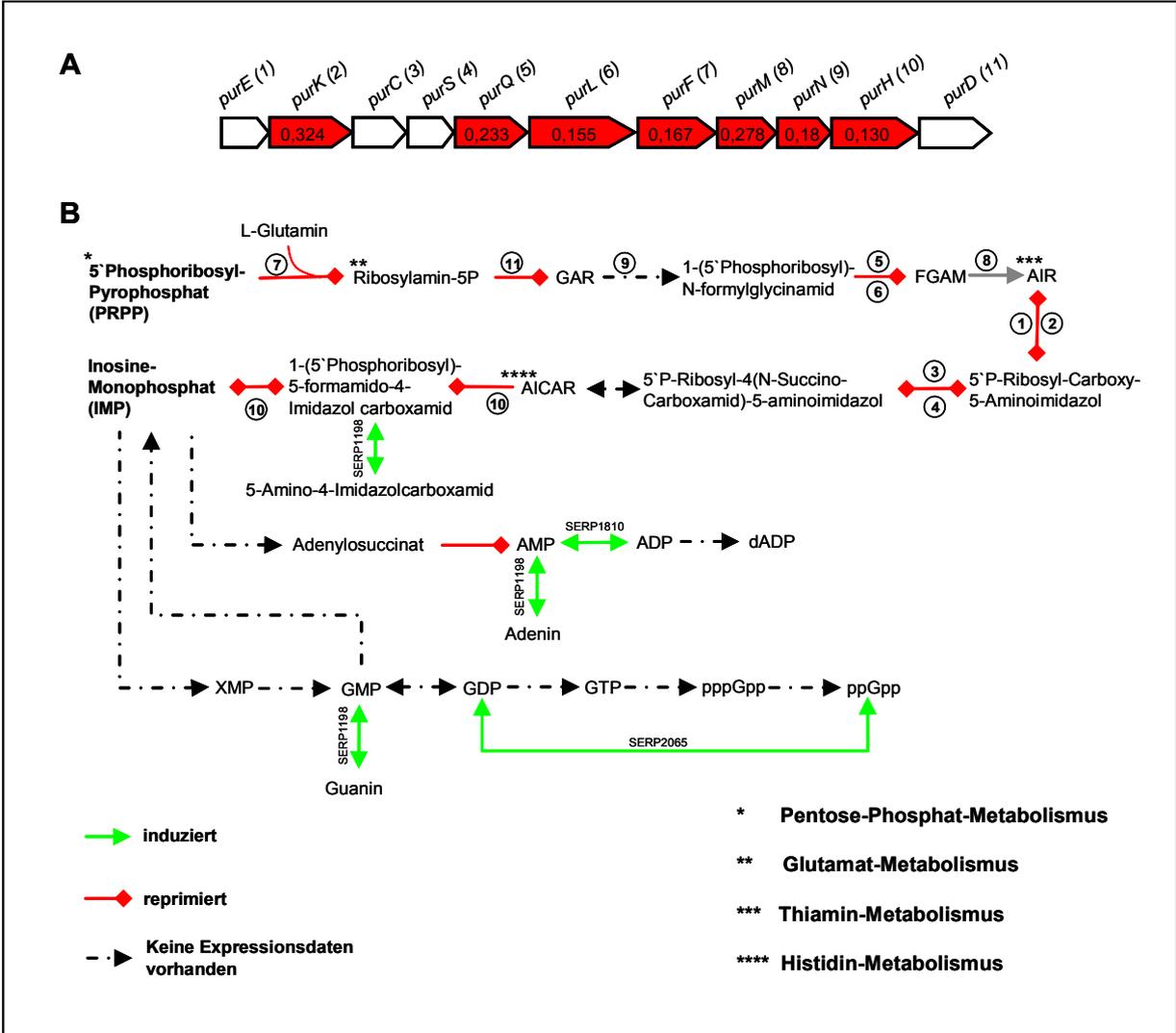


Abb. 4.7: **A)** Schematische Darstellung des *purED*-Operons von *S. epidermidis* RP62A. Gene, die bei *S. epidermidis* 567 als unterschiedlich exprimiert identifiziert wurden, sind rot markiert. Die Zahlen innerhalb der ORFs sind die jeweiligen relativen Expressionswerte. **B)** Zentrale Stoffwechselschritte des Purin-Metabolismus bei *S. epidermidis*. Die Pfeile markieren die Schritte, die von Enzymen katalysiert werden, deren Gene unter Einfluss von Synercid® induziert (grün) oder reprimiert (rot) waren. Für die Gene, deren Proteine die durch schwarze Pfeile dargestellten Schritte katalysieren, waren keine Expressionsdaten vorhanden. * markieren Verbindungen zu anderen Stoffwechselwegen. Die Zahlen markieren die Gene des *purED*-Operons (**A**) sowie die von deren Enzym katalysierten Schritte (**B**).

Die Gruppe der Aminosäure-Stoffwechsel-Gene besteht aus insgesamt 16 unterschiedlich exprimierten Genen, von denen sieben induziert und neun reprimiert waren. Unter den induzierten Genen befanden sich die Gene *sdhA* und *sdhB* (Ratio: 2,007 und 2,411). Beide kodieren eine L-Serin-Dehydrogenase, die eine Gleichgewichtsreaktion zwischen Serin und Pyruvat katalysiert. Außerdem konnten die Gene *arcA* (Ratio: 2,424) und *arcB-1* (Ratio:

2,282) als induziert identifiziert werden. Diese kodieren eine Arginin-Deaminase (*arcA*) und eine Ornithin-Carbamoyltransferase (*arcB-1*), die beide an der Energiegewinnung aus Arginin durch den Arginin-Deaminase-Stoffwechsel beteiligt sind.

Die unterschiedlich regulierten Gene, deren Proteine eine Rolle im Lipid-Stoffwechsel spielen, kodieren für zwei Alkohol-Dehydrogenasen sowie eine Glycerol-Dehydrogenase (*gldA*) und sind alle relativ stark induziert (Ratio: zwischen 2,4 und 3).

4.2.1.3. Hypothetische Gene

Es wurden 36 unter dem Einfluss von subinhibitorische Konzentrationen von Synercid[®] unterschiedlich exprimierte Gene, die hypothetische Proteine kodieren, identifiziert. Um Aufschluss über ihre mögliche Funktion zu bekommen, wurde mit Hilfe des BLAST-Algorithmus nach Proteinen mit ähnlicher Sequenz gesucht (Anhang; Tab.7.2). Das am stärksten in seiner Expression veränderte Gen war das Gen SERP0049 (Ratio: 9,204), dessen Protein Homologien zu einem integralen Membranprotein von *B. cereus* aufweist. Außerdem war das Gen SERP2065 unter dem Einfluss von Synercid[®] induziert (Ratio: 2,097). Die Datenbank Analysen haben gezeigt, dass SERP2065 ein noch nicht charakterisiertes Protein mit einer RelA/SpoT-Domäne und Ähnlichkeiten zu einer putativen GTP-Pyrophosphokinase kodiert. Proteine mit einer RelA/SpoT-Domäne sind möglicherweise sowohl bei der Synthese, als auch bei dem Abbau von Guanosin-3',-5' Pyrophosphat (ppGpp) beteiligt. Dabei handelt es sich um ein kleines Effektormolekül, das eine wichtige Rolle bei der Regulation der ribosomalen Proteinsynthese im Rahmen der Stringent response und beim Eintritt der Bakterien in die stationäre Wachstumsphase spielt. Interessanterweise wird ppGpp im Purin-Stoffwechselweg synthetisiert (25, 110, 133), der ebenfalls deutlich durch Synercid[®] beeinflusst wird (vergleiche 4.2.1.2).

4.2.1.4. Transportsysteme

Mit Hilfe der Mikroarray-Experimente wurden 32 für Proteine von Transportsystemen kodierende, und unter Synercid[®] im Vergleich zur Kontrollbedingung unterschiedlich transkribierte Gene identifiziert. 13 dieser Proteine sind Teil von ABC-Transportsystemen. Die Gene SERP0400 – SERP0403 kodieren für Proteine eines bei Staphylokokken noch nicht näher charakterisierten Eisenkomplex-ABC-Transportsystems, das Ähnlichkeiten zu dem putativen Siderophor-ABC-Transportsystem SstD aufweist (121). Ein weiteres, stark

induziertes Transportsystem war das OpuC-System. Bei diesem bereits in *B. subtilis* und *L. monocytogenes* beschriebenen System handelt es sich um einen Glycin-Betain-Transporter. Des Weiteren konnte auch das Gen *arcD* als signifikant induziert (Ratio: 2,105) identifiziert werden. Dieses kodiert einen Arginine-Ornithin-Antiporter, der Teil des bereits unter 4.1.3.2. erwähnten Arginin-Deaminase-Stoffwechsels ist.

4.2.1.5. Genregulation

In dieser Gruppe befinden sich sämtliche Gene, deren Proteine eine regulatorische Funktion ausüben. Insgesamt wurden acht dieser Gene unter dem Einfluss von Synercid[®] als unterschiedlich exprimiert identifiziert, von denen bisher ausschließlich das Gen *glnR* (Ratio: 0,360) genauer charakterisiert ist. Dieses kodiert den Regulator der Glutamin-Synthetase, der deren Expression in Abhängigkeit von der Stickstoffkonzentration reguliert (152). Bei allen anderen beruht die Zuordnung in diese Gruppe ausschließlich auf Sequenzhomologien. Das am stärksten induzierte Gen war das SERP2118 (Ratio: 3,67), das einen noch nicht weiter charakterisierten Regulator der LysR-Familie kodiert. Die anderen Regulatoren konnten den Cro/CI- und GntR-Familien zugeordnet werden.

4.2.1.6. Überprüfung der *S. epidermidis* Expressionsdaten mit Hilfe von qRT-PCR

Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die relative Expression einzelner Gene unter dem Einfluss von Synercid[®] untersucht. Somit konnten zum einen die Daten der Mikroarray-Versuche überprüft und zum anderen die Expression von Genen, von denen noch keine eindeutigen Daten vorlagen, analysiert werden. Zur Isolierung der RNA wurde *S. epidermidis* 567, wie bereits für die Mikroarray Experimente, in B⁻-Medium mit 0,06 µg/ml Synercid[®] bei 37°C bis zu einer OD_{550nm} von 1 angezogen. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie unter 3.25 beschrieben. Die für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide sind unter 3.1.10 (Tab. 3.2) aufgelistet. Zur Bestimmung der relativen Expression der Gene sowie zur Normalisierung der Daten wurde das Gen *rrsA*, das für eine 16S rRNA kodiert, verwendet. Die Ergebnisse der qRT-PCR Analysen sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

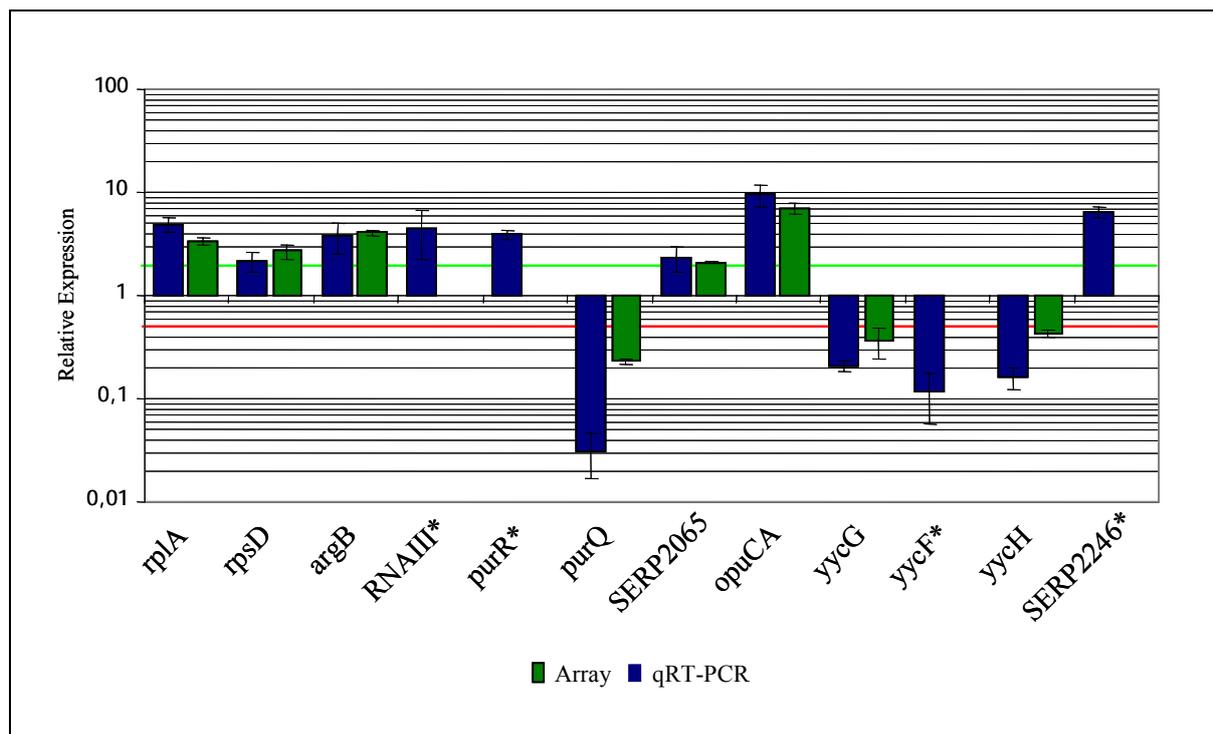


Abb. 4.8: Überprüfung der Mikroarray-Daten mit Hilfe von qRT-PCR. Im Graphen sind die Daten der qRT-PCR und die entsprechenden Daten der Mikroarrays dargestellt. * markiert Gene für die keine Mikroarraydaten vorhanden waren.

Übereinstimmend mit den Mikroarray-Experimenten, konnte mit Hilfe der qRT-PCR für die Gene *rplA*, *rpsD*, *argB*, *purQ* und *SERP2065* eine unter Einfluss von Synercid[®] induzierte und für die Gene *opuCA*, *yycG* sowie *yycH* eine reprimierte Expression gemessen werden. Die Auswahl dieser Gene erfolgte zufällig, allerdings wurde darauf geachtet, dass Gene aus unterschiedlichen funktionalen Gruppen vertreten waren. Des Weiteren konnte für die Gene, *purR*, *SERP2246* (*arcR*) sowie die *RNAIII*, für die keine Mikroarray-Daten vorlagen, eine Induktion der Expression unter dem Einfluss des Antibiotikums, nachgewiesen werden. Für *yycF*, von dem ebenfalls keine Daten vorhanden waren, wurde gezeigt, dass dieses unter dem Einfluss von Synercid[®] deutlich reprimiert ist. Von diesen Genen war bereits bekannt, dass sie entweder von einem oder mehreren der als unterschiedlich reguliert identifizierten Gene in ihrer Expression beeinflusst werden, beziehungsweise diese selbst beeinflussen.

Bei den Genen des *ica*-Operons war die Bestimmung der relativen Expression, mit Hilfe der qRT-PCR nicht möglich, da von den cDNA-Proben von RNA die unter nicht induzierenden Bedingungen isoliert wurde, kein nachweisbares PCR-Produkt gewonnen werden konnte. Da allerdings ausschließlich mit RNA aus Bakterien, die in Anwesenheit von Synercid® angezogen wurden, ein Produkt amplifiziert werden konnte, kann man darauf schließen, dass die *ica*-Gene unter dem Einfluss des Antibiotikums induziert waren.

4.2.2. Transkriptionsanalysen bei *S. aureus*

Für die Transkriptionsanalysen bei *S. aureus* MA12 wurden 5 unabhängige Mikroarray-Hybridisierungen, exakt wie bei *S. epidermidis* 567 (siehe 4.2.1), durchgeführt. Das experimentelle Vorgehen ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

cDNA-Sonden	Array #1	Array #2	Array #3	Array #4	Array #5
Cy3 (532nm)	Synercid	Kontrolle	Synercid	Kontrolle	Kontrolle
Cy5 (635nm)	Kontrolle	Synercid	Kontrolle	Synercid	Synercid

Tab. 4.3: Zusammenfassung des experimentellen Versuchsaufbau zu Analyse des Einflusses von Synercid® auf das Transkriptom von *S. aureus* MA12. Es wurden fünf verschiedene Hybridisierungen durchgeführt. Jede Hybridisierung stellt ein unabhängiges biologisches Experiment dar.

Die Qualität der Hybridisierungen wurde, wie bereits unter 4.3.1. beschrieben, anhand der detektierbaren Spots ermittelt. In Tabelle 4.4. ist die Anzahl der detektierbaren Features pro Hybridisierung zusammengefasst. Die besten Ergebnisse wurden mit den Arrays #1, #2 und #4 erzielt. Bei diesen konnten zwischen 80% und 91% der Features detektiert werden. Bei Array #3 wurde nur ein unzureichendes Hybridisierungsergebniss mit circa 65% detektierbaren Features, erzielt. Dieser wurde bei den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

cDNA-Sonden	Array #1 detektierte Features	Array #2 detektierte Features	Array #3 detektierte Features	Array #4 detektierte Features	Array #5 detektierte Features
Cy3	2176 81,7%	2469 92,6%	1777 66,7%	2511 94,2%	2133 80,0%
Cy5	2287 85,8%	2504 94,0%	2339 87,8%	2393 89,8%	1855 69,6%
Beide	2150 80,7%	2437 91,4%	1741 65,3%	2387 89,6%	1768 66,3%

Tab. 4.4: Anzahl der detektierbaren Spots pro Hybridisierung. Die Reihen zeigen an, in welchem Kanal ein Signal gemessen werden konnte. In den Spalten sind die Gesamtzahlen sowie Prozente der detektierbaren Features aufgelistet.

Durch Analyse der Array-Daten konnten insgesamt 488 (20,7%) unterschiedlich regulierte Gene identifiziert werden. Allerdings wurden wegen der zum Teil großen Unterschiede zwischen den Arrays große Varianzen der Expressionsdaten akzeptiert, wenn diese dieselbe Tendenz (induziert oder reprimiert) zeigten. 118 (5,02%) der Gene waren unter dem Einfluss von Synercid[®] in ihrer Expression induziert und 370 (15,7%) reprimiert. In Abbildung 4.9 wurden alle signifikant unterschiedlich regulierten Gene nach ihrer Funktion in Gruppen unterteilt. Die weitaus größte Gruppe bildeten die hypothetischen Gene (n=268). Die funktionalen Gruppen mit den meisten unterschiedlich regulierten Genen, waren die der Translation (n=40), Aminosäure-Metabolismus (n=31), Transportsysteme (n=30) sowie Nukleotid- (n=28) und Kohlenstoff-Metabolismus (n=27). 31 Gene, die entweder keiner Gruppe eindeutig zugeteilt werden konnten oder deren Kategorien nur einzelne Gene enthielten, wurden in der Gruppe „Andere“ zusammengefasst. Sämtliche Daten sind im Anhang (Tab.7.4) aufgelistet.

4.2.2.1. Translation

In dieser Gruppe sind alle Gene zusammengefasst die unter dem Einfluss von Synercid[®] unterschiedlich reguliert waren und Proteine des Translationsapparates kodieren. Es befinden sich insgesamt 40 Gene in dieser Gruppe. Diese kodieren 35 ribosomale Proteine, zwei Elongationsfaktoren, einen Initiationsfaktor, sowie ein DNA-Bindeprotein und einen Ribosomen-Recycling-Faktor. All diese Gene waren in *S. aureus* MA12 unter Einfluss von Synercid[®] signifikant induziert (Ratio: 2,02 bis 4,99).

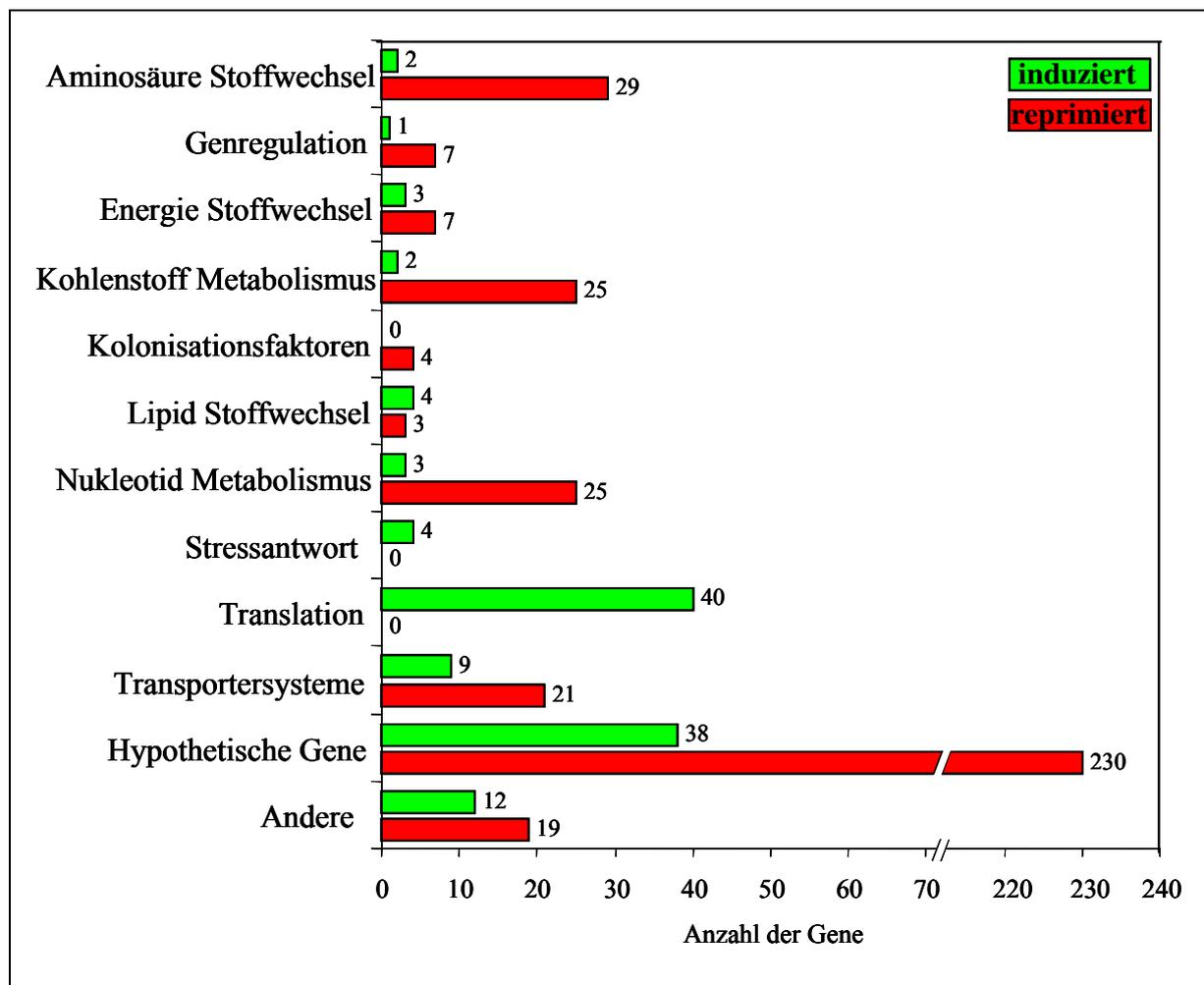


Abb. 4.9: Funktionale Gruppen von Genen die, unter dem Einfluss subinhibitorischer Synercid[®]-Konzentrationen bei *S. aureus* MA12 unterschiedlich exprimiert waren. Die Balken zeigen die Anzahl der Gene pro Gruppe an. Die Zahlen geben die Gesamtzahl der Gene pro Gruppe an.

4.2.2.2. Metabolismus

21,3 % aller in *S. aureus* MA12 unter dem Einfluss von Synercid[®] unterschiedlich regulierter Gene kodieren Proteine mit einer Funktion im Stoffwechsel. Es waren vor allem Gene, deren Enzyme eine Rolle im Aminosäure-, Nukleotid-, Kohlenstoff- sowie Energie- und Lipid-Stoffwechsel spielen, betroffen. Insgesamt waren ~1,4% der Gene dieser Gruppe unter dem Einfluss von Synercid[®] stärker und 98,6% schwächer exprimiert.

28 Gene des Nukleotid-Stoffwechsels wurden unter dem Einfluss von Synercid[®] unterschiedlich exprimiert. Von diesen waren die Gene *adk*, *ctrA* und *ndk* die einzigen, die induziert waren. Als reprimiert wurden 8 der insgesamt 11 Gene des *purED*-Operons (vergleiche Abb. 4.5), deren Enzyme die Synthese von IMP aus PRPP im Purin-Stoffwechsel

katalysieren, gefunden. Ebenfalls reprimiert waren die Gene *pyrAA*, *pyrAB*, *pyrB*, *pyrC*, *pyrE* und *pyrF*, die auf dem Genom von *S. aureus* N315 innerhalb eines 12 Gene umfassenden Genclusters lokalisiert sind (Abb. 4.10). Die Pyr-Proteine katalysieren im Pyrimidin-Stoffwechsel die Synthese von UMP aus L-Glutamin. Des Weiteren waren auch die Gene *ureA*, *ureB*, *ureC*, sowie *ureF* und *ureG* unter dem Einfluss von Synercid[®] reprimiert. Deren Proteine sind am Abbau von Harnstoff zu CO₂ und NH₃ beteiligt.

Von den verschiedenen Stoffwechselwegen des Aminosäure-Metabolismus waren hauptsächlich Gene der Lysin-Biosynthese, des Histidin-, sowie Arginine-Prolin-Metabolismus und der Valin-Leucin-Isoleucin-Biosynthese unter dem Einfluss von Synercid[®] unterschiedlich reguliert. Die einzigen Gene mit induzierter Expression waren das *dltA* (Ratio: 3,994), das eine Ligase kodiert welche die Umwandlung von D-Alanin in D-Alanyl-Polyribitolphosphat katalysiert, und das *pfs* (Ratio: 2,852). Dieses kodiert eine Nukleosidase, welche die Synthese von Adenin aus 5-Methylthioadenosin im Arginine-Prolin-Metabolismus katalysiert. Gene, die unter Synercid[®] abgeschwächt exprimiert waren und Enzyme des Arginine-Prolin-Metabolismus kodieren waren das *arcA* (Ratio: 0,355), dessen Enzym die Synthese von Citrullin aus Arginin katalysiert, sowie *rocA* (Ratio: 0,154) und *rocD* (Ratio: 0,257). Die Proteine der Gene *rocA* und *rocD*, eine 1-Pyrrolin-5-Carboxylat Dehydrogenase und eine Ornithin-Aminotransferase, katalysieren eine Gleichgewichtsreaktion zwischen L-Glutamat (Glutamat-Metabolismus) und Ornithin, das dann wiederum über den Harnstoffzyklus zu Citrullin umgewandelt werden kann. Die Gene *ilvB*, *ilvC* sowie das *ilvD* kodieren Enzyme, welche die Synthese von L-Valin und L-Isoleucin aus Pyruvat (Pyruvat-Metabolismus) und 2-Oxobutanoat (Glycin-Serin-Threonin-Metabolismus) katalysieren.

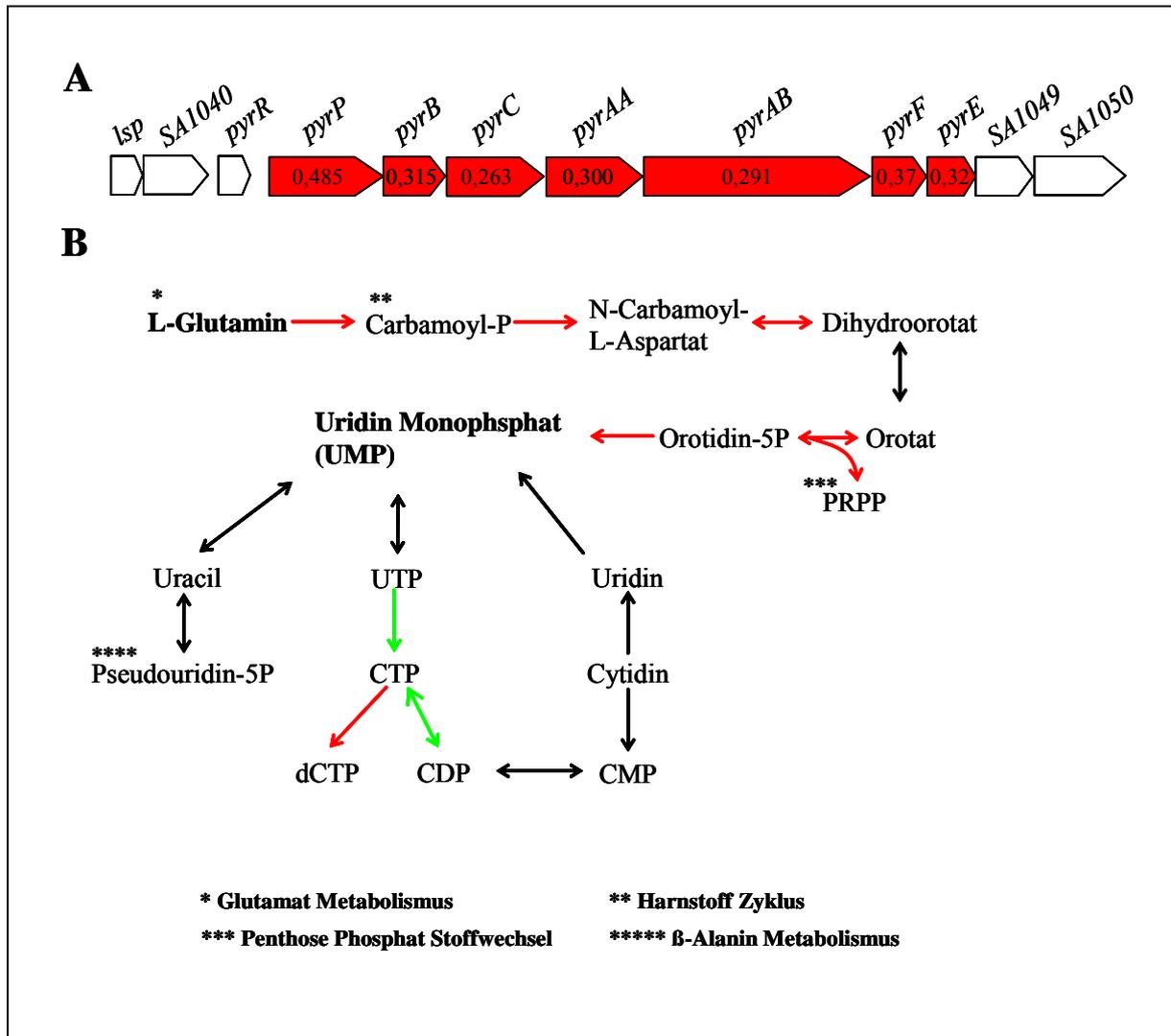


Abb. 4.10: **A)** Schematische Darstellung des *pyr*-Operons von *S. aureus*. Gene, die als unterschiedlich exprimiert identifiziert wurden, sind rot markiert. Die Zahlen innerhalb der ORFs sind die jeweiligen relativen Expressionswerte. **B)** Zentrale Stoffwechselschritte des Pyrimidin-Metabolismus bei *S. epidermidis*. Die Pfeile markieren die Schritte, die von Enzymen katalysiert werden, deren Gene unter Einfluss von Synercid[®] induziert (grün) oder reprimiert (rot) waren. Für die Gene, deren Proteine die durch schwarze Pfeile dargestellten Schritte katalysieren, waren keine Expressionsdaten vorhanden. * markieren Verbindungen zu anderen Stoffwechselwegen.

Von unterschiedlich exprimierten Gene, deren Proteine am Kohlenstoff-Metabolismus beteiligt sind, waren nur das *gap* (Ratio: 2,730) und das *pgk* (Ratio: 2,196) unter dem Einfluss von Synercid[®] induziert. Deren Proteine katalysieren die Gleichgewichtsreaktionen zwischen Glyceraldehyd-3-Phosphat und Glycerat-3-Phosphat in der Glykolyse. Vom Galaktose-Metabolismus waren die Gene *lacA*, *lacB*, *lacC*, *lacD* und *lacG* reprimiert. Deren Proteine katalysieren die Synthese von Laktose-6-Phosphat aus D-Glyceraldehyd-3-Phosphat und

Es waren 7 Gene, deren Proteine eine Rolle im Fettsäure-Stoffwechsel spielen, unter dem Einfluss von Synercid[®] unterschiedlich exprimiert. Die Gene der Proteine AccC, FabD, FabG sowie PlsX, die gemeinsam Fettsäuren aus Acetyl-CoA synthetisieren, waren alle ungefähr gleichstark induziert (Ratio: circa 2,3). Wohingegen die Gene (*geh*, *lip* und SA0223) deren Proteine am Abbau von Fettsäuren beteiligt sind, unter dem Einfluss von Synercid[®] leicht reprimiert waren (Ratio: 0,328 - 0,495).

4.2.2.3. Oberflächenproteine und Zellwandsynthese

Mit Hilfe der Mikroarray-Experimente konnten 18 Gene, die Zellwandproteine oder Faktoren der Zellwandsynthese kodieren, als unter Synercid[®] unterschiedlich reguliert identifiziert werden. In dieser Gruppe waren außer den Genen *clfB* und *tagA* noch insgesamt 14 Gene, die Kapselproteine kodieren, unter Synercid[®] reprimiert. Außerdem konnten die Gene *ftsH*, das einen Zellteilungsfaktor kodiert und *pep2*, welches das Penicillin-Bindeprotein 2 kodiert, in *S. aureus* MA12 als induziert identifiziert werden.

4.2.2.4. Genregulation

In dieser Gruppe wurden sämtliche Gene zusammengefasst, deren Proteine eine regulatorische Funktion ausüben. Es konnten insgesamt 8 dieser Gene als unterschiedlich reguliert identifiziert werden. Vier von diesen Genen, sind Regulatoren von Stoffwechsel Genen (*lacR*, *gapR*, *gntR* und *malR*). LacR, der Repressor des Lactose-Operons (*lacABCDFEG*), von dem einige Gene unter dem Einfluss von Synercid als reprimiert identifiziert wurden (vergleiche 4.2.2.2), war unter dem Einfluss von Synercid[®] induziert. Ebenfalls induziert war das Gen *gapR*, das den Aktivator von *gap* darstellt. Damit übereinstimmend wurde dieses, welches die Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase Gap kodiert, als induziert identifiziert (vergleiche 4.2.2.2). Im Gegensatz dazu war das Gen *gntR*, das den Repressor des Glukonat-Operons kodiert, sowie das *malR*, welches den Repressor des Maltose-Operons kodiert, unter dem Einfluss von Synercid[®] reprimiert.

Des Weiteren waren Gene, deren Produkte Teil des bei Staphylokokken sehr komplexen, globalen Regulationsnetzwerkes sind, unter dem Einfluss von Synercid[®] unterschiedlich reguliert. Dabei handelt es sich um die SarA-homologen Gene *sarH1* (*sarS*), *sarH2* (*sarT*) und *sarH3* (*sarU*), sowie den Toxin-Repressor *rot*, die unter dem Einfluss von Synercid[®]

reprimiert waren. Wegen zu großer Varianzen der einzelnen Arraydaten von SarA und der *agr*-Gene, konnte ihre relative Expression nicht bestimmt werden.

4.2.2.5. „Andere“

Hier wurden alle Gene zusammengefasst, die entweder keiner Gruppe eindeutig zugeteilt werden konnten, oder deren Kategorien nur einzelne Gene enthielten. Dabei handelt es sich um Gene der Biotin-Synthese (*bioA*, *bioB*, *bioD*) und Gene, die die RNA-Polymerase-Untereinheiten (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC*) kodieren, sowie die Gene für das Antigen (*isaA*) und die Hämolyse (*hlgB*, *hlgC*). In dieser Gruppe sind ebenfalls die als reprimiert identifizierten Gene *icaA* (Ratio: 0,319) und *icaC* (Ratio: 0,486) des *ica*-Operons enthalten. Diese Daten stimmen, auch wenn für die restlichen Gene des Operons keine eindeutigen Daten durch die Mikroarray-Experimente gewonnen werden konnten, mit den Erwartungen aus den Biofilmtest (vergleiche 4.1.3) überein.

4.2.2.6. Überprüfen der *S. aureus* Expressionsdaten mit Hilfe von qRT-PCR

Mit Hilfe der qRT-PCR sollten die Mikroarraydaten überprüft werden. Zur Isolierung der RNA wurde *S. aureus* MA12, wie bereits für die Mikroarray Experimente, in B⁻-Medium mit 60 ng/ml Synercid[®] bei 37°C bis zu einer OD_{550nm} von 1 angezogen. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie unter 3.25 beschrieben. Die für die qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide sind unter 3.1.10 (Tabelle 3.3) aufgelistet. Zur Bestimmung der relativen Expression der Gene sowie zur Normalisierung der Daten wurde die Gene *srrA* und *srrB*, die beide eine 16S rRNA kodieren sowie *gyrA*, das die Gyrase-Untereinheit A kodiert, verwendet.

Insgesamt konnten mit fast allen verwendeten Oligonukleotiden erfolgreiche qRT-PCR Reaktionen durchgeführt werden. Allerdings wurde beim Vergleich von qRT-PCRs, die mit cDNA aus unterschiedlicher RNA durchgeführt wurden, festgestellt dass die relative Expression der untersuchten Gene starke Unterschiede in ihrer Stärke und zum Teil auch ihrer Tendenz (stärker bzw. schwächer exprimiert als unter Kontrollbedingungen) aufwiesen. Trotz mehrfacher Kontrollen der Wachstumsbedingungen sowie Überprüfung der Bakterienkultur auf Kontaminationen konnte das Problem nicht gelöst werden. Es war daher nicht möglich mit Hilfe der qRT-PCR verwertbare Expressionsdaten, die mit denen der Mikroarray-Experimente hätten verglichen werden können, zu gewinnen.

Es muss daher betont werden, dass die Array-Daten mit Hilfe der durchgeführten qRT-PCRs bisher nicht bestätigt werden konnten. Es wurden aber, wie bereits bei den Arrays, sehr starke Schwankungen bezüglich der Expression der Gene unter dem Einfluss von Synercid® im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Phänotypische Beobachtungen hinsichtlich der Koloniemorphologie, des Wachstumsverhaltens und der Biofilmbildung zeigten im Verlauf dieser Arbeit, dass der Stamm *S. aureus* MA12 auch bei diesen Parametern eine erhebliche Variabilität und Schwankungsbreite aufwies. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es sich bei *S. aureus* MA12 möglicherweise um einen Mutatorstamm handelt (siehe Abschnitt 4.4.).

4.2.3. Zusammenfassung 4.2

Die Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass subinhibitorische Synercid®-Konzentrationen:

- 1. das Transkriptom sowohl bei *S. epidermidis* 567 als auch bei *S. aureus* MA12 stark beeinflussen.**
- 2. sowohl bei *S. epidermidis* 567 als auch bei *S. aureus* MA12 neben einer Reihe von Genen vor allem solche, die Proteine der Translation kodieren induzieren und solche, welche Enzyme des Nukleotid- und Kohlenstoff-Metabolismus kodieren, reprimieren.**

4.3. Nukleotid-Stoffwechsel und seine Rolle bei der Biofilmbildung von Staphylokokken

Die Transkriptionsanalysen bei *S. epidermidis* wie auch bei *S. aureus* legen einen starken Einfluss von Synercid[®] auf den Nukleotid-Stoffwechsel nahe. So kann man zum Beispiel, anhand der beobachteten Repression des *purED*-Operons auf eine erhöhte Konzentration von Zwischenprodukten des Purin-Stoffwechsels schließen, da diese für die Aktivierung des PurR, dem Repressor des Operons, eine Rolle spielt. Es wurde daher untersucht ob, die Anwesenheit von extrazellulären Nukleotiden einen ähnlichen Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* und *S. aureus* wie Synercid[®] ausübt.

Des Weiteren wurde bei *S. epidermidis* eine induzierte Expression des Gens SERP2065, das eine GTP-Pyrophosphatase mit einer RelA/SpoT-Domäne kodiert, unter dem Einfluss von Synercid[®] festgestellt. Diese Domäne ist charakteristisch für Proteine, welche die Synthese und/oder den Abbau von ppGpp katalysieren. Durch Messen der intrazellulären ppGpp-Konzentration sollte ein möglicher Einfluss der verstärkten Expression von SERP2065 auf die Konzentration des Signalmoleküls untersucht werden. Außerdem sollte durch die Bestimmung der GTP-Konzentration festgestellt werden, ob eine Veränderung der ppGpp-Konzentration die Konzentration anderer Zwischenprodukte des Purin-Stoffwechsels verändert wird.

4.3.1. Einfluss von extrazellulären Nukleotiden auf die Biofilmbildung von Staphylokokken

Um den Effekt von extrazellulären Nukleotiden auf die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 567 und *S. aureus* MA12 zu analysieren, wurden Biofilmtests mit Polystyren-Mikrotiterplatten durchgeführt. Dabei wurde die Biofilmbildung der Bakterien in TSB-Medium und unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von Ionisinmonophosphat, Guanosinmonophosphat sowie Cytosinmonophosphat untersucht.

In Abbildung 4.12 ist die relative Biofilmbildung von *S. epidermidis* 567 unter Einfluss der Nukleotide im Vergleich zur Biofilmbildung in TSB dargestellt. Die Analysen ergaben, dass *S. epidermidis* 567 unter Anwesenheit von extrazellulärem Ionisinmonophosphat (IMP), Guanosinmonophosphat (GMP) und Cytosinmonophosphat (CMP) einen verstärkten Biofilm

bildet. Allerdings wurde unter Einfluss von CMP Konzentrationen von über 3 mM keine induzierte Biofilmbildung mehr beobachtet. Die stärkste Induktion der Biofilmbildung war unter dem Einfluss von 3 bzw. 5 mM IMP zu beobachten (Ratio ~1,29).

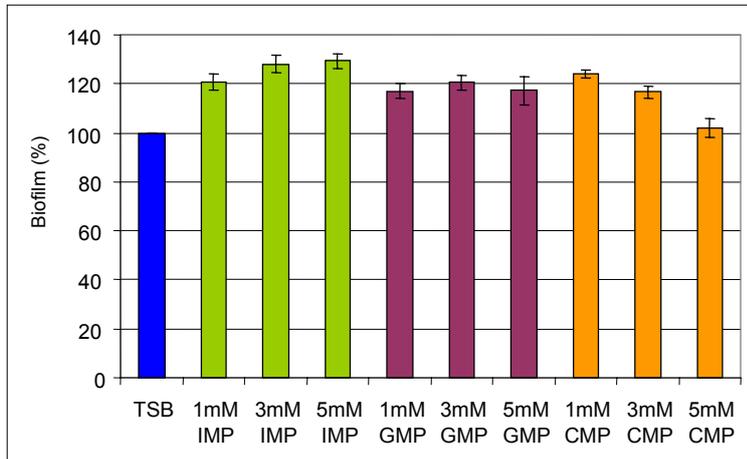


Abb. 4.12: Relative Biofilmbildung von *S. epidermidis* 567 unter dem Einfluss von Inosinmonophosphat (IMP), Guanosinmonophosphat (GMP) und Cytosinmonophosphat (CMP) im Vergleich zur Biofilmbildung in TSB.

Im Gegensatz zu *S. epidermidis* 567 konnte bei *S. aureus* MA12 ausschließlich unter dem Einfluss von extrazellulärem CMP eine leicht verstärkte Biofilmbildung beobachtet werden (Abb. 4.13). Unter dem Einfluss von IMP und GMP war kein signifikanter Unterschied zur Biofilmbildung in TSB zu erkennen.

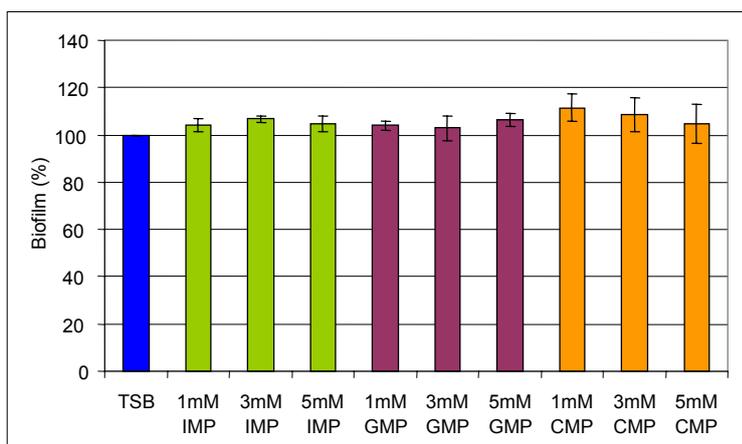


Abb. 4.13: Relative Biofilmbildung von *S. aureus* MA12 unter dem Einfluss von Inosinmonophosphat (IMP), Guanosinmonophosphat (GMP) und Cytosinmonophosphat (CMP) im Vergleich zur Biofilmbildung in TSB.

4.3.2. Einfluss von Synercid® auf die Konzentration von intrazellulärem Guanosin-3`-5`-bisphosphat und Guanosintriphosphat (GTP)

Um die intrazelluläre Konzentration des ppGpp sowie des GTP zu bestimmen wurden, in Kooperation mit Tanja Schirmeister und Markus Schiller (Institut für Pharmazie, Universität Würzburg) wie unter 3.2.20 beschrieben, HPLC-Analysen durchgeführt. Dafür wurden *S. epidermidis* 567 und *S. aureus* MA12 in B-Medium ohne und mit 60 ng/ml Synercid® bis zu einer OD_{550nm} von ~1,0 angezogen. Die intrazellulären Nukleotide wurden, wie unter 3.2.20 beschrieben, aus den Bakterien isoliert. In Abbildung 4.14 sind die Chromatogramme und UV-Spektren der Proben von *S. epidermidis* 567 dargestellt.

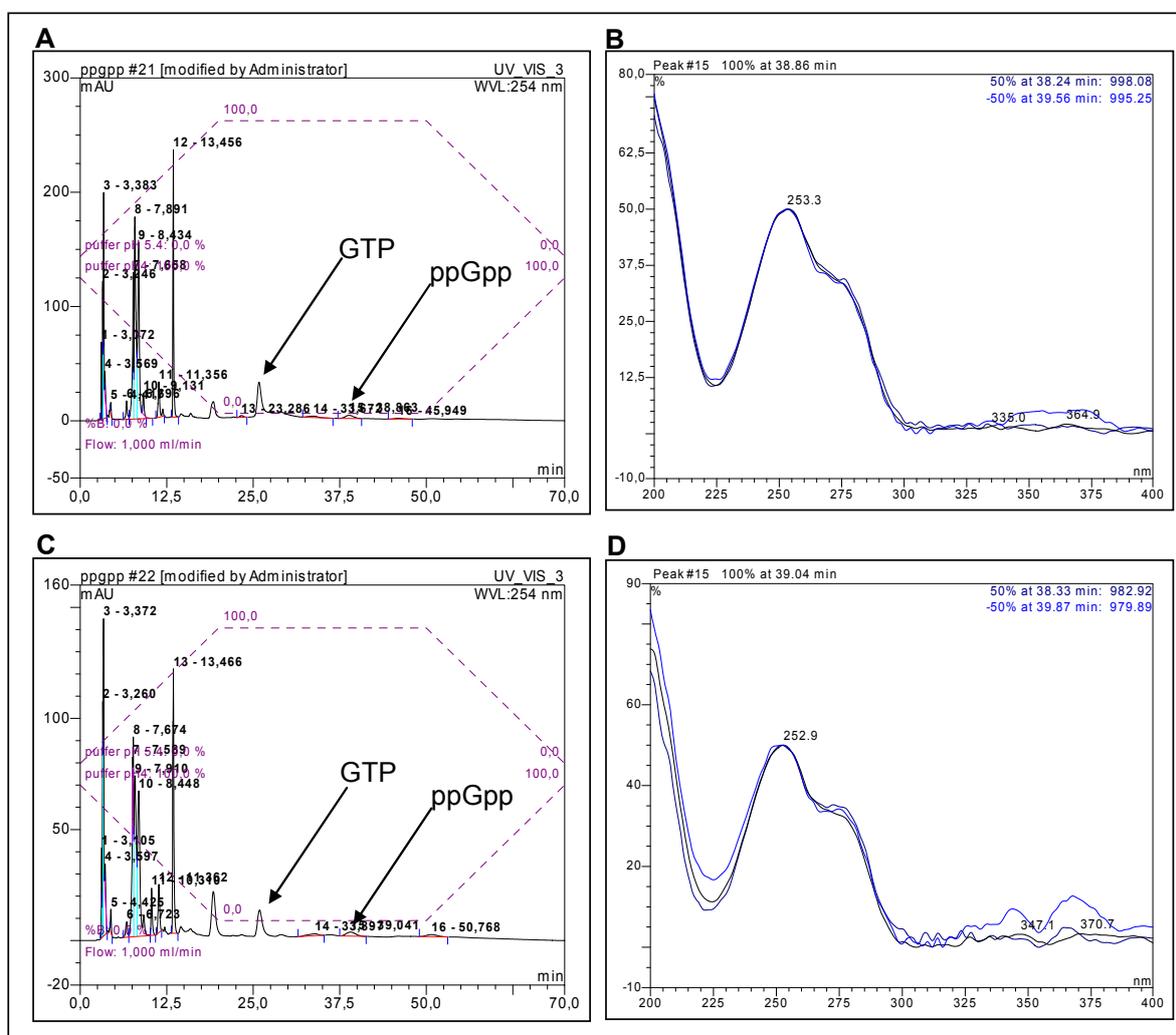


Abb. 4.14: Chromatogramm der intrazellulären Nukleotide von *S. epidermidis* 567 in **A)** B-Medium und **C)** B-Medium + 60 ng/ml Synercid® und das UV Spektrum des ppGpp Peaks von *S. epidermidis* 567 in **B)** B-Medium und **D)** B-Medium + 60 ng/ml Synercid®.

Die ppGpp-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe zweier Standard-Verdünnungen (1mM; 10 μ M) bestimmt. Die mit Hilfe der jeweiligen Peak-Integration berechneten Konzentrationen sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Die Daten zeigen, dass die ppGpp-Konzentration in *S. epidermidis* und *S. aureus* unter dem Einfluss von Synercid[®] im Vergleich zu den Standardbedingungen, deutlich reduziert war. In *S. epidermidis* 567 wurden Konzentrationen von ~ 235 nmol mg⁻¹ Trockenzellgewicht (dcw) unter Standardbedingungen und ~ 146 nmol mg⁻¹ dcw unter dem Einfluss von Synercid[®] gemessen. Somit ist die Konzentration in *S. epidermidis* 567 unter dem Einfluss von Synercid[®] um circa 38% reduziert. Die bei *S. aureus* MA12 bestimmten Konzentrationen lagen bei ~ 261 nmol mg⁻¹ dcw (Standardbedingung) und ~ 64 nmol mg⁻¹ dcw. Dies entspricht einer, um circa 74% reduzierten ppGpp-Konzentration unter dem Einfluss von Synercid[®].

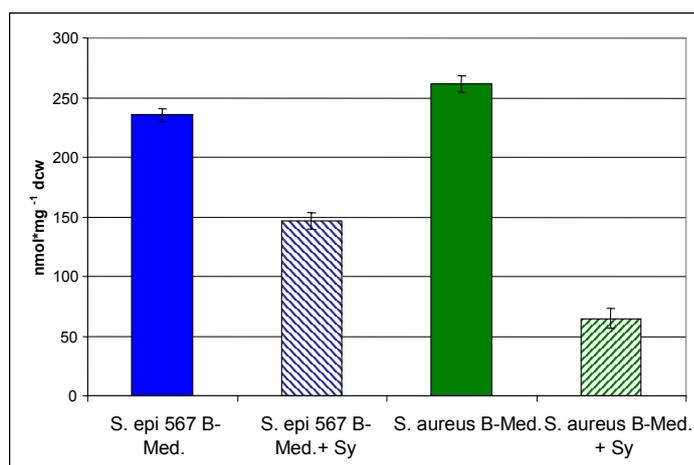


Abb. 4.15: Intrazelluläre ppGpp-Konzentration von *S. epidermidis* und *S. aureus* in B-Medium mit und ohne 60 ng/ml Synercid[®].

Aus technischen Gründen konnten die GTP-Konzentrationen nicht bestimmt werden, daher wurden hier die durch Integration der Peaks bestimmten relativen Werte miteinander verglichen. Die GTP-Konzentration der Proben aus Bakterien, die ohne Synercid[®] angezogen wurden, ist in Abbildung 4.16 als 100% angegeben.

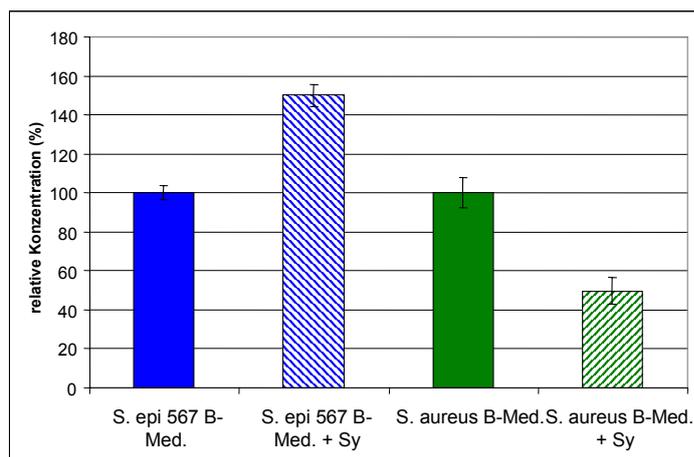


Abb. 4.16: Relative Konzentration von intrazellulärem GTP von *S. epidermidis* und *S. aureus* in B-Medium mit, und ohne 60 ng/ml Synercid®.

Wie die Daten zeigen, ist die Konzentration von GTP in *S. epidermidis* 567 unter dem Einfluss von Synercid® im Vergleich zur Standardbedingung um ~50% erhöht. Im Gegensatz dazu wurde in *S. aureus* MA12 unter dem Einfluss des Antibiotikums eine im Vergleich zur Standardbedingung um circa 48% reduzierte Konzentration von intrazellulärem GTP gemessen.

4.3.3. Zusammenfassung 4.4

Die Untersuchungen haben ergeben, dass:

1. *S. epidermidis* 567 unter dem Einfluss von extrazellulärem IMP, GMP und CMP einen verstärkten Biofilm bildet.
2. Die Biofilmbildung von *S. aureus* MA12 unter dem Einfluss von extrazellulärem IMP, GMP und CMP nicht beeinflusst wird.
3. sowohl bei *S. epidermidis* 567 als auch *S. aureus* MA12, unter dem Einfluss von 60 ng/ml Synercid®, die Konzentration von intrazellulärem ppGpp reduziert ist.
4. bei *S. epidermidis* 567, unter dem Einfluss von 60 ng/ml Synercid®, die Konzentration von intrazellulärem GTP stark erhöht ist. Wohingegen bei *S. aureus* MA12 eine reduzierte Konzentration gemessen wurde.

4.4. Analyse der Frequenz von Punktmutationen bei *S. aureus* MA12

Da die mit dem *S. aureus* MA12 durchgeführten Transkriptionsanalysen auffällig große Unterschiede in der Genexpression gezeigt haben, wurde vermutet, dass es sich dabei möglicherweise um einen Stamm mit erhöhter Mutationsfrequenz handelt.

Um die Frequenz von Punktmutationen bei *S. aureus* MA12 zu bestimmen, wurde als Maß die Entstehung von Rifampicin-resistenten Klonen herangezogen, die auf Spontanmutationen im *rpoB*-Gen beruht, das für die RNA-Polymerase kodiert. Dazu wurden, wie unter 3.5 beschrieben, Verdünnungen von Übernachtskulturen auf MH-Agarplatten mit und ohne Rifampicin ausplattiert. Diese wurden bei 37°C für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert und anschließend die Anzahl der Rifampicin-resistenten Kolonien bestimmt. Der Versuch wurde achtmal durchgeführt, wobei *S. aureus* MA12 aus zwei verschiedenen Stammsammlungen (AG Ziebuhr und AG Ohlsen) verwendet wurde.

Weder bei Bakterien die in LB-Medium noch bei denen, die in Anwesenheit von Synercid[®] angezogen wurden, konnte nach 24-stündiger Inkubation eine erhöhte Mutationsfrequenz bestimmt werden ($6,5 \times 10^{-8}$ bis $2,9 \times 10^{-9}$). Erst nach weiterer Inkubation für 24 Stunden war eine ungewöhnlich große Anzahl resistenter Klone bei zwei (LB-Medium) bzw. einem (LB + Synercid[®]) der Tests zu beobachten. Das Bestimmen der Frequenz ergab Werte von $5,3 \times 10^{-3}$ bis $7,6 \times 10^{-2}$. Da die Klone sich stark in Größe und Morphologie der Kolonien unterschieden (Abb. 4.17), wurde zunächst eine Kontamination der Platten vermutet. Mit Hilfe des API-Staph-Systems konnte dies allerdings eindeutig ausgeschlossen werden.

Um auszuschließen, dass das Auftreten der Klone nach zwei Tagen möglicherweise durch einen einsetzenden Abbau des Antibiotikums bedingt war, wurden die Versuche mit antibiotikumhaltigen Agarplatten wiederholt, die ohne Inokulum bereits für 42 h bei 37°C vorinkubiert waren. Diese Kontrollen ergaben keine Unterschiede zum oben beschriebenen Versuch, so dass die größere Anzahl der beobachteten Klone nicht auf den Abbau des Antibiotikums zurückzuführen war.



Abb. 4.17: Kolonien von *S. aureus* MA12 nach 48 h Inkubation bei 37°C auf MH-Agarplatten mit 10 µg/ml Rifampicin. Die mit * gekennzeichnete Kolonie war bereits nach 24 h erkennbar.

Da die Rifampicin-Resistenz auf Punktmutationen in dem Gen *rpoB*, das eine RNA-Polymerase kodiert, beruht (182), wurde das *rpoB*-Gen von sechs Rifampicin-resistenten Klonen sequenziert. Interessanterweise konnten keine Sequenzunterschiede zu den Ausgangsstämmen festgestellt werden. Zusätzlich wurden die Gene *rsbU*, *tpi* sowie *mutS* sequenziert. Bei dem Gen *tpi* handelt es sich um ein *housekeeping* Gen, das zum Bestimmen von Verwandtschaftsgraden zwischen einzelnen Stämmen verwendet wird und über hoch konservierte Sequenzen verfügt. *rsbU* ist ein Regulatorgen des alternativen Sigmafaktors SigmaB und für spontane Mutationen bekannt (93, 184). Das Gen *mutS* kodiert das *DNA mismatch repair protein* MutS das eine wichtige Rolle für das DNA Reparatursystems spielt. Diese Gen wurde sequenziert, da Mutationen in diesem Gen zu einer Inaktivierung des Proteins und somit einer erhöhten Frequenz an Mutationen im Genom führen könnten. Wie bereits bei der Sequenz des Gens *rpoB*, konnte auch bei diesen Genen keine Punktmutation identifiziert werden.

4.4.1. Zusammenfassung 4.3

Die Analyse der Frequenz von Punktmutationen bei *S. aureus* MA12 hat ergeben, dass:

1. nach Inkubation der Bakterien auf Rifampicin-haltigen Agarplatten für 24 h nur eine geringe Mutationsfrequenz ($6,5 \times 10^{-8}$ bis $2,9 \times 10^{-9}$), allerdings nach einer Inkubation für 48h eine stark erhöhte Frequenz ($5,3 \times 10^{-3}$ bis $7,6 \times 10^{-2}$) zu beobachten war.
2. Rifampicin-resistente Kolonien sich stark in Größe und Morphologie unterscheiden.
3. Synercid[®] keinen nachweisbaren Effekt auf die Mutationsfrequenz bei *S. aureus* ausübt.
4. in den sequenzierten Genen (*rpoB*; *rsbU*, *tpi*, *mutS*) konnten keine Unterschiede zwischen den Rifampicin-resistenten Klonen und dem Ausgangsstamm festgestellt werden.

4.5. Charakterisierung des ArcR-Regulons von *S. aureus*

Staphylokokken sind fakultativ anaerobe Bakterien, die in Abwesenheit von Sauerstoff entweder durch Fermentation oder durch die Verwendung eines alternativen terminalen Elektronenakzeptors wachsen können (123). Ihre Fähigkeit, sich sehr schnell an extreme Veränderungen der Sauerstoffkonzentration anzupassen, lässt vermuten, dass sie über einen oder mehrere Sensoren verfügen, welche die Genexpression in Abhängigkeit zum Sauerstoffangebot regulieren (117). Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass *E. coli*, *P. aeruginosa* und *B. subtilis* über Proteine der FNR/CRP-Proteinfamilie verfügen, die beim Umstellen von aeroben auf anaerobe Bedingungen eine wichtige regulatorische Rolle spielen. Sie fungieren sowohl als Sensoren für eine Vielzahl unterschiedlichster Faktoren, als auch als globale Expressionsregulatoren (91). J. Makhlin *et al.* konnten kürzlich bei Staphylokokken ein Gen identifizieren, welches für ein putatives CRP/FNR ähnliches Protein kodiert (112). Dieses als ArcR bezeichnete Protein stellt einen ein Transkriptionsaktivator des *arcABDCR*-Operons dar (112). Als möglicher Sauerstoffsensoren und gleichzeitiger Regulator könnte ArcR auch bei der Biofilmbildung eine Rolle spielen, zumal bekannt ist, dass Sauerstoffmangel die Biofilmbildung bei Staphylokokken induzieren kann (31). Des Weiteren wurde durch die Transkriptionsanalysen bei *S. epidermidis* und *S. aureus* gezeigt, dass Gene des *arcABDCR*-Operons, unter dem Einfluss von Synercid[®], also Biofilm induzierenden bzw. reprimierenden Bedingungen, unterschiedlich exprimiert sind (vergleiche 4.3).

Um die Rolle von ArcR in *S. aureus* genauer zu charakterisieren, wurde zunächst die *arcR*-Deletion von *S. aureus* SH-1000 in *S. aureus* COL mit Hilfe des Phagens 85 transduziert (vergleiche 2.14). Dieser Stamm wurde gewählt, da er nach heutigem Kenntnisstand, im Gegensatz zu SH-1000, über alle wichtigen Regulatoren verfügt, und des Weiteren schon häufiger für Transkriptom und Proteomanalysen verwendet wurde. Wie in Abbildung 4.18 dargestellt, konnte durch PCR mit spezifischen Oligonukleotiden für *arcR* und die Kanamycin-Kassette (Tab.3.4) die korrekte Insertion der *arcR*-Deletion nachgewiesen werden.

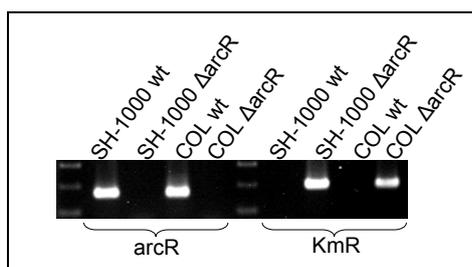


Abb. 4.18: Kontroll-PCR der *S. aureus* COL $\Delta arcR$ Deletionsmutante.

4.5.1. Wachstumsanalysen

Um die Funktion von ArcR in *S. aureus* COL zu untersuchen, wurden Wachstumsanalysen in Flüssig- als auch auf Festmedien durchgeführt. Zunächst wurde das Wachstum von *S. aureus* COL Wildtyp (WT) mit dem der *arcR*-Mutante in TSB*-Medium + 0,25% Glukose bei 37°C unter aeroben und anaeroben Bedingungen analysiert. Wie in den Abbildungen 4.19 dargestellt, war weder unter anaeroben noch aeroben Bedingungen ein Unterschied zwischen WT und Mutante bezüglich Wachstumsgeschwindigkeit und maximal erreichter Zelldichte zu erkennen. Unter aeroben Bedingungen wuchsen sowohl der WT als auch die Mutante mit einer Generationszeit von ~ 40 min und erreichten eine maximale OD_{550nm} von 8 – 8,5. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen wuchsen die Bakterien bedeutend langsamer (Generationszeit ~70 min) und erreichten eine maximale OD_{550nm} von ~ 2.

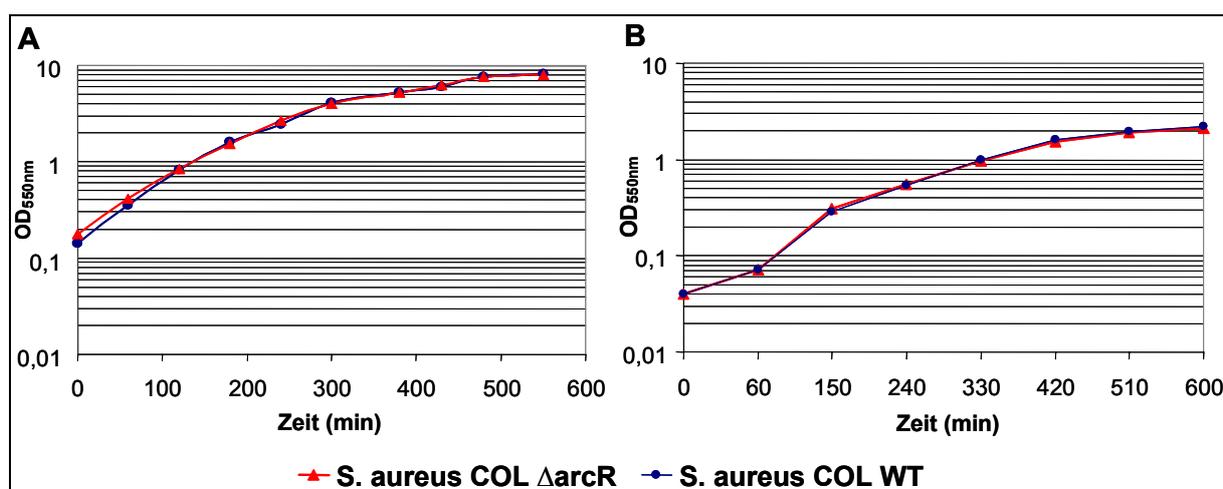


Abb. 4.19: Wachstumskurve von *S. aureus* COL Wildtyp und *arcR*-Mutante in TSB* Medium + 0,25% Glukose bei 37°C unter A) aeroben und B) anaeroben Bedingungen.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei ArcR um den Transkriptionsaktivator des *arcABDCR*-Operons von *S. aureus*. Dieses Operon kodiert alle für den Arginin-Deaminase-Stoffwechsel nötigen Proteine, der das Umwandeln von Arginin in ATP, Ornithin, Ammoniak und CO₂ ermöglicht (108). Um festzustellen, ob die *S. aureus* COL *arcR*-Mutante in Medium, in dem Arginin die Hauptenergiequelle darstellt, ein Wachstumsdefizit gegenüber dem WT aufweist, wurden erneut Analysen in Flüssigmedium durchgeführt. Dafür wurden die Bakterien in TSB* (ohne Glukose) und TSB* + 50 mM L-Arginin bei 37°C unter aeroben und anaeroben Bedingungen angezogen. Als Kontrolle wurde TSB* Medium verwendet, das entweder 0,25% Glukose oder Glukose und L-Arginin enthielt. Es konnten weder unter anaeroben noch unter aeroben Bedingungen signifikante Unterschiede im Wachstum von Wildtyp und Mutante festgestellt werden. Unter aeroben Bedingungen erreichten die Bakterien eine OD_{550nm} von ~7 in TSB* und TSB* + 50mM L-Arginin, und ~7,5 – 8 in TSB* + 50mM L-Arginin + 0,25% Glukose und TSB* + 0,25% Glukose. Die maximale OD_{550nm}, die von *S. aureus* COL WT und Mutante unter anaeroben Bedingungen erreicht wurde, war ~ 2,2 in TSB* + 50mM L-Arginin + 0,25% Glukose und TSB* + 0,25% Glukose. In TSB* und TSB* + 50mM L-Arginin wurde eine optische Dichte von ~1,6 erreicht.

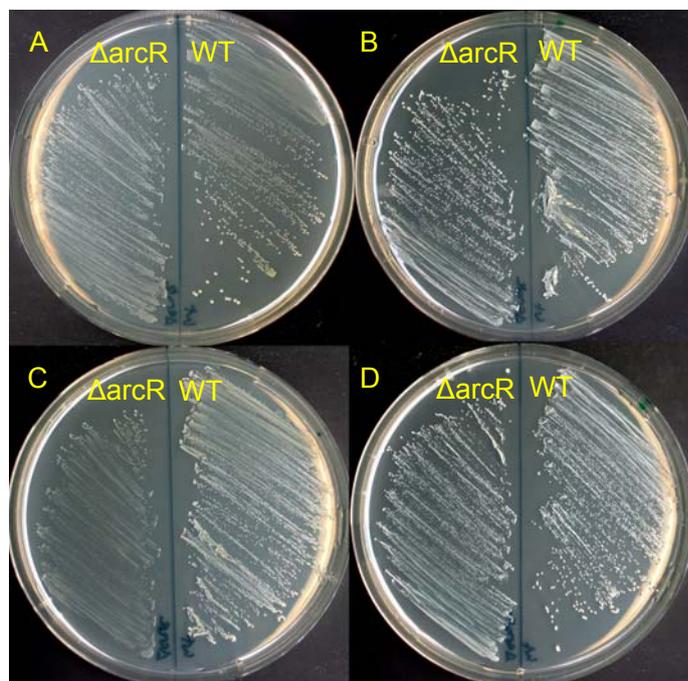


Abb.4.20: Wachstumsanalysen mit *S. aureus* COL WT und der *arcR*-Deletionsmutante. Die Bakterien wurden von einer Übernachtskultur auf Agarplatten mit **A)** TSB*, **B)** TSB* + 0,25% Glukose, **C)** TSB* + 50 mM L-Arginin und **D)** TSB* + 50 mM L-Arginin + 0,25% Glukose ausplattiert und für 72 h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen inkubiert.

Parallel wurden diese Analysen auch auf Agarplatten durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 24 h unter aeroben und 72 h unter anaeroben Bedingungen, jeweils bei 37°C. Unter aeroben Bedingungen konnten, wie auch bereits im Flüssigmedium, keine Unterschiede im Wachstum zwischen *S. aureus* COL WT und *arcR*-Mutante beobachtet werden. Allerdings war unter anaeroben Bedingungen, in Abhängigkeit von der Energiequelle, ein deutlicher Unterschied im Wachstum zwischen WT und Mutante festzustellen (Abb.4.20). Auf Platten mit TSB* (ohne zusätzliche Energiequelle) war, sowohl beim WT als auch bei der Mutante, ein nur sehr schwaches Wachstum zu beobachten. Auf Platten mit TSB* + 0,25% Glukose zeigten beide Stämme, im Vergleich zu Platten ohne Glukose, ein wesentlich verbessertes Wachstum. Allerdings zeigte die Mutante auf Medium mit L-Arginin als Hauptenergiequelle (TSB* + 50mM L-Arginin; TSB* + 0,25% Glukose + 50mM L-Arginin) im Vergleich zum WT ein deutliches Wachstumsdefizit. Auf Platten mit Glukose und L-Arginin war das Wachstum von WT, im Vergleich zu den anderen Medien, deutlich verbessert, wohingegen das der *arcR* Mutante ungefähr dem Wachstum auf TSB* + 0,25% Glukose entsprach. Diese Daten deuten, im Gegensatz zu den Wachstumsanalysen in Flüssigmedium darauf hin, dass *S. aureus* COL den Aktivator ArcR benötigt, um Arginin unter anaeroben Wachstumsbedingungen als Energiequelle nutzen zu können.

4.5.2. Biofilmbildung

Durch Biofilmanalysen sollte festgestellt werden, ob die *arcR*-Deletion die Biofilmbildung bei *S. aureus* beeinflusst. Dafür wurden mit den Stämmen SH-1000 WT und COL WT sowie deren *arcR*-Mutanten Biofilmtest in TSB-Medium mit verschiedenen Glukose sowie NaCl Konzentrationen durchgeführt. Des Weiteren wurde untersucht, ob die Deletion den Effekt von Synercid® auf die Biofilmbildung verändert. Dafür wurden Biofilmtests in TSB + 0,25% Glukose und unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen (0,03 – 0,12 µg/ml) verwendet. Bei keinem dieser Tests konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Mutanten und WT festgestellt werden (Abb. 4.21).

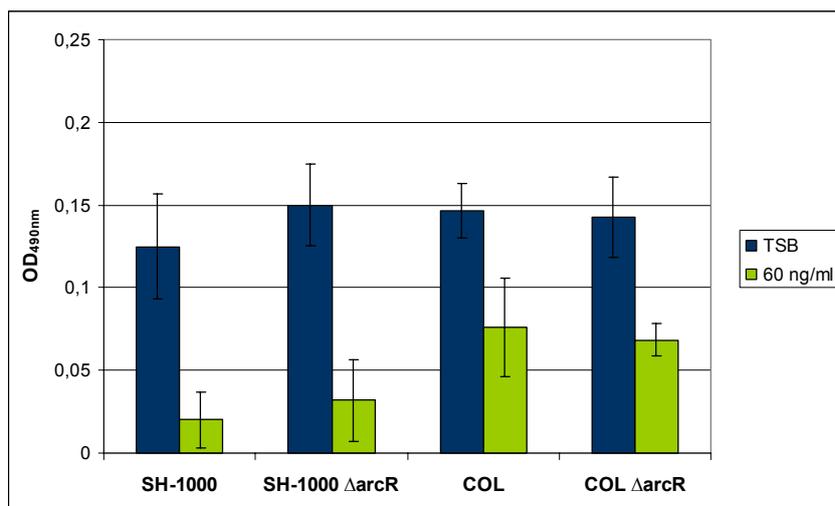


Abb. 4.21: Biofilmbildung von *S. aureus* SH-1000, SH-1000 Δ arcR sowie *S. aureus* COL und COL Δ arcR in TSB-Medium und TSB-Medium + 60 ng/ml Synercid®.

4.5.3. Transkriptionsanalysen

Durch Sequenzanalysen im Genom von *S. aureus* konnten 14 Kopien eines bereits bei *B. licheniformis* und *B. subtilis* beschriebenen Bindemotivs von CRP-Proteinen identifiziert werden (108, 112). Dieses Motiv ist in der Promotorregion von 13 Genen, die hauptsächlich für Proteine des anaeroben Stoffwechsels kodieren (Tabelle 4.5), lokalisiert. Dabei handelt es sich unter anderen, um eine Lactat-Dehydrogenase, Alkohol-Dehydrogenase, Pyruvat-Format-Dehydrogenase und eine Alanin-Dehydrogenase. Außerdem konnten von J. Makhlin circa 14 weitere Sequenzen identifiziert werden, die sich jeweils nur durch eine Base von der des Bindemotivs (TGTGA-N6-TCACA) unterscheiden (112). Das häufige Vorhandensein dieses Motivs lässt darauf schließen, dass ArcR möglicherweise einen Regulator darstellt, der neben dem *arcABDCR*-Operon selbst, noch andere Gene reguliert.

Für Transkriptomanalysen mit qRT-PCR wurde *S. aureus* COL und die *arcR*-Mutante in verschiedenen Medien unter aeroben und anaeroben Bedingungen (vergleiche 3.6.1), bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{550nm} von 1 angezogen, die RNA, wie unter 3.20 beschrieben, isoliert und daraus cDNA synthetisiert. Um die Wachstumsbedingungen zu überprüfen, wurde jede cDNA auf die Expression des Gens *nrdD*, das für die anaerobe Nukleotid-Reduktase kodiert, untersucht. Von *nrdD* ist bekannt, dass es unter anaeroben Bedingungen stark induziert exprimiert wird (117). Für die weiteren Analysen wurde ausschließlich cDNA verwendet, bei der entweder nur eine leichte (aerobe Bedingungen) oder eine im Vergleich dazu sehr starke (anaerobe Bedingungen) *nrdD* Expression gemessen

werden konnte. Die relative Expressionsstärke der Gene wurde durch Vergleich mit der Expression des Gens *rrsA*, das eine 16S rRNA kodiert und sowohl im WT als auch in der Mutante gleich stark exprimiert war, bestimmt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

ORF_ID	Gen-Name	Funktion
SAV0148	<u><i>adhE</i></u>	Aldehyd-Alkohol Dehydrogenase
SAV0181		Integrales 164-aa Membranprotein
SAV0226	<u><i>pflAB</i></u>	Pyruvate-Formate Lyase
SAV0241	<u><i>lctE</i></u>	L-Lactate Dehydrogenase
SAV0305	<u><i>nirC</i></u>	Nitrat/Format Transporter
SAV0605	<u><i>adhI</i></u>	Alkohol Dehydrogenase I
SAV1439	<u><i>alaDH</i></u>	Alanin Dehydrogenase
SAV2005		Hypothetische Gen
SAV2366	<u><i>lctP2</i></u>	L-LactatPermease 2
SAV2401	<u><i>nirR</i></u>	Protein NirR
SAV2480		Stark konserviertes hypothetisches Gen
SAV2524	<u><i>ddhI</i></u>	D-Lactat Dehydrogenase
SAV2635	<u><i>arcABDC-arcR</i></u>	Arginin Deiminase Operon
etc.		

Tab. 4.5: Gene mit der putativen Bindesequenz des FNR/CRP-Proteins ArcR. Die unterstrichenen Gene spielen eine Rolle beim anaeroben Stoffwechsel.

Um festzustellen, ob die Expression der Gene mit der putativen Bindesequenz durch ArcR reguliert wird, wurden zunächst mit einer zufälligen Auswahl qRT-PCRs durchgeführt. Da von den Genen *pflB*, *adhE* und *ldhE* bekannt war, dass sie vor allem unter anaeroben Bedingungen exprimiert werden, wurde zunächst deren Expression in WT und Mutante in TSB*-Medium (TSB ohne Glukose) unter aeroben mit der unter anaeroben Bedingungen verglichen (Abb. 4.22). Dabei konnte sowohl bei *S. aureus* COL als auch der *arcR*-Mutante, für alle Gene, mit Ausnahme *aroC*, eine starke Induktion unter anaeroben Bedingungen beobachtet werden. Besonders stark war die Induktion für *ldhE*. Für *aroC* wurde eine leichte, aber nicht signifikante Repression (Ratio: 0,54 bzw. 0,75) beobachtet. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen WT und der ArcR-Mutante festgestellt werden.

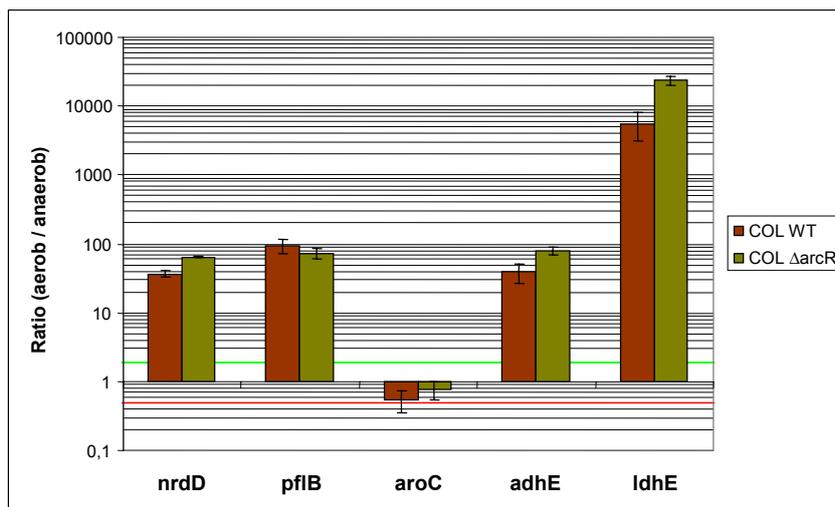


Abb. 4.22: Expressionsanalysen mit Hilfe von qRT-PCR. Relative Expression in *S. aureus* COL WT und *S. aureus* COL $\Delta arcR$ unter anaeroben im Vergleich zu aeroben Bedingungen.

Durch direkten Vergleich der Expression dieser Gene in WT und Mutante unter aeroben und anaeroben Bedingungen in TSB* waren zwar Unterschiede festzustellen (Abb. 4.23). Allerdings konnten diese zum größten Teil nicht als signifikant gewertet werden. Signifikant war die in der Mutante unter aeroben Bedingungen abgeschwächte (Ratio von 0,46) und unter anaeroben Bedingungen verstärkte (Ratio: 2,16) Expression des Gens *ldhE*. Außerdem konnte für *nrdD* in der Mutante unter aeroben Bedingungen eine, laut den Auswertekriterien, signifikant schwächere Expression festgestellt werden. Allerdings muss man hier aufgrund der generell sehr schwachen Expression dieses Gens unter aeroben Bedingungen davon ausgehen, dass dies durch technische Mängel bedingt war.

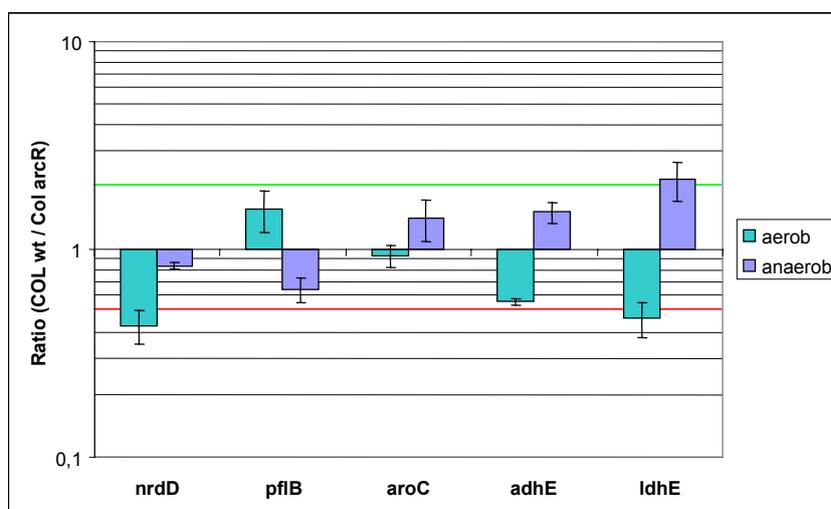


Abb.4.23: Expressionsanalysen mit Hilfe von qRT-PCR. Vergleich der Expression zwischen *S. aureus* COL und *S. aureus* COL $\Delta arcR$ unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

J. Makhlin konnte eindeutig zeigen, dass die Expression von *arcR* unter anaeroben Bedingungen mit Arginin als Hauptenergiequelle deutlich induziert ist (112). Daher wurde die Genexpression in WT und ArcR-Mutante, die in Anwesenheit von Arginin gewachsen waren, mit denen die ohne Arginin angezogen wurden, verglichen (Abb. 4.24). Auch wenn die Expression der Gene erneut nicht als signifikant unterschiedlich betrachtet werden können, deutet der Vergleich dieser Daten zwischen WT und Mutante doch einen Effekt durch die ArcR-Deletion an. So waren die Gene *ldhE*, *adhE*, *aroC* und *pflB* in der Mutante in Medium mit zusätzlichem Arginin schwächer exprimiert, wohingegen sie im WT stärker exprimiert wurden (Abb. 4.24).

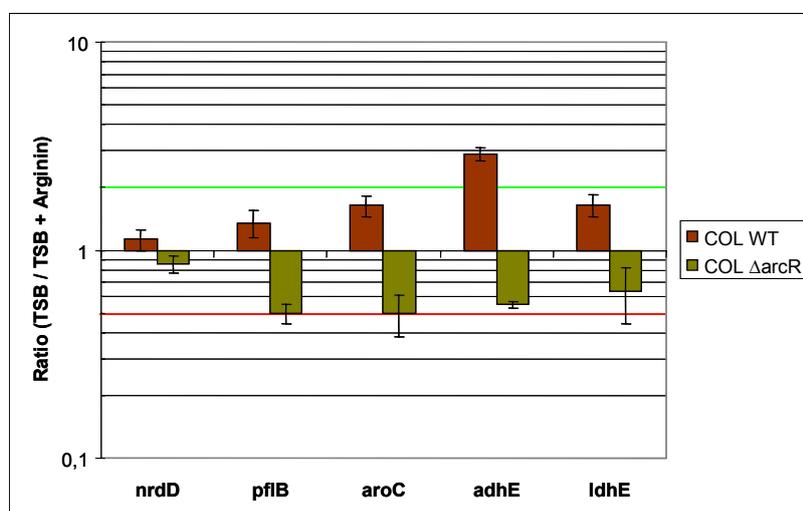


Abb. 4.24: Expressionsanalysen mit Hilfe von qRT-PCR. Relative Expression in COL WT und der Δ arcR unter anaeroben Bedingungen in TSB*-Medium mit Arginin als Hauptenergiequelle im Vergleich zu TSB* ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle.

Um festzustellen ob die Expression anderer, bisher nicht untersuchter, Gene durch die Deletion des ArcR verändert wird, wurden DNA-Mikroarray Experimente durchgeführt. Die dafür verwendeten Spezies-spezifischen DNA-Mikroarrays (Scienion AG, Berlin) basieren auf dem Genom von *S. aureus* N315 (95) und repräsentieren circa 90% der auf dem Genom vorhandenen Gene. Die Durchführung der Versuche erfolgte wie bereits unter 4.3 beschrieben. Hierfür wurden *S. aureus* COL WT und die *arcR*-Mutante in TSB* + 50 mM L-Arginin unter anaeroben Bedingungen bei 37°C bis zu einer OD_{550nm} von 1 angezogen. Zum Vergleich der Transkriptome von WT und Mutante wurden vier unabhängige Hybridisierungen, wie unter 2.22 beschrieben, durchgeführt (Tab. 4.6).

cDNA-Sonden	Array #1	Array #2	Array #3	Array #4
Cy3 (532nm)	COL $\Delta arcR$	COL WT	COL WT	COL $\Delta arcR$
Cy5 (635nm)	COL WT	COL $\Delta arcR$	COL $\Delta arcR$	COL WT

Tab. 4.6: Zusammenfassung des experimentellen Versuchsaufbau zum Transkriptomvergleich von *S. aureus* COL WT und *S. aureus* COL $\Delta arcR$. Jede der 4 Hybridisierungen stellt ein unabhängiges Experiment dar.

Es wurden bei den Mikroarrays insgesamt sehr gute Hybridisierungsergebnisse erzielt (83 – 86% Detektierbarkeit), so dass alle für weitere Auswertungen verwendet wurden. Allerdings hat diese ergeben, dass zwischen WT und *arcR*-Mutante, außer für das *arcABDCR*-Operon, keine signifikanten Unterschiede gemessen werden konnten. In Abbildung 4.25 sind exemplarisch die relativen Expressionsdaten der Mutante im Vergleich zum WT für die Gene mit der vorhergesagten CRP-Bindesequenz dargestellt.

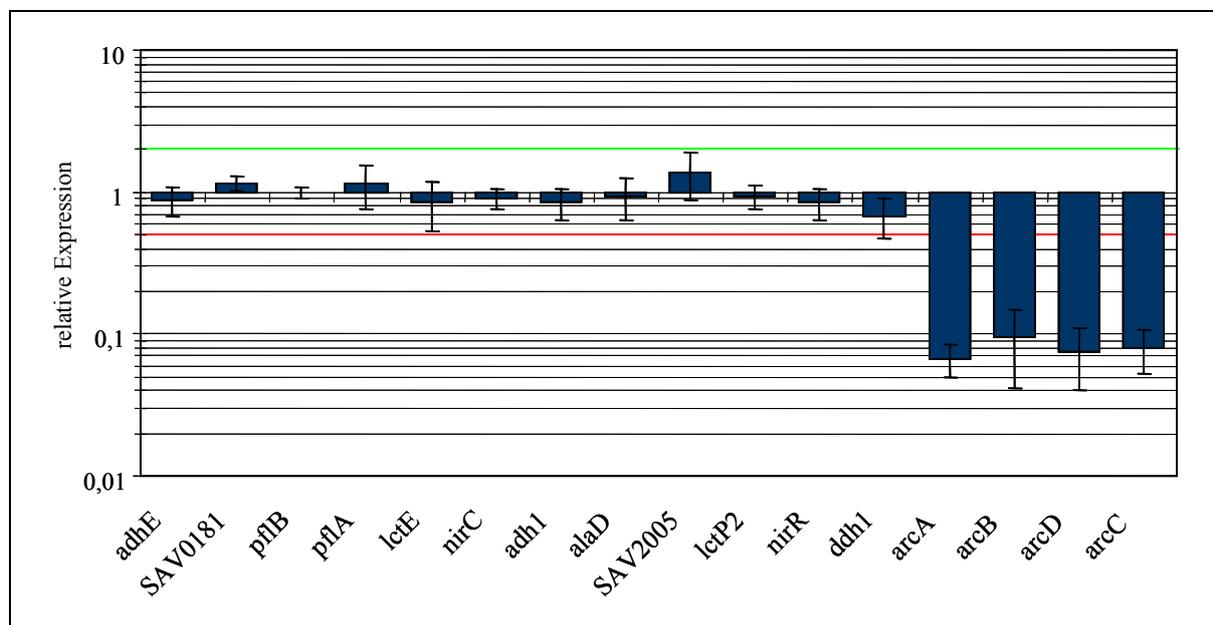


Abb.4.25: Expressionsanalyse mit Hilfe von DNA-Mikroarrays. Es ist die relative Expression der Gene mit potentieller CRP-Bindesequenz, in der COL *arcR*-Mutante im Vergleich zum WT dargestellt.

4.5.4. Zusammenfassung 4.5

Die hier beschriebenen Versuche haben gezeigt, dass

1. die Deletion des *arcR* in *S. aureus* Col das Wachstum unter aeroben Bedingungen nicht beeinflusst.
2. unter anaeroben Bedingungen, auf Agarplatten mit L-Arginin als Hauptenergiequelle die *arcR*-Mutante gegenüber dem WT ein deutlich reduziertes Wachstum zeigt.
3. die Deletion des ArcR keinen Effect auf die Biofilmbildung von *S. aureus* ausübt.
4. unter den untersuchten Bedingungen ArcR ausschließlich auf das *arcABDCR*-Operon einen regulatorischen Einfluss ausübt.

5. Diskussion

Es wird allgemein angenommen, dass Antibiotika wichtige Waffen im Konkurrenzkampf zwischen Mikroorganismen darstellen und, dass sie dabei auch in geringen Konzentrationen Signale zum Modulieren des Metabolismus von Bakterien darstellen (132, 183). In der klinischen Forschung finden subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen bereits seit längerer Zeit Beachtung. Ein Grund dafür ist die Erkenntnis, dass Antibiotika während einer Therapie, in Abhängigkeit von ihrer Kinetik, zeitweise nur subinhibitorische Konzentrationen im Patienten erreichen (128), worauf Bakterien durch Veränderung ihres Stoffwechsels reagieren ohne in ihrem Wachstum gehemmt zu sein (172). Bei einer Reihe von Bakterien konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass Antibiotika wie Clindamycin oder Methicillin in subinhibitorischen Konzentrationen die Bildung von Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel das Alpha-Toxin von *S. aureus*, zum Teil stark beeinflussen (57, 58, 64, 96, 130, 150, 155, 159, 186). Des Weiteren wurde gezeigt, dass bei verschiedenen *S. aureus* Stämmen unter Einfluss von subinhibitorischen Clindamycin-Konzentrationen die meisten extrazellulären Proteinen nicht gebildet werden, ohne dass cytoplasmatische Proteine in ihrer Bildung davon betroffen zu sein scheinen. Nähere Analysen lassen darauf schließen, dass dies auf einer differenziellen Inhibition der Proteinsynthese von einem oder mehreren Regulatorproteinen beruht (64). Neben diesem gibt es noch eine Reihe weiterer Hinweise darauf, dass Antibiotika bereits in sehr geringen Konzentrationen die Genexpression von Bakterien beeinflussen (12, 52, 53, 57, 64, 129). Diesbezüglich ist bekannt, dass subinhibitorische Konzentration einiger Antibiotika bei Staphylokokken die Expression von Virulenzfaktoren, einschließlich solchen welche die Adhäsion an Wirtszellen vermitteln, modulieren (14, 46, 47, 156). Des Weiteren wurde gezeigt, dass subinhibitorische Konzentrationen von Erythromycin, Tetracyclin und Synercid[®] die Expression des *ica*-Operons bei *S. epidermidis* 220-1 induzieren (142). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss subinhibitorischer Synercid[®]-Konzentrationen auf die Biofilmbildung und die Transkription von *S. aureus* und *S. epidermidis* untersucht. Für die Transkriptionsanalysen wurden sowohl Mikroarray-, als auch qRT-PCR-Experimente durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass subinhibitorische Konzentrationen von Synercid[®], Erythromycin und Clindamycin bei *S. epidermidis* zu einer verstärkten Biofilmbildung führen. Bei *S. aureus* wurde hingegen unter Einfluss von Synercid[®] eine reduzierte

Biofilmbildung beobachtet. Außerdem ergaben die Transkriptionsanalysen, dass durch Synercid[®], sowohl in *S. epidermidis* als auch in *S. aureus*, die Expression zahlreicher Gene beeinflusst wird. Im Besonderen war die Transkription von Genen, die ribosomale Proteine und Enzyme des Stoffwechsels kodieren betroffen.

Des Weiteren wurde die regulatorische Funktion des kürzlich von J. Makhlin (112) in *S. aureus* identifizierten Regulators ArcR untersucht. Dabei handelt es sich um ein FNR/CRP ähnliches Protein, das die Expression des *arc*-Operons reguliert. Die Transkription dieses Operons war sowohl bei *S. epidermidis* als auch bei *S. aureus* unter dem Einfluss von Synercid[®] verändert.

5.1. Das Wachstum von Staphylokokken unter Einfluss sub-inhibitorischer Synercid[®]-Konzentrationen

Zurzeit werden hauptsächlich zwei Strategien zur Entdeckung und Entwicklung neuer Antibiotika verfolgt: (i) es werden die strukturellen Unterschiede von Antibiotika einer Klasse genauer untersucht. Man hofft dadurch Verbindungen zu finden, die mit denselben Mechanismen an das Zielprotein binden aber vorhandene Resistenzmechanismen umgehen, (ii) und es wird mit Hilfe von Hochdurchsatzverfahren nach neuen Substanzen mit antibiotischer Aktivität gesucht. Zur Charakterisierung einer neuen Substanz (z.B. *Target* Identifizierung), wird die Reaktion der Bakterien auf die Substanz mit Hilfe von Proteom- und Transkriptomanalysen untersucht (7, 71, 74). Dabei werden Proteom- oder Transkriptomprofile von Bakterien verglichen, die (i) unter Kontrollbedingungen, (ii) unter Einfluss von bereits charakterisierten Substanzen und (iii) unter Einfluss der zu charakterisierten Substanz gewachsen waren. Es hat sich herausgestellt, dass die Konzentration der Substanzen, die bei diesen Analysen verwendet werden von entscheidender Bedeutung ist. Diesbezüglich wurde anhand von Transkriptomanalysen gezeigt, dass durch Verwenden der höchsten Konzentrationen, unter welcher das Wachstum der Bakterien noch nicht oder nur leicht beeinflusst ist, die besten Daten für die Analyse des Wirkmechanismus gewonnen werden können (74).

Die für diese Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass Synercid[®] das Wachstum von *S. aureus* und *S. epidermidis* bereits ab einer Konzentration von 30 ng/ml leicht beeinflusst. Allerdings konnte erst ab Konzentrationen von über 60 ng/ml eine Reduzierung der maximal erreichten optischen Dichte beobachtet werden. Für weitere Analysen scheinen vor allem Konzentrationen zwischen 30 und 60 ng/ml geeignet zu sein, da unter diesen Konzentrationen bei beiden Stämmen eine nur sehr leichte Beeinträchtigung des Wachstums beobachtet wurde.

5.2. Synercid[®] und seine Wirkung auf die Biofilmbildung von Staphylokokken

Biofilme sind an Oberflächen haftende Kolonien von Mikroorganismen, die in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind (79). Eine wichtige Eigenschaft von Biofilmen ist die Antibiotikatoleranz der damit assoziierten Bakterien, sowie der Schutz vor dem Immunsystem des Wirtes (15, 22, 42, 111, 131, 154). Diese Eigenschaften sind wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass Infektionen mit biofilmbildenden Bakterien, wie den Staphylokokken, häufig nur sehr schwer zu therapieren sind.

Die Biofilmbildung bei Bakterien wird von einer Vielzahl von extrazellulären Faktoren beeinflusst. Bei *S. epidermidis* wurde der Effekt von Umweltsignalen auf die Transkription des *ica*-Operons direkt durch die Fusion des *ica*-Promotors mit dem *lacZ* Gen von *E. coli* untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass hohe Temperaturen, osmotischer Stress sowie subinhibitorische Konzentrationen von Tetracyclin, Erythromycin und Synercid[®] die *ica*-Promotoraktivität erhöhen (142).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von subinhibitorischen Konzentrationen von Synercid[®] und anderen Translationsinhibitoren auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* und *S. aureus* untersucht. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 567 durch subinhibitorische Konzentrationen von Synercid[®], Erythromycin und Clindamycin verstärkt wird. Dies scheint zum Teil einen Widerspruch zu der von S. Rachid *et al.* publizierten Arbeit darzustellen (142), da in dieser kein Effekt von Clindamycin, allerdings einen schwach induzierenden Effekt von Tetracyclin auf die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 220 nachgewiesen wurde. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede in dem Verwenden verschiedener Stämme in beiden Studien begründet liegt.

Vor allem da bereits gezeigt wurde, dass subinhibitorische Clindamycin-Konzentrationen unterschiedliche Auswirkungen auf die Genexpression von verschiedenen *S. aureus* Stämmen haben (64). Übereinstimmend mit der Arbeit von S. Rachid *et al.* wurde unter Einfluss von Synercid[®] die stärkste Induktion und unter Einfluss von subinhibitorischen Gentamycin-Konzentrationen keine Beeinflussung der Biofilmbildung beobachtet. Des Weiteren konnte kein Effekt von Kanamycin auf die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 567 festgestellt werden.

Da es sich bei den verwendeten Antibiotika ausschließlich um Inhibitoren der Protein-Translation, mit ähnlichen Wirkmechanismen handelt, scheint es zunächst verwunderlich, dass diese nicht denselben Einfluss auf die Biofilmbildung haben. Es wurde allerdings bereits gezeigt, dass Antibiotika das Proteom von Bakterien unterschiedlich beeinflussen. So konnte bei Erythromycin und Clindamycin eine für die meisten der bisher untersuchten Inhibitoren der Protein-Translation typische, verstärkte Bildung der ribosomalen Proteine nachgewiesen werden, wohingegen Kanamycin und Gentamycin die Bildung dieser Faktoren nicht induzieren (7, 99).

Um den Effekt von Synercid[®] auf die Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* zu untersuchen, wurden die Stämme MA12, MA12-2, SH-1000 und 8325-4 verwendet. Anhand dieser Stämme sollte gleichzeitig die mögliche Beteiligung des alternativen Transkriptionsfaktors SigB an der Biofilmbildung bei *S. aureus* untersucht werden. Bei den Stämmen MA12 und SH-1000 handelt es sich um Stämme mit funktionalem SigB, bei MA12 um eine SigB-Mutante und bei 8325-4 um einen Stamm mit einer 11bp Deletion im Gen *rsbU*, das ein Regulatorprotein von *sigB* kodiert.

Bei allen hier verwendeten Stämmen wurde, im Gegensatz zu *S. epidermidis*, eine Reduktion der Biofilmbildung unter Einfluss von Synercid[®] beobachtet. Dies stimmt mit einer älteren Arbeit überein, bei der anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine Reduktion der Biofilmbildung bei *S. aureus* nach Behandlung mit Clindamycin nachgewiesen wurde (118). Die stärkste Reduktion des Biofilms wurde bei dem Stamm SH-1000 beobachtet. Da dieser unter den getesteten Bedingungen aber einen nur sehr schwachen Biofilm gebildet hat, was den Vergleich des Biofilms unter den verschiedenen Bedingungen erschwerte, sollte SH-1000 für diese Untersuchungen als ungeeignet betrachtet werden. Des Weiteren wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen mit intaktem und defektem SigB festgestellt.

Somit konnte eine mögliche Rolle des alternativen Transkriptionsfaktors SigB bei der Biofilmreduktion unter Einfluss von Synercid[®] ausgeschlossen werden. Diese Daten scheinen aber zunächst im Widerspruch zu der von S. Rachid *et al.* veröffentlichten Arbeit zu stehen, in welcher der Stamm MA12-2 als Biofilm negativ und SigB als essentiell für die Bildung eines Biofilms beschrieben wurde (141). In dieser Arbeit wurde die Biofilmbildung von MA12 und MA12-2 in TSB-Medium analysiert, wo beide Stämme einen ähnlich schwachen Biofilm bildeten. Allerdings konnte nur bei MA12 die Bildung des Biofilms durch Zugabe von 3% NaCl induziert werden. J. Valle wiederum fand Hinweise darauf, dass SigB möglicherweise einen leichten, indirekten Einfluss auf die Expression der *ica*-Gene ausübt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SigB nicht essentiell für die *ica*-Expression und PIA-Synthese ist (175). Diese Daten deuten möglicherweise darauf hin, dass SigB in *S. aureus* vor allem bei der stressinduzierten Biofilmbildung eine Rolle spielt.

Über den Mechanismus, mit dem Synercid[®] die Biofilmbildung beeinflusst, lässt sich anhand unserer Daten noch keine Aussage treffen. Da aber die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* nur durch Synercid[®], Erythromycin und Clindamycin beeinflusst wird, kann man vermuten, dass es sich nicht um einen für die Klasse der Translationsinhibitoren spezifischer Mechanismus handelt. Davon ausgehend, dass der alternative Transkriptionsfaktor SigB eine Rolle bei der stressinduzierten Biofilmbildung spielt, handelt es sich wahrscheinlich nicht um eine durch die allgemeine Stressantwort induzierte Veränderung der Biofilmbildung. Ob der Mechanismus eventuell spezifisch für eine Unterklasse von Translationsinhibitoren ist, muss noch geklärt werden.

Um den Einfluss von Synercid[®] auf die Biofilmbildung bei Staphylokokken anhand von Transkriptionsanalysen zu untersuchen wurde, unter Berücksichtigung der Wachstumsanalysen, 60 ng/ml als optimale Synercid[®]-Konzentration für *S. epidermidis* 567 und *S. aureus* MA12 in B-Medium bestimmt. Bei dieser Konzentration konnte bei beiden Stämmen eine eindeutige Beeinflussung des Biofilms neben einer nur sehr leichten Beeinträchtigung des Wachstums beobachtet werden.

5.3. Einfluss subinhibitorischer Synercid®-Konzentrationen auf die Transkription von *Staphylococcus epidermidis*

Die mittlerweile große Zahl an sequenzierten Genomen von pathogenen Mikroorganismen ermöglicht es, anhand von bioinformatischen und globalen Transkriptionsanalysen potentielle Ziele für neue Medikamente zu identifizieren (153, 163). Des Weiteren liefern Transkriptionsanalysen bei Bakterien, die mit einem Inhibitor behandelt wurden, nützliche Daten für die Analyse von Stoffwechselwegen und der Charakterisierung von Wirkmechanismen (51). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Transkriptions- und Proteomanalysen bei Mikroorganismen, die einer oder mehreren Antibiotikaklassen ausgesetzt waren, durchgeführt (6, 7, 11, 20, 37, 51, 99, 124, 153, 174). Die dabei gewonnenen Profile ermöglichten es, die Wirkmechanismen verschiedener Antibiotika zu unterscheiden und außerdem Wirkmechanismen neuer inhibitorischer Substanzen vorherzusagen (99). Bei diesen Analysen hat es sich gezeigt, dass hohe Antibiotikakonzentrationen einen größeren Effekt auf die Transkription ausüben und somit zu einem komplexen und schwierig zu analysierendem Profil führen (51, 153). Wohingegen geringere Konzentrationen primär zu Antibiotika-spezifischen und weniger zu zusätzlichen, durch Inhibition des Wachstums verursachten Effekten führen (74, 99). Des Weiteren haben diese Analysen zur Identifizierung eines Translationsinhibitoren-spezifischen Profils geführt (7, 99). Dieses Profil zeigt eindeutig, dass die meisten Antibiotika dieser Klasse eine verstärkte Bildung von ribosomalen Proteinen sowie die Expression von Translations- und Elongationsfaktoren induzieren. Eine Ausnahme scheinen Aminoglykoside wie Kanamycin und Gentamycin darzustellen, bei denen dieser Effekt bisher noch nicht beobachtet werden konnte (7). Interessanterweise konnte bei diesen auch keine Beeinflussung der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 567 beobachtet werden (vergleiche 5.1).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen eindeutig, dass subinhibitorische Synercid®-Konzentrationen, sowohl bei *S. epidermidis* als auch bei *S. aureus* einen starken Einfluss auf das Transkriptom ausüben. Bei beiden Arten wurde, unter Einfluss von Synercid®, das für Translationsinhibitoren spezifische Expressionsprofil (verstärkte Expression von Genen, die ribosomale Proteine, Translations- oder Elongationsfaktoren kodieren) beobachtet. Des Weiteren waren vor allem Gene in ihrer Expression verändert, deren Proteine eine Funktion

bei der Nukleotid-Biosynthese, des Kohlenstoff-Metabolismus sowie bei Transportsystemen und der Zellwandsynthese ausüben.

Es wurden bereits einige Gene, deren Produkte eine Rolle bei der Biofilmbildung von Staphylokokken spielen, identifiziert. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass außer bei den kürzlich entdeckten PIA-unabhängigen Mechanismen (144, 168), die vom *ica*-Operon kodierten Proteine und die von diesen katalysierte Bildung des PIA essentiell für die Biofilmbildung bei Staphylokokken ist (105). Des Weiteren ist bei *S. epidermidis* die Biofilminduktion mit einer verstärkten Expression der *ica*-Gene verbunden (41, 142). Durch unsere Daten konnte dies, übereinstimmend mit der Arbeit von S. Rachid *et al.* publizierten Studie (142), für die Gene *icaA* und *icaC*, die unter dem Einfluss von Synercid[®] in ihrer Expression deutlich induziert waren, bestätigt werden. Die Arraydaten für die Gene *icaB* und *icaD* konnten, wegen zu großer Varianzen, bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden. Außerdem war eine Überprüfung der relativen Expression mit Hilfe von qRT-PCR wegen der unter nicht induzierenden Bedingungen schwachen Expression des *ica*-Operons nicht möglich. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass es sich bei dem *ica*-Gencluster um ein Operon handelt. Des Weiteren lässt die Tatsache, dass die *ica*-Gene ausschließlich unter Biofilm-induzierten Bedingungen durch die qRT-PCR amplifiziert werden konnten, auf eine verstärkte Expression des gesamten Operons unter Einfluss von Synercid[®] schließen.

Da diese Analysen in B⁻Medium ohne Glukose, also unter Bedingungen bei denen die Bakterien keinen Biofilm bilden können (vergleiche 4.1.2), durchgeführt wurden, bestätigen unsere Daten die Annahme, dass auch unter Wachstumsbedingungen unter denen kein Biofilm gebildet wird, die *ica*-Gene exprimiert werden und PIA sehr wahrscheinlich aufgrund eines Mangels an Glukose bzw. Energie nicht gebildet wird (180).

Bis heute wurden mehrere Regulationswege der *ica*-Genexpression identifiziert. Vor allem der alternative Transkriptionsfaktor SigB, der Repressor des *ica*-Operons IcaR, der globale Regulator SarA, sowie das Quorumsensing-System Agr spielen dabei eine zentrale Rolle (33, 171, 179). Durch die Mikroarray-Experimente wurde, neben einer Reihe anderer Regulatoren, eine Induktion der Gene *agrA* und *agrB* festgestellt. Mit Hilfe von qRT-PCR konnte ebenfalls eine verstärkte Transkription des Effektormoleküls RNAIII, einer regulatorischen RNA, nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die verstärkte Transkription auch zu einer erhöhten Aktivität des Quorumsensing-Systems führt. Diese Daten scheinen im

Widerspruch zu einer von C. Vuong *et al.* publizierten Arbeit zu stehen (179). Darin wurde anhand einer *S. epidermidis agr*-Mutante der Einfluss des Quorumsensing Systems auf die Biofilmbildung untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine induzierte *agr*-Expression, durch die Inhibierung der primären Adhäsion und ohne die PIA Synthese zu beeinflussen, indirekt zu einer Reduzierung der Biofilmbildung führt. Die Richtigkeit beider Ergebnisse vorausgesetzt, lässt vermuten, dass der Einfluss des Agr-Systems auf die Biofilmbildung von anderen zusätzlichen Faktoren abhängt. Die Arraydaten erlauben aber bisher keine Aussage darüber, ob die anderen unter Synercid[®] unterschiedlich exprimierten Regulatoren, eine Rolle bei der Biofilmbildung in *S. epidermidis* spielen.

Bei der primären Adhäsion, dem ersten Schritt der Biofilmbildung, spielt die Zusammensetzung der Zelloberfläche sowie deren Hydrophobizität eine wichtige Rolle (62, 136). Es konnten diverse unterschiedlich regulierte Gene identifiziert werden, die integrale Membranproteine, Lipoproteine oder Enzyme der Teichonsäurensynthese kodieren. Dies legt nahe, dass es durch den Einfluss von Synercid[®] zu einer Veränderung im Membranaufbau kommt. Ob dies allerdings durch das Antibiotikum direkt verursacht wird oder eine Folge der Biofilminduktion ist, lässt sich anhand der hier präsentierten Daten nicht feststellen.

5.4. Synercid[®] führt in *S. epidermidis* 567 durch Erhöhen der Konzentration an Zwischenprodukten des Purin-Stoffwechsels zu dessen verringerter Aktivität

Viele der unter dem Einfluss von Synercid[®] in *S. epidermidis* unterschiedlich exprimierten Gene kodieren Enzyme des Stoffwechsels. Da die Synthese des PIA Vorläufermoleküls (UDP-aktiviertes N-Acetylglukosamin (48)) mit der Transaminierung von Fruktose-6-Phosphat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, beginnt ist dies aber nicht weiter überraschend. Außerdem konnte bereits für einige der Biofilm-induzierenden Umweltbedingungen auch eine Beeinflussung des Stoffwechsels, wie zum Beispiel dem Zitrat-Zyklus (TCA-Zyklus) (92, 160, 169, 180), nachgewiesen werden. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Aktivität des TCA-Zyklus unter Limitierung von Nährstoffen und Stressbedingungen, wie hohe Temperaturen oder Ethanol, reduziert ist (92, 160, 169). Der TCA-Zyklus ist für den vollständigen Abbau von schwer zu verwertenden C-Quellen und der

anschließenden Bildung von Reduktionspotential und Zwischenprodukten der Biosynthese essentiell. Neuere Daten lassen vermuten, dass die Bildung von PIA durch das Fehlen von PIA-Vorläufermolekülen oder Energie reduziert werden kann, obwohl die Ica-Proteine gebildet werden (33). Damit übereinstimmend konnte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Adhärenzassays beobachtet werden, dass Staphylokokken in Medien ohne Glukose kein oder nur einen sehr schwachen Biofilm bilden, obwohl, wie durch die Transkriptionsanalysen gezeigt, unter diesen Bedingungen die *ica*-Gene exprimiert werden. Da dieses aber bisher nicht genau analysiert wurde, kann nur vermutet werden, dass Glukose, die durch die Glykolyse unter anderem zu Fruktose-6-Phosphat abgebaut wird, als Substrat für die PIA-Bildung benötigt wird. C. Voung *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass es durch Inhibierung des TCA-Zyklus zu einer verstärkten Biofilmbildung bei *S. epidermidis* kommt (180). Sie gehen davon aus, dass durch die verringerte Aktivität des TCA-Zyklus mehr Oxalacetat abgeleitet und über die Glukoneogenese Fruktose-6-Phosphat gebildet wird (Abb. 5.1). Des Weiteren vermutet man, dass die Inhibierung des TCA-Zyklus das Redox-Potential der Zelle verändert, wodurch ein bisher nicht identifizierter Regulator der *ica*-Gene aktiviert wird und deren Expression erhöht. Dies scheint zunächst einen Widerspruch darzustellen, da die Glukoneogenese der Bildung von Glykogen aus Phosphoenolpyruvat dient und normalerweise unter Bedingungen, wo nicht genügend Glukose vorhanden ist, stattfindet. Also unter Bedingungen wo Staphylokokken keinen Biofilm bilden. Eine Erklärung könnte aber sein, dass die Glukoneogenese Energie verbraucht und dem TCA-Zyklus Kohlenstoffverbindungen entzieht, wodurch wiederum anaplerotische Reaktionen durchgeführt werden müssen und somit nicht genügend Fruktose-6-Phosphat für die Bildung von PIA zur Verfügung steht (180).

Damit übereinstimmend zeigen die hier vorgestellten Expressionsdaten eine starke Beeinflussung zentraler Stoffwechselwege wie der Purin-Biosynthese sowie dem Energie- und Kohlenstoff-Metabolismus durch Synercid[®]. Bezüglich der *pur*-Gene, deren Produkte eine zentrale Rolle bei der Purin-Biosynthese spielen (vergleiche Abb. 4.5), ist aus früheren Arbeiten bekannt, dass sie bei *S. aureus* im Biofilm nur schwach exprimiert werden (10). Außerdem wurde gezeigt, dass die *pur*-Gene unter Einfluss von Inhibitoren der Translation in ihrer Expression beeinflusst werden. Bei *S. pneumoniae* und *B. subtilis* werden die *pur*-Gene, nachdem die Bakterien den Antibiotika bis zu 30 min ausgesetzt wurden, stärker exprimiert. Allerdings ist nach 60 min eine deutliche Repression der *pur*-Gen Expression zu erkennen (99, 125). Da in unseren Versuchen die Bakterien länger als 60 min dem Antibiotikum

ausgesetzt waren, stimmen diese Daten durchaus mit den unsrigen, wo die Gene eindeutig in ihrer Expression gehemmt waren, überein. Man kann aufgrund der unterschiedlichen Expression dieser Gene, in Abhängigkeit von der Zeit, darauf schließen, dass sich der Einfluss der Translationsinhibitoren auf die Expression im Laufe der Zeit verändert bzw. die Bakterien eine gewisse Zeit benötigen, um sich an die veränderten Wachstumsbedingungen anzupassen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Insertion des Transposons Tn917 in *purR* zu einem Biofilm-neaktiven Phänotyp bei *S. epidermidis* führt (89). All diese Daten deuten auf eine wichtige Rolle des Purin-Stoffwechsels bei der Biofilmbildung.

Von PurR, dem Repressor des *purED*-Operons, ist bekannt dass er durch erhöhte Konzentrationen von Zwischenprodukten des Purin-Stoffwechsels aktiviert wird. Die verstärkte Expression des *purR* unter dem Einfluss von Synercid[®] deutet darauf hin, dass der Einfluss des Antibiotikums zu einer erhöhten Konzentration dieser Metabolite und dadurch zu der verminderten Expression des *purED*-Operons führt. Diese Vermutung wird dadurch, dass extrazelluläres IMP, GMP und CMP induzierend auf die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 567 wirkt, unterstützt. Es muss aber erwähnt werden, dass über die Aufnahme von diesen Nukleotiden bei Staphylokokken bisher nichts bekannt ist. Der Biofilm-induzierende Effekt von IMP, GMP und CMP könnte also auf einer verminderten Expression des *purED*-Operons aber durchaus auch auf anderen Mechanismen beruhen.

Durch den Vergleich unserer Expressionsdaten mit den in der KEGG Datenbank (www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html) vorhandenen Informationen über Stoffwechselwege von Staphylokokken vermuten wir, dass unter dem Einfluss von Synercid[®] durch eine verminderte Aktivität der Purin-Biosynthese weniger 5`Phosphoribosyl-Pyrophosphat aus dem Pentose-Phosphat-Stoffwechsel und weniger L-Glutamin aus dem Glutamat-Metabolismus zu IMP umgewandelt wird. Der Pentose-Phosphat-Stoffwechsel nimmt α -D-Glukose-6-Phosphat aus der Glykolyse durch die vom Gen *zwf2* kodierte Glukose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase auf. Da *zwf2* unter dem Einfluss von Synercid[®] nur schwach exprimiert wird, scheint durch eine verringerte Aufnahme neuer Metabolite aus der Glykolyse ein Überschuss dieser im Pentose-Phosphat-Stoffwechsel verhindert zu werden. Im Glutamat-Metabolismus wird ein Überschuss vermutlich dadurch verhindert, dass weniger 2-Oxogluterat aus dem TCA-Zyklus aufgenommen wird. Dieses könnte dann wiederum vermehrt der Glykolyse bzw. der Glukoneogenese zur Verfügung stehen und somit einen ähnlichen Effekt auf den Stoffwechsel ausüben wie die von Vuong *et al.* beschriebene

Inhibierung des TCA-Zyklus (180). Letztendlich könnte also unter Anwesenheit von Glukose, die Menge an Zwischenprodukten in der Glykolyse ansteigen, wodurch mehr Metabolite für die Bildung von UDP-N-Acetyl-D-Glukosamin, dem PIA-Vorläufermolekül, zur Verfügung stehen würden. Gemeinsam mit der Bildung der Ica-Proteine, würde dies zu der bei den Biofilmtests beobachteten verstärkten Biofilmbildung führen.

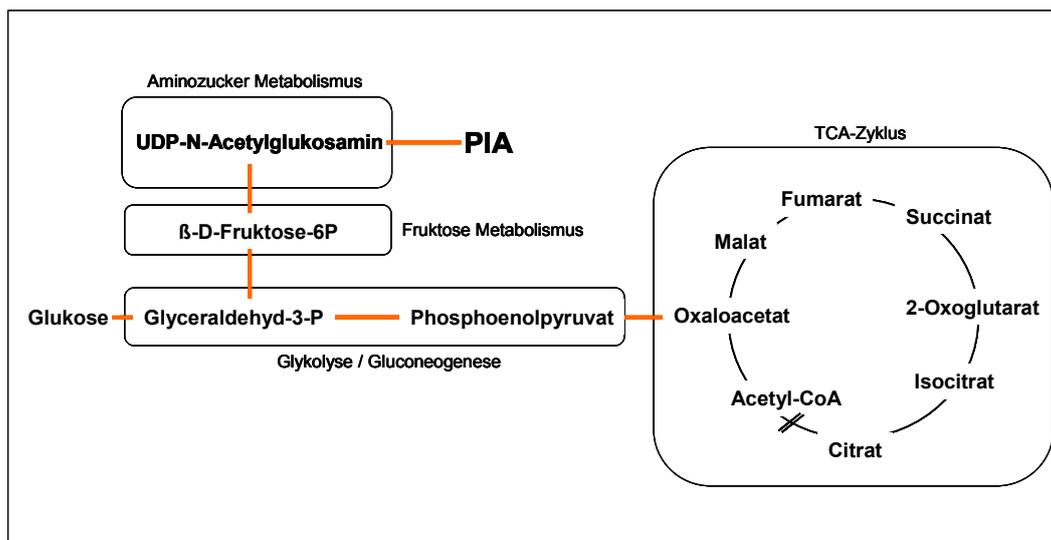


Abb. 5.1: Schematische Darstellung des von Vuong *et al.* (180) vorgeschlagenen Kohlenstoff-Flusses während der durch Inhibierung der TCA-Zyklus induzierten PIA-Synthese in *S. epidermidis*. // markiert die durch Fluorocitrat inhibierte enzymatische Reaktion.

5.5. Der Abbau von Guanodin-3',5'-Bisphosphat (ppGpp) vermittelt eine verstärkte Bildung ribosomaler Proteine und führt zu einer erhöhten Konzentration an Metaboliten des Purin-Stoffwechsels

Der Einfluss von Synercid[®] auf die Purin-Biosynthese kann durch die Induktion des bisher nicht näher charakterisierten Gens SERP2065 erklärt werden. Die *in silico* Analyse dieses Gens hat ergeben, dass es eine GTP-Pyrophosphokinase mit einer RelA/SpoT-Domäne kodiert. Diese Domäne wurde zuerst in den Proteinen RelA und SpoT von *E. coli* identifiziert. Bei RelA handelt es sich um eine ppGpp-Synthetase und bei SpoT um ein Enzym, dass

sowohl bei der Synthese als auch dem Abbau von ppGpp beteiligt ist (185). Bei dem kleinen Nukleotid Guanosin-3',5'-Disphosphat (ppGpp) handelt es sich um ein Signalmolekül, das bei der Anpassung des Stoffwechsels an Wachstumsbedingungen eine zentrale Rolle spielt (25). So führt zum Beispiel die Anhäufung von ppGpp bei der durch Hungerstress ausgelösten *stringent response* zu einer verringerten Bildung von ribosomalen Proteinen, Translationsfaktoren, tRNA und rRNA (38). Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass die durch Translationsinhibitoren induzierte verstärkte Bildung von ribosomalen Proteinen bei *H. influenzae* durch eine Verringerung der ppGpp Konzentration vermittelt wird (37). Man geht bisher davon aus, dass die verstärkte Bildung von ribosomalen Proteinen der Kompensation des inhibierenden Effekts von Translationsinhibitoren dient.

Da die Synthese bzw. der Abbau von ppGpp ausschließlich in der Purin-Biosynthese stattfindet, nehmen wir an, dass durch dessen Abbau die Konzentration anderer Zwischenprodukte des Stoffwechsels verändert wird. Diese Annahme wurde durch die durchgeführten HPLC-Analysen unterstützt. So konnte in *S. epidermidis* 567 unter dem Einfluss von Synercid[®] eine um circa 38% reduzierte intrazelluläre ppGpp-Konzentration und gleichzeitig eine um circa 50% erhöhte GTP-Konzentration gemessen werden. Gemeinsam mit den unter 5.3.3. diskutierten Ergebnissen deuten diese Daten darauf hin, dass eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration zentraler Zwischenprodukte des Nukleotid-Stoffwechsels, wie sie durch den Abbau von ppGpp bedingt wird, zu einer verminderten Aktivität des Purin-Stoffwechsels führt.

5.6. Transporter, das YycGF Zweikomponenten-System und SsaA – mögliche Faktoren für die Biofilmbildung bei *S. epidermidis*

Bis heute geht man davon aus, dass PIA die Hauptkomponente des PIA-abhängigen Biofilms darstellt (54). Wie bereits erwähnt gab es in letzter Zeit mehrere Hinweise darauf, dass Staphylokokken auch über einen PIA-unabhängigen Mechanismus einen Biofilm bilden können (73, 144, 168). Dies könnte möglicherweise bedeuten, dass auch bei dem PIA abhängigen Biofilm weitere Komponenten eine Rolle beim Aufbau der extrazellulären Matrix spielen. Neben der chemischen Analysen durch die bisher außer PIA vor allem Teichonsäuren und noch nicht weiter charakterisierte Proteine identifiziert wurden (72, 90, 148), könnte die Identifizierung und Charakterisierung von Transportsystemen, die an der Biofilmbildung

beteiligt sind, zur Aufklärung der Biofilmzusammensetzung beitragen. Allerdings ist bis heute, außer der vermeintlichen Rolle von IcaC am PIA-Transport (48, 54), noch nichts über die Beteiligung von Transportsystemen an der Bildung des Biofilms bekannt. Dass die bei dieser Arbeit untersuchten Stämme einen PIA-vermittelten Biofilm bilden, kann aufgrund der unterschiedlichen Expression der *ica*-Gene angenommen werden.

Die Transkriptomanalysen haben gezeigt, dass eine Vielzahl von Genen die Komponenten von Transportsystemen kodieren, bei *S. epidermidis* unter Biofilm induzierenden Bedingungen unterschiedlich reguliert sind. Da es sich dabei aber zum größten Teil um bisher nicht charakterisierte Systeme handelt, kann über ihre Funktion an dieser Stelle nur spekuliert werden.

Ein von Synercid[®] besonders stark induziertes System war ein Aminosäuren-Transportersystem, das von den Genen SERP2028 – 2031 kodiert wird. Dieses besitzt große Ähnlichkeit zu dem Cholin-Aufnahmesystem OpuC aus *B. subtilis*, das bei der Adaption an Osmo- und Temperaturstress beteiligt ist (69). In diesem Zusammenhang konnte auch eine verringerte Expression der Gene *betA* und *betB*, deren Produkte die Umwandlung von Cholin in Betain katalysieren, nachwiesen werden. Dies lässt vermuten, dass *S. epidermidis* unter Einfluss von Synercid[®] die Konzentration von intrazellulärem Cholin erhöht. Ob dies allerdings dem Schutz vor osmotischem Stress dient oder Cholin möglicherweise über andere Stoffwechselwege umgewandelt wird, ist nicht klar.

Außerdem waren die Gene *yycF*, *yycG* und *yycH*, die Proteine des *yycGF* Zweikomponenten-Systems kodieren, reprimiert. Dieses in GC-reichen Gram-positiven Bakterien hoch konservierte System wurde bei *B. subtilis* und *S. pneumoniae* als essentiell beschrieben (39, 166). Bei *S. aureus* scheint das System eine Rolle für die Membranpermeabilität und Virulenz zu spielen (116). Es wurden mehrere YycF spezifische Bindesequenzen in den Promotorregionen von Genen, deren Produkte für die Virulenz und Membransynthese eine Rolle spielen, identifiziert. Zum Beispiel befinden sich in der Promotorregion des Gens *ssaA* zwei YycF-Bindestellen (36). *SsaA*, welches das extrazelluläre *staphylococcal secretory* Antigen (SsaA) kodiert, war unter dem Einfluss von Synercid[®] induziert. Damit übereinstimmend konnte bei einer kürzlich publizierten Transkriptomanalyse mit *S. aureus* eine erhöhte Expressionsrate von *ssaA* in den biofilmassoziierten Bakterien im Vergleich zu planktonischen festgestellt werden (143). Die Aminosäuresequenz des SsaA besitzt ein A-X-

A-A Motiv (97), bei welcher es sich um eine Erkennungssequenz von Peptidasen handelt. Diese kommt häufig bei extrazellulären Proteinen wie zum Beispiel dem Autolysin AltE vor (61, 135). Außerdem konnte durch bioinformatische Analysen gezeigt werden, dass auch das Protein Aap, welches sowohl an der PIA vermittelten Biofilmbildung beteiligt ist, als auch als verkürztes Protein die Bildung eines PIA unabhängigen Biofilms vermittelt, dieses Motiv besitzt. Ob allerdings das A-X-A-A Motiv charakteristisch für Proteine ist, die bei der Biofilmbildung eine Rolle spielen, muss noch untersucht werden.

Die Ähnlichkeit zu AltE und die Tatsache, dass dieses bei der primären Adhäsion beteiligt ist, könnten bedeuten, dass SsaA möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Biofilmbildung von *S. epidermidis* spielt. Unsere Daten lassen somit vermuten, dass es sich bei YycF um einen Repressor von SsaA mit eventueller regulatorischer Funktion bei der Biofilmbildung handelt. Um diese Hypothese zu untermauern, sollte die genaue Funktion des SsaA sowie des Zweikomponenten-Systems yycFG analysiert werden.

5.7. Hypothese zur Synercid[®]-induzierten Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 567

Anhand bereits publizierter und unserer Daten vermuten wir, dass *S. epidermidis* die Inaktivierung der Ribosomen durch eine erhöhte Bildung ribosomaler Proteine kompensiert und dass dies durch eine verringerte ppGpp Konzentration vermittelt wird. Durch den Abbau des ppGpp steigt letztendlich die Konzentration von Zwischenprodukten der Purin-Biosynthese an, was zur Aktivierung des PurR und der Repression des *purED*-Operons führt. Durch die dadurch verringerte Aktivität der Purin-Biosynthese werden weniger Zwischenprodukte aus dem Pentose-Phosphat- und dem Glutamat-Stoffwechsel abgeführt. Um einen Überschuss zu vermeiden, nehmen diese wiederum weniger Zwischenprodukte aus der Glykolyse bzw. dem TCA-Zyklus auf. Letztendlich steigt also die Konzentration an Zwischenprodukten in der Glykolyse, die zur Bildung von PIA verwendet werden können, wenn ausreichend Glukose im Medium vorhanden ist. Welche Gene an der durch Synercid[®] induzierten Expression der *ica*-Gene und der eventuell an der Biofilmbildung beteiligten Membrankomponenten und Transporter-systeme beteiligt sind, konnte anhand unserer Daten nicht geklärt werden. Allerdings könnte es sich bei einem der unterschiedlich exprimierten hypothetischen Regulatoren um den von C. Vuong *et al.* vorhergesagten Regulator handeln,

der in Abhängigkeit des NAD^+/NADH -Verhältnisses die Expression des *ica*-Operons und anderer an der Biofilmbildung beteiligter Komponenten reguliert (180). In Abbildung 5.2 ist der mögliche Kohlenstoff-Fluss in *S. epidermidis* 567 unter dem Einfluss von Synercid[®] schematisch dargestellt.

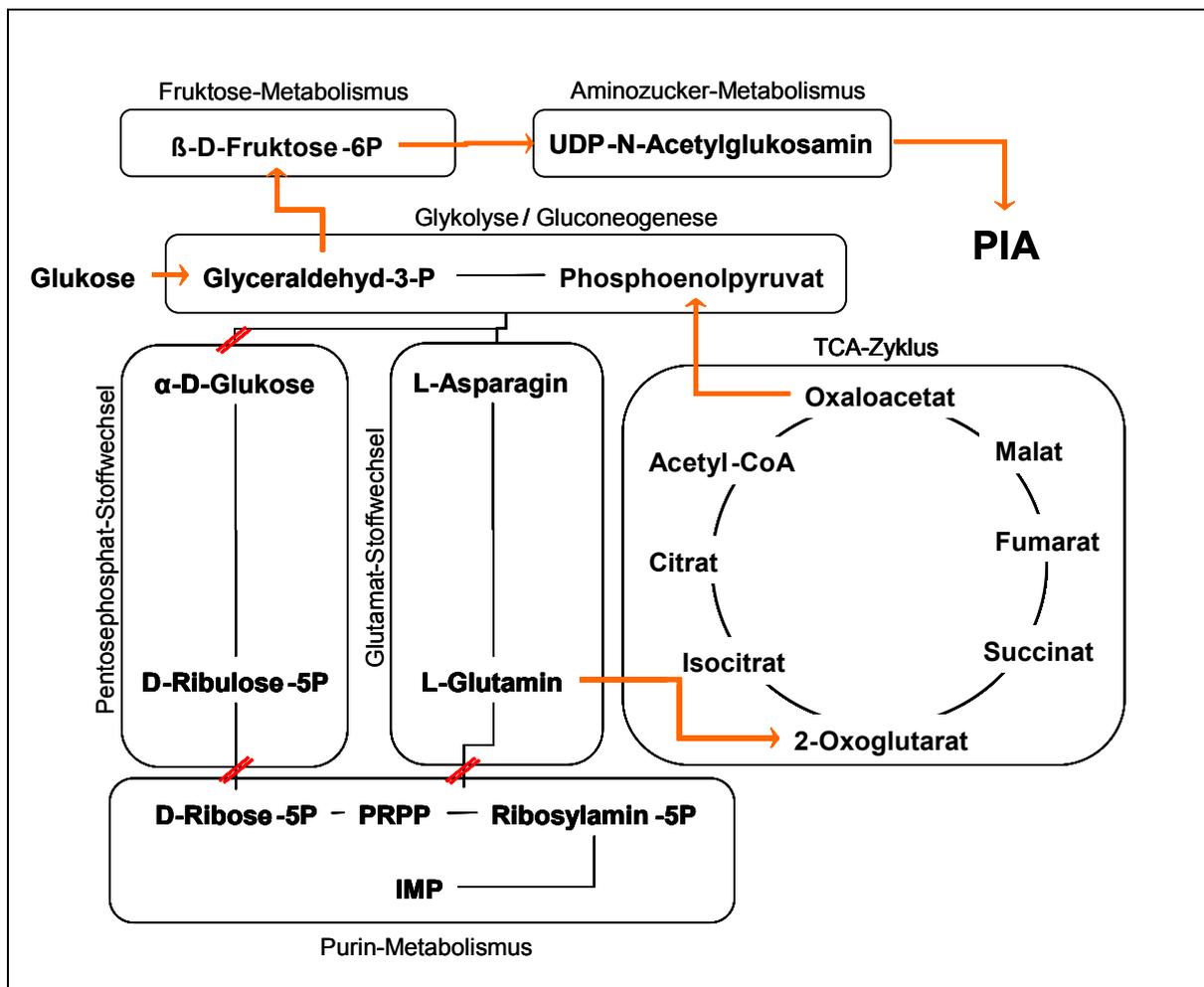


Abb. 5.2: Schematische Darstellung des möglichen Kohlenstoff-Flusses bei der unter Anwesenheit von Glukose durch Synercid[®] induzierten PIA-Synthese in *S. epidermidis*. // markiert zentrale enzymatische Reaktion die von Enzymen katalysiert werden, deren Gene unter dem Einfluss von Synercid[®] reprimiert sind. → deuten den vermuteten Kohlenstoff-Fluss an.

Diese Hypothese wird vor allem dadurch unterstützt, dass bei Translationsinhibitoren (Gentamycin, Kanamycin), die keine verstärkte Bildung an ribosomalen Proteinen induzieren (99), keine Induktion der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* beobachtet wurde.

5.8. Einfluss von subinhibitorischen Synercid[®]-Konzentrationen auf das Transkriptom von *S. aureus* MA12

Wie wegen der reduzierten Biofilmbildung von *S. aureus* unter dem Einfluss von Synercid[®], erwartet wurde, konnte mit Hilfe der Mikroarrays eine verringerte Expression der Gene *icaA* und *icaC* nachgewiesen werden. Allerdings war es, wie bereits bei *S. epidermidis* 567, nicht möglich für die Gene *icaB* und *icaD* aussagekräftige Daten zu gewinnen. Da aber, wie bereits erwähnt, die *ica*-Gene als Operon kodiert werden, kann man davon ausgehen, dass diese Gene in *S. aureus* MA12 unter dem Einfluss von Synercid[®] abgeschwächt exprimiert werden.

Von den bekannten an der Biofilmregulation beteiligten Regulatoren war laut unseren Daten bei *S. aureus* MA12 keiner unter dem Einfluss von Synercid[®] unterschiedlich exprimiert. Allerdings war die Expression der Gene *rot*, *sarS* (H1), *sarT* (H2) und *sarU* (H3) deutlich reprimiert. Bei diesen handelt es sich um Mitglieder der SarA-Familie, die alle eine Rolle im so genannten SarA/Agr-Regulationsnetzwerk von *S. aureus* spielen. Dieses Regulationsnetzwerk spielt bei *S. aureus* eine zentrale Rolle bei der Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und der Bildung von Virulenzfaktoren (19). Bisher konnte gezeigt werden, dass SarA, das eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung von *S. aureus* spielt (9), die Expression von *spa* (Protein A) und *sarT* reprimiert und die *agr*-RNAI induziert (26, 27, 151, 164). Das RNAI-Transkript umfasst die Gene des *agr*-Quorumsensing-Systems, das die Transkription der regulatorischen RNIII induziert, welche unter anderem die Expression von virulenzassoziierten Genen reguliert. (78, 127). Außerdem reprimiert die RNIII die Expression des Regulators SarT (151), der wiederum *sarU* reprimiert (114). Dass SarU einen Aktivator des *agr*-Systems darstellt, deutet eine Kontrolle des gesamten Systems, durch positive Rückmeldung an (114, 151). Von *sarA* und dem *agr*-System, von denen keine Daten gewonnen werden konnten, ist bekannt, dass sie die Bildung von Kapselpolysacchariden induzieren (176). Bei unseren Analysen wurden insgesamt 14 Kapsel-kodierende Gene mit reduzierter Expression identifiziert. Dies könnte möglicherweise darauf hindeuten, dass *sarA* und die *agr*-Gene unter dem Einfluss von Synercid[®] ebenfalls schwächer exprimiert werden. Da die Deletion von SarA zu einer verminderten Biofilmbildung führt (9), könnte die verringerte Biofilmbildung unter dem Einfluss von Synercid[®] ein weiteres Indiz für eine reduzierte Expression von *sarA* darstellen. Bezüglich der Kapselproteine konnte kürzlich gezeigt werden, dass ihre Bildung durch subinhibitorische Florfenicol-Konzentrationen

deutlich verringert und gleichzeitig die Adhäsion an Epithelzellen verstärkt wird (14). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dies durch eine verstärkte Expression des SaeRS Zweikomponenten-Systems vermittelt wird. Damit übereinstimmend wurde, unter dem Einfluss von Synercid[®], eine verstärkte Expression des Gens *saeS*, das die Histidin Proteinkinase des SaeRS Zweikomponenten-Systems kodiert (50), gemessen.

Der Regulator *rot* (*repressor of toxins*) wurde erst kürzlich durch eine Transposonmutagenese identifiziert (120). Genauere Analysen haben gezeigt, dass Rot sowohl als positiver als auch als negativer Regulator die Expression einer Reihe von Virulenzfaktoren kontrolliert (149). Außerdem gibt es Hinweise, dass Rot vom *agr*-System beeinflusst wird, allerdings konnte der genaue Mechanismus bisher nicht geklärt werden (120). B. Said-Salim hat kürzlich das Transkriptom einer *S. aureus rot/agr*-Doppelmutante mit dem einer *agr*-Mutante verglichen, wodurch gezeigt werden konnte, dass Rot die Transkription einer Reihe von Genen sowohl positiv als auch negativ beeinflusst (149). Übereinstimmend mit diesen Daten konnten wir eine verstärkte Expression der Gene *splC* (Serin Protease) und SA0663 (hypothetisches Gen) bei gleichzeitig reprimierter Expression von *rot* beobachten. Außerdem waren die von Rot reprimierten Gene *clfB* (*clumping factor B*), *dhoM* (Homoserin-Dehydrogenase), *gtaB* (UTP-Glukose-1-Phosphat-Uridyltransferase), *hsdR* (Typ I Restriktionsenzym), *nrdD* (anaerobe Ribonukleosid-Triphosphat Reduktase), *purM* (Phosphoribosylformylglycinamid-Cyclo-Logase) und *thrC* (Threonin-Synthetase) unter dem Einfluss von Synercid[®] verstärkt exprimiert. Allerdings widersprechen unsere Expressionsdaten zum größten Teil denen von B. Said-Salim, der für seine Analysen einen *agr*-negativen Stamm verwendet hat. Die Unterschiede könnten dadurch erklärt werden, dass in MA12, einem *agr*-positiven Stamm, das Quorumsensing-System zu diesen Expressionsunterschieden führt.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnen Expressionsdaten kann man unter Berücksichtigung bereits publizierter Daten vermuten, dass Synercid[®] zu einer verminderten Expression des *sarA* sowie der *agr*-Gene und einer induzierten Expression des *saeS* führt, und es somit zu einer verminderten Bildung der Kapselproteine kommt. Des Weiteren kann man daraus möglicherweise schließen, dass diese eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung bei *S. aureus* spielen, zumal bekannt ist dass, ihre Expression in biofilmassoziierten Bakterien stark induziert ist (10).

Wie bereits bei *S. epidermidis* konnte auch bei *S. aureus* ein starker Einfluss von Synercid® auf die Genexpression von Genen, die Enzyme des Stoffwechsels kodieren, beobachtet werden. Allerdings waren neben den bei *S. epidermidis* beeinflussten Stoffwechselwegen auch Gene von Enzymen der Pyrimidin-Biosynthese und des Stickstoff-Metabolismus in ihrer Expression beeinflusst. Es scheint aber, wie auch bei *S. epidermidis*, zu einer Umverteilung der Stoffwechsel-Zwischenprodukte unter dem Einfluss von Synercid® zu kommen. Dies scheint ebenfalls, wie die HPLC-Analysen der ppGpp-Konzentration andeuten, durch eine verringerte Konzentration des kleinen Nukleotids ppGpp bedingt zu sein.

Im Gegensatz zu *S. epidermidis* kommt es allerdings zu einer reduzierten Expression der *ica*-Gene und, vermutlich dadurch bedingt, zu einer abgeschwächten Biofilmbildung. Außerdem wurde in *S. aureus* MA12 unter dem Einfluss von Synercid® eine reduzierte Konzentration an GTP gemessen, was möglicherweise andeutet, dass überschüssige Zwischenprodukte des Purin-Stoffwechsels bei *S. aureus* anders als bei *S. epidermidis* verteilt werden. Auch wenn die Daten eindeutig auf eine Beeinflussung zentraler Regulatoren hinweisen, kann bisher keine Aussage darüber getroffen werden, welche Faktoren tatsächlich zu der reduzierten Expression der *ica*-Gene führen. Des Weiteren kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Unterschiede zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* bezüglich der Biofilmbildung durch verschiedene Regulationsmuster und / oder unterschiedliche katabolische Fähigkeiten bedingt werden. Eine genauere Analyse der katalytischen und regulatorischen Fähigkeiten ist bislang, aufgrund der bei Staphylokokken großen Anzahl von hypothetischen und nicht charakterisierten Genen, leider nicht möglich.

Abschließend muss darauf hingewiesen werden, dass die *S. aureus* Expressionsdaten der einzelnen Mikroarrays zum Teil stark variierten. Daher mussten die Auswertung weniger stringent durchgeführt werden, was zwangsläufig dazu führt, dass mehr „falsch-positive“ Daten in die Ergebnisliste aufgenommen werden. Des Weiteren war es nicht möglich die einzelnen Daten mit Hilfe von qRT-PCR zu überprüfen, da dabei ebenfalls sehr starke Varianzen zwischen den Experimenten auftraten. Wegen der Übereinstimmungen mit den Daten von *S. epidermidis* sowie bereits publizierten Arbeiten wird aber davon ausgegangen, dass der Einfluss subinhibitorischer Synercid®-Konzentrationen auf das Transkriptom von *S. aureus* durch die Daten korrekt wiedergegeben wird.

Die Ursache der starken Expressionsunterschiede konnte nicht geklärt werden. Es gab allerdings Hinweise, dass es sich bei *S. aureus* MA12 möglicherweise um einen so genannten Mutatorstamm handelt (vergleiche 5.9).

5.9. Bei *S. aureus* MA12 handelt es sich möglicherweise um einen Mutatorstamm

Die genetische Variabilität, welche benötigt wird um sich erfolgreich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, entsteht zum einen durch Mutation und zum anderen durch Rekombination. Es konnte gezeigt werden, dass sobald eine Anpassung durch die Häufigkeit von Mutationen limitiert wird, Bakterien mit einer konstitutiv erhöhten Mutationsfrequenz (Mutatorstämme), einen deutlichen Selektionsvorteil besitzen. Die erhöhte Mutationsfrequenz dieser Stämme beruht in der Regel auf Defekten in den *mismatch-repair* Systemen. Es gibt aber auch Anzeichen dafür, dass die Mutationsfrequenz durch stressinduzierte, reversible Aktivierung oder Inaktivierung von Genfunktionen erhöht werden kann, und somit zu einem kurzzeitigen Mutatorphänotyp führt (13).

Da die Transkriptomanalysen bei *S. aureus* MA12 zum Teil sehr starke Unterschiede in der Genexpression gezeigt haben und dieser Stamm auch morphologisch große Varianzen aufwies, wurde vermutet dass es sich bei *S. aureus* MA12 um einen Mutator handelt. Unterstützt wurde diese Vermutung durch zwei der durchgeführten Adhärenzassays. Bei diesen wurde im Gegensatz zu der normalerweise unter dem Einfluss von Synercid[®], reduzierten Biofilmbildung eine leichte Induktion beobachtet. Beim Bestimmen der Mutationsfrequenz konnten allerdings nur bei drei der insgesamt acht Tests nach 48 h eine erhöhte Zahl an Rifampicin-resistenten Klone gefunden werden. Des Weiteren hatte Synercid[®] keinen messbaren Einfluss auf die Bildung von Rifampicin-resistenten Klonen. Die Tatsache, dass durch die Sequenzierung der Gene *rpbB*, *mutS*, *tpi* und *rsbU*, bei keinem der Klone Mutationen gefunden werden konnten, deutet darauf hin, dass die Unterschiede in der Genexpression und der Biofilmbildung nicht auf einer erhöhten Mutationsfrequenz beruhen. Des Weiteren scheinen die Unterschiede nicht durch Stress induziert zu werden. Soweit konnte der molekulare Hintergrund für die Varianzen in der Genexpression und hinsichtlich der beiden widersprüchlichen Biofilmanalysen in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Dies sollte jedoch unbedingt Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. *S. aureus* MA12 sollte erst

dann für weitere Versuche, gleich welcher Art, verwendet werden, wenn die Ursachen seiner Phänotypvariabilität bekannt sind.

5.10. Das ArcR-Regulon von *S. aureus*

Bei dem erst kürzlich von J. Makhlin identifizierten ArcR handelt es sich um den Transkriptionsaktivator des *arcABDC*-Operons (112). Dieses Operon kodiert alle Enzyme des Arginin-Deaminase- (ADI) Stoffwechsels, in welchem die Umwandlung von Arginin zu Ornithin, Ammonium und CO₂ als Endprodukte mit der gleichzeitigen Bildung von ATP katalysiert wird (108, 188). Bei dem ADI-Stoffwechsel handelt es sich um ein gut konserviertes System, das unter Eubakterien und Archeabakterien weit verbreitet ist (8, 109, 189). Die physiologische Rolle und die Regulierung des Systems unterscheidet sich aber zum Teil stark zwischen den verschiedenen Mikroorganismen (8, 34, 170). Zum Beispiel ist bei *B. licheniformis* und *P. aeruginosa* der ADI-Stoffwechsel ausschließlich unter anaeroben Bedingungen, unter welchen er durch einen Transkriptionsaktivator der CRP/FNR Familie induziert wird, aktiv (43, 45, 108, 109). Bei manchen Milchsäurebakterien, wie *Streptococcus sanguis* und *Lactococcus sakei* wird das System über Katabolitrepression kontrolliert und kann durch Arginin induziert werden (189). Wie J. Makhlin zeigen konnte, ist das System in *S. aureus* unter Kontrolle des positiven Regulators ArcR, der in Anwesenheit von Glukose und/oder Sauerstoff deaktiviert wird (112).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen wurde die *arcR*-Deletion in *S. aureus* COL transduziert. Dieser Stamm wurde gewählt, da parallel Proteomanalysen in der Arbeitsgruppe von S. Engelmann (Universität Greifswald) durchgeführt wurden und für COL bereits Proteomdaten zur Verfügung standen. Da aber ArcR bisher nur in *S. aureus* SH-1000 charakterisiert ist (112), wurden zunächst dessen Rolle in *S. aureus* COL anhand von Wachstumsanalysen überprüft. Es konnte, übereinstimmend mit den Ergebnissen von J. Makhlin, gezeigt werden, dass ArcR von *S. aureus* COL weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen essentiell für das Wachstum ist. Des Weiteren lässt das verschlechterte Wachstum der COL *arcR*-Mutante unter anaeroben Bedingungen auf Agarplatten mit Arginin als Hauptenergiequelle darauf schließen, dass in *S. aureus* COL ArcR benötigt wird, um Arginin als Energiequelle nutzen zu können. Dass weder von J. Makhlin noch bei unseren Analysen in Flüssigmedien ein Wachstumsunterschied zu beobachten war,

könnte daran liegen, dass es sich bei den verwendeten Medien um Vollmedien gehandelt hat, und somit noch andere Energiequellen für die Bakterien zur Verfügung standen. Während es im Flüssigmedium zu einer permanenten und gleichmäßigen Durchmischung kommt, könnten diese auf Agarplatten lokal verbraucht werden, womit dann für die einzelnen Kolonien das Angebot limitiert werden würde. Um dies genauer zu untersuchen, müssten Wachstumsanalysen in chemisch definiertem Medium durchgeführt werden, womit das Angebot an Energiequellen besser zu kontrollieren wäre. Leider steht aber bisher für Staphylokokken kein brauchbares chemisch definiertes Medium zur Verfügung.

Die Transkriptionsanalysen mit *S. aureus* und *S. epidermidis* zeigten beide eine veränderte Expression der Gene *arcA* und *arcB* unter dem Einfluss von Synercid[®], die eindeutig mit der Biofilmbildung korrelierte (vergleiche 4.3). Damit übereinstimmend wurde gezeigt, dass sowohl *arcR* als auch das *arcABDC-Operon* in Biofilm-assoziierten *S. aureus* stärker exprimiert werden als in planktonischen Bakterien (10). Dass allerdings durch die Adhärenzassays keine veränderte Biofilmbildung bei den *arcR*-Mutanten im Vergleich zum WT beobachtet werden konnte, deutet an, dass ArcR weder für die Bildung den Biofilms selbst noch für dessen Beeinflussung durch Synercid[®] eine messbare Rolle zu spielen scheint.

Mit Hilfe der Transkriptionsanalysen sollte festgestellt werden, ob ArcR die Expression noch weiterer Gene, außer dem *arcABDC-Operon*, reguliert. Es konnten allerdings weder mit qRT-PCR noch mit Mikroarrays ein signifikanter Unterschied in der Expression, außer dem *arcABDC-Operons* selbst, beobachtet werden. Diese Ergebnisse wurden durch Proteomanalysen, die in der Arbeitsgruppe von S. Engelmann (Universität Greifswald) durchgeführt wurden, bestätigt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass vor allem Transkriptomanalysen bei leichten Expressionsunterschieden schnell an ihre technischen Grenzen stoßen und daher ein regulatorischer Einfluss von ArcR auf andere Gene noch nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Momentan untersucht I. Borovok (Universität Tel Aviv), anhand von *Proteinshift*-Assays die Bindekapazität von ArcR an das mehrfach im Genom von *S. aureus* vorhandene putative FNR/CRP-spezifische Bindemotiv. Sollte er eine spezifische Bindung nachweisen können, würde das darauf schließen lassen, dass die Transkriptom- und Proteomanalysen unter Bedingungen durchgeführt wurden, unter denen die Aktivität von ArcR möglicherweise durch das Fehlen oder Vorhandensein anderer Faktoren eingeschränkt ist, beziehungsweise der regulatorische Effekt von ArcR auf diese Gene *in vivo* nur sehr schwach ist.

5.11. Ausblick

Seit Einführung von Antibiotika in die Medizin haben fast alle medizinisch relevanten Bakterien Resistenzen gegen diese Substanzen entwickelt. Besonders problematisch ist vor allem die klinische Etablierung von multiresistenten *S. aureus*, *S. epidermidis* sowie verschiedenen multiresistenten Enterokokken- und Pseudomonas-Stämmen. Außerdem gibt die zunehmende Verbreitung Methicillin-resistenter *S. aureus* sowie multiresistenter *S. pneumoniae* Stämmen in der Bevölkerung Anlass zur Besorgnis. Daher ist die Entwicklung neuer Antibiotika unerlässlich. Allerdings stellt dies allein keine Lösung des Problems dar. Es ist außerdem erforderlich, die Mechanismen der Resistenzentwicklung besser zu verstehen, da ansonsten keine Möglichkeit besteht, diesen entgegenzuwirken.

Bereits seit einiger Zeit werden die Wirkmechanismen von Antibiotika mit Hilfe von Transkriptom- und Proteomanalysen untersucht. Diese Arbeiten haben alle einen großen Einfluss der Antibiotika auf die jeweiligen Zielstrukturen wie auch den Metabolismus der Bakterien nachgewiesen. Des Weiteren gibt es eine Reihe von Hinweisen, dass Antibiotika neben ihrer antibakteriellen Wirkung noch andere, möglicherweise regulatorische Funktionen ausüben. So wurde bereits für einige Antibiotika nachgewiesen, dass sie unter subinhibitorischer Konzentration zum Beispiel die Bildung von Virulenzfaktoren beeinflussen. Da Antibiotika, in Abhängigkeit von ihrer jeweiligen Kinetik, auch während einer Therapie zeitweise und/oder lokal nur in subinhibitorischen Konzentrationen vorkommen, könnten diese weiteren Funktionen durchaus auch medizinisch relevant sein. Transkriptomanalysen können darüber Aufschluss geben, welchen Einfluss subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen haben und ob unter diesen Bedingungen möglicherweise Mechanismen aktiviert werden, welche die Bildung von Resistenzen fördern könnten.

Diese Arbeit zeigt, dass Transkriptomanalysen auch Aufschluss darüber geben, welche zellulären Mechanismen bei der Reaktion auf geringe Konzentrationen von Antibiotika eine Rolle spielen und wie diese aktiviert bzw. inaktiviert werden. Dies ermöglicht wiederum die Identifizierung weiterer Targets, deren Inhibierung eine Reaktion des Bakteriums auf Antibiotika und somit eventuell die Bildung von Resistenzen erschweren könnte. Aufgrund der hier vorgestellten Daten kann man zum Beispiel folgern, dass eine Resistenzentwicklung gegen Translationsinhibitoren durch zusätzliche Inhibierung von Proteinen, die an der Regulierung der ppGpp Konzentration beteiligt sind, verhindert werden könnte. Ebenso wäre

es ein interessanter zukünftiger Ansatz, die Biofilmbildung von Staphylokokken auf diesem Weg gezielt zu beeinflussen.

Im zeitlichen und experimentellen Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, die Funktion einzelner Gene, die als unterschiedlich reguliert identifiziert wurden, im Detail zu analysieren. Allerdings ist eine genauere Untersuchung einiger der diskutierten Gene bzw. Stoffwechselwege, für die Bestätigung der aufgestellten Hypothese zum Kohlenstoff-Fluss und zur Biofilmbildung unerlässlich. Besonders vielversprechend scheinen dabei die Gene des Purin-Stoffwechsels, wie *purR* bzw. das *purED*-Operon sowie das Gen SERP2065 von *S. epidermidis* und die bisher noch nicht charakterisierten Regulatoren von *S. epidermidis* und *S. aureus* zu sein. Außerdem bieten sich Gene, deren Produkte an der Zellwandsynthese, Transportsystemen und einige der in ihrer Expression besonders stark unter dem Einfluss von Synercid[®] veränderten hypothetischen Gene (Tabelle 5.1) für weitere Analysen an. Deren Charakterisierung könnten weitere Hinweise darüber liefern ob sie selbst an der Biofilmbildung beteiligt sind oder aber ihre unterschiedliche Expression durch die Beeinflussung des Stoffwechsels bedingt wurde.

ORF_ID	Funktion
<i>S. epidermidis</i>	
SERP1749	putative membrane protein [<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953]
SERP2129	oxidoreductase,short-chain dehydrogenase/reductase family
SERP2143	fructosamine kinase family protein
SERP2167	hypothetical protein, similar to transcriptional regulator [<i>Bacillus clausii</i> KSM-K16]
SERP2271	putative membrane protein [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus MRSA252]
<i>S. aureus</i>	
SA0184	conserved hypothetical protein
SA0185	conserved hypothetical protein
SA0186	PTS system, sucrose-specific IIBC component, putative
SA0187	hypothetical protein, similar to transcription regulator
SA0322	hypothetical protein, similar to transcription regulator
SA0648	conserved hypothetical protein
SA0738	conserved hypothetical protein
SA0975	conserved hypothetical protein
SA1833	hypothetical protein, similar to transcription regulator

Tab. 5.1: Liste einiger, unter dem Einfluss von Synercid[®] besonders stark unterschiedlich exprimierter Gene von *S. epidermidis* und *S. aureus*. Diese stellen eine kleine Auswahl der für weitere Analysen interessanter hypothetischer Gene dar.

6. Literatur

1. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed ed.
2. 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep **51**:565-7.
3. **Aires de Sousa, M., and H. de Lencastre.** 2004. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol Med Microbiol **40**:101-11.
4. **Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet **359**:1819-27.
5. **Baldassarri, L., G. Donnelly, A. Gelosia, M. C. Voglino, A. W. Simpson, and G. D. Christensen.** 1996. Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. Infect Immun **64**:3410-5.
6. **Bandow, J. E., H. Brotz, and M. Hecker.** 2002. *Bacillus subtilis* tolerance of moderate concentrations of rifampin involves the sigma(B)-dependent general and multiple stress response. J Bacteriol **184**:459-67.
7. **Bandow, J. E., H. Brotz, L. I. Leichert, H. Labischinski, and M. Hecker.** 2003. Proteomic approach to understanding antibiotic action. Antimicrob Agents Chemother **47**:948-55.
8. **Barcelona-Andres, B., A. Marina, and V. Rubio.** 2002. Gene Structure, Organization, Expression, and Potential Regulatory Mechanisms of Arginine Catabolism in *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. **184**:6289-6300.
9. **Beenken, K. E., J. S. Blevins, and M. S. Smeltzer.** 2003. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. Infect Immun **71**:4206-11.
10. **Beenken, K. E., P. M. Dunman, F. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, S. J. Projan, J. S. Blevins, and M. S. Smeltzer.** 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. J Bacteriol **186**:4665-84.
11. **Betts, J. C., A. McLaren, M. G. Lennon, F. M. Kelly, P. T. Lukey, S. J. Blakemore, and K. Duncan.** 2003. Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother **47**:2903-13.

12. **Bisognano, C., P. E. Vaudaux, D. P. Lew, E. Y. Ng, and D. C. Hooper.** 1997. Increased expression of fibronectin-binding proteins by fluoroquinolone-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:906-13.
13. **Bjedov, I., O. Tenailon, B. Gerard, V. Souza, E. Denamur, M. Radman, F. Taddei, and I. Matic.** 2003. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Science* **300**:1404-9.
14. **Blickwede, M., R. Goethe, C. Wolz, P. Valentin-Weigand, and S. Schwarz.** 2005. Molecular basis of florfenicol-induced increase in adherence of *Staphylococcus aureus* strain Newman. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:315-323.
15. **Boles, B. R., M. Thoendel, and P. K. Singh.** 2004. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:16630-5.
16. **Bouanchaud, D. H.** 1997. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin. *J Antimicrob Chemother* **39 Suppl A**:15-21.
17. **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**:1453-1464.
18. **Boyce, J. M., G. Potter-Bynoe, C. Chenevert, and T. King.** 1997. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol* **18**:622-7.
19. **Bronner, S., H. Monteil, and G. Prevost.** 2004. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev* **28**:183-200.
20. **Cao, M., T. Wang, R. Ye, and J. D. Helmann.** 2002. Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* sigma(W) and sigma(M) regulons. *Mol Microbiol* **45**:1267-76.
21. **Carbon, C.** 1990. Significance of tissue levels for prediction of antibiotic efficacy and determination of dosage. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**:510-6.
22. **Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, and A. Buret.** 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* **37**:1771-6.

23. **Cha, R., W. J. Brown, and M. J. Rybak.** 2003. Bactericidal activities of daptomycin, quinupristin-dalfopristin, and linezolid against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in an in vitro pharmacodynamic model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3960-3.
24. **Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **10**:781-91.
25. **Chatterji, D., and A. Kumar Ojha.** 2001. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Current Opinion in Microbiology* **4**:160-165.
26. **Cheung, A. L., K. Schmidt, B. Bateman, and A. C. Manna.** 2001. SarS, a SarA homolog repressible by *agr*, is an activator of protein A synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**:2448-55.
27. **Chien, Y., A. C. Manna, and A. L. Cheung.** 1998. SarA level is a determinant of *agr* activation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **30**:991-1001.
28. **Christensen, G. D., L. P. Barker, T. P. Mawhinney, L. M. Baddour, and W. A. Simpson.** 1990. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **58**:2906-11.
29. **Cocito, C., M. Di Giambattista, E. Nyssen, and P. Vannuffel.** 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **39 Suppl A**:7-13.
30. **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**:4400-8.
31. **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**:4079-85.
32. **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**:2888-96.
33. **Dobinsky, S., K. Kiel, H. Rohde, K. Bartscht, J. K. Knobloch, M. A. Horstkotte, and D. Mack.** 2003. Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J Bacteriol* **185**:2879-86.

34. **Dong, Y., Y.-Y. M. Chen, J. A. Snyder, and R. A. Burne.** 2002. Isolation and Molecular Analysis of the Gene Cluster for the Arginine Deiminase System from *Streptococcus gordonii* DL1. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5549-5553.
35. **Donlan, R. M.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**:881-90.
36. **Dubrac, S., and T. Msadek.** 2004. Identification of Genes Controlled by the Essential YycG/YycF Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**:1175-1181.
37. **Evers, S., K. Di Padova, M. Meyer, H. Langen, M. Fountoulakis, W. Keck, and C. P. Gray.** 2001. Mechanism-related changes in the gene transcription and protein synthesis patterns of *Haemophilus influenzae* after treatment with transcriptional and translational inhibitors. *Proteomics* **1**:522-44.
38. **Eymann, C., G. Homuth, C. Scharf, and M. Hecker.** 2002. *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **184**:2500-2520.
39. **Fabret, C., and J. A. Hoch.** 1998. A Two-Component Signal Transduction System Essential for Growth of *Bacillus subtilis*: Implications for Anti-Infective Therapy. *J. Bacteriol.* **180**:6375-6383.
40. **Fey, P. D., J. S. Ulphani, F. Gotz, C. Heilmann, D. Mack, and M. E. Rupp.** 1999. Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **179**:1561-4.
41. **Fluckiger, U., M. Ulrich, A. Steinhuber, G. Doring, D. Mack, R. Landmann, C. Goerke, and C. Wolz.** 2005. Biofilm Formation, *icaADBC* Transcription, and Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis by Staphylococci in a Device-Related Infection Model. *Infect. Immun.* **73**:1811-1819.
42. **Fux, C. A., J. W. Costerton, P. S. Stewart, and P. Stoodley.** 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**:34-40.
43. **Galimand, M., M. Gamper, A. Zimmermann, and D. Haas.** 1991. Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**:1598-606.
44. **Gally, D. L., J. A. Bogan, B. I. Eisenstein, and I. C. Blomfield.** 1993. Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol* **175**:6186-93.

45. **Gamper, M., A. Zimmermann, and D. Haas.** 1991. Anaerobic regulation of transcription initiation in the *arcDABC* operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**:4742-50.
46. **Gemmell, C. G.** 1995. Antibiotics and the expression of staphylococcal virulence. *J Antimicrob Chemother* **36**:283-91.
47. **Gemmell, C. G., and C. W. Ford.** 2002. Virulence factor expression by Gram-positive cocci exposed to subinhibitory concentrations of linezolid. *J Antimicrob Chemother* **50**:665-72.
48. **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**:18586-93.
49. **Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. DeBoy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson, and C. M. Fraser.** 2005. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J. Bacteriol.* **187**:2426-2438.
50. **Giraud, A. T., C. G. Raspanti, A. Calzolari, and R. Nagel.** 1994. Characterization of a Tn551-mutant of *Staphylococcus aureus* defective in the production of several exoproteins. *Can J Microbiol* **40**:677-81.
51. **Gmuender, H., K. Kuratli, K. Di Padova, C. P. Gray, W. Keck, and S. Evers.** 2001. Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis. *Genome Res* **11**:28-42.
52. **Goerke, C., J. Koller, and C. Wolz.** 2006. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:171-7.
53. **Goh, E. B., G. Yim, W. Tsui, J. McClure, M. G. Surette, and J. Davies.** 2002. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:17025-30.
54. **Götz, F.** 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* **43**:1367-78.

55. **Götz, F. a., and G. Peters.** 2000. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci., p. 55-88. *In* F. A. Waldfogel, and and A. L. Bisno (ed.), *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. American Society of Microbiology Press, Washington, DC.
56. **Greenway, D. L., and R. R. England.** 1999. ppGpp accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* subjected to nutrient limitation and biocide exposure. *Lett Appl Microbiol* **29**:298-302.
57. **Hacker, J., U. Wallner, E. Straube, and H. Hof.** 1992. Effect of antibiotics on expression of virulence-associated genes. *Z Arztl Fortbild (Jena)* **86**:271-6.
58. **Hallander, H. O., G. Laurell, and G. Lofstrom.** 1966. Enhancement of staphylococcal pathogenicity in the presence of penicillin. *Acta Pathol Microbiol Scand* **68**:463-4.
59. **Hanaki, H., H. Akagi, S. Nomura, N. Unemi, and K. Hiramatsu.** 1996. Structure-activity relationships of cephalosporin derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *J Antibiot (Tokyo)* **49**:402-4.
60. **Hancock, R. E.** 2005. Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis* **5**:209-18.
61. **Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Gotz.** 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**:1013-24.
62. **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**:1083-91.
63. **Henney, J. E.** 1999. From the Food and Drug Administration. *Jama* **282**:1613.
64. **Herbert, S., P. Barry, and R. P. Novick.** 2001. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**:2996-3003.
65. **Hershberger, E., S. Donabedian, K. Konstantinou, and M. J. Zervos.** 2004. Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. *Clin Infect Dis* **38**:92-8.
66. **Hiramatsu, K.** 1998. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *Am J Med* **104**:7S-10S.

67. **Hiramatsu, K., N. Aritaka, H. Hanaki, S. Kawasaki, Y. Hosoda, S. Hori, Y. Fukuchi, and I. Kobayashi.** 1997. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **350**:1670-3.
68. **Holden, M. T., E. J. Feil, J. A. Lindsay, S. J. Peacock, N. P. Day, M. C. Enright, T. J. Foster, C. E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S. D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. D. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell, B. G. Spratt, and J. Parkhill.** 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9786-91.
69. **Holtmann, G., and E. Bremer.** 2004. Thermoprotection of *Bacillus subtilis* by Exogenously Provided Glycine Betaine and Structurally Related Compatible Solutes: Involvement of Opu Transporters. *J. Bacteriol.* **186**:1683-1693.
70. **Huebner, J., and D. A. Goldmann.** 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Annu Rev Med* **50**:223-36.
71. **Hughes, T. R., M. J. Marton, A. R. Jones, C. J. Roberts, R. Stoughton, C. D. Armour, H. A. Bennett, E. Coffey, H. Dai, Y. D. He, M. J. Kidd, A. M. King, M. R. Meyer, D. Slade, P. Y. Lum, S. B. Stepaniants, D. D. Shoemaker, D. Gachotte, K. Chakraborty, J. Simon, M. Bard, and S. H. Friend.** 2000. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* **102**:109-26.
72. **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**:519-24.
73. **Hussain, M., M. H. Wilcox, and P. J. White.** 1993. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol Rev* **10**:191-207.
74. **Hutter, B., C. Schaab, S. Albrecht, M. Borgmann, N. A. Brunner, C. Freiberg, K. Ziegelbauer, C. O. Rock, I. Ivanov, and H. Loferer.** 2004. Prediction of Mechanisms of Action of Antibacterial Compounds by Gene Expression Profiling. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2838-2844.

75. **Iandolo, J. J.** 1989. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* **43**:375-402.
76. **Ito, T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu.** 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1449-58.
77. **Ito, T., K. Kuwahara, K. Hisata, K. Okuma, L. Cui, and K. Hiramatsu.** 2004. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current status and molecular epidemiological perspective. *Kansenshogaku Zasshi* **78**:459-69.
78. **Janzon, L., and S. Arvidson.** 1990. The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Embo J* **9**:1391-9.
79. **Jarvis, W. R., and W. J. Martone.** 1992. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother* **29 Suppl A**:19-24.
80. **Jevons, M. P., A. W. Coe, and M. T. Parker.** 1963. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* **1**:904-7.
81. **John, M., H. Rohrig, J. Schmidt, U. Wieneke, and J. Schell.** 1993. Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:625-9.
82. **Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu.** 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1549-55.
83. **Kehoe, L. E., J. Snidwongse, P. Courvalin, J. B. Rafferty, and I. A. Murray.** 2003. Structural basis of Synercid (quinupristin-dalfopristin) resistance in Gram-positive bacterial pathogens. *J Biol Chem* **278**:29963-70.
84. **Klastersky, J.** 2003. Role of quinupristin/dalfopristin in the treatment of Gram-positive nosocomial infections in haematological or oncological patients. *Cancer Treat Rev* **29**:431-40.
85. **Kloos, W. E., D. N. Ballard, J. A. Webster, R. J. Hubner, A. Tomasz, I. Couto, G. L. Sloan, H. P. Dehart, F. Fiedler, K. Schubert, H. de Lencastre, I. S. Sanches, H. E. Heath, P. A. Leblanc, and A. Ljungh.** 1997. Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol* **47**:313-23.
86. **Kloos, W. E., and T. L. Bannerman.** 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**:117-40.

-
87. **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**:2624-33.
 88. **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**:3838-48.
 89. **Knobloch, J. K.-M., M. Nedelmann, K. Kiel, K. Bartscht, M. A. Horstkotte, S. Dobinsky, H. Rohde, and D. Mack.** 2003. Establishment of an Arbitrary PCR for Rapid Identification of Tn917 Insertion Sites in *Staphylococcus epidermidis*: Characterization of Biofilm-Negative and Nonmucoid Mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5812-5818.
 90. **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 Microbiology Letters* **255**:11-16.
 91. **Korner, H., H. J. Sofia, and W. G. Zumft.** 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**:559-92.
 92. **Kornmann, H., P. Duboc, P. Niederberger, I. Marison, and U. von Stockar.** 2003. Influence of residual ethanol concentration on the growth of *Gluconacetobacter xylinus* I 2281. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**:168-73.
 93. **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**:4751-7.
 94. **Kresken, M., and D. Hafner.** 2001. How can we protect against broad-band pathogens? The situation with quinolone resistance. *Pharm Unserer Zeit* **30**:436-45.

95. **Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu.** 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**:1225-40.
96. **Lagrou, K., W. E. Peetermans, M. Jorissen, J. Verhaegen, J. Van Damme, and J. Van Eldere.** 2000. Subinhibitory concentrations of erythromycin reduce pneumococcal adherence to respiratory epithelial cells in vitro. *J Antimicrob Chemother* **46**:717-23.
97. **Lang, S., M. A. Livesley, P. A. Lambert, W. A. Littler, and T. S. Elliott.** 2000. Identification of a novel antigen from *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **29**:213-20.
98. **Leclercq, R., L. Nantas, C. J. Soussy, and J. Duval.** 1992. Activity of RP 59500, a new parenteral semisynthetic streptogramin, against staphylococci with various mechanisms of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics. *J Antimicrob Chemother* **30 Suppl A**:67-75.
99. **Lin, J. T., M. B. Connelly, C. Amolo, S. Otani, and D. S. Yaver.** 2005. Global Transcriptional Response of *Bacillus subtilis* to Treatment with Subinhibitory Concentrations of Antibiotics That Inhibit Protein Synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1915-1926.
100. **Low, D. E.** 1995. Quinupristin/dalfopristin: spectrum of activity, pharmacokinetics, and initial clinical experience. *Microb Drug Resist* **1**:223-34.
101. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**:520-32.
102. **Lundstrom, T. S., and J. D. Sobel.** 2004. Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and daptomycin. *Infect Dis Clin North Am* **18**:651-68, x.
103. **Mack, D.** 1999. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect* **43 Suppl**:S113-25.

104. **Mack, D., P. Becker, I. Chatterjee, S. Dobinsky, J. K. 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. *Int J Med Microbiol* **294**:203-12.
105. **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**:175-83.
106. **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**:3244-53.
107. **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**:1004-8.
108. **Maghnouj, A., A. A. W. Abu-Bakr, S. Baumberg, V. Stalon, and C. Vander Wauven.** 2000. Regulation of anaerobic arginine catabolism in *Bacillus licheniformis* by a protein of the Crp/Fnr family. *FEMS Microbiology Letters* **191**:227-234.
109. **Maghnouj, A., T. F. de Sousa Cabral, V. Stalon, and C. Vander Wauven.** 1998. The *arcABDC* Gene Cluster, Encoding the Arginine Deiminase Pathway of *Bacillus licheniformis*, and Its Activation by the Arginine Repressor ArgR. *J. Bacteriol.* **180**:6468-6475.
110. **Magnusson, L. U., A. Farewell, and T. Nystrom.** 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology* **13**:236-242.
111. **Mah, T. F., and G. A. O'Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**:34-9.
112. **Makhlin, J.** 2004. The role of ArcR, a member of CRP-FNR family of proteins, in the regulation of gene expression in *Staphylococcus aureus*. Dissertation. Tel Aviv University, Tel Aviv.

113. **Malbruny, B., A. Canu, B. Bozdogan, B. Fantin, V. Zarrouk, S. Dutka-Malen, C. Feger, and R. Leclercq.** 2002. Resistance to quinupristin-dalfopristin due to mutation of L22 ribosomal protein in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:2200-7.
114. **Manna, A. C., and A. L. Cheung.** 2003. *sarU*, a *sarA* homolog, is repressed by SarT and regulates virulence genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **71**:343-53.
115. **Marrie, T. J., and J. W. Costerton.** 1984. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *J Clin Microbiol* **19**:687-93.
116. **Martin, P. K., T. Li, D. Sun, D. P. Biek, and M. B. Schmid.** 1999. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **181**:3666-73.
117. **Masalha, M., I. Borovok, R. Schreiber, Y. Aharonowitz, and G. Cohen.** 2001. Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *J Bacteriol* **183**:7260-72.
118. **Mayberry-Carson, K. J., W. R. Mayberry, B. K. Tober-Meyer, J. W. Costerton, and D. W. Lambe, Jr.** 1986. An electron microscopic study of the effect of clindamycin on adherence of *Staphylococcus aureus* to bone surfaces. *Microbios* **45**:21-32.
119. **McKinnon, P. S., and S. L. Davis.** 2004. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Issues in the Treatment of Bacterial Infectious Diseases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **23**:271-288.
120. **McNamara, P. J., K. C. Milligan-Monroe, S. Khalili, and R. A. Proctor.** 2000. Identification, cloning, and initial characterization of *rot*, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **182**:3197-203.
121. **Morrissey, J. A., A. Cockayne, P. J. Hill, and P. Williams.** 2000. Molecular cloning and analysis of a putative siderophore ABC transporter from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **68**:6281-8.
122. **Mukhtar, T. A., and G. D. Wright.** 2005. Streptogramins, oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis. *Chem Rev* **105**:529-42.
123. **Neubauer, H., and F. Gotz.** 1996. Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* **178**:2005-9.

124. **Ng, W. L., K. M. Kazmierczak, G. T. Robertson, R. Gilmour, and M. E. Winkler.** 2003. Transcriptional regulation and signature patterns revealed by microarray analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 challenged with sublethal concentrations of translation inhibitors. *J Bacteriol* **185**:359-70.
125. **Ng, W. L., K. M. Kazmierczak, and M. E. Winkler.** 2004. Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Mol Microbiol* **53**:1161-75.
126. **Noble, M. A., J. L. Isaac-Renton, E. A. Bryce, D. L. Roscoe, F. J. Roberts, M. Walker, S. Scharf, A. Walsh, M. Altamirano-Dimas, and M. Gribble.** 1998. The toilet as a transmission vector of vancomycin-resistant enterococci. *J Hosp Infect* **40**:237-41.
127. **Novick, R. P., H. F. Ross, S. J. Projan, J. Kornblum, B. Kreiswirth, and S. Moghazeh.** 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo J* **12**:3967-75.
128. **Odenholt, I.** 2001. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents* **17**:1-8.
129. **Ohlsen, K., K. P. Koller, and J. Hacker.** 1997. Analysis of expression of the alpha-toxin gene (*hla*) of *Staphylococcus aureus* by using a chromosomally encoded *hla::lacZ* gene fusion. *Infect Immun* **65**:3606-14.
130. **Ohlsen, K., W. Ziebuhr, K. P. Koller, W. Hell, T. A. Wichelhaus, and J. Hacker.** 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2817-23.
131. **Oie, S., Y. Huang, A. Kamiya, H. Konishi, and T. Nakazawa.** 1996. Efficacy of disinfectants against biofilm cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbios* **85**:223-30.
132. **Parsek, M. R., and E. P. Greenberg.** 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8789-93.
133. **Paul, B. J., W. Ross, T. Gaal, and R. L. Gourse.** 2004. rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics* **38**:749-770.
134. **Pechere, J. C.** 1996. Streptogramins. A unique class of antibiotics. *Drugs* **51 Suppl 1**:13-9.

135. **Perlman, D., and H. O. Halvorson.** 1983. A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol* **167**:391-409.
136. **Peschel, A., M. Otto, R. W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung, and F. Gotz.** 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**:8405-10.
137. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
138. **Projan, S. J.** 2000. Preclinical pharmacology of GAR-936, a novel glycylycylcine antibacterial agent. *Pharmacotherapy* **20**:219S-223S; discussion 224S-228S.
139. **Projan, S. J. a., and R. Novick.** 1997. The molecular basis of virulence., p. 55-81. *In* G. L. a. Archer and K. Crossley (ed.), *Staphylococci in Human Disease*. Churchill Livingstone, New York.
140. **Pulverer, G., and R. Halswick.** 1967. Coagulase-negative staphylococci (*Staphylococcus albus*) as pathogens. *Dtsch Med Wochenschr* **92**:1141-5.
141. **Rachid, S., S. Cho, K. Ohlsen, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor *sigB*. *Adv Exp Med Biol* **485**:159-66.
142. **Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3357-63.
143. **Resch, A., R. Rosenstein, C. Nerz, and F. Gotz.** 2005. Differential Gene Expression Profiling of *Staphylococcus aureus* Cultivated under Biofilm and Planktonic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2663-2676.
144. **Rohde, H., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J. K.-M. 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. *Molecular Microbiology* **55**:1883-1895.
145. **Rupp, M. E., and G. L. Archer.** 1994. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**:231-43; quiz 244-5.

146. **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**:33-6.
147. **Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht, and D. Mack.** 1999. 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**:2627-32.
148. **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**:3007-17.
149. **Said-Salim, B., P. M. Dunman, F. M. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, P. J. McNamara, S. Arvidson, T. J. Foster, S. J. Projan, and B. N. Kreiswirth.** 2003. Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot. *J Bacteriol* **185**:610-9.
150. **Schlievert, P. M., and J. A. Kelly.** 1984. Clindamycin-induced suppression of toxic-shock syndrome-associated exotoxin production. *J Infect Dis* **149**:471.
151. **Schmidt, K. A., A. C. Manna, S. Gill, and A. L. Cheung.** 2001. SarT, a repressor of alpha-hemolysin in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **69**:4749-58.
152. **Schreier, H. J., S. M. Caruso, and K. C. Maier.** 2000. Control of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase expression by *glnR* from *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol* **41**:425-9.
153. **Shaw, K. J., and B. J. Morrow.** 2003. Transcriptional profiling and drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* **3**:508-12.
154. **Shiau, A. L., and C. L. Wu.** 1998. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol* **42**:33-40.
155. **Shibl, A. M.** 1983. Effect of antibiotics on production of enzymes and toxins by microorganisms. *Rev Infect Dis* **5**:865-75.
156. **Shibl, A. M.** 1987. Influence of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence of staphylococci. *Rev Infect Dis* **9**:704-12.
157. **Singh, K. V., G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:1845-50.

158. **Slama, T. G., A. Amin, S. A. Brunton, J. File, Thomas M., G. Milkovich, K. A. Rodvold, D. F. Sahn, and J. Varon.** 2005. A clinician's guide to the appropriate and accurate use of antibiotics: the Council for Appropriate and Rational Antibiotic Therapy (CARAT) criteria. *The American Journal of Medicine* **118**:1-6.
159. **Sofer, D., N. Gilboa-Garber, A. Belz, and N. C. Garber.** 1999. 'Subinhibitory' erythromycin represses production of *Pseudomonas aeruginosa* lectins, autoinducer and virulence factors. *Chemotherapy* **45**:335-41.
160. **Somerville, G. A., A. Cockayne, M. Durr, A. Peschel, M. Otto, and J. M. Musser.** 2003. Synthesis and deformylation of *Staphylococcus aureus* delta-toxin are linked to tricarboxylic acid cycle activity. *J Bacteriol* **185**:6686-94.
161. **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**:93-100.
162. **Takahashi, K., K. Kasai, and K. Ochi.** 2004. Identification of the bacterial alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:4320-4.
163. **Tang, C. M., and E. R. Moxon.** 2001. The impact of microbial genomics on antimicrobial drug development. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**:259-69.
164. **Tegmark, K., A. Karlsson, and S. Arvidson.** 2000. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **37**:398-409.
165. **Tenover, F. C., M. V. Lancaster, B. C. Hill, C. D. Steward, S. A. Stocker, G. A. Hancock, C. M. O'Hara, S. K. McAllister, N. C. Clark, and K. Hiramatsu.** 1998. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* **36**:1020-7.
166. **Throup, J. P., K. K. Koretke, A. P. Bryant, K. A. Ingraham, A. F. Chalker, Y. Ge, A. Marra, N. G. Wallis, J. R. Brown, D. J. Holmes, M. Rosenberg, and M. K. Burnham.** 2000. A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **35**:566-76.
167. **Timmerman, C. P., A. Fleer, J. M. Besnier, L. De Graaf, F. Cremers, and J. Verhoef.** 1991. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* **59**:4187-92.

168. **Toledo-Arana, A., N. Merino, M. Vergara-Irigaray, M. Debarbouille, J. R. Penades, and I. Lasa.** 2005. *Staphylococcus aureus* Develops an Alternative, *ica*-Independent Biofilm in the Absence of the *arlRS* Two-Component System. *J. Bacteriol.* **187**:5318-a-5329.
169. **Tomlins, R. I., M. D. Pierson, and Z. J. Ordal.** 1971. Effect of thermal injury on the TCA cycle enzymes of *Staphylococcus aureus* MF 31 and *Salmonella typhimurium* 7136. *Can J Microbiol* **17**:759-65.
170. **Tonon, T., J. P. Bourdineaud, and A. Lonvaud-Funel.** 2001. The *arcABC* gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Res Microbiol* **152**:653-61.
171. **Tormo, M. A., M. Marti, J. Valle, A. C. Manna, A. L. Cheung, I. Lasa, and J. R. Penades.** 2005. SarA is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *J Bacteriol* **187**:2348-56.
172. **Tornqvist, I. O., S. E. Holm, and O. Cars.** 1990. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Scand J Infect Dis Suppl* **74**:94-101.
173. **Tsiodras, S., H. S. Gold, G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman, R. C. Moellering, and M. J. Ferraro.** 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **358**:207-8.
174. **Utaida, S., P. M. Dunman, D. Macapagal, E. Murphy, S. J. Projan, V. K. Singh, R. K. Jayaswal, and B. J. Wilkinson.** 2003. Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cell-wall-active antibiotics reveals a cell-wall-stress stimulon. *Microbiology* **149**:2719-32.
175. **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*. *Mol Microbiol* **48**:1075-87.
176. **van Wamel, W., Y. Q. Xiong, A. S. Bayer, M. R. Yeaman, C. C. Nast, and A. L. Cheung.** 2002. Regulation of *Staphylococcus aureus* type 5 capsular polysaccharides by *agr* and *sarA* in vitro and in an experimental endocarditis model. *Microb Pathog* **33**:73-9.
177. **Vannuffel, P., and C. Cocito.** 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs* **51 Suppl 1**:20-30.
178. **Veenstra, G. J., F. F. Cremers, H. van Dijk, and A. Flier.** 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **178**:537-41.

179. **Vuong, C., C. Gerke, G. A. Somerville, E. R. Fischer, and M. Otto.** 2003. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **188**:706-18.
180. **Vuong, C., J. B. Kidder, E. R. Jacobson, M. Otto, R. A. Proctor, and G. A. Somerville.** 2005. *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesion Production Significantly Increases during Tricarboxylic Acid Cycle Stress. *J. Bacteriol.* **187**:2967-2973.
181. **Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F. R. DeLeo, and M. Otto.** 2004. A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion, and Virulence. *J. Biol. Chem.* **279**:54881-54886.
182. **Wichelhaus, T., V. Schafer, V. Brade, and B. Boddingtonhaus.** 2001. Differential effect of *rpoB* mutations on antibacterial activities of rifampicin and KRM-1648 against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* **47**:153-6.
183. **Williams, P., M. Camara, A. Hardman, S. Swift, D. Milton, V. J. Hope, K. Winzer, B. Middleton, D. I. Pritchard, and B. W. Bycroft.** 2000. Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**:667-80.
184. **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**:3574-9.
185. **Xiao, H., M. Kalman, K. Ikehara, S. Zemel, G. Glaser, and M. Cashel.** 1991. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem* **266**:5980-90.
186. **Yoh, M., E. K. Frimpong, S. P. Voravuthikunchai, and T. Honda.** 1999. Effect of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents (quinolones and macrolide) on the production of verotoxin by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Can J Microbiol* **45**:732-9.
187. **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**:890-6.

188. **Zuniga, M., M. Champomier-Verges, M. Zagorec, and G. Perez-Martinez.** 1998. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sake*. *J Bacteriol* **180**:4154-9.
189. **Zuniga, M., M. d. C. Miralles, and G. Perez-Martinez.** 2002. The Product of *arcR*, the Sixth Gene of the *arc* Operon of *Lactobacillus sakei*, Is Essential for Expression of the Arginine Deiminase Pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6051-6058.

7. Anhang

7.1. *S. epidermidis* 567 Expressionsdaten

Tab.7.1: Expressionsdaten von *S. epidermidis* 567 unter dem Einfluss von Synercid[®]

ORF_ID	Gen-Name	Funktion	Ratio
Aminosäure Stoffwechsel			
SERP0119		Orn/Lys/Arg decarboxylase	2.175
SERP0545	<i>rocD</i>	ornithine aminotransferase	0.411
SERP0546	<i>gluD</i>	glutamate dehydrogenase, NAD-specific	0.331
SERP0766	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	2.305
SERP0876	<i>femC</i>	glutamine synthetase	0.270
SERP1046	<i>ansA</i>	L-asparaginase	0.295
SERP1729		aldehyde dehydrogenase	2.959
SERP2094	<i>sdhA</i>	L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, alpha subunit	2.007
SERP2095	<i>sdhB</i>	L-serine dehydratase, iron-sulfur-dependent, beta subunit	2.411
SERP2176	<i>betA</i>	choline dehydrogenase	0.268
SERP2177	<i>betB</i>	betaine aldehyde dehydrogenase	0.379
SERP2190	<i>cysI</i>	sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta-component	0.255
SERP2249	<i>arcB-1</i>	ornithine carbamoyltransferase	2.282
SERP2250	<i>arcA</i>	arginine deiminase	2.424
SERP2470		spermidine N1-acetyltransferase, putative	0.492
Regulation			
SERP0293	<i>sirR</i>	iron-dependent repressor	2.039
SERP0875	<i>glnR</i>	glutamine synthetase repressor	0.360
SERP1383		transcriptional regulator, Cro/CI family	2.079
SERP1478		transcriptional regulator, GntR family	2.984
SERP1979	<i>sarZ</i>	transcriptional regulator, MarR-family	2.575
SERP2096	<i>pfoR</i>	perfringolysin O regulator protein	2.210
SERP2118		transcriptional regulator, LysR family	3.670

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.1: Fortsetzung

ORF_ID	Gen-Name	Funktion	Ratio
SERP2241		transcriptional regulator	2.046
Kohlenstoff Metabolismus			
SERP0216		hexulose-6-phosphate synthase, putative	3.532
SERP0236	<i>pta</i>	phosphate acetyltransferase	0.341
SERP0244		oxidoreductase, aldo/keto reductase family	2.988
SERP0442	<i>gapA-1</i>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.410
SERP0446	<i>eno</i>	Enolase	0.273
SERP0682	<i>pdhC</i>	pyruvate dehydrogenase complex E2 component, dihydrolipoamide acetyltransferase	0.456
SERP0683	<i>pdhD</i>	pyruvate dehydrogenase complex E3 component, lipoamide dehydrogenase	0.495
SERP1067	<i>zwf-2</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0.390
SERP1250	<i>gapA-2</i>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.191
SERP1336	<i>tal</i>	Transaldolase (pentose path)	0.473
SERP1770		UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase family protein	0.480
SERP1924	<i>rpiA</i>	ribose 5-phosphate isomerase	0.392
SERP1927		L-ribulokinase, putative	0.265
SERP2032		sorbitol dehydrogenase, putative	0.163
SERP2076		fructose-1,6-bisphosphatase, putative	0.385
SERP2083		glyoxalase family protein	4.072
SERP2115		pyruvate oxidase	2.336
SERP2156	<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	0.364
SERP2170	<i>ppdK</i>	pyruvate phosphate dikinase	0.163
SERP2166	<i>fdxB</i>	fructose-bisphosphate aldolase, class I	2.090
Lipid Stoffwechsel			
SERP1785		alcohol dehydrogenase, zinc-containing	2.423
SERP1786		alcohol dehydrogenase, zinc-containing	2.968
SERP2346	<i>gldA</i>	glycerol dehydrogenase	2.446
Purin Metabolismus			
SERP0650	<i>purK</i>	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit	0.324

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.1: Fortsetzung

ORF_ID	Gen-Name	Funktion	Ratio
SERP0653	<i>purQ</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase I	0.2330
SERP0654	<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	0.1522
SERP0655	<i>purF</i>	Amidophosphoribosyltransferase	0.1674
SERP0656	<i>purM</i>	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	0.2783
SERP0657	<i>purN</i>	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	0.1815
SERP0658	<i>purH</i>	phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	0.129
SERP0777	<i>rpoZ</i>	DNA-directed RNA polymerase, omega subunit	2.006
SERP0841	<i>pnp</i>	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	0.426
SERP1198	<i>apt</i>	adenine phosphoribosyltransferase	2.379
SERP1446	<i>purB</i>	adenylosuccinate lyase	0.434
SERP1747	<i>deoD</i>	purine nucleoside phosphorylase	0.486
SERP1810	<i>adk</i>	Adenylate kinase (ATP-AMP transphosphorylase)	2.061
SERP1835		xanthine/uracil permease family protein	0.356
SERP1865		inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase family protein	0.357
Stressantwort			
SERP0480		OsmC/Ohr family protein	11.83
SERP1299		general stress protein-like protein, putative	3.484
SERP1269		universal stress protein family	2.987
SERP1273		universal stress protein family	7.742
Translation			
SERP0044	<i>rpsF</i>	30S ribosomal protein S6	2.572
SERP0046	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	3.088
SERP0178	<i>rplK</i>	50S ribosomal protein L11	4.027
SERP0179	<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1	3.387
SERP0180	<i>rplJ</i>	50S ribosomal protein L10	3.979
SERP0185		30S ribosomal protein L7Ae, putative	2.065
SERP0186	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	2.411
SERP0419		ribosomal subunit interface protein	2.338
SERP0718	<i>rpmF</i>	50S ribosomal protein L32	2.588
SERP0721	<i>pheS</i>	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit	0.465
SERP0758	<i>ileS</i>	isoleucyl-tRNA synthetase	0.300
SERP0790	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	2.208

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.1: Fortsetzung

ORF_ID	Gen-Name	Funktion	Ratio
SERP1093	<i>efp</i>	translation elongation factor P	2.104
SERP1153	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	3.846
SERP1192	<i>aspS</i>	aspartyl-tRNA synthetase	0.430
SERP1182	<i>alaS</i>	alanyl-tRNA synthetase	0.444
SERP1203	<i>tgt</i>	queuine tRNA-ribosyltransferase	2.195
SERP1209	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	2.813
SERP1211	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	2.247
SERP1228	<i>valS</i>	valyl-tRNA synthetase	0.491
SERP1242	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	2.711
SERP1243	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	2.792
SERP1244	<i>infC</i>	translation initiation factor IF-3	2.350
SERP1284	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	2.697
SERP1727	<i>rpmE</i>	50S ribosomal protein L31 type B	3.334
SERP1806	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	2.023
SERP1812	<i>rplO</i>	50S ribosomal protein L15	2.491
SERP1814	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	2.533
SERP1815	<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	3.069
SERP1816	<i>rplF</i>	50S ribosomal protein L6	3.109
SERP1817	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	2.784
SERP1818	<i>rpsN-2</i>	30S ribosomal protein S14	5.265
SERP1819	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	3.168
SERP1822	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	4.285
SERP1823	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	3.626
SERP1824	<i>rplP</i>	50S ribosomal protein L16	2.222
SERP1825	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	3.854
SERP1826	<i>rplV</i>	50S ribosomal protein L22	2.915
SERP1827	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	3.020
SERP1828	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2	2.928
SERP1829	<i>rplW</i>	50S ribosomal protein L23	2.899
SERP1830	<i>rplD</i>	50S ribosomal protein L4	2.493
SERP1831	<i>rplC</i>	50S ribosomal protein L3	2.111
SERP1832	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	2.460

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.1: Fortsetzung

ORF_ID	Gen-Name	Funktion	Ratio
Transport			
SERP0092		sodium-dependent transporter, putative	0.445
SERP0304		nucleoside permease NupC, putative	0.436
SERP0400		iron compound ABC transporter, permease protein	2.115
SERP0401		iron compound ABC transporter, permease protein	2.322
SERP0402		iron compound ABC transporter, ATP-binding protein	2.530
SERP0403		transferrin receptor	3.807
SERP0489		ABC transporter, ATP-binding protein	2.433
SERP0490		ABC transporter, permease protein	2.274
SERP0686		spermidine/putrescine ABC transporter, ATP-binding protein	3.290
SERP0692		Mn ²⁺ /Fe ²⁺ transporter, NRAMP family	0.109
SERP0785		protein phosphatase 2C domain protein	0.437
SERP0800		chromosome segregation SMC protein, putative	0.462
SERP0801	<i>ftsY</i>	cell division protein	0.407
SERP0977	<i>brnQ-1</i>	branched-chain amino acid transport system II carrier protein	2.280
SERP1122		ABC transporter, ATP-binding protein	2.145
SERP1202	<i>yajC</i>	preprotein translocase, subunit	2.125
SERP1376		protein export protein PrsA, putative	0.385
SERP1403		ABC transporter, permease/ATP-binding protein	2.196
SERP1811	<i>secY</i>	preprotein translocase, SecY subunit	2.006
SERP1909		PTS system, IIBC components	0.298
SERP1944		drug resistance transporter, EmrB/QacA family	2.563
SERP1952		ABC transporter, permease protein	6.601
SERP2028	<i>opuCD</i>	amino acid ABC transporter, permease protein	5.291
SERP2029	<i>opuCC</i>	amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein	5.464
SERP2030	<i>opuCB</i>	amino acid ABC transporter, permease protein	6.257
SERP2031	<i>opuCA</i>	amino acid ABC transporter, ATP-binding protein	6.909
SERP2038		ABC transporter, ATP-binding protein	2.478
SERP2131	<i>copA</i>	cation-transporting ATPase, E1-E2 family	0.508
SERP2247		arginine/ornithine antiporter	2.105

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.1: Fortsetzung

ORF_ID	Gen-Name	Funktion	Ratio
SERP2328		anion transporter family protein	0.498
SERP2532	<i>yycH</i>	yycH protein	0.364
SERP2533	<i>yycG</i>	sensory box histidine kinase YycG	0.434
„Andere“			
SERP0084	<i>nuoF</i>	NADH dehydrogenase I, F subunit	0.3175
SERP0127		methyltransferase, tetrapyrrole family	4.565
SERP0135		endoribonuclease L-PSP, putative	3.202
SERP0141	<i>mfd</i>	transcription-repair coupling factor	0.450
SERP0217		SIS domain protein	3.705
SERP0237		lipoate-protein ligase A family protein	0.374
SERP0240		phosphomevalonate kinase	2.040
SERP0269		hydrolase, alpha/beta hydrolase fold family	0.419
SERP0299		teichoic acid biosynthesis protein X, putative	0.470
SERP0390	<i>bmrU</i>	multidrug resistance protein	0.485
SERP0449	<i>est</i>	Carboxylesterase	2.126
SERP0507		CBS domain protein (hemolysine)	2.253
SERP0524		NADH dehydrogenase, putative	0.497
SERP0560		coenzyme A disulfide reductase	0.423
SERP0563		membrane protein, putative	0.411
SERP0576		glutaredoxin, ArsC family	3.931
SERP0610		integral membrane protein, TerC family	2.994
SERP0614		abortive infection family protein	2.743
SERP0663		67 kDa Myosin-crossreactive antigen	6.087
SERP0676		metallo-beta-lactamase family protein	0.432
SERP0729	<i>uvrC</i>	excinuclease ABC, C subunit	5.199
SERP0778	<i>coaBC</i>	phosphopantothienylcysteine decarboxylase/phosphopantothenate--cysteine ligase	0.519
SERP0882		surface lipoprotein-related protein	7.090
SERP0944		ThiJ/PfpI family protein	8.499
SERP0947	<i>femB</i>	methicillin resistance factor	0.488
SERP0955		oligoendopeptidase F, putative	0.227
SERP1012		5'-3' exonuclease, putative	0.421
SERP1026	<i>birA</i>	bifunctional protein	0.476

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.1: Fortsetzung

ORF_ID	Gen-Name	Funktion	Ratio
SERP1095		lipoprotein, putative	0.500
SERP1098		rhodanese-like domain protein	2.731
SERP1178		O-methyltransferase family protein	2.448
SERP1191		HesA/MoeB/ThiF family protein	0.388
SERP1206	<i>ruvA</i>	Holliday junction DNA helicase	2.039
SERP1266	<i>dnaE</i>	DNA polymerase III, alpha subunit	0.4677
SERP1279	<i>thiI</i>	thiamine biosynthesis protein	2.074
SERP1291		1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, putative	2.159
SERP1292		serine protease HtrA, putative	0.264
SERP1350		oxidoreductase, aldo/keto reductase family	6.358
SERP1378	<i>cbfI</i>	cmp-binding-factor 1	0.412
SERP1384		DNA-binding response regulator, LuxR family	2.182
SERP1391		RNA methyltransferase, TrmH family, group 2	2.083
SERP1392		iron-sulfur cluster-binding protein, putative	3.094
SERP1413		ThiJ/PfpI family protein	8.343
SERP1455	<i>ppaC</i>	manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	0.444
SERP1490	<i>agrB</i>	accessory gene regulator protein B	4.055
SERP1493	<i>agrA</i>	accessory gene regulator protein A	8.137
SERP1748		Dps family protein	3.734
SERP1765		ATP-binding protein, Mrp/Nbp35 family	0.431
SERP1864		BioY family protein	0.424
SERP2042		lipoprotein, putative	2.372
SERP2074		HesA/MoeB/ThiF family protein	0.458
SERP2120	<i>ssaA</i>	secretory antigen precursor	2.383
SERP2129		oxidoreductase,short-chain dehydrogenase/reductase family	7.274
SERP2132		heavy metal-binding protein, putative	2.475
SERP2143		fructosamine kinase family protein	7.839
SERP2244		capA-related protein	0.265
SERP2245		tributyryl esterase EstA, putative	0.199
SERP2293	<i>icaA</i>	intercellular adhesion protein A	9.035
SERP2296	<i>icaC</i>	intercellular adhesion protein C	6.064

Tab.7.2: Unter Synercid® unterschiedlich exprimierte hypothetische Gene von *S. epidermidis*

ORF_ID	Ähnlichkeit mit Proteinen anderer Organismen (nBLAST)	Ratio
SERP0037	trans-sulfuration enzyme family protein	3.212
SERP0049	Integral membrane protein [Bacillus cereus ATCC 14579]	9.204
SERP0087	Uncharacterized conserved protein [Function unknown]	0.367
SERP0106	integral membrane protein [Lactobacillus plantarum WCFS1]	0.272
SERP0112	Orn/Lys/Arg decarboxylase DNA polymerase III, delta prime subunit, putative	0.271
SERP0125	methyltransferase [Bacillus cereus G9241]	4.827
SERP0126	dicted endonuclease containing a URI Domain [Exiguobacterium sp. 255-15]	3.772
SERP0182	6S rRNA m(2)G 1207 methyltransferase [Bacillus cereus G9241]	4.161
SERP0235	Chlorite dismutase [Bacillus licheniformis ATCC 14580]	0.372
SERP0276	integral membrane protein [Lactobacillus plantarum WCFS1]	0.340
SERP0336	EMG2 protein [Bacillus cereus ATCC 14579]	2.796
SERP0469	phage-related protein YmaC [Bacillus licheniformis ATCC 14580]	2.805
SERP0484	arsenate reductase [Staphylococcus epidermidis ATCC 12228]	2.160
SERP0615	ykvS [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]	2.892
SERP0667	S-adenosylmethionine (SAM)-dependent methyltransferase [Bacillus clausii KSM-K16]	0.291
SERP0679	putative lipoprotein [Staphylococcus aureus subsp. aureus MRSA252]	2.483
SERP0699	hypothetical protein ABC2399 [Bacillus clausii KSM-K16]	2.125
SERP0717	Predicted metal-binding, possibly nucleic acid-binding protein [Enterococcus faecium]	2.340
SERP0742	hypothetical protein membrane Spanning protein [Bacillus cereus G9241]	0.427
SERP0789	Thiamine pyrophosphokinase [Bacillus anthracis str. A2012]	0.482
SERP0883	Threonine aldolase [Streptococcus suis 89/1591]	3.750
SERP0901	hypothetical protein	2.669
SERP1013	possible GTPases, GTP1/OBG family [Bacillus cereus ZK]	0.479
SERP1141	putative membrane protein [Staphylococcus aureus subsp. aureus MRSA252]	0.487
SERP1179	hypothetical protein	3.356
SERP1181	hypothetical protein	2.178
SERP1210	proteinhypothetical ribosome-associated protein [Bacillus cereus ATCC 14579]	2.758
SERP1405	Uncharacterized domain/protein associated with RNAses G and E [Streptococcus thermophilus LMD-9]	4.342
SERP1749	putative membrane protein [Yersinia pseudotuberculosis IP 32953]	2.477

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.2: Fortsetzung

ORF_ID	Ähnlichkeit mit Proteinen anderer Organismen (nBLAST)	Ratio
SERP1750	hypothetical protein	0.488
SERP1772	hypothetical protein	0.323
SERP1773	Predicted UDP-glucose 6-dehydrogenase [Bacillus anthracis str. A2012]	0.303
SERP1974	hypothetical protein	2.264
SERP2116	hypothetical protein	2.710
SERP2167	hypothetical protein, similar to transcriptional regulator [Bacillus clausii KSM-K16]	3.564
SERP2065	hypothetical protein, similar to GTP-pyrophosphokinase	2.097
SERP2068	hypothetical protein	3.748
SERP2169	hypothetical proteinsimilar to transcription regulator of gluconeogenic genes [Lactobacillus plantarum WCFS1]	0.342
SERP2271	putative membrane protein [Staphylococcus aureus subsp. aureus MRSA252]	3.387

Tab.7.3: Gene von *S. epidermidis* RP62A, von den mit den Mikroarrays unter den untersuchten Bedingungen in *S. epidermidis* 567 kein Transkript detektiert wurde.

ORF_ID	Funktion
SERP0012	transcriptional regulator, Cro-CI family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0018	lipase, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0020	ABC transporter, permease protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0021	ABC transporter, ATP-binding protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0025	major facilitator family transporter (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0037	trans-sulfuration enzyme family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0042	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0043	lysozyme domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0052	phosphoglycerate mutase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0071	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0080	cobalamin synthesis protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0093	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0094	cysteine synthase-cystathionine beta-synthase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0095	trans-sulfuration enzyme family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0111	membrane protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

ORF_ID	Funktion
SERP0157	transcriptional regulator, GntR family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0196	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0198	teichoic acid biosynthesis protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0210	arsenical pump membrane protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0223	major facilitator family transporter (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0227	penicillin V acylase, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0245	transporter, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0246	ABC transporter, substrate-binding protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0247	transcriptional regulator, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0263	endonuclease III, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0264	transcriptional regulator, MerR family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0273	hydrolase, alpha-beta hydrolase fold family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0279	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0280	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0315	ABC transporter, permease protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0338	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0345	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0350	hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0351	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0387	histidinol-phosphate aminotransferase (hisC) [2.6.1.9] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0389	alcohol dehydrogenase, iron-containing [1.1.1.1] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0397	ribonucleoside-diphosphate reductase 2, alpha subunit (nrdE) [1.17.4.1] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0417	comF operon protein 1, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0418	comF operon protein 3 (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0460	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0463	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0467	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0504	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0531	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0548	argininosuccinate lyase (argH) [4.3.2.1] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0569	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0579	competence protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0671	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0672	cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I (cydA) [1.10.3.-] (Staphylococcus epidermidis RP62A)

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

ORF_ID	Funktion
SERP0684	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0740	hydrolase, haloacid dehalogenase-like family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0760	glyoxalase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0809	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0809	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0859	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0879	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0905	ribosomal protein S14 (rpsN-1) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0957	phosphate ABC transporter, ATP-binding protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0959	phosphate ABC transporter, permease protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP0960	phosphate ABC transporter, phosphate-binding protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1011	cell wall associated fibronectin-binding protein (ebh) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1021	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1059	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1060	tyrosine recombinase XerD (xerD) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1067	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (zwf-2) [1.1.1.49] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1067	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (zwf-2) [1.1.1.49] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1067	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (zwf-2) [1.1.1.49] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1089	acetylornithine aminotransferase (argD) [2.6.1.11] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1090	acetylglutamate kinase (argB) [2.7.2.8] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1092	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase (argC) [1.2.1.38] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1104	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1106	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1155	competence protein ComEC-Rec2, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1157	comE operon protein 1, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1226	type III leader peptidase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1266	DNA polymerase III, alpha subunit (dnaE) [2.7.7.7] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1286	OsmC-Ohr family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1316	cell wall surface anchor family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1333	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1334	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1335	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1382	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

ORF_ID	Funktion
SERP1394	amino acid ABC transporter, ATP-binding protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1395	amino acid ABC transporter, permease-amino acid-binding protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1499	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1501	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1502	DNA-binding protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1504	hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1508	thioredoxin, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1510	ribonucleoside-diphosphate reductase 2, beta subunit (nrdF-2) [1.17.4.1] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1512	HNH endonuclease family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1523	DNA-cytosine methyltransferase (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1537	DNA polymerase III, alpha subunit, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1541	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1541	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1541	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1544	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1545	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1552	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1570	Staphylococcal nuclease family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1585	6'-aminoglycoside N-acetyltransferase-2"-aminoglycoside phosphotransferase (aacA) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1589	hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1593	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1595	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1599	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1600	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1601	site-specific recombinase, phage integrase family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1621	DNA-binding protein HU, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1623	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1624	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1635	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1636	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1649	lipase-acylhydrolase domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1650	prophage, amidase, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1650	prophage, amidase, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1696	HD domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1702	sceD protein (sceD) (Staphylococcus epidermidis RP62A)

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

ORF_ID	Funktion
SERP1703	single-stranded DNA-binding protein family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1788	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1840	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1878	Staphylococcal accessory regulator Y (sarY) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1879	transcriptional regulator, AraC family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1886	sugE protein (sugE-1) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1887	sugE protein (sugE-2) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1906	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1907	hydrolase, haloacid dehalogenase-like family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1934	transcriptional regulator, PadR family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1950	membrane protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP1969	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2008	cation efflux family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2045	short chain dehydrogenase-reductase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2064	PAP2 family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2087	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2110	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2112	alcohol dehydrogenase, zinc-containing [1.1.1.1] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2117	LrgA family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2122	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [2.3.3.10] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2145	hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2160	conserved domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2192	phosphoadenylyl-sulfate reductase (cysH) [1.8.4.8] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2212	conserved domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2217	cytosine-purines, uracil, thiamine, allantoin permease family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2220	universal stress protein family, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2225	transcriptional regulator, ArsR family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2233	transcriptional regulator, LysR family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2240	transposase, IS200 family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2240	transposase, IS200 family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2253	peptidase, M20-M25-M40 family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2256	conserved domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2283	phosphonate ABC transporter, permease protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

ORF_ID	Funktion
SERP2287	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2289	transporter, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2299	N-acetyltransferase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2302	phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase (hisA) [5.3.1.16] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2303	amidotransferase HisH (hisH) [2.4.2.-] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2304	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (hisB) [4.2.1.19] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2305	histidinol dehydrogenase (hisD) [1.1.1.23] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2306	ATP phosphoribosyltransferase (hisG) [2.4.2.17] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2307	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2308	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2311	acetyltransferase, GNAT family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2330	thiamine biosynthesis protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2336	lipase, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2339	drug transporter, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2347	biotin synthetase (bioB) [2.8.1.6] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2359	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2360	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2361	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2364	peptidase, M20-M25-M40 family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2365	pyruvate formate-lyase-activating enzyme (pflA) [1.97.1.4] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2368	peptide ABC transporter, ATP-binding protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2369	peptide ABC transporter, ATP-binding protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2371	peptide ABC transporter, permease protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2372	peptide ABC transporter, peptide-binding protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2373	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2375	diaminopimelate epimerase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2377	conserved domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2381	NADH:flavin oxidoreductase-fumarate reductase, flavoprotein subunit, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2384	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2385	conserved domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2386	cobalamin synthesis protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2391	SspC protein (sspC) (Staphylococcus epidermidis RP62A)

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

ORF_ID	Funktion
SERP2392	cell wall associated biofilm protein (bhp) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2393	6-carboxyhexanoate--CoA ligase (bioW) [6.2.1.14] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2394	aminotransferase, class II (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2405	sensor histidine kinase (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2406	DNA-binding response regulator, AraC family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2422	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2423	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2425	membrane protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2426	transcriptional regulator, ArsR family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2430	arsenical pump membrane protein (arsB) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2431	arsenate reductase (arsC-2) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2432	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2433	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2434	rhodanese-like domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2435	metallo-beta-lactamase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2435	metallo-beta-lactamase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2435	metallo-beta-lactamase family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2437	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2439	hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2441	transporter, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2443	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2445	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2447	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2449	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2451	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2452	conserved domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2453	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2454	hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2455	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2456	hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2457	CRISPR-associated protein, TM1807 family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2458	CRISPR-associated protein, TM1808 family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2459	CRISPR-associated protein, TM1792 family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2460	CRISPR-associated protein, TM1810 family (Staphylococcus epidermidis RP62A)

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

ORF_ID	Funktion
SERP2461	CRISPR-associated protein, TM1811 family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2462	CRISPR-associated protein Cas2 (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2463	CRISPR-associated protein Cas1 (cas1) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2465	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2465	lipoprotein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2467	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2468	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2472	type I restriction-modification system, M subunit (hsdM) [2.1.1.-] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2475	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2477	hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2479	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2480	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2481	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2482	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2483	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2484	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2485	K ⁺ -transporting ATPase, C subunit (kdpC) [3.6.3.12] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2486	K ⁺ -transporting ATPase, B subunit (kdpB) [3.6.3.12] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2487	K ⁺ -transporting ATPase, A subunit (kdpA) [3.6.3.12] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2495	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2499	cassette chromosome recombinase B (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2501	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2503	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2504	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2505	RadC domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2505	RadC domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2506	Tn554, transposase A (tnpA-3) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2506	Tn554, transposase A (tnpA-3) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2506	Tn554, transposase A (tnpA-3) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2506	Tn554, transposase A (tnpA-3) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2506	Tn554, transposase A (tnpA-3) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2508	Tn554, transposase C (tnpC-3) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2509	Tn554, streptomycin 3"-adenylyltransferase (spC) [2.7.7.47] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2509	Tn554, streptomycin 3"-adenylyltransferase (spC) [2.7.7.47] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2509	Tn554, streptomycin 3"-adenylyltransferase (spC) [2.7.7.47] (Staphylococcus epidermidis RP62A)

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

ORF_ID	Funktion
SERP2510	Tn554, rRNA adenine N-6-methyltransferase (ermA-3) [2.1.1.48] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2510	Tn554, rRNA adenine N-6-methyltransferase (ermA-3) [2.1.1.48] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2510	Tn554, rRNA adenine N-6-methyltransferase (ermA-3) [2.1.1.48] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2512	Tn554, hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2512	Tn554, hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2513	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2514	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2515	rhodanese-like domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2517	xylose repressor (xylR) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2522	MaoC domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2523	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase UgpQ, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2527	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2528	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2543	azlC protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERP2544	beta-hemolysin (hly) (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0001	replication-associated protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0006	site-specific recombinase, resolvase family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0009	transcriptional regulator, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0012	aminoglycoside 6-adenylyltransferase (aadE) [2.7.7.-] (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0015	conserved hypothetical protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0016	transcriptional regulator, TetR family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0017	ABC transporter, permease protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0018	ABC transporter, ATP-binding protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0019	conserved domain protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0023	universal stress protein family (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0024	sulfate permease family protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0025	resolvase, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0027	mobilization protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0029	rlx protein, putative (Staphylococcus epidermidis RP62A)
SERPA0030	mobilization protein (Staphylococcus epidermidis RP62A)

7.2. *S. aureus* MA12 Expressionsdaten

Tab.7.4: Expressionsdaten von *S. aureus* MA12 unter dem Einfluss von Synercid[®]

Gen Name	Funktion	Ratio
Aminosäure Metabolismus		
<i>acuA</i>	acetoin dehydrogenase homolog	0,295
<i>acuC</i>	acetoin utilization protein	0,341
<i>adhE</i>	alcohol-acetaldehyde dehydrogenase	0,284
<i>aldA</i>	aldehyde dehydrogenase homologue	0,272
<i>arcA</i>	arginine deiminase	0,355
<i>betA</i>	choline dehydrogenase	0,428
<i>cysM</i>	cysteine synthase homologue	0,493
<i>dapA</i>	dihydrodipicolinate synthase	0,390
<i>dapB</i>	dihydrodipicolinate reductase	0,385
<i>dapD</i>	tetrahydrodipicolinate acetyltransferase	0,421
<i>dhoM</i>	homoserine dehydrogenase	0,482
<i>dltA</i>	D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase	3,994
<i>gudB</i>	NAD-specific glutamate dehydrogenase	0,323
<i>hisB</i>	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	0,424
<i>hisF</i>	cyclase-like protein hisF	0,267
<i>hisG</i>	ATP phosphoribosyltransferase	0,307
<i>hisH</i>	amidotransferase hisH	0,297
<i>hisI</i>	histidine biosynthesis bifunctional protein HisIE	0,236
<i>hutI</i>	imidazolonepropionase	0,272
<i>hutU</i>	urocanate hydratase	0,211
<i>ilvB</i>	acetolactate synthase large subunit	0,414
<i>ilvC</i>	alpha-keto-beta-hydroxylacil reductoisomerase	0,355
<i>ilvD</i>	dihydroxy-acid dehydratase	0,431
<i>katA</i>	Catalase	0,454
<i>metE</i>	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	0,499
<i>odhA</i>	2-oxoglutarate dehydrogenase E1	0,354
<i>pfs</i>	5'-methylthioadenosine nucleosidase/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	2,852
<i>rocA</i>	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	0,154
<i>rocD</i>	ornithine aminotransferase	0,257

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
<i>thrC</i>	threonine synthase	0,487
SA2413	sulfite reductase flavoprotein	0,475
Energie Stoffwechsel		
atpC	FoF1-ATP synthase epsilon subunit	2,284
atpD	ATP synthase beta chain	2,617
atpE	ATP synthase C chain	2,335
narG	respiratory nitrate reductase alpha chain	0,096
narH	nitrate reductase beta chain narH	0,291
narI	nitrate reductase gamma chain	0,225
narK	nitrite extrusion protein	0,251
nasD	nitrite reductase	0,382
nasE	assimilatory nitrite reductase	0,136
nasF	uroporphyrin-III C-methyl transferase	0,177
Genregulation		
lacR	lactose phosphotransferase system repressor	2,284
gapR	glycolytic operon regulator	2,201
gntR	gluconate operon transcriptional repressor	0,315
malR	maltose operon transcriptional repressor	0,409
rot	repressor of toxins Rot	0,496
sarH1	staphylococcal accessory regulator A homolog	0,470
sarH2	staphylococcal accessory regulator A homolog	0,347
sarH3	staphylococcal accessory regulator A homolog	0,328
Kohlenstoff Metabolismus		
acsA	acetyl-CoA synthetase	0,476
araB	probable L-ribulokinase	0,482
citB	aconitate hydratase	0,371
citG	fumarate hydratase, class-II	0,422
ddh	D-specific D-2-hydroxyacid dehydrogenase	0,37
fhs	formyltetrahydrofolate synthetase	0,474
fruA	fructose specific permease	0,339
fruB	fructose 1-phosphate kinase	0,362
gap	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2,73

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
gntB	gluconate permease	0,321
gntK	luconokinase	0,242
gtaB	UTP-glucose-1-phosphate uridyltransferase	0,455
lacA	galactose-6-phosphate isomerase LacA subunit	0,242
lacB	galactose-6-phosphate isomerase LacB subunit	0,267
lacC	tagatose-6-phosphate kinase	0,244
lacD	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	0,272
lacG	6-phospho-beta-galactosidase	0,309
malA	alpha-D-1,4-glucosidase	0,419
pckA	phosphoenolpyruvate carboxykinase	0,384
pflA	formate acetyltransferase activating enzyme	0,169
pflB	formate acetyltransferase	0,159
pgk	phosphoglycerate kinase	2,196
sdhB	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein subunit	0,448
SA0239	sorbitol dehydrogenase	0,476
SA2395	L-lactate dehydrogenase	0,305
Lipid Metbolismus		
accC	acetyl-CoA carboxylase accC	2,339
fabD	malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	2,346
fabG	3-oxoacyl- reductase	2,284
geh	glycerol ester hydrolase	0,495
lip	triacylglycerol lipase precursor	0,328
plsX	fatty acid/phospholipid synthesis protein	2,307
SA0223	acetyl-CoA acetyltransferase homologue	0,465
Nukleotid Metabolismus		
adk	adenylate kinase	2,921
ctrA	CTP synthase	2,352
lctE	L-lactate dehydrogenase	0,154
lctP	L-lactate permease homologue	0,537
leuA	2-isopropylmalate synthase	0,445
leuB	3-isopropylmalate dehydrogenase	0,313
ndk	nucleoside diphosphate kinase	2,982

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
nrdD	anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase	0,358
purC	Phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthetase homologue	0,433
purD	phosphoribosylamine--glycine ligase PurD	0,322
purF	phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase PurF	0,384
purH	bifunctional purine biosynthesis protein PurH	0,317
purL	phosphoribosylformylglycinamide synthetase PurL	0,241
purM	phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase PurM	0,215
purN	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	0,334
purQ	phosphoribosylformylglycinamide synthase I PurQ	0,331
pyrAA	carbamoyl-phosphate synthase small chain	0,326
pyrAB	carbamoyl-phosphate synthase large chain	0,291
pyrB	aspartate transcarbamoylase chain A	0,315
pyrC	dihydroorotase	0,263
pyrE	orotate phosphoribosyltransferase	0,317
pyrF	orotidine-5-phosphate decarboxylase	0,369
pyrP	uracil permease	0,485
ureA	urease gamma subunit	0,432
ureB	urease beta subunit	0,335
ureC	urease alpha subunit	0,327
ureF	urease accessory protein UreF	0,403
ureG	urease accessory protein UreG	0,458
Translation		
frr	ribosome recycling factor	2,109
fus	translational elongation factor G	2,777
infC	translation initiation factor IF-3 infC	2,353
rplA	50S ribosomal protein L1	2,601
rplB	50S ribosomal protein L2	2,824
rplC	50S ribosomal protein L3	3,073
rplD	50S ribosomal protein L4	2,926
rplE	50S ribosomal protein L5	3,376
rplF	50S ribosomal protein L6	2,775

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
rplJ	50S ribosomal protein L10	2,363
rplK	50S ribosomal protein L11	2,671
rplL	50S ribosomal protein L7/L12	3,786
rplM	50S ribosomal protein L13	2,774
rplN	50S ribosomal protein L14	2,368
rplO	50S ribosomal protein L15	3,751
rplP	50S ribosomal protein L16	2,744
rplQ	50S ribosomal protein L17	3,141
rplR	50S ribosomal protein L18	2,106
rplU	50S ribosomal protein L21	4,181
rplV	50S ribosomal protein L22	4,758
rplW	50S ribosomal protein L23	2,957
rplX	50S ribosomal protein L24	2,841
rpmA	50S ribosomal protei L27	2,646
rpmC	50S ribosomal protein L29	2,787
rpmD	50S ribosomal protein L30	3,452
rpsB	30S ribosomal protein S2	3,129
rpsC	30S ribosomal protein S3	4,417
rpsE	30S ribosomal protein S5	3,435
rpsG	30S ribosomal protein S7	2,033
rpsH	30S ribosomal protein S8	2,776
rpsJ	30S ribosomal protein S10	2,894
rpsK	30S ribosomal protein S11	3,185
rpsK	30S ribosomal protein S12	2,916
rpsM	30S ribosomal protein S13	2,471
rpsN	30S ribosomal protein S14	2,311
rpsQ	30S ribosomal protein S17	3,248
rpsR	30S ribosomal protein S18	3,959
rpsS	30S ribosomal protein S19	4,994
ssb	single-strand DNA-binding protein of phage phi PVL	2,022
SA1100	elongation factor EF-TS	2,157

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
Transport		
dltD	poly D-alanine transfer protein	2,470
glpT	glycerol-3-phosphate transporter	0,42
gltB	glutamate synthase large subunit	0,373
glvC	PTS system, arbutin-like IIBC component	0,345
lacE	PTS system, lactose-specific IIBC component	0,481
lacF	PTS system, lactose-specific IIA component	0,491
mnhC	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit	2,692
mtlF	PTS system, mannitol specific IIBC component	0,397
opp-1A	oligopeptide transporter putative substrate binding domain	0,462
opp-1C	oligopeptide transporter putative membrane permease domain	0,497
opp-1F	oligopeptide transporter putative ATPase domain	0,493
oppB	oligopeptide transport system permease protein	0,499
oppB(trunc.)	truncated hypothetical protein, similar to oligopeptide ABC transporter permease	0,455
oppD	oligopeptide transport system ATP-binding protein OppD homologue	0,464
opuD	glycine betaine transporter	2,056
ptsG	PTS system, glucose-specific IIABC component	0,437
putP	high affinity proline permease	2,471
secE	preprotein translocase subunit	3,093
secY	preprotein translocase SecY subunit	3,205
sirA	lipoprotein	0,385
uhpT	hexose phosphate transport protein	0,384
SA0198	oligopeptide transport system ATP-binding protein OppF homologue	0,266
SA0208	maltose/maltodextrin transport permease homologue	0,128
SA0209	maltose/maltodextrin transport permease homologue	0,119
SA0233	PTS enzyme (EC 2.7.1.69), maltose- and glucose-specific, factoe II homologue	0,363
SA0774	ABC transporter ATP-binding protein homologue	2,935
SA0776	aminotransferase NifS homologue	2,736
SA1224	ABC transporter (ATP-binding protein) homolog	2,555
SA2156	L-lactate permease lctP homolog	0,383
SA2442	preprotein translocase secA homolog	0,368

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
Zellwandsynthese		
capA	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5A	0,371
capB	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5B	0,249
capC	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C	0,357
capD	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5D	0,296
capE	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E	0,349
capF	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5F	0,317
capG	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5G	0,323
capM	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5M	0,421
capN	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5N	0,357
capO	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8O	0,375
capP	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap5P	0,335
clfB	Clumping factor B	0,445
ftsH	cell-division protein	2,341
pep2	PBP2	2,602
tagA	teichoic acid biosynthesis protein	0,463
SA2455	capsular polysaccharide biosynthesis, capC	0,369
SA2456	capsular polysaccharide biosynthesis, capB	0,322
SA2457	capsular polysaccharide biosynthesis, capA	0,289
„Andere“		
asp23	alkaline shock protein 23, ASP23	0,403
bioA	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononoate aminotransferase	0,376
bioB	biotin synthase	0,309
bioD	dethiobiotin synthetase	0,278
butA	acetoinreductase	0,376
dnaG	DNA primase	2,236
ebhA	hypothetical protein, similar to streptococcal adhesin emb	0,392
fnt	Fnt, autolysis and methicillin resistant-related protein	0,417
fntC	oxacillin resistance-related FntC protein	2,352
hlgB	gamma-hemolysin component B	0,449
hlgC	gamma-hemolysin component C	0,497
hmrA	similar to amidase (HmrA)	0,424

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
hsdR	probable type I restriction enzyme restriction chain	0,473
icaA	intercellular adhesion protein A	0,319
icaC	intercellular adhesion protein C	0,486
isaA	immunodominant antigen A	2,015
nanA	N-acetylneuraminate lyase subunit	0,209
recF	DNA repair and genetic recombination protein	2,531
recU	recombination protein U homolog	2,898
rpoA	DNA-directed RNA polymerase alpha chain	3,709
rpoB	RNA polymerase beta chain	2,113
rpoC	RNA polymerase beta-prime chain	2,424
saeS	histidine protein kinase	2,715
sdrD	Ser-Asp rich fibrinogen-binding, bone sialoprotein-binding protein	0,332
smbA	uridylylate kinase	2,543
spIC	serine protease SpIC	4,735
sspA	serine protease; V8 protease; glutamyl endopeptidase	0,474
SA0204	acyl carrier protein phosphodiesterase	0,330
SA0587	lipoprotein, Streptococcal adhesin PsaA homologue	0,269
SA0746	staphylococcal nuclease	0,479
SA1007	Alpha-Hemolysin precursor	0,416
SA1222	truncated transposase	0,455
SA1271	threonine deaminase IlvA homolog	3,225
SA1606	plant metabolite dehydrogenase homolog	0,474
SA1725	Staphopain, Cysteine Proteinase	0,316
Hypothetische Gene		
SA1835	hypothetical protein, similar to integrase	2,934
SA0003	conserved hypothetical protein	2,243
SA0042	conserved hypothetical protein	3,664
SA0054	hypothetical protein	3,411
SA0078	hypothetical protein	3,161
SA0090	hypothetical protein	0,445
SA0097	hypothetical protein	0,488
SA0098	hypothetical protein	0,466

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
SA0103	hypothetical protein	0,434
SA0104	hypothetical protein	0,479
SA0114	conserved hypothetical protein	0,346
SA0124	hypothetical protein	0,287
SA0125	hypothetical protein	0,499
SA0137	hypothetical protein, similar to transport system protein	0,477
SA0138	hypothetical protein, similar to alkylphosphonate ABC transporter	0,442
SA0139	hypothetical protein	0,437
SA0140	hypothetical protein, similar to lactococcal phosphatase homologue	0,437
SA0160	conserved hypothetical protein	0,248
SA0163	hypothetical protein, similar to cation-efflux system membrane protein CzcD	0,281
SA0165	hypothetical protein, similar to alpha-helical coiled-coil protein SrpF	0,373
SA0166	hypothetical protein, similar to nitrate transporter	0,409
SA0167	hypothetical protein, similar to membrane lipoprotein SrpL	0,486
SA0168	hypothetical protein, similar to probable permease of ABC transporter	0,442
SA0184	conserved hypothetical protein	0,148
SA0185	conserved hypothetical protein	0,126
SA0186	PTS system, sucrose-specific IIBC component, putative	0,154
SA0187	hypothetical protein, similar to transcription regulator	0,141
SA0191	conserved hypothetical protein	3,823
SA0202	hypothetical protein, similar to gamma-glutamyltranspeptidase precursor	0,391
SA0203	hypothetical protein	0,455
SA0205	hypothetical protein, similar to lysostaphin precursor	0,192
SA0207	hypothetical protein, similar to maltose/maltodextrin-binding protein	0,148
SA0211	hypothetical protein, similar to NADH-dependent dehydrogenase	0,179
SA0212	conserved hypothetical protein	0,197
SA0213	conserved hypothetical protein	0,284
SA0215	hypothetical protein, similar to two-component response regulator	0,264
SA0216	hypothetical protein, similar to two-component sensor histidine kinase	0,401

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
SA0217	hypothetical protein, similar to periplasmic-iron-binding protein BitC	0,426
SA0220	hypothetical protein, similar to glycerophosphodiester phosphodiesterase	0,439
SA0224	hypothetical protein, similar to 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	0,256
SA0225	hypothetical protein, similar to glutaryl-CoA dehydrogenase	0,254
SA0226	hypothetical protein, similar to acid-CoA ligase	0,375
SA0231	hypothetical protein, similar to flavohemoprotein	0,322
SA0234	hypothetical protein, similar to inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase	0,268
SA0235	hypothetical protein, similar to BglG antiterminator family	0,341
SA0236	hypothetical protein, similar to PTS fructose-specific enzyme IIBC component	0,284
SA0254	hypothetical protein, similar to transcription regulator GntR family	0,407
SA0264	hypothetical protein, similar to penicillin amidase V	0,419
SA0270	hypothetical protein, similar to secretory antigen precursor ssaA	0,397
SA0295	hypothetical protein, similar to outer membrane protein precursor	0,342
SA0297	hypothetical protein, similar to ABC transporter ATP-binding protein	0,345
SA0299	hypothetical protein, similar to carbohydrate kinase, PfkB family	0,393
SA0301	conserved hypothetical protein	0,487
SA0303	hypothetical protein, similar to sodium-coupled permease	0,215
SA0305	hypothetical protein, similar to glucokinase	0,312
SA0306	conserved hypothetical protein	0,326
SA0307	conserved hypothetical protein	0,446
SA0313	hypothetical protein, similar to glycine cleavage system H protein	0,448
SA0314	conserved hypothetical protein	0,382
SA0315	hypothetical protein	0,343
SA0316	hypothetical protein, similar to lipoate-protein ligase	0,239
SA0318	hypothetical protein, similar to transport protein SgaT	0,297
SA0322	hypothetical protein, similar to transcription regulator	0,169
SA0323	conserved hypothetical protein	0,228
SA0326	conserved hypothetical protein	0,334
SA0327	conserved hypothetical protein	0,449
SA0331	conserved hypothetical protein	0,378

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
SA0336	hypothetical protein	1,907
SA0346	hypothetical protein, similar to cystathionine beta-lyase	0,441
SA0347	hypothetical protein, similar to cystathionine gamma synthetase	0,486
SA0359	conserved hypothetical protein	0,479
SA0395	hypothetical protein	0,386
SA0400	hypothetical protein	3,128
SA0412	conserved hypothetical protein	0,365
SA0417	hypothetical protein, similar to sodium-dependent transporter	0,325
SA0420	hypothetical protein, similar to ABC transporter ATP-binding protein	0,396
SA0421	hypothetical protein, similar to ABC transporter permease protein	0,393
SA0422	hypothetical protein, similar to lactococcal lipoprotein	0,377
SA0423	hypothetical protein, similar to autolysin (N-acetylmuramoyl-L-alanin amidase)	0,379
SA0499	conserved hypothetical protein	2,593
SA0502	hypothetical protein, similar to ribosomal protein	6,672
SA0511	hypothetical protein, similar to UDP-glucose 4-epimerase related protein	0,358
SA0583	hypothetical protein, similar to Na ⁺ /H ⁺ antiporter	0,412
SA0584	conserved hypothetical protein	0,382
SA0585	conserved hypothetical protein	0,247
SA0588	conserved hypothetical protein	0,256
SA0589	hypothetical protein, similar to ABC transporter ATP-binding protein	0,281
SA0590	hypothetical protein, similar to iron dependent repressor	0,312
	hypothetical protein	0,397
SA0606	conserved hypothetical protein	0,451
SA0648	conserved hypothetical protein	4,216
SA0652	hypothetical protein, similar to transcription regulation protein	0,442
SA0653	hypothetical protein, similar to transcription repressor of fructose operon	0,369
SA0663	hypothetical protein	1,892
SA0674	hypothetical protein, similar to anion-binding protein	2,025
SA0721	conserved hypothetical protein	0,492
SA0738	hypothetical protein	5,771

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
SA0752	hypothetical protein	0,365
SA0753	conserved hypothetical protein	0,468
SA0775	conserved hypothetical protein	1,918
SA0777	hypothetical protein, similar to nitrogen fixation protein NifU	2,004
SA0817	hypothetical protein, similar to NADH-dependent flavin oxidoreductase	0,353
SA0830	conserved hypothetical protein	1,940
SA0849	hypothetical protein, similar to peptide binding protein OppA	0,417
SA0850	hypothetical protein, similar to oligopeptide ABC transporter oligopeptid binding protein	0,414
SA0886	hypothetical protein, similar to lactococcin 972 immunity factor	0,449
SA0949	conserved hypothetical protein	1,654
SA0975	conserved hypothetical protein	7,188
SA0976	conserved hypothetical protein	1,783
Sa1004	hypothetical protein, similar to fibrinogen-binding protein	0,269
SA1071	conserved hypothetical protein	2,311
SA1108	conserved hypotehtical protein	1,923
SA1217	hypothetical protein, similar to negative regulator PhoU	0,407
SA1219	hypothetical protein, similar to phosphate ABC transporter	0,441
SA1220	hypothetical protein, similar to phosphate ABC transporter	0,387
SA1270	hypothetical protein, similar to amino acid pearmease	0,251
SA1356	conserved hypothetical protein	3,296
SA1420	conserved hypothetical protein	2,212
SA1426	conserved hypothetical protein	2,142
SA1472	conserved hypothetical protein	5,138
SA1552	hypothetical protein	0,437
SA1577	hypothetical protein, similar to FmtB protein	0,475
SA1590	hypothetical protein	0,347
SA1610	hypothetical protein	0,399
SA1726	hypothetical protein	0,291

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
SA1764	hypothetical protein	6,198
SA1767	hypothetical protein	0,34
SA1768	hypothetical protein	0,229
SA1769	hypothetical protein	0,431
SA1774	hypothetical protein	0,488
SA1775	hypothetical protein, similar to scaffolding protein [Bacteriophage phiN315]	0,293
SA1776	hypothetical protein	0,486
SA1777	hypothetical protein	0,304
SA1782	hypothetical protein	0,219
SA1786	hypothetical protein	0,426
SA1787	hypothetical protein	4,253
SA1797	hypothetical protein	0,384
SA1798	hypothetical protein	2,577
SA1809	hypothetical protein	2,146
SA1825	hypothetical protein	3,636
SA1828	hypothetical protein	2,138
SA1833	hypothetical protein, similar to transcription regulator	8,155
SA1849	conserved hypothetical protein	0,434
SA1850	conserved hypothetical protein	0,474
SA1860	hypothetical protein, similar to acetolactate synthase smal unit	0,349
SA1912	hypothetical protein	2,149
SA1934	hypothetical protein	0,476
SA1983	hypothetical protein	0,421
SA1988	hypothetical protein, similar to alginate lyase	0,374
SA1990	conserved hypothetical protein	0,405
SA1999	hypothetical protein, similar to regulatory protein, SIR2 family	0,458
SA2002	hypothetical protein, similar to transcription regulator MerR family	0,432
SA2007	hypothetical protein, similar to alpha-acetolactate decarboxylase	0,497
SA2049	hypothetical protein	3,507
SA2050	conserved hypothetical protein	2,383
SA2081	hypothetical protein, similar to urea transporter	0,412

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
SA2091	hypothetical protein	0,455
SA2092	hypothetical protein, similar to transcription regulator	0,401
SA2111	hypothetical protein, similar to 6-carboxyhexanoate-- CoA ligase	0,322
SA2112	hypothetical protein, similar to 8-amino-7- oxononanoate synthase	0,297
SA2117	hypothetical protein, similar to Na ⁺ /H ⁺ antiporter, putative	0,487
SA2119	hypothetical protein, similar to dehydrogenase	0,355
SA2125	hypothetical protein, similar to formiminoglutamase	0,401
SA2125	hypothetical protein, similar to transcriptional regulator	0,485
SA2131	conserved hypothetical protein	0,442
SA2143	conserved hypothetical protein	3,372
SA2161	hypothetical protein, similar to attachment to host cells and virulence	0,536
SA2174	hypothetical protein, similar to transcriptional regulator	0,498
SA2175	hypothetical protein, similar to small heat shock protein	0,464
SA2178	hypothetical protein, similar to transcriptional regulator	0,321
SA2179	hypothetical protein, similar to response regulators of two-component reolarory system	0,188
SA2180	hypothetical protein, similar to two component sensor histidine kinase	0,206
SA2183	hypothetical protein, similar to nitrate reductase delta chain	0,156
SA2189	hypothetical protein, similar to NirR	0,216
SA2190	conserved hypothetcial protein	0,336
SA2193	conserved hypothetical protein	0,478
SA2216	hypothetical protein, similar to ABC transporter, ATP- binding protein	0,472
SA2217	hypothetical protein, similar to lipoprotein innermembrane ABC-transporter	0,442
SA2230	hypothetical protein, similar to beta-lactamase	0,441
SA2232	hypothetical protein, similar to 2-dehydropantoate 2- reductase	0,415
SA2238	conserved hypothetical protein	0,478
SA2242	conserved hypotehtical protein	0,411
SA2244	hypothetical protein, similar to endo-1,4-beta- glucanase	0,467
SA2248	hypothetical protein, similar to glutamate synthase	0,429

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
SA2256	conserved hypothetical protein	0,385
SA2260	hypothetical protein, similar to glucose 1-dehydrogenase	0,305
SA2262	conserved hypothetical protein	0,328
SA2266	hypothetical protein, similar to oxidoreductase	0,479
SA2268	hypothetical protein	0,453
SA2279	hypothetical protein, similar to phosphomannomutase	0,453
SA2281	hypothetical protein	0,441
SA2282	hypothetical protein	0,344
SA2283	conserved hypothetical protein	0,337
SA2300	hypothetical protein, similar to glucarate transporter	0,369
SA2301	hypothetical protein, similar to alkaline phosphatase	0,319
SA2302	hypothetical protein, similar to ABC transporter	0,378
SA2303	hypothetical protein, similar to membrane spanning protein	0,370
SA2313	conserved hypothetical protein	0,429
SA2339	hypothetical protein, similar to antibiotic transport-associated protein	0,303
SA2342	hypothetical protein, similar to O-acetyltransferase	0,366
SA2362	conserved hypothetical protein	0,426
SA2365	hypothetical protein, similar to short chain oxidoreductase	0,413
SA2368	hypothetical protein, similar to cobalamin synthesis related protein CobW	0,405
SA2373	hypothetical protein	0,436
SA2378	conserved hypothetical protein	0,392
SA2381	hypothetical protein	0,389
SA2396	hypothetical protein, similar to amino acid transporter	0,428
SA2397	hypothetical protein, similar to pyridoxal-phosphate dependent amylotransferase	0,455
SA2407	conserved hypothetical protein	0,477
SA2439	conserved hypothetical protein	0,422
SA2440	hypothetical protein	0,428
SA2441	hypothetical protein, similar to lipopolysaccharide biosynthesis protein	0,380
SA2444	hypothetical protein	0,447
SA2447	hypothetical protein, similar to streptococcal hemagglutinin protein	0,165
SA2448	conserved hypothetical protein	0,381

Fortsetzung auf nächster Seite

Tab.7.3: Fortsetzung

Gen Name	Funktion	Ratio
SA2466	hypothetical protein, similar to phosphoribosyl-formimino-5-aminoimidazole carboxamide ritodide isomerase	0,374
SA2470	hypothetical protein, similar to histidinol dehydrogenase	0,365
SA2472	hypothetical protein, similar to ATP phosphoribosyl-transferase regulatory subunit	0,381
SA2473	hypothetical protein	0,486
SA2474	conserved hypothetical protein	0,459
SA2477	conserved hypotehtical protein	0,496
SA2496	hypothetical protein	0,404
SA320	hypothetical protein, similar to PTS fructose-specific enzyme IIBC component	0,104
SAS001	Conserved hypothetical protein	0,447
SAS008	hypothetical protein	0,454

8. Lebenslauf

Hans-Marcus Kränzler

Geb. am 12.06.1975 in Heilbronn

Schulausbildung

1982 – 1987 Gerhard-Hauptmann Grundschule, Heilbronn

1987 – 1991 Mönchsee Gymnasium, Heilbronn

1991 –1996 Schloss-Schule Kirchberg; Abschluss: Abitur

Studium

1997 – 2003 Studium der Biologie an der Universität Würzburg, Schwerpunkte:
Mikrobiologie (Hauptfach), Genetik und Biochemie
Oktober 2003: Diplom, Gesamtnote: sehr gut

Thema der Diplomarbeit: Genexpressionsanalysen in *S. aureus* mit
Hilfe der Mikroarray-Technologie

seit 11/03 Promotionsstudium am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der
Universität Würzburg, unter Anleitung von Frau Dr. W. Ziebuhr

Assoziiertes Mitglied des internationalen Graduierten Kollegs
„Generegulation in and by microbial pathogens“

Würzburg, April 2006

9. Publikationsliste

Publikationen in referierten Zeitschriften:

Influence of subinhibitory concentrations of the streptogramin antibiotic quinupristin/dalfopristin (Synercid®) on global gene expression in a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* isolate. 2006. Kraenzler, H. M., Schiller, M., Schirmeister, T., and W. Ziebuhr. *Antimicrob. Agents Chemother.* (eingereicht).

Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: How a commensal bacterium turns into a pathogen. 2006. Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kraenzler, H. M., Batzilla, Ch., and S. Kozitskaya. *Intern. J. Antimicrob. Agents.* (im Druck).

Tagungsbeiträge:

Regulation of gene expression in *Staphylococcus aureus* by antibiotics and global regulators. H. Kränzler, W. Ziebuhr, A. Michel, K. Streker, J. Hacker, K. Ohlsen, 12th International Conference on Bacilli: Functional Genomics of Gram-positive Microorganisms. 22 – 27 June 2003 Baveno, Italy. Poster.

Investigation of *Staphylococcus aureus* gene expression in response to subinhibitory Synercid® concentrations using a full-genome DNA microarray. H. Kränzler, J. Hacker, W. Ziebuhr. 55th DGHM annual meeting 28 September - 1 October 2003 Dresden, Germany. Vortrag.

Investigation of gene expression of Staphylococci under the influence of subinhibitory concentrations of antibiotics. H. Kränzler, J. Hacker, W. Ziebuhr. International Symposium – Threat of Infection: Microbes of High Pathogenic Potential – Strategies for Detection, Control and Eradication. 25 – 28 July 2004 Würzburg, Germany. Poster.

Influence of subinhibitory concentrations of Synercid® on the gene expression of *Staphylococcus epidermidis*. H. Kränzler and W. Ziebuhr. Joint Meeting of FEMS and the Israeli Center for the Study of Emerging Diseases: Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis. 23 – 27 January 2005 Ein Gedi, Israel. Poster