

BAYERISCHE JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG



Fakultät für Biologie

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

**Analyse einer chromosomalen Deletion
und Entdeckung einer neuartigen
nicht-translatierten RNA
in *Staphylococcus epidermidis***

vorgelegt von

MARTIN ECKART
aus Neuendettelsau

Würzburg, 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: PROF. DR. MARTIN MÜLLER

1. Gutachter: PROF. DR. DR. H. C. MULT. JÖRG HACKER

2. Gutachter: PROF. DR. ROY GROSS

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

gem. § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg von Oktober 2002 bis September 2006 angefertigt. Hiermit versichere ich, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Außer dem Titel *Diplom-Biologe (Univ.)*, habe ich bisher keine anderen akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 4. Oktober 2006

Martin Eckart

Danksagung

Um klar zu sehen, genügt oft ein
Wechsel der Blickrichtung

(Antoine de Saint Exupéry)

Die Experimente, welche dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden im Zeitraum von Oktober 2002 bis September 2006 durchgeführt. Ein besonderer Dank gilt PD DR. WILMA ZIEBUHR, die mir als Betreuerin der Dissertation ein interessantes Thema überließ. Durch ihre stete Bereitschaft, auch neue und alternative Fragestellungen zu diskutieren, hat sie den Verlauf meiner Arbeit stetig unterstützt.

Ich danke Herrn PROF. DR. DR. H. C. MULT. JÖRG HACKER für die Übernahme des Erstgutachtens, sowie für die Bereitstellung von Materialien und des Arbeitsplatzes am Institut für Molekulare Infektionsbiologie. Vielen Dank auch an Herrn PROF. DR. ROY GROSS vom Lehrstuhl für Mikrobiologie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Wie wäre erfolgreiches Arbeiten ohne eine gute Laboratmosphäre denkbar. Ein herzliches Dankeschön deshalb an meine drei Mitstreiter im Labor Susanne Hennig, Hennes Kränzler, Katja Dietrich und den Rest der „Staphs“, die mir immer mit Rat und Tat beistanden, wenn es vonnöten war. Danke an Matthias Scheuermayer, der mit mir viele Schachpartien ausfocht und so manchen Kilometer lief. Dank Claudia, Stefan, Barbara, Mella, Sabine und Lars hatten wir nicht nur im Labor, sondern auch danach oft noch viel Spaß. Gedankt sei auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Infektionsbiologie und Zentrums für Infektionsforschung, die hier nicht einzeln aufgeführt sind, für die stete Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Zusammenarbeit.

An letzter Stelle der Autorenliste wissenschaftlicher Artikel stehen in der Regel die wichtigen Personen, ohne welche die Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Nicht zuletzt bedanke ich mich deshalb bei meiner Familie und meiner Frau Steffi, ohne deren Rückhalt und Unterstützung während des Studiums und der Promotion vieles nicht so leicht gefallen wäre.

Vielen Dank an alle, die mir des Öfteren einen Wechsel der Blickrichtung ermöglichten.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einführung	5
1.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> als Erreger nosokomialer Infektionen	5
1.2. Mobile genetische Elemente	8
1.2.1. Insertionselemente und Transposons	9
1.2.2. Genomische Inseln	10
1.2.3. Bakteriophagen	13
1.3. Kleine regulatorische RNAs in Bakterien	13
1.4. Ziele der Arbeit	17
2. Material	19
2.1. Verwendete Bakterienstämme	19
2.2. Medien zur Bakterienkultur	20
2.3. Zusätze für Medien und Agarplatten	20
2.4. Puffer und Lösungen	21
2.5. Plasmide und Oligonukleotide	24
2.5.1. Plasmide	24
2.5.2. Oligonukleotide	25
2.6. Geräte	30
2.7. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	31
2.8. Größenstandards	31
3. Methoden	33
3.1. Arbeiten mit DNA	33
3.1.1. Plasmid-Isolierung im kleinen Maßstab aus <i>E. coli</i>	33
3.1.2. Plasmid-Isolierung im mittleren Maßstab aus <i>E. coli</i>	33
3.1.3. Plasmid-Isolierung aus <i>Staphylococcus spp.</i>	34
3.1.4. Isolierung chromosomaler DNA aus Staphylokokken	34
3.1.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	34
3.1.6. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
3.1.7. Transformation von <i>E. coli</i>	35
3.1.8. Transformation von Staphylokokken	35
3.1.9. Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten	35
3.1.10. Ligation von DNA-Fragmenten	36
3.1.11. Phenolextraktion	36
3.1.12. Ethanol-fällung	36
3.1.13. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37

3.1.14. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
3.1.15. Aufreinigung von PCR-Produkten	39
3.1.16. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
3.1.17. Sequenzierung	39
3.1.18. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	40
3.1.19. Southern Blot-Analyse	42
3.1.20. Dot-Blot	43
3.1.21. Elution markierter Sonden von Nylonmembranen	43
3.2. Arbeiten mit RNA	43
3.2.1. Isolierung der Gesamt-RNA aus Staphylokokken	43
3.2.2. Northern Blot-Analyse	44
3.2.3. <i>In-vitro</i> -Transkription mit T7-RNA-Polymerase	45
3.2.4. PCR mit cDNA (RT-PCR)	45
3.2.5. Bestimmung der Enden von RNA-Transkripten	46
3.2.6. Elektrophoretischer Mobilitäts- <i>Shift</i> -Assay (EMSA)	47
3.3. Arbeiten mit Protein	47
3.3.1. Isolierung His-markierter Proteine aus <i>E. coli</i>	47
3.3.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.3.3. Western Blot-Analyse	49
3.3.4. Bestimmung der Proteinkonzentration	49
3.4. Phänotypische Tests	50
3.5. Genomvergleich durch Microarrayanalyse	50
3.5.1. Indirekte Markierung chromosomaler DNA	50
3.5.2. Hybridisierung und Auswertung des Microarrays	51
3.6. Rechner-gestützte Analyse-Methoden	51
4. Ergebnisse	53
4.1. Sequenzierung und Beschreibung der Deletion von <i>S. epidermidis</i> 307/9	53
4.1.1. Sequenzierung des Deletionsbereiches	53
4.1.2. Annotation der deletierten Region und Bioinformatik	57
4.1.3. Deletierte Metabolismus-Operons	59
4.1.4. Pathogenitäts-assoziierte Gene im Deletionsbereich	61
4.1.5. Neues SCC-Element	62
4.1.6. <i>in-silico</i> -Vergleich der Stämme RP62A, ATCC 12228 und des Deletionsbereiches	63
4.2. Microarray-basierter Genomvergleich	70
4.3. Identifizierung eines RNA-Transkripts stromaufwärts des <i>ica</i> -Operons	75
4.3.1. Analyse der IGR _{<i>ica</i>} -Region durch Southern-Hybridisierung	75
4.3.2. Northern Analyse der Gesamt-RNA von <i>S. epidermidis</i>	76
4.3.3. Bioinformatische Analyse der intergenischen Region IGR _{<i>ica</i>}	77
4.3.4. Bestimmung der Transkript-Orientierung	77
4.3.5. Ermittlung der Transkriptlänge	78
4.3.6. Sekundärstruktur der IGR _{<i>ica</i>} -RNA	79
4.3.7. RT-PCR-Analyse	81
4.3.8. Untersuchungen zu Hfq	82
4.3.9. <i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i>	85
4.3.10. Nachweis von IS ₂₅₆ -Insertionen in der IGR _{<i>ica</i>}	86

4.3.11. Untersuchungen zu weiteren IS256-Insertionen in Biofilm-negativen Phasenvarianten	87
4.3.12. Konstruktion einer IGRica-Mutante	90
5. Diskussion	95
5.1. Analyse der Deletion in <i>S. epidermidis</i> 307	96
5.1.1. Homologe Rekombination von IS256 in <i>S. epidermidis</i> 307 führt zu großen Deletionen im Genom	96
5.1.2. <i>S. epidermidis</i> 307 besitzt einen neuen Typ von SCC-Insel	97
5.1.3. Horizontaler Gentransfer zwischen Staphylokokken-Spezies	99
5.2. Unterscheidung saprophytischer und pathogener <i>S. epidermidis</i>	101
5.2.1. Genomische Variabilität im Vergleich von pathogenen und saprophytischen Stämmen von <i>S. epidermidis</i>	101
5.2.2. Genom-Inversion durch homologe Rekombination von IS <i>Sep1</i>	101
5.2.3. Genomvergleich durch Microarray-Analyse	103
5.3. Die IGRica-RNA trägt möglicherweise zur Regulation der Biofilmbildung bei	105
5.3.1. Kleine regulatorische RNAs	105
5.3.2. Wechselwirkungen regulatorischer RNAs	106
5.3.3. Einfluss von IS256 auf die Expression der IGRica-RNA	109
5.4. Suche nach neuen regulatorischen RNAs	110
5.5. Ausblick	111
A. Annotation des Deletionsbereiches von <i>S. epidermidis</i> 307/9	113
B. Vergleichende Genomanalyse	117
C. formatblast.pl	131
D. Vektorkarten	133
E. Abkürzungen	135
F. Publikationen und Tagungsbeiträge	137
G. Lebenslauf	139

Tabellenverzeichnis

1.1. Unterklassen von Pathogenitätsinseln	11
1.2. Typen von SCC-Elementen	12
4.1. Auswertung des Microarray-Genomvergleichs	72
4.2. Promotorstrukturen und Transkriptionsterminatoren in der <i>IGRica</i>	77
4.3. IS256-Insertionen in Phasenvarianten von <i>S. epidermidis</i> 307	89

Abbildungsverzeichnis

1.1. Biofilm im Katheter	6
1.2. <i>icaADBC</i> -Operon	7
1.3. IS256 und Komposit-Transposon Tn4001	11
1.4. Wirkmechanismen kleiner regulatorischer RNAs	14
1.5. Hfq-Protein mit gebundener RNA	15
2.1. Größenstandards für die Elektrophorese	31
4.1. Insert des Cosmids Nr. 10	54
4.2. SCC _{mec} -Insel vom Typ III	55
4.3. Rechter Rand des Deletionsbereiches	56
4.4. Kontroll-PCRs für Gene des Deletionsbereiches in 307 WT und 307/9	56
4.5. PCR-Fragmente zur Verbindung der sequenzierten Deletionsbereiche	57
4.6. Vergleich des Deletionsbereiches mit RP62A und ATCC 12228	64
4.7. Region um <i>bhp</i> und <i>aap</i> im Vergleich	65
4.8. Serin-reiches Protein	66
4.9. <i>icaADBC</i> -Operon mit Umgebung	67
4.10. Microarray-Genomvergleich	71
4.11. Vorhandene oder fehlende Gene im Deletionsbereich	72
4.12. Southern-Analyse der IGR _{ica}	76
4.13. Northern-Analyse der IGR _{ica}	76
4.14. IGR _{ica} mit Promotoren und Transkriptionsterminatoren	78
4.15. Orientierung der IGR _{ica} -RNA	78
4.16. <i>primer-extension</i> -Analyse der IGR _{ica} -RNA	80
4.17. Promotor-Vergleich	80
4.18. Sekundärstrukturvorhersage der IGR _{ica} -RNA	81
4.19. RT-PCR-Analyse der IGR _{ica} -RNA	82
4.20. RT-PCR-Analyse der IGR _{ica} -RNA während der Wachstumsphasen	82
4.21. Sequenzvergleich von Hfq	83
4.22. RT-PCR-Analyse der <i>hfq</i> -RNA	83
4.23. Klonierung von Hfq in pQE30	84
4.24. Aufreinigung des Hfq-Proteins	85
4.25. EMSA der IGR _{ica} -RNA	86
4.26. Adhärenztest mit Phasenvarianten von <i>S. epidermidis</i> 307	87
4.27. Nachweis von IS256-Insertionen in der IGR _{ica}	87
4.28. Insertionen von IS256 in der IGR _{ica}	88
4.29. Konstruktion der IGR _{ica} -Mutante	92
5.1. Genom-Inversion	103

Zusammenfassung

Staphylococcus epidermidis ist ein wichtiger Bestandteil der gesunden Hautflora des Menschen, gleichzeitig aber auch der häufigste Erreger nosokomialer Infektionen bei immunsupprimierten Patienten. Die Forschungsarbeiten haben sich in den vergangenen Jahren besonders auf Faktoren und Mechanismen konzentriert, welche zur Etablierung der Spezies als Pathogen beigetragen haben. Eine typische Eigenschaft klinischer Isolate ist die Fähigkeit, auf künstlichen Oberflächen Biofilme zu bilden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der IS-vermittelten Genomflexibilität und der Vergleich der Genomstruktur nosokomialer und kommensaler Isolate von *S. epidermidis*. Dazu wurde eine 260 kb große spontane Deletion im Chromosom des Biofilm-bildenden Stammes *S. epidermidis* 307 sequenziert und annotiert, von der bekannt war, dass sie durch eine homologe Rekombination zweier IS256-Kopien ausgelöst wurde. Auf dem deletierten Fragment fanden sich neben dem *ica*-Operon zahlreiche potentielle Virulenz-assoziierte Gene. Das überraschende Ergebnis dieser Analyse war jedoch die Identifizierung eines neuartigen SCC-Elementes, das den rechten Rand der Deletion begrenzt. Dies ist die erste Beschreibung eines SSC-Elementes mit einer CcrC-Rekombinase, dem das Methicillin-Resistenzgen *mecA* fehlt. In der Nähe des Rekombinasegens fand sich *S. haemolyticus*-spezifische DNA. Weitere Untersuchungen zeigten, dass das SCC-Element durch die IS256/Tn4001-vermittelte Deletion in der Mutante verkürzt wurde. Genomvergleiche *ica*-positiver und *ica*-negativer Stämme von *S. epidermidis* mittels Microarrays, sowie *in-silico*-Analysen zweier vollständiger *S.-epidermidis*-Genome ergaben, dass sich kommensale und pathogene Stämme in nur wenigen Faktoren unterscheiden. Diese befinden sich jedoch fast alle in einer Region um den *oriC*, in dessen Nähe auch die Insertionsstelle für die SCC*mec*-Inseln lokalisiert ist. Das deletierte DNA-Fragment von *S. epidermidis* 307 konnte ebenfalls dieser Region zugeordnet werden, die offenbar eine Zone hoher genomischer Flexibilität darstellt, in der fremde DNA integriert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass das *ica*-Operon diesen variablen Genomabschnitt begrenzt. Die exakte Grenze zwischen *ica*-positiven und *ica*-negativen Stämmen bildet eine Thr-tRNA, die in einer 1,4 kb großen intergenischen Region stromabwärts des *icaR*-Regulatorgens lokalisiert ist. In unmittelbarer Nachbarschaft konnte ein Transkript nachgewiesen werden, welches nur in *ica*-positiven *S. epidermidis* vorkommt. Gestützt auf bioinformatische Analysen wurden zunächst die Polarität und Länge des Transkriptes, sowie der korrespondierende Promotor experimentell bestimmt. Demnach

handelt es sich um eine 487 nt lange RNA, die entgegengesetzt zur Thr-tRNA orientiert ist und mit dieser teilweise überlappt. Da die Nukelotid-Sequenz weder eine Ribosomen-Bindungsstelle noch einen größeren Leserahmen aufweist, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um eine nicht-translatierte RNA handelt. Qualitative RT-PCR-Experimente zeigten, dass die IGR*ica*-RNA konstitutiv exprimiert wird. Spontane IS256-Insertionsmutanten in der Promotorregion der IGR*ica*-RNA wiesen phänotypisch eine deutlich verminderte Biofilmbildung auf. Daher ist zu vermuten, dass die IGR*ica*-RNA in die Regulation dieses wichtigen Virulenzfaktors involviert ist. In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass *S. epidermidis* das in vielen Spezies konservierte Hfq-Protein exprimiert, welches ein Bindungspartner und Chaperon für zahlreiche regulatorische RNAs darstellt. gel-shift-Experimente mit rekombinantem Hfq-Protein aus *S. epidermidis* ergaben jedoch keine nachweisbare Wechselwirkung der IGR*ica*-RNA mit diesem Faktor *in vitro*.

Insgesamt hat die Studie gezeigt, dass *S. epidermidis* eine Spezies mit einer außerordentlich hohen Genomflexibilität ist, die sich hauptsächlich in einer bestimmten Genomregion abspielt und für die IS-Elemente von besonderer Bedeutung sind. Die Identifizierung von DNA aus anderen Staphylokokken-Arten in dieser Region zeigt, dass *S. epidermidis* zu horizontalem Gentransfer über Speziesgrenzen hinweg in der Lage ist. Dies, sowie die Daten zur neuen SCC-Kassette, unterstreichen die Bedeutung von *S. epidermidis* als Reservoir für die Entwicklung neuartiger Resistenz- und Virulenzdeterminanten, die gerade im Krankenhausmilieu auf Spezies mit höherem Virulenzpotential übertragen werden können und so einen wichtigen Faktor für die anhaltende Problematik nosokomialer Infektionen mit *S. aureus* darstellen. Die Entdeckung einer RNA mit möglicherweise regulatorischer Funktion ist der erste Faktor dieser Art, der – abgesehen von einigen phylogenetisch hochkonservierten RNAs – bisher in *S. epidermidis* nachgewiesen wurde. Die funktionale Analyse der IGR*ica*-RNA und die Suche nach weiteren regulatorischen RNAs in Staphylokokken eröffnen ein weites Forschungsfeld, das erheblich zum besseren Verständnis der Lebensweise dieser bedeutenden Krankheitserreger beitragen kann.

Summary

Staphylococcus epidermidis is an important part of the human skin flora, but also the most frequent cause of nosocomial infections in immune-suppressed patients. Research in the last years focused on the factors and mechanisms leading to the establishment of the species as a pathogen. A typical feature of clinical isolates of *S. epidermidis* is the ability to form biofilms on artificial surfaces.

Topic of this work was the IS-mediated genome flexibility and the comparison of genome structure from nosocomial and commensal *S. epidermidis* isolates. A 260 kb large spontaneous deletion in the chromosome of the biofilm-forming strain *S. epidermidis* 307 was sequenced and annotated. The deletion was caused by homologous recombination of two IS256 copies. It contained many putative virulence-associated genes besides the *ica* operon. However, the surprising result of this analysis was the identification of a new SCC element that limits the right border of the deletion. This is the first report of a SCC element containing a CcrC recombinase but lacking the *mecA* gene. DNA of *S. haemolyticus* is located near the recombinase gene *ccrC*. Further studies showed that the SCC element is truncated due to IS256/Tn4001 mediated deletion in the mutant. Genome comparison of *ica*-positive and *ica*-negative *S. epidermidis* strains using microarrays revealed that commensal and pathogenic strains differ only in very few factors. This was confirmed by *in silico* comparison of two complete genomes of *S. epidermidis*. Most of the virulence factors are harbored within a region around the *oriC*. The insertion sites of the SCC_{mec} islands and the deleted fragment of *S. epidermidis* are also located in this part of the genome, that obviously represents a region of high genomic flexibility and in which foreign DNA can be integrated.

Furthermore, this work showed that the *ica* operon delimits this variable segment of the genome. The exact border between *ica*-positive and *ica*-negative strains represents a Thr-tRNA within the 1.4 kb intergenic region downstream of the *icaR* regulatory gene. In the direct vicinity a transcript could be detected that is only present in *ica*-positive *S. epidermidis*. Based on bioinformatical analysis the polarity, length, and the corresponding promoter were experimentally determined. The RNA ranges 487 nt in length and overlaps partly with the Thr-tRNA on the opposite strand. Neither a ribosomal binding site nor an appropriate open reading frame can be found; so, it is likely that the RNA is not translated. Qualitative RT-PCR experiments showed constitutive expression of the IGR_{ica}-RNA. Spontaneous IS256 insertion mutants within the promoter region of the IGR_{ica}-RNA

Summary

exhibited a clearly diminished biofilm formation. Therefore, it is tempting to speculate that the IGRica-RNA is involved in the regulation of this important virulence factor. The experiments show that *S. epidermidis* also expresses the highly conserved Hfq protein that functions as a binding partner and a chaperon for many regulatory RNAs. However, gel shift experiments with recombinant Hfq from *S. epidermidis* revealed no detectable interaction of the IGRica-RNA with this factor *in vitro*.

In summary, the study shows that *S. epidermidis* is a species with extraordinary high genome flexibility in a certain region of the genome where IS elements have a special influence. Identification of DNA from other staphylococcal species demonstrates that *S. epidermidis* is capable of horizontal gene transfer beyond the species barrier. This and the newly discovered SCC element emphasize the importance of *S. epidermidis* as a reservoir for the development of new resistance and virulence determinants. These factors can be transferred easily within the hospital environment to species with a higher virulence potential. This represents an important factor for the long-standing problem of nosocomial infections with *S. aureus*. The discovered RNA with a putative regulatory function is the first factor of this kind that has been identified in *S. epidermidis* so far, besides some phylogenetically conserved RNAs. Functional analysis of the IGRica-RNA and investigation for other regulatory RNAs in staphylococci open a wide field of research that can contribute considerably to the understanding of these important pathogens.

1. Einführung

1.1. *Staphylococcus epidermidis* als Erreger nosokomialer Infektionen

Staphylokokken wurden bereits vor über 120 Jahren von [Ogston \(1883\)](#) als eine Gruppe von Entzündungs- und Eitererregern beschrieben. Ihr Name leitet sich von der Erscheinungsform (*σταφυλε* [Traube] und *κοκκος* [Kern]) ab. In der ursprünglich von *S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. saprophyticus* vertretenen Gattung sind heute 36 verschiedene Arten bekannt ([Götz et al. 2004](#)). Sie lassen sich nach ihrer Fähigkeit, Blutplasma zur Gerinnung zu bringen, in zwei Klassen unterteilen: Koagulase-positive und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) mit *S. aureus* und *S. epidermidis* als Hauptvertretern. Die grampositiven, ca. 1 µm großen Bakterien sind unbegeißelt und bilden keine Sporen.

Koagulase-negative Staphylokokken waren bisher als relativ harmlose Kommensale auf der Haut bekannt. Insbesondere *S. epidermidis* hat sich in den vergangenen zwei Jahrzehnten zunehmend neben *S. aureus* als humanpathogene Erreger etabliert. Beide stellen einen Großteil der menschlichen Hautflora dar. ([Kloos u. Bannerman 1994](#)). Während *S. aureus* oft in Zusammenhang mit Sepsis und eitrigen Infektionen auftritt, kann *S. epidermidis* nur bei einem immungeschwächten Wirt Infektionen auslösen. Man bezeichnet ihn daher als einen opportunistischen Keim. Tatsächlich besitzt *S. epidermidis* nur eine beschränkte Anzahl an Toxinen und Virulenzfaktoren. Die Pathogenität von *S. epidermidis* beruht in erster Linie auf der Fähigkeit, an künstlichen Oberflächen zu adhären, mehrschichtige Biofilme auszubilden und relativ schnell Antibiotikaresistenzen zu erwerben ([Vuong u. Otto 2002](#)).

Sehr oft kann sich *S. epidermidis* bei beeinträchtigten Patienten zum primären Erreger entwickeln. So sind beispielsweise AIDS-Kranke, Krebs-Patienten oder Frühgeborene besonders gefährdet, da ihr Immunsystem künstlich unterdrückt oder noch nicht vollständig ausgebildet ist. Die Infektionen finden meist über intravenöse Katheter statt, die einen Zugang von der Haut zum Blutkreislauf ermöglichen ([Domingo u. Fontanet 2001](#); [Taccognelli et al. 1997](#)). Bereits am Katheter findet eine Biofilmbildung statt (siehe [Abb. 1.1](#)). Jegliche Art von Dauerkathetern oder künstlichen Implantaten sind von Infektionen durch *S. epidermidis* betroffen. In den meisten Fällen besteht die einzige wirksame Therapie darin, den infizierten Fremdkörper zu entfernen und durch einen neuen zu ersetzen ([Hoyle u.](#)

1. Einführung

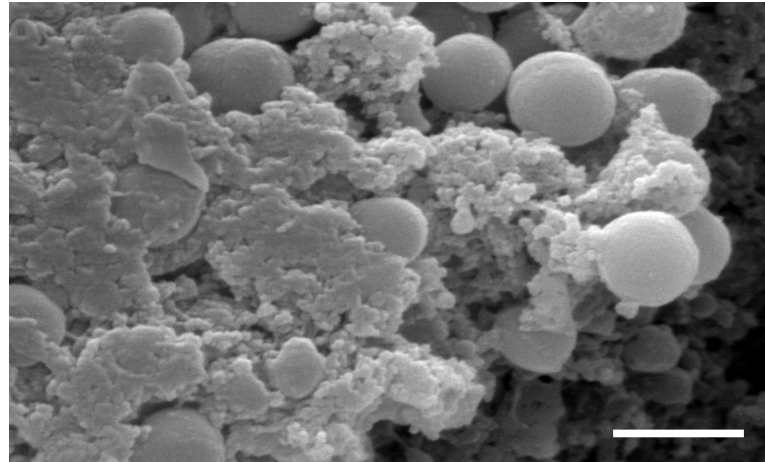


Abbildung 1.1.: Biofilm von *S. epidermidis* 307 im Herzkatheter einer Ratte. Der Balken entspricht 1 μm .

Costerton 1991).

Biofilmbildung. Staphylokokken bilden eine mehrschichtige Biofilmmatrix aus. Diese besteht zum überwiegenden Teil aus Polysaccharid Interzellulärem Adhäsion (PIA), ein β -1,6 verknüpftes Glucosaminoglycan (Mack *et al.* 1996a, b). Die Proteine für Synthese und Export der notwendigen Bausteine sind im *icaADBC*-Operon kodiert (siehe Abb. 1.2). Stromaufwärts befindet sich *icaR*, welches für einen transkriptionellen Repressor von *icaA* kodiert (Heilmann *et al.* 1996; Conlon *et al.* 2002b). Während IcaA, IcaC und IcaD in der Membran lokalisiert sind, findet man IcaB hauptsächlich extrazellulär. IcaA besitzt eine *N*-Acetylglucosaminyl-Transferaseaktivität und verknüpft einzelne Moleküle von UDP-*N*-Acetylglucosamin zu Oligomeren von bis zu 20 Resten. IcaD dient dabei möglicherweise als Chaperon für die korrekte Faltung und Insertion in der Membran, sowie als Verbindung zwischen IcaA und IcaC. Dieses scheint an der Translokation der Oligomere über die Membran und an der weiteren Verknüpfung zu Polymeren von 130 Einheiten beteiligt zu sein (Gerke *et al.* 1998). Von Vuong *et al.* (2004a) konnte gezeigt werden, dass IcaB für die Deacetylierung des Poly-*N*-Acetylglucosamin verantwortlich ist. Bei Mutanten, denen *icaB* fehlt, kann acetyliertes Poly-*N*-Acetylglucosamin nicht an der Zelloberfläche haften, da ihm die kationischen Eigenschaften fehlen. Im Mausmodell einer Fremdkörper-assoziierten Infektion zeigt die *icaB*-Mutante eine stark verringerte Persistenz.

Die Aktivität von IcaR, dem Repressor von *icaA*, wiederum unterliegt seinerseits diversen Umwelteinflüssen. So unterdrückt Ethanol die Expression von IcaR und aktiviert dadurch das *ica*-Operon. NaCl wirkt ebenfalls reprimierend auf den Repressor, kann jedoch die Biofilmbildung auch über einen alternativen Weg stimulieren (Conlon *et al.* 2002a). Ethanol und Salz sind jedoch nicht die einzigen Reize, die zur PIA-Synthese führen. So konnte gezeigt werden, dass subinhibitorische Konzentrationen verschiedener Antibiotika oder osmotischer Stress zu verstärkter *ica*-Promotoraktivität führen (Rachid *et al.* 2000a, b). Neben dem Polysaccharid PIA, welches den Hauptbestandteil der interzellulären Matrix

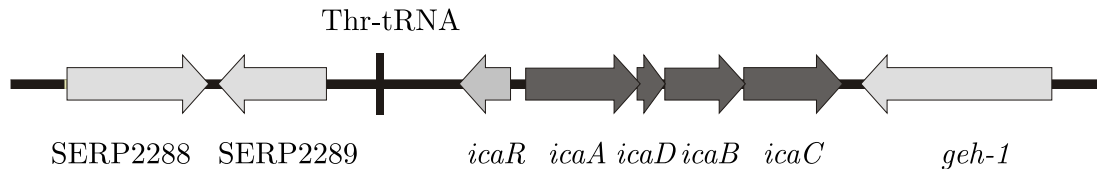


Abbildung 1.2.: *icaADBC*-Operon mit umgebender Region (ca. 11,5 kb). SERP2288, Protein der 5'-Nukleotidase-Familie; SERP2289, potentieller Transporter; *geh-1*, Lipase; in der intergenischen Region zwischen SERP2289 und *icaR* von 1434 bp befindet sich das Gen einer Threonyl-tRNA, sowie zweier kleinerer hypothetischer ORFs, die hier nicht dargestellt sind.

darstellt, findet man auch proteinogene Biofilmbestandteile. Das *accumulation associated protein* Aap und das Bap-homologe Protein (Bhp) können unabhängig von PIA gebildet werden. Beide tragen zur komplexen Architektur des Biofilms bei (Hussain *et al.* 1997; Cucarella *et al.* 2001; Tormo *et al.* 2005). Vor kurzem konnte von Sadovskaya *et al.* (2005) nachgewiesen werden, dass extrazelluläre Teichonsäuren ein integraler Bestandteil des von *S. epidermidis* produzierten Biofilms sind.

Die Biofilmbildung lässt sich in zwei Phasen unterteilen. Bevor die Vernetzung der Zellen stattfindet, müssen sie erst auf der Oberfläche adhärieren. Proteinfaktoren, wie die Adhäsine AtlE, Aae und andere, vermitteln die primäre Anheftung an Polymer-Oberflächen (Heilmann *et al.* 1997, 2003; Veenstra *et al.* 1996). Wie kürzlich gezeigt wurde, bildet *S. epidermidis* Faktoren, die auch an die Matrixproteine Fibrinogen, Fibronektin und Vitronektin binden (Hartford *et al.* 2001; Heilmann *et al.* 1997, 2003; Williams *et al.* 2002). Die Adhäsion und Biofilmbildung bei *S. epidermidis* ist ein sehr komplexer Vorgang, der von vielen Faktoren beeinflusst wird. Es ist daher sehr aufwändig, Biomaterialien zu entwickeln, die nicht adhäsiv sind und anheftende Staphylokokken schon beim ersten Kontakt zerstören (Mack *et al.* 2004).

Antibiotikaresistenz und Abwehr des Immunsystems. Innerhalb des Biofilms sind die Bakterien bereits durch eine physikalische Barriere vor dem Immunsystem und gegen Antibiotika geschützt (Mah u. O'Toole 2001; Raad *et al.* 1998). Die PIA-Produktion wird wie von Vuong *et al.* (2005) beschrieben durch Änderungen im Tricarbonsäure-Zyklus erhöht. Auf diese Weise werden auch weitere Bereiche des Metabolismus beeinflusst, die von diesem zentralen Kreislauf abhängen. Im Biofilm findet somit ein stark veränderter Stoffwechsel statt, der sich in unterschiedlichen Proteom- und Transkriptommustern zeigt (Resch *et al.* 2006). Zusätzlich besitzen Staphylokokken auch die Fähigkeit, Resistenzen gegenüber Antibiotika zu erwerben und zu übertragen. Einen Überblick bietet Apfalter (2003). Bereits relativ früh nach Entdeckung und Einführung des Penicillins 1926 zeigten sich erste Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika. Penicillin unterbindet die Funkti-

1. Einführung

on der Penicillin-Bindeproteine (PBP 1–4) und verhindert dadurch die Kreuzvernetzung der Mureinschicht. Durch die Bildung von β -Lactamasen wurden Staphylokokken schnell resistent gegen Penicilline. Auch die Entwicklung von Methicillin und Oxacillin, deren β -Lactamring geschützt war, führte schon in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts zu Methicillin-resistenten Isolaten von *S. aureus* (Barber 1961). Auch KNS wurden rasch unempfindlich gegenüber Methicillin bzw. Oxacillin. Dies beruht auf einem veränderten Penicillin-Bindeprotein (PBP2a), welches vom *mecA*-Gen kodiert wird. PBP2a besitzt nur eine geringe Affinität zu β -Lactam-Antibiotika. Sehr wahrscheinlich stammt *mecA* aus *S. sciuri* und wurde über horizontalen Gentransfer auf andere Staphylokokken-Spezies übertragen (Wiolders *et al.* 2001; Wu *et al.* 1996). *mecA* ist Teil einer mobilen genomischen Insel, der *staphylococcal cassette chromosome*, die in Abschnitt 1.2 genauer beschrieben wird.

Bei Glycopeptid-Antibiotika, einer Gruppe die ebenfalls auf den Zellwandaufbau wirken, wurden Resistenzen durch vermehrten Einsatz hervorgerufen. 1987 traten die ersten Glycopeptid-Resistenzen bei KNS auf (Schwalbe *et al.* 1987). Vancomycin und Teicoplanin greifen bei der Zellwandsynthese am terminalen D-Alanin der N-Acetyl-Muraminsäure an und verhindern so die Vernetzung. Bei resistenten Stämmen endet die Seitenkette statt mit D-Alanin-D-Alanin mit D-Alanin-D-Hydroxybutyrat. Dadurch kann das Antibiotikum nicht mehr binden und ist wirkungslos. Vor wenigen Jahren waren schon über 50 % aller nosokomialen *S. epidermidis* Stämme und 15 % der *S. aureus* Stämme resistent gegen Oxacillin (Kresken *et al.* 2001). Viele Staphylokokken-Infektionen sind heute nur noch mit Reserveantibiotika therapierbar, bei wenigen existiert kein wirkungsvolles Antibiotikum.

In ihrem natürlichen Habitat, der Hautflora des Menschen, besteht ein ständiger Kontakt der Staphylokokken mit dem Immunsystem. Die Bestandteile des Biofilms bilden neben der physikalischen Barriere auch einen chemischen Schutz vor den Immunzellen. PIA dient zur Abwehr gegen die antibakteriellen Peptide LL-37, β -Defensin und Dermicidin (Vuong *et al.* 2004b). *S. epidermidis* bildet darüber hinaus eine Poly- γ -DL-Glutamat-Kapsel, die bei *Bacillus subtilis* einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt. Sie trägt zur Resistenz gegen die salzreiche Umgebung auf der Haut, sowie gegenüber antimikrobiellen Peptiden und humanen Neutrophilen bei (Kocianova *et al.* 2005; Little u. Ivins 1999).

1.2. Mobile genetische Elemente

Das bakterielle Genom stellt keine einheitliche Struktur dar, sondern ist neben dem essentiellen Kerngenom von mobilen Elementen durchsetzt. Während z. B. die Proteine für Transkription, Translation, Replikation und zentrale Stoffwechselwege im Kerngenom kodiert sind, findet man im flexiblen Genpool u. a. Pathogenitätsfaktoren, Gene des Sekundärstoffwechsels sowie Resistenzgene. Das Kerngenom ist auf dem Chromosom und teilweise auf

Plasmiden kodiert, der flexible Genpool auf mobilen Elementen, wie genomischen Inseln, Phagen, Plasmiden, Integrons und Transposons. Mobile genetische Elemente besitzen oft einen vom Kerngenom abweichenden GC-Gehalt, sowie eine alternative Codon-Verwendung (Hacker u. Carniel 2001).

1.2.1. Insertionselemente und Transposons

Die kleinste Einheit der mobilen Elemente stellen die Insertionselemente (IS-Elemente) dar. Sie sind aus zwei *inverted repeats* (IR) an beiden Enden zusammengesetzt, die ein oder zwei offene Leseraster umschließen, welche für die Mobilisierung kodieren. Diese Transposasen erkennen spezifisch die Enden und führen zur Exzision und Reintegration des IS-Elements. Es lassen sich zwei Transpositionsmechanismen unterscheiden. Die replikative Transposition führt zur Verdoppelung des IS-Elements, da die ursprüngliche Kopie erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu führt der konservative Transpositionsmechanismus zum Verlust des IS-Elements an der anfänglichen Stelle.

Durch ihre Mobilität spielen Insertionselemente eine wichtige Rolle in der Genomorganisation von Bakterien. Die beiden bisher sequenzierten und annotierten Genome von *S. epidermidis* besitzen 57 – zum Teil verkürzte – IS-Elemente, die über das gesamte Chromosom verteilt sind (Gill *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2003b). *S. aureus* besitzt im Durchschnitt nur 10–17 Kopien verschiedener IS-Elemente. Dies deutet darauf hin, dass *S. epidermidis* als Kommensale und nur schwach pathogener Vertreter stärker auf ein flexibles Genom angewiesen ist, als *S. aureus*. Das in der Nahrungsmittel-Produktion zur Fermentation eingesetzte Bakterium *S. carnosus* besitzt weder Virulenzfaktoren noch Insertionssequenzen oder repetitive DNA-Elemente (Götz u. Rosenstein, pers. Mitteilung).

Insertionselemente finden sich nicht nur in Bakterien, sie kommen auch im gesamten eukaryontischen Stammbaum vor. Bis 1989 waren nur ca. 50 bakterielle IS-Elemente bekannt. Seitdem hat sich diese Zahl auf über 500 gesteigert. Sie lassen sich in 19 Familien eingruppiert. Diese besitzen spezifische Eigenschaften wie (1) Ähnlichkeiten in der genetischen Organisation, (2) Ähnlichkeit der Transposasen, (3) gleichartige Eigenschaften der terminalen IR und (4) Veränderungen an der Zielsequenz. (Mahillon u. Chandler 1998; Siguier *et al.* 2006). Obwohl viele Insertionselemente sowohl in *S. aureus*, als auch in *S. epidermidis* vorkommen (IS256, IS431, IS1272, etc.), treten auch Spezies-spezifische Elemente auf. So das IS*Sep1*, welches ausschließlich in *S. epidermidis* zu finden ist. Es befindet sich in den Stämmen RP62A und ATCC 12228 an unterschiedlichen Stellen, was auf ein funktionstüchtiges Element hinweist. Mit 13 Kopien im Stamm RP62A und 15 Kopien im Stamm ATCC 12228 ist es das häufigste IS-Element in *S. epidermidis*. Zurzeit ist weder bekannt, welche Funktion IS*Sep1* ausübt, noch, ob es in anderen KNS vorhanden ist (Ohlsen *et al.* 2006).

1. Einführung

IS256. Das Insertionselement IS256 (Byrne *et al.* 1989), nach dem die IS256-Familie benannt ist, spielt in der Pathogenität von *S. epidermidis* eine besondere Rolle. Die Familie besteht derzeit aus 56 bekannten Mitgliedern mit Längen von 1298–1486 bp. Sie besitzen ein offenes Leseraster, welches für die Transposase kodiert. Die terminalen IR variieren zwischen 24 bp und 41 bp. In der Zielsequenz verursachen sie bis auf wenige Ausnahmen Duplikationen von 8 bp (Mahillon u. Chandler 1998). Zwei Kopien von IS256 bilden die Enden des Komposit-Transposons Tn4001, das eine Aminoglycosid-Resistenz vermittelt. Zusätzlich kommt IS256 noch in drei weiteren unabhängigen Kopien im Genom von *S. epidermidis* RP62A vor. Im Unterschied zu anderen Insertionssequenzen wie IS257 oder IS1272, die gleichmäßig unter pathogenen und saprophytischen *S.-epidermidis*-Stämmen verteilt sind, zeigt IS256 eine starke Präferenz zu klinischen Isolaten (Kozitskaya *et al.* 2004). Dies wird auch dadurch deutlich, dass der Stamm ATCC 12228 kein IS256 besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass IS256 sowohl in die Phasenvariation der Biofilmbildung durch aktive Transposition in das *ica*-Operon involviert ist, als auch passiv an der Umordnung des Staphylokokken-Chromosoms durch homologe Rekombination zweier IS-Elemente (Ziebuhr *et al.* 2000, 1999).

Das Insertionselement IS256 ist 1324 bp lang und besitzt das *tnp*-Gen, welches für eine Transposase kodiert (siehe Abb. 1.3). Der Promotor der Transposase ist P_{in}. Rechts und links wird IS256 von zwei *imperfect inverted repeats* (IR_L und IR_R) begrenzt. Auf einer Länge von 26 bp sind die *repeats* nur an 17 Stellen komplementär (Byrne *et al.* 1989). IS256 besitzt neben dem Promotor für die Transposase noch weitere interne Promotorstrukturen (P und P_{out}, durch die es benachbarte Gene in der Umgebung aktivieren kann (Maki u. Murakami 1997).

Tn4001. Komplexer als Insertionselemente, die ausschließlich sich selbst mobilisieren, sind Transposons. Klasse-I-Transposons bestehen aus zwei IS-Elementen, welche ein oder mehrere Gene flankieren; meist sind dies Resistenzkassetten (z. B. Tn5, Tn9, Tn10, Tn903). Klasse-II-Transposons sind nur durch *inverted repeats* begrenzt, die jedoch keine Insertionselemente sind (z. B. Tn3, Tn1000). So besteht das Komposit-Transposon Tn4001 (4566 bp) aus einer Aminoglycosid-Resistenzkassette (*aacA-aphD*), die durch zwei IS256-Elemente mobilisiert wird (siehe Abb. 1.3). Es wurde ursprünglich auf dem Plasmid pSK1 aus *S. aureus* beschrieben, findet sich aber auch in *S. epidermidis* RP62A (Lyon *et al.* 1984). Dieser Stamm enthält auch noch ein weiteres Transposon. Tn554 (6691 bp) kodiert Resistenzen gegen Erythromycin und Spectinomycin (Murphy *et al.* 1985).

1.2.2. Genomische Inseln

Komplexer und größer als Insertionselemente und Transposons sind genomische Inseln. Ihre Größe variiert zwischen 10 kb und 100 kb. Sie wurden zuerst in *E. coli* als Pathogenitäts-

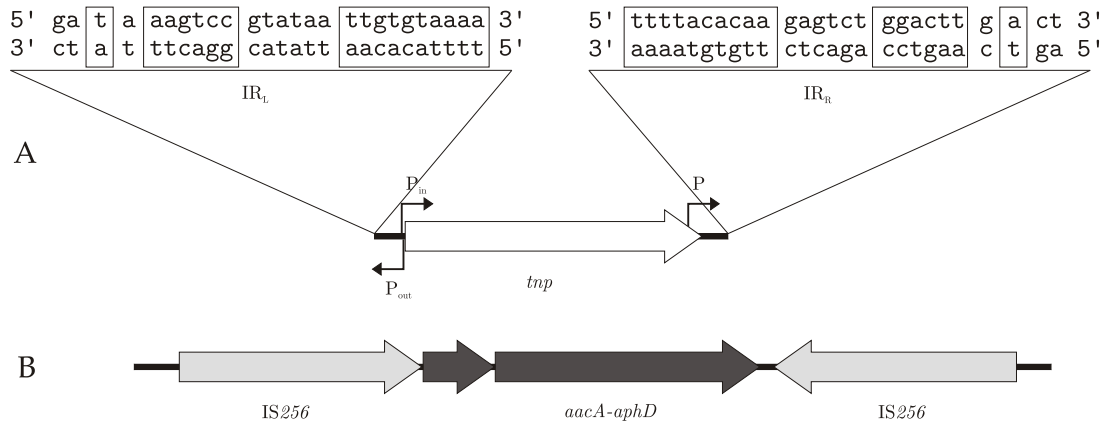


Abbildung 1.3.: IS256 und Tn4001. (A) IS256 mit der Transposase *tnp* und den *imperfect inverted repeats* IR_L und IR_R. Der Promotor P_{in} ist der Beginn der Transposase, P und P_{out} weisen aus dem IS-Element heraus. (B) Das Kompositransposon Tn4001 besitzt zwei intakte Kopien von IS256 die eine Gm/Tm/Km-Resistenzkassette, sowie einen verkürzten ORF ohne Funktion einschließen.

inseln beschrieben (Blum *et al.* 1994). Genominseln beinhalten sehr häufig Phagen- oder Plasmid-Bruchstücke, Integrasen und IS-Elemente. In gramnegativen Bakterien sind sie meist in tRNA-Gene inseriert. Transposons tragen oft nur eine Resistenzkassette, eingeschlossen von zwei Insertionselementen. Genomische Inseln hingegen beherbergen ganze Gencluster mit spezifischen Funktionen. Dies bringt einen evolutionären Vorteil mit sich, da so eine große Zahl von Genen auf einmal übertragen werden kann und auf diese Weise „Evolution in Quantensprüngen“ stattfindet (Groisman u. Ochman 1996). Aus dieser Sicht kann man genomische Inseln auch allgemein als „Fitness-Inseln“ bezeichnen. Je nachdem, welche Lebensweise der Träger hat, kann man sie wie in Tab. 1.1 in verschiedene Unterklassen aufteilen.

Fitness-Insel	Funktion	Organismus
PAI	Adhäsine	uropathogene <i>E. coli</i>
ECI	Methicillinresistenz	<i>S. aureus</i>
SAI	Eisenaufnahme	fäkale <i>E. coli</i>
SYI	Stickstofffixierung	<i>Mesorhizobium loti</i>
PAI	Toxin	<i>Vibrio cholerae</i>
ECI	Abbau von Phenolen	<i>Pseudomonas pudita</i>
PAI	Typ-IV-Sekretionssystem	<i>Legionella pneumophila</i>
SAI	Adhäsine	fäkale <i>E. coli</i>
PAI	Typ-III-Sekretionssystem	<i>Shigella flexneri</i>

Tabelle 1.1.: Unterklassen von Fitness-Inseln. ECI, ökologische Insel; PAI, Pathogenitätsinsel; SAI, saprophytische Insel; SYI, symbiotische Insel. Modifiziert nach Hacker u. Carniel (2001).

1. Einführung

Genomische Inseln, die bei Staphylokokken eine große Rolle spielen, sind die so genannten *staphylococcal cassette chromosome elements* (SCC-Elemente) (Ito *et al.* 2001, 1999). Sie variieren in der Länge zwischen ca. 24 kb und 67 kb. Verschiedene Rekombinasen (CcrA, CcrB, CcrC) sind für die *site*-spezifische Exzision und Reintegration am 3'-Ende des *orfX* notwendig. Die Regionen, die nicht in der Umgebung der Rekombinasen oder eines charakteristischen Gens (*mecA*, *pbp4*, u. a.) liegen, bezeichnet man als *junkyard*-Segmente (J1–J3). Je nach Zusammensetzung dieser Bausteine, werden die SCC-Elemente in unterschiedliche Klassen eingeteilt. So lässt sich zwischen denjenigen, die das *mecA*-Gen besitzen (SCC*mec*) und jenen, welchen es fehlt unterscheiden. Tabelle 1.2 zeigt die im Augenblick (März 2006) bekannten Klassen von SCC-Elementen.

SCC Typ	<i>mec</i> -Klasse	<i>ccr</i> -Komplex	Stamm	GenBank Nr. (Referenz)
SCC <i>mec</i> I	B	1	NCTC10442	AB033763 (Ito <i>et al.</i> 2001)
SCC <i>mec</i> II	A	2	N315	D86934 (Ito <i>et al.</i> 2001)
SCC <i>mec</i> III	A	3	85/2082	AB037671 (Ito <i>et al.</i> 2001)
SCC <i>mec</i> IVa	B	2	CA05	AB063172 (Ma <i>et al.</i> 2002)
SCC <i>mec</i> IVb	B	2	8/6-3P	AB063173 (Ma <i>et al.</i> 2002)
SCC <i>mec</i> IVc	B	2	MR108	AB096217 (Ito <i>et al.</i> 2003)
SCC <i>mec</i> IVd	B	2	JCSC4469	AB097677 (Zhang <i>et al.</i> 2005)
SCC <i>mec</i> V	C	5	JCSC3624(WIS)	AB121219 (Ito <i>et al.</i> 2004)
SCC <i>cap1</i>	n. v.	n. v.	M	U10927 (Luong <i>et al.</i> 2002)
SCC ₁₂₂₆₃	n. v.	1	GIFU12263	AB063171 (Katayama <i>et al.</i> 2003)
SCC <i>pbp4</i> (in SCC-CI)	n. v.	2 (4)	ATCC 12228	BK001539 (Mongkolrattanothai <i>et al.</i> 2004)

Tabelle 1.2.: Derzeit bekannte Typen von SCC-Elementen. *mec*-Klasse: A, IS₄₃₁-*mecA*-*mecR1*-*mecI*; B, IS₄₃₁-*mecA*- Δ *mecR1*-IS₁₂₇₂; C, IS₄₃₁-*mecA*- Δ *mecR1*-IS₄₃₁; D, IS₄₃₁-*mecA*- Δ *mecR1*. *ccr*-Komplex: 1, *ccrA1B1*; 2, *ccrA2B2*; 3, *ccrA3B3*; 4, *ccrA4B4*; 5, *ccrC*. Die Unterklassen von SCC*mec* IV basieren auf unterschiedlichen *junkyard*-Bereichen. Modifiziert und erweitert nach Zhang *et al.* (2005).

Die SCC*mec*-Elemente der Staphylokokken werden zu den ökologischen Inseln (ECI) gezählt. Sie vermitteln eine β -Lactam-Resistenz und dienen damit dem Überleben unter Antibiotikastress. Das klinische Isolat *S. epidermidis* RP62A besitzt ein SCC*mec*-Element des Typs II, das ursprünglich in *S. aureus* N315 identifiziert wurde (Ito *et al.* 2001). Da es in beiden Staphylokokken-Spezies vorkommt und auf Nukleotidebene zu 98 % übereinstimmt, ist anzunehmen, dass ein horizontaler Gentransfer zwischen beiden Arten stattgefunden hat. Diese Hypothese wird durch Studien unterstützt, welche auf die Existenz von ursprünglichen SCC*mec*-Elementen schließen lassen (Hanssen *et al.* 2004; Mongkolrattanothai *et al.* 2004; Wiolders *et al.* 2001). Die wachsende Zahl an neu beschriebenen SCC-Typen deutet darauf hin, dass in den Elementen ein andauernder Umordnungsprozess und Rekombination stattfindet.

SCC-Elemente dienen nicht nur als Überträger der Methicillin-Resistenz, sondern können allgemein als Vektor für Fitness-Gene angesehen werden. Beispielhaft kann hierfür das SCC*pbp4*-Element aus *S. epidermidis* ATCC 12228 genannt werden. Diesem fehlt das *mecA*-Gen und es trägt stattdessen ein Gen für das Penicillin-Bindeprotein PBP4, das

Teichonsäure-Biosynthese-Gen *tagF* sowie Cadmium- und Quecksilber-Resistenzen (Gill *et al.* 2005; Mongkolrattanothai *et al.* 2004). Möglicherweise sind *S. epidermidis* und andere KNS an der Bildung von Multiresistenzen beteiligt, die im Zuge des lateralen Gentransfers mit Hilfe von SCC-Elementen auf *S. aureus* übertragen werden können (Ohlsen *et al.* 2006). Neben Resistenzgenen beherbergen genomische Inseln auch Toxine. Auf der ersten beschriebenen Pathogenitätsinsel von *S. aureus*, SaPII, ist das *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) kodiert (Lindsay *et al.* 1998). In einem Genomvergleich von vier *S. aureus*- und zwei *S. epidermidis*-Isolaten, die vollständig annotiert sind, beschreiben Gill *et al.* (2005) sieben Toxin-kodierende genomische Inseln für *S. aureus*. In *S. epidermidis* konnten bisher noch keine Inseln entdeckt werden, die Toxingene enthalten.

1.2.3. Bakteriophagen

Die meisten Stämme von *S. aureus* besitzen mehrere Phagen. Sie gehören den Familien *Myoviridae* und *Siphoviridae* an und lassen sich in die sieben Serotypen A bis L unterteilen. Von den über 40 bekannten Phagen-Genomen der Staphylokokken besitzen einige wichtige Virulenzfaktoren wie z. B. Enterotoxin A oder Panton-Valentin-Leukocidin (Betley u. Mekalanos 1988; Kaneko *et al.* 1998). Vielen ORFs der Phagen kann keine Funktion zugeordnet werden. Manche größeren Bakteriophagen haben daneben noch eine zweite Gruppe von Genen, die im Zusammenhang mit dem lytischen Zyklus stehen. Darunter befinden sich Leseraster für Amidasen und Holine. Da diese Phagen sowohl *S. aureus*, als auch *S. epidermidis* infizieren, spielen sie möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Virulenzfaktoren in einem breiten Wirtsbereich. Ihre mosaikartige Struktur legt gemeinsame Rekombination zwischen unterschiedlichen Phagen nahe. Diese Eigenschaften zeigen die Bedeutung von Bakteriophagen für die Flexibilität der Genome von Staphylokokken (Ohlsen *et al.* 2006).

In den beiden sequenzierten Genomen von *S. epidermidis* RP62A und ATCC 12228 findet man nur bei ersterem einen Bakteriophagen, der Ähnlichkeiten zu ϕ SP β von *B. subtilis* aufweist (Lazarevic *et al.* 1998). Er ist an der *att site* in *yeeE* integriert. Vergleichende Genom-Hybridisierungen zeigen, dass der Phage einzig im Genom des Stamms RP62A vorhanden ist und vor nicht allzu langer Zeit integriert wurde. Die Phagen-Sequenz ist durchsetzt von Insertionssequenzen, die erst nach der Integration inseriert haben können. Dies weist auf eine hohe Rekombinationsaktivität im Stamm RP62A hin (Gill *et al.* 2005).

1.3. Kleine regulatorische RNAs in Bakterien

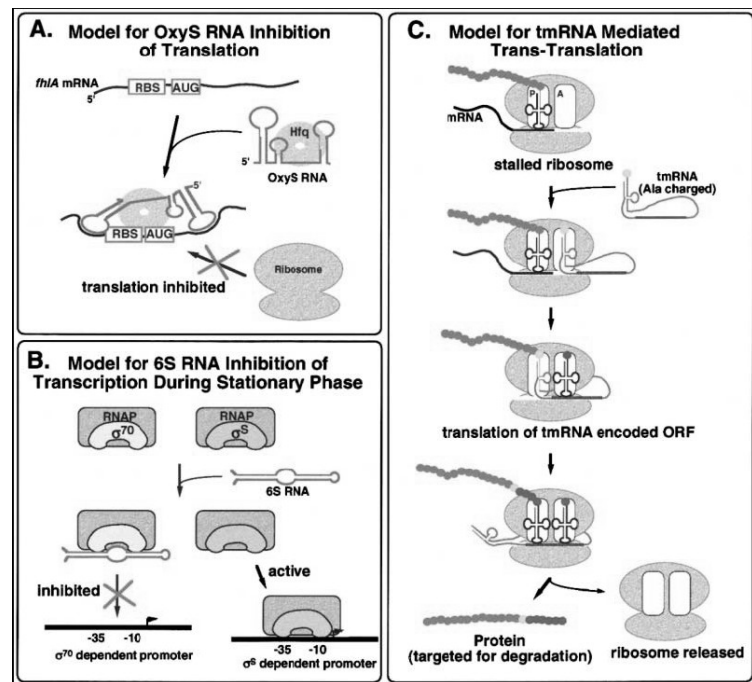
Kleine RNAs, die nicht translatiert werden, sind bereits länger bekannt; Transfer-RNAs (tRNAs) als Transportmittel für Aminosäuren oder ribosomale RNAs als Bausteine der Ribosomen (rRNAs). Ende der 1960er Jahre wurden jedoch auch nicht-kodierende RNAs

1. Einführung

(ncRNAs) entdeckt, die eine regulatorische Funktion besitzen. So die 4,5S und 6S RNA von *E. coli* (Griffin 1971; Hindley 1967). Seit dieser Zeit konnten in *E. coli* über 60 neue ncRNAs entdeckt und zum großen Teil auch charakterisiert werden. In Eukaryonten findet man ebenfalls kleine RNAs. Sie dienen unter anderem der Modulation von Entwicklung, programmiertem Zelltod und des *chromosomal silencing* (Gottesman 2005).

Anders als offene Leseraster lassen sich sRNAs nicht direkt in der Genomsequenz erkennen. Daher ist zu erklären, dass sie erst relativ spät entdeckt wurden. Inzwischen können jedoch einige Gemeinsamkeiten für nicht-translatierte RNAs beschrieben werden. Sie liegen meist in den intergenischen Regionen zwischen zwei Genen oder Operons und überlappen nicht mit diesen. In nahe verwandten Spezies sind sie oft konserviert. Weitere Faktoren sind Haarnadelschleifen, ein Rho-unabhängiger Transkriptionsterminator und Promotoren in intergenischen Regionen, welche nicht offenen Leserastern zuzuordnen sind (Wassarman *et al.* 2001). Diese Eigenschaften können genutzt werden, um eine Rechner-gestützte Suche nach sRNAs in Genomen durchzuführen (Rivas *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002).

Abbildung 1.4.: Wirkmechanismen kleiner regulatorischer RNAs. (A) Regulation durch RNA-RNA-Interaktion; (B) RNA-Protein-Interaktion; (C) Intrinsische katalytische Aktivität der sRNA. Aus Wassarman (2002)



In Bakterien sind kleine RNAs für die Regulation von Transkription und Translation, sowie Modifikation oder Stabilität der mRNA beschrieben. Die sRNAs können in drei verschiedene Kategorien eingeteilt werden (siehe Abb. 1.4). Je nach Wirkungsweise unterscheidet man zwischen (i) Basenpaarbindung von RNA und RNA, (ii) Interaktion zwischen RNA und Protein und (iii) Intrinsischer katalytischer Aktivität der RNA. Dabei können sRNAs, die über Basenpaarbindungen mit ihrem Ziel wechselwirken, in zwei Klassen unterteilt werden. Jene, die direkt am gegenüberliegenden Strang kodiert sind und solche, die an anderen Stellen des Genoms lokalisiert sind (Storz *et al.* 2005).

Antisense Wechselwirkung

Die direkte Basenpaarung, und damit die Inhibition der Translation, ist der am weitesten verbreitete Mechanismus, durch den sRNAs regulatorisch wirken. Die regulatorischen RNAs, welche diesem Typ angehören, können zwei Gruppen zugeordnet werden. Diejenigen, die auf dem komplementären Strang, jedoch am selben genomischen Ort liegen, bezeichnet man als *cis*-kodierte *antisense*-RNAs. Sie bilden eine perfekte Komplementarität zu ihrer Ziel-RNA. Anders die *trans*-kodierte *antisense*-RNAs. Sie sind an distinkten Orten des Chromosoms kodiert und wirken häufig nur durch imperfekte Basenpaarung.

***cis*-kodierte *antisense*-RNAs.** Zunächst als in Regulation der Stabilität und Replikation von Plasmiden involviert, wurden *cis*-kodierte sRNAs anschließend auch als Bestandteile von Phagen und Transposons identifiziert (Storz *et al.* 2005). Viele, der auf Plasmiden kodierten sRNAs, dienen der Stabilisierung von mRNA.

***trans*-kodierte *antisense*-RNAs.** Während nur wenige regulatorische RNAs bekannt sind, die *cis*-kodiert sind, konnten viele *trans*-kodierte *antisense*-RNAs beschrieben werden. Eine Eigenschaft dieser sRNAs ist, dass sie den Wirtsfaktor des Bakteriophagen Q β , Hfq, binden. Hfq wurde Ende der 1960er Jahre als notwendiger *host factor* (HF-I) von *E. coli* für die Initiation der Replikation von Q β entdeckt (Franze de Fernandez *et al.* 1968). Erst in den letzten 15 Jahren wurde die Bedeutung von Hfq im bakteriellen Metabolismus deutlich. *hfq*-Nullmutanten zeigen ein verlangsamtes Wachstum, längere Zellen, Sensitivität gegenüber UV-Licht und ein verändertes Proteinmuster im 2D-Gel (Tsui *et al.* 1994).

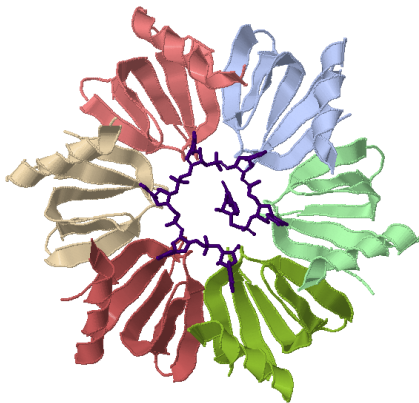


Abbildung 1.5.: Hfq von *S. aureus* mit gebundener RNA. Die Nukleosidreste AU₅ liegen in den Taschen der Hfq-Monomere entlang der zentralen Pore. Erstellt mit Jmol (<http://jmol.sourceforge.net/>), nach Schumacher *et al.* (2002) erstellt.

Von Schumacher *et al.* (2002) konnte die dreidimensionale Struktur des Hfq-Proteins aus *S. aureus* aufgeklärt werden (siehe Abb. 1.5). Das ringförmige Hexamer besitzt einen Durchmesser von ungefähr 65 Å und eine Breite von ca. 23 Å. Die zentrale Öffnung in der Mitte hat einen Durchmesser von ca. 12 Å. Hfq besteht aus sechs identischen Untereinheiten; diese haben die Struktur eines gekrümmten, 5-strängigen β -Faltblatts, das von einer α -Helix am

1. Einführung

N-Terminus beendet wird. Obwohl auf Aminosäure-Sequenzebene kaum eine Ähnlichkeit besteht, sind die Strukturen des bakteriellen Hfq und der homologen Sm/Lsm-Monomere bei Eukaryonten nahezu identisch. Sie sind an vielen RNA-prozessierenden Reaktionen beteiligt und interagieren mit den U-reichen Regionen der RNAs [Überblick in [Pannone u. Wolin \(2000\)](#)]. Auch Hfq bindet U-reiche Sequenzen. Die RNA ist im Hfq-RNA-Komplex in der zentralen Pore spiralförmig gebunden. Dabei liegt je ein Nukleotid in einer der sechs Taschen zwischen den einzelnen Untereinheiten des Hexamers ([Schumacher et al. 2002](#)). Da Hfq als Hexamer wirkt, muss die RNA, um zu binden, durch die Pore geführt werden. Dies wird dadurch erleichtert, dass nach der initialen Bindung der RNA an Hfq eine Konformationsänderung stattfindet, welche die Pore von 12 Å auf ca. 15 Å öffnet und somit den Durchtritt der RNA erleichtert ([Valentin-Hansen et al. 2004](#)).

Modifizierung der Proteinaktivität

Einige sRNAs wirken direkt auf die Aktivität der Proteinfunktion ein. So können sie im Falle der 4,5S-RNA Teil des *signal reconition particle* (SRP) sein. Sie bildet einen Komplex mit dem p48-Protein und kann Signalsequenzen binden. Daher spielt sie eine wichtige Rolle im Protein-Export. In der stationären Phase wird durch die verstärkte Aktivität der 6S-RNA ein alternativer σ -Faktor verwendet und dadurch ein differenziertes Transkriptionsmuster bewirkt. Die von [Lee et al. \(1985\)](#) entdeckte 6S-RNA war die erste, welche weder als mRNA, rRNA noch tRNA klassifiziert werden konnte.

Katalytische Aktivität

Kleine RNAs können auch selbst katalytisch aktiv sein, d.h. enzymatische Funktionen ausführen. Die tmRNA besitzt sowohl Eigenschaften von *messenger*-RNA, als auch von *transfer*-RNA. Daher kann sie sich bei Ribosomen, deren Synthese ins Stocken geraten ist, an die A-Stelle der 23S-Untereinheit anlagern und das entstehende Peptid für den Abbau markieren. RNase P, das Schlüsselenzym der RNA-Prozessierung, besitzt selbst eine katalytisch aktive RNA in ihrem Zentrum, die unter anderem die 5'-Enden von tRNAs prozessiert.

Kleine RNAs in Staphylokokken

Für *S. aureus* waren bereits zwei sRNAs beschrieben. RNAI, welche die Replikation des Resistenzplasmids pSK41 reguliert ([Kwong et al. 2004](#)) und RNAIII, welche Virulenzgene für Exoproteine oder Zellwand-assoziierte Proteine kontrolliert ([Novick et al. 1993](#)). Durch Sequenzvergleiche konnten bereits einige, schon aus *E. coli* bekannte, kleine regulatorische RNAs vorhergesagt werden (tmRNA, RNase-P-RNA, 4,5S-RNA und 6S-RNA). Kürzlich wurden ausgehend von einem bioinformatischen Ansatz 12 weitere sRNA-Transkripte nach-

gewiesen. Für eine antisense-RNA konnten drei potentielle mRNA Ziele identifiziert werden (Pichon u. Felden 2005).

1.4. Ziele der Arbeit

Das IS256-Element spielt in pathogenen *S. epidermidis* eine wichtige Rolle bei der Genomflexibilität. Es kommt sowohl als Teil des Komposit-Transposons Tn4001, als auch in unabhängigen Kopien vor. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass IS256 zusammen mit Tn4001 nicht nur zur Umorganisation des Genoms führen, sondern auch zu großen Deletionen, bei denen u. a. die Fähigkeit zur Biofilmbildung verloren geht (Löbner 2002). Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen ca. 250 kb großen Bereich zu beschreiben, der bei solch einem Deletionsereignis durch Rekombination zweier IS256-Kopien verloren ging.

Die Pathogenität von *S. epidermidis* beruht in erster Linie auf der Fähigkeit Biofilm auf den unterschiedlichsten Oberflächen zu bilden (Vuong u. Otto 2002). Um weitere Unterschiede zwischen pathogenen und saprophytischen Isolaten von *S. epidermidis* zu untersuchen, wurden verschiedene Stämme mit dem Genom des Stammes RP62A verglichen. Durch Microarrayanalyse sollten mögliche neue Pathogenitätsfaktoren identifiziert werden. Während der Genomvergleiche wurde in der intergenischen Region stromaufwärts des *ica*-Operons (IGR_{ica}) ein Transkript identifiziert, das Merkmale einer regulatorischen RNA aufweist und deshalb in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert wurde.

2. Material

2.1. Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft/Ref.
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i>	Boehringer
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	Nal ^s , Sr ^s , Rif ^s , Km ^r , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	Qiagen
<i>S. aureus</i> RN 4220	Restriktions-negativ	Kreiswirth, 1983
<i>S. carnosus</i> TM300	kein Biofilmbildner, Negativkontrolle für Adhärenzassays	Götz, 1986
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Saprophyt; produziert keinen Biofilm	ATCC 12228
<i>S. epidermidis</i> CSF41489	Isolat aus Rückenmarksflüssigkeit bildet induzierbaren Biofilm	Conlon, 2002
<i>S. epidermidis</i> O-47	Klink-Isolat; Biofilmbildner	Heilmann, 1996
<i>S. epidermidis</i> P4	Nasenabstrich von Klinik-Personal	Stammsamml.
<i>S. epidermidis</i> RP62A	Blutkultur-Isolat; starker Biofilmbildner	ATCC 35984
<i>S. epidermidis</i> 195	Saprophyt; produziert keinen Biofilm	Stammsamml.
<i>S. epidermidis</i> 196	Saprophyt; produziert keinen Biofilm	Stammsamml.
<i>S. epidermidis</i> 197	Saprophyt; produziert keinen Biofilm	Stammsamml.
<i>S. epidermidis</i> 307	Blutkultur-Isolat; Biofilmbildner	Lößner, 2002
<i>S. epidermidis</i> 307/5, 307/9, 307/15, 307/29, 307/30, 307/40, 307/43, 307/44, 307/46, 307/47, 307/50, 307/54, 307/58, 307/59, 307/61, 307/63, 307/69, 307/80, 307/103	Biofilm-negative Phasenvarianten	Lößner, 2002
<i>S. epidermidis</i> 567	induzierbarer Biofilmbildner; Klinik-Isolat	Rachid, 2000

2.2. Medien zur Bakterienkultur

Luria-Bertani-Medium	Casein (pankreatisch verdaut)	1 % (w/v)
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	NaCl	0,5 % (w/v)
Müller-Hinton-Medium	Müller-Hinton Broth (Oxoid)	1,2 % (w/v)
Brain-Heart-Infusion-Medium	Brain Heart Infusion (Oxoid)	3,7 % (w/v)
Trypticase-Soy-Broth-Medium	Trypticase Soy Broth (Difco)	3 % (w/v)
Kongorot-Agar	Trypticase Soy Broth (Difco)	3 % (w/v)
	Glucose	1 % (w/v)
	Agar	1,5 % (w/v)
	H ₂ O _{dest}	ad 9/10 Endvol.
	Kongorot getrennt in 1/10 Endvol. H ₂ O _{dest} autokl.	0,08 % (w/v)

2.3. Zusätze für Medien und Agarplatten

Stammlösungen verwendeter Zusätze. Die Lösungen werden bei -20 °C aufbewahrt.

Ampicillin	100 mg/ml	Ampicillin-Natriumsalz in H ₂ O _{dest}
Chloramphenicol	10 mg/ml	Chloramphenicol in Ethanol (70 %)
Erythromycin	100 mg/ml	Erythromycin freie Base in Ethanol (100 %)
Kanamycin	25 mg/ml	Kanamycinsulfat in H ₂ O _{dest}
IPTG	1 M	IPTG in H ₂ O _{dest}
X-Gal	2 %	X-Gal in Dimethylformamid

Zur Herstellung von Agarplatten wird dem Medium 1,3 % (w/v) Agar beigemischt. Soft-Agar zum Überschichten besteht aus LB-Medium versetzt mit 0,2 % (w/v) Agar.

2.4. Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I	Tris-Base	300 mM
	Methanol	20 %
Anodenpuffer II	Tris-Base	25 mM
	Methanol	20 %
Coomassie-Blau-G250 Lösung	Coomassie-Blau-G250	0,25 % (w/v)
	Methanol	44 % (v/v)
	Essigsäure (konz.)	10 % (v/v)
Coomassie-Entfärbelösung	Methanol	5 % (v/v)
	Essigsäure (konz.)	7,5 % (v/v)
Denaturierungslösung	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
Denaturierungslösung	HCl	250 mM
DNA-Probenpuffer	TE-Puffer	50 % (v/v)
	Glycerin	49 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
	Xylencyanol	0,5 % (w/v)
EMSA RNA-Bindungspuffer	KCl	50 mM
	MgCl ₂	1 mM
	NaCl	50 mM
	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
EMSA Ladepuffer	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)
Formamid-Puffer	Formamid	50 % (v/v)
	SSC	6×
	SDS	0,5 % (w/v)
	Na ₃ PO ₄	2,5 mM
Kathodenpuffer	Tris-Base	25 mM
	Methanol	20 %
	ε-Amino-n-Caprinsäure	40 mM

2. Material

MOPS-Puffer (10×)	EDTA	10 mM
	MOPS	200 mM
	Natriumacetat	50 mM
	pH 7,0 mit NaOH einstellen	
Natriumcarbonat-Puffer	Na ₂ CO ₃	1 M
	pH 9,0 mit HCl einstellen	
Neutralisierungslösung	NaCl	1,5 M
	Tris/HCl (pH 7,5)	0,5 M
PBS (10×)	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄	1,5 mM
	NaCl	140 mM
	Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
PCR-Master-Mix	dNTP-Mix	0,8 mM
	MgCl ₂	2 mM
	PCR-Puffer	1×
Phosphat-Waschpuffer	K ₂ HPO ₄	4,75 mM
	KH ₂ PO ₄	25 μM
	Ethanol	80 % (v/v)
PFGE EC-Puffer	NaCl	1 M
	EDTA	0,1 M
	Tris-Base	6 mM
	Brij 58	0,5 %
	N-Laurylsarcosyl	0,5 %
	Desoxycholat	0,2 %
PFGE LGT-Puffer (10×)	Tris-Base	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
	EDTA	100 mM
PFGE SE-Puffer	NaCl	75 mM
	EDTA	25 mM
Puffer I	EDTA	10 mM
	RNase A	0,1 mg/ml
	Tris/HCl (pH 8,0)	50 mM
Puffer II	NaOH	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)
Puffer III	Natriumacetat (pH 4,8)	3 M

2.4. Puffer und Lösungen

QBT-Puffer	Isopropanol	15 % (v/v)
	MOPS (pH 7,0)	50 mM
	NaCl	750 mM
	Triton X-100	0,15 % (w/v)
QC-Puffer	Isopropanol	15 % (v/v)
	MOPS (pH 7,0)	50 mM
	NaCl	1,0 M
QF-Puffer	Isopropanol	15 % (v/v)
	NaCl	1,6 M
	Tris/HCl (pH 8,5)	50 mM
RNA-Ladepuffer (2×)	Formamid	65 % (v/v)
	Formaldehyd	4,4 % (v/v)
	MOPS-Puffer	2×
	Saccharose	2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,2 % (w/v)
	Xylencyanol	0,2 % (w/v)
RNase-Puffer	EDTA (pH 8,0)	0,2 M
	RNase A	3 µg/ml
SDS-PAGE Laufpuffer (10×)	Glycin	1,9 M
	SDS	15 % (w/v)
	Tris/HCl (pH 8,6)	250 mM
SDS-PAGE Probenpuffer (2×)	β-Mercaptoethanol	84 mM
	Bromphenolblau	0,04 % (w/v)
	Glyzerin	20 % (v/v)
	SDS	2 % (w/v)
	Tris/HCl (pH 6,8)	50 mM
SSC (20×)	Natriumcitrat	300 mM
	NaCl	3 M
TAE-Puffer (50×)	EDTA	50 mM
	Essigsäure (konz.)	1 M
	Tris-Base (pH 8,5)	2 M
TBE-Puffer (10×)	Borsäure	890 mM
	EDTA	20 mM
	Tris-Base (pH 8,3)	890 mM
TBS-Puffer	Tris-Base (pH 7,0)	50 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,0 mit HCl einstellen	

2. Material

TBST-Puffer	Tris-Base (pH 7,0)	50 mM
	NaCl	150 mM
	pH 7,0 mit HCl einstellen	
	Tween 80	0,05 %
TE-Puffer	EDTA	1 mM
	Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM
TPE-Puffer (10×)	EDTA	20 mM
	Tris-Base (pH 8,0)	890 mM
	pH 8,0 mit H ₃ PO ₄ einstellen	
TS-Puffer	Saccharose	25 % (w/v)
	Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM

2.5. Plasmide und Oligonukleotide

2.5.1. Plasmide

Vektor	Eigenschaften	Herkunft
pBT2	Temperatur-sensitiver Shuttle-Vektor, Ap ^r in <i>E. coli</i> , Cm ^r in <i>Staphylococcus spp.</i>	R. Brückner <i>et al.</i> , 1997
pEC1	pUC18 mit <i>ermB</i> -Kassette, Ap ^r , Em ^r	R. Brückner <i>et al.</i> , 1992
pGEM-T Easy	Vektor für die direkte Klonierung von PCR-Produkten, Ap ^r	Promega
pME3	pGEM-T Easy mit PCR-Fragment der Lücke zwischen Cosmid 130 und Cosmid 114	diese Arbeit
pME4	pGEM-T Easy mit PCR-Fragment der Lücke zwischen Cosmid 114 und Cosmid 1072	diese Arbeit
pME5	pGEM-T Easy mit IGR _{ica} von <i>S. epidermidis</i> 307	diese Arbeit
pME6	pGEM-T Easy mit IGR _{ica} von <i>S. epidermidis</i> 567	diese Arbeit
pME7	pGEM-T Easy mit IGR _{ica} von <i>S. epidermidis</i> RP62A	diese Arbeit
pME8	pGEM-T Easy mit IGR _{ica} von <i>S. epidermidis</i> O-47	diese Arbeit
pME9	pGEM-T Easy mit IGR _{ica} von <i>S. epidermidis</i> 307/50	diese Arbeit
pME10	pGEM-T Easy mit IGR _{ica} von <i>S. epidermidis</i> 307/58	diese Arbeit

Fortsetzung nächste Seite

Vektor	Eigenschaften	Herkunft
pME11	pGEM-T Easy mit IGR ica von <i>S. epidermidis</i> 195	diese Arbeit
pME12	pGEM-T Easy mit IGR ica von <i>S. epidermidis</i> 196	diese Arbeit
pME13	pGEM-T Easy mit IGR ica von <i>S. epidermidis</i> 197	diese Arbeit
pME14	pGEM-T Easy mit SERP2289 und $icaR$ von <i>S. epidermidis</i> 567	diese Arbeit
pME14a	pME14 mit $ermB$ aus pEC1	diese Arbeit
pME15	pBT2 mit IGR ica -Deletion, Ap ^r in <i>E. coli</i> , Cm ^r in <i>Staphylococcus spp.</i> , Em ^r	diese Arbeit
pME16	pQE30 mit hfq aus <i>S. epidermidis</i> 307	diese Arbeit
pQE30	Expressionsvektor, Ap ^r	Qiagen
pREP4	Repressionsvektor, Km ^r	Qiagen

2.5.2. Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3') ¹
Standard-PCR	
agr fwd	AGT TGG GAT GGC TCA ACA AC
agr rev	CAA CAA CGA AAC ATG GTG CT
arsC-2-for	TAC TTT ATA TGT ACA GGT AAT TCA
arsC-2-rev	TTT AAA TGA TTC AAT AGC GG
Bap_left	AAG CTC CCA GTA AAG GTC AC
Bap_right	AAA AGC TGG ACG AAA CAT CC
ccrC1	TAT TCA CGT GTT AGT ACG TCT G
ccrC2	AAG TGG TAA TTT GGT CGA TG
Hfq_1	ACA TCC AAG ACC AAG CAC TAG
Hfq_2	TCA CTT CAG TTG CTT CAG ACG
icaA1	GAC CTC GAA GTC AAT AGA GGT
icaA2	CCC AGT ATA ACG TTG GAT ACC
icaC upper	ATA AAC TTG AAT TAG TGT ATT
icaC lower	ATA TAT AAA ACT CTC TTA ACA
icaR-mut-left-PstI-HindIII	CCT GCA GAA GCT TCA TCT AAA TAA TCT CAA TTT AAA TAA CTG
icaR-mut-right-SacI-BamHI	GGA GCT CGG ATC CAT GTT GTT ATA CTG AAA CAG TAA TA
IGR-transkr_1	ATA AAT TGT CTC AGG CC
IGR-transkr_2	GTG CTT ATT TTA TAT TTT GAA AA
IGRtr2	AAG AGG CTA ATC ATT CG
Inter1	TTC CTC CCT TTT CTT AAT ATC A
Inter4	TAT GTA ACA AAT TCG AGA TTT C
mdr-mut-left-BamHI	CGG GAT CCT TAT AGA GGC GTC ACC A
mdr-mut-right-KpnI	GGG GTA CCT AGC GGA GGG AGA AG

Fortsetzung nächste Seite

2. Material

Bezeichnung	Sequenz (5'→3') ¹
mcp4-for	ATG AGT GAA GCA AAT CAT AA
mcp4-rev	TTT CGT CAT TAA TTA ATG AAC
orfX-1	TAT TGG AAG CAA GCC ATT GCA
orfX-2	TAT GAC GCG CAT CAT TTG GTG TGG
OxyS_2	CGG ATC CTG GAG ATC CGC
pbp4-1	GGA TTG AAC CCT AGA GGA GCA GT
pbp4-2	TAT TGT TGG CAC CAC TGG GA
rsbU for	GAA ATG TGA AGC ATT CAC
rsbU rev neu	ATT ACC CTC TAC ATC TCG
SERP2421-for	TAC TTG CTT ATA TCT TGA TGG
SERP2421-rev	TTC ACT AAA GTA TTG TAT GAC
SERP2426-for	AAA GAT GTT TAA TGC ACT TG
SERP2426-rev	TTA AAG TAT CTT ACA ACA AGT AT
SEsarA1	TCC CTT CAA AAC CAA ACG AA
SEsarA2	AAT TCA GGA CAT GCA CCA CA
tagF1	GGA GGA ATA CAT CAC AGG TTG CT
tagF2	TCG AAT ATG ATG CGC CCT GAC A
RT-PCR	
IGRtr-1_RT	AAA CGT TAA ATG GCC TGA GAC
IGRtr-2_RT	AGG AGC TTT TTG CTC GCG TTG GT
<i>in vitro</i> -Transkription	
IGR-transkr_1_T7	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA ATA AAT TGT CTC AGG CC
IGR-transkr_2_T7	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GTG CTT ATT TTA TAT TTT GAA AA
OxyS_1-T7	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AAC GGA GCG GCA CCT C
IGRtr1-T7	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA AAT TAA GTA TAG GTG CTT ATT T
Proteinaufreinigung	
Hfq_end_HindIII	CCA AGC TTT TAT TCT TCA CTA TTC ACT TC
Hfq_start_BamHI_FXa	CGG GAT CCA <i>TCG AGG GCA GGA</i> TGA TTG CAA ACG AAA ACA TC CAA
5'/3'-RACE und Primer Extension	
IGR_prim-ext-3	IR800-CTA CGC TGT ACC TCA TTT CA
PCR-Anchor-Primer	GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C
SP_3'_RACE	TGA GGT ACA GCG TAG TGT TAC ACA A
Universelle Sequenzierprimer	
M13forward	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
SCos1_reverse	IR800-ACG ACA GGT GCT GAA AGC GAG
SCos1_uni	IR800-CGA AAA GTG CCA CCT GAC GTC
Sequenzierprimer	
ccrC-out	CGA AAG TCT TAT CCC TCA AT
ccrCout-2	CAG AAC GAA AGG AAG TCT CTT ATG

Fortsetzung nächste Seite

Bezeichnung	Sequenz (5'→3') ¹
ccrCout-3	TAG TGT TTG AGT TGT TGT TCT AAT G
CDS46forSCCmecIII-1	ATG AGT TTT TCG TTT CTC TTC
CDS46revSCCmecIII-1	TTA AAA TGT ACA AAT GCC ACC
CDS-62_SCCmecIII_for	CTA CTT TTG AAC CTG TTG TT
CDS62forSCCmecIII-2	GGT GCG CTT ATC CAT GA
CDS62forSCCmecIII-3	GAT AGT GTT TGA ATA TGT GTA GGT TC
CDS-62_SCCmecIII_rev	GAA AGT TAT AAG CTC GAA CA
CDS62revSCCmecIII-2	CCC TGA TTT GAA GGA ACA AGT
CDS62revSCCmecIII-3	CGT TCG CTA ATT TGC AAT G
CDS62revSCCmecIII-3_1	CGC AGA TAA CCA CCG TA
Cos10_R-out	TAG GGA ATC ATA TTA TGA CAT GGA T
Cos1015L	GCA TCC ACA TCA ACG AGC GTA AG
Cos1015L-2	GTA CGT CAT TAA GCG AAT CGG C
Cos1072L	TTA CAA ATA CAG CTC AAT CC
Cos10L	TAA ATG CAC CAT AAA TGG CTT
cos1130R3-2	TGC TCT CTG ACA TTT GAA TCT TC
Cos114L	ACT GGT CAA GTG GTT GAT AA
Cos114L3-1	CGG TTT GTC TAG CGT AAG TGT GAC
Cos114L3-2	ACA CAC CTG GTG TAG GCG GA
Cos114R	ATC ATC GAA TAC AAA TCG TC
Cos114R2	CGA CGT GCT TTA CTC CCT AGA AAT TT
cos114R4	CCA CAC CAT TAA CAA CGT TCC
Cos130R	AAC TTT AGC AGT ATC CTC AA
Cos130R3-1	CGA CTA GTT GGA ATC TCA ATC GCC AC
del_seq_1_1	GCA TTT GGG ATG TAT GCG CAG
del_seq_1_2	TTG CAG AGC AAT ACG TCG ACC
del_seq_10_1	TTC AGT TTT GGC AAC TCC TGG
del_seq_10_10	GCT CAT GGT GTA TCT TCT GCC
del_seq_10_11	CAC GGA CGA GGA TTT C
del_seq_10_12	TTC CGG GAG CTA TAG GTA TTG
del_seq_10_13	CCC ACA GGC ATA TCT ACA AAC G
del_seq_10_14	ATG CAA AGT GCA CAG TTG GC
del_seq_10_1r	GTA CAT TGT TTG GAA TTC AAG CTA ACC
del_seq_10_2	GCG GTA TAA ACA CCA TAG TCC
del_seq_10_3	GAT TGG GAA ATG TCA AAT GTT G
del_seq_10_4	TGT CAC TTG CTG CTT GC
del_seq_10_5	ATG TTC ACC ATC AAG TTG GCT
del_seq_10_6	TGA ATG CGG AAG AAC CAA GC
del_seq_10_7	GGT GCA TGC GAG ATA ACT AAT GC
del_seq_10_8	CGG ATA CAT TAC TTC AAG AAG CTG
del_seq_10_9	CAG TTG TAT TCA TAG CTA GTG C
del_seq_11_1	AGA TAC ATC ACC TGC CTT CAC
del_seq_11_10	GAA CAA CTT CGT CAT TGT TCG AC
del_seq_11_11	TTG GGG TGG TAC TAA ATA TAA CGT G
del_seq_11_12	CTG AGT TGC TTC ACA TTG TC

Fortsetzung nächste Seite

2. Material

Bezeichnung	Sequenz (5'→3') ¹
del_seq_11_13	TAT TCG ATT TAA CAA GTC GTG TG
del_seq_11_2	GTT TCT ACT TCT ACA GGG TGC
del_seq_11_3	GTG AAG GCA GGT GAT GTA TCT
del_seq_11_4	CCA TAC TGA ACC GAT TAT CGC
del_seq_11_5	GGC ATT GAG TAG TGC TGA CAT
del_seq_11_6	GGC GTT ACC AGT TGT TTT CA
del_seq_11_7	GTA ACG AGT CGG CGT GAG
del_seq_11_8	AGT TCA ACA TTT ACA GCA TGT TCA G
del_seq_11_9	ACA AAC AGA ACA AGT TGA ACA CAA A
del_seq_11-15	GAA GGC TAT CGT GAT GAA GAG TTT G
del_seq_12_1	CCA GTA TCA AAT GGC GAT CAC
del_seq_12_2	GGA TAT TTT GCG TCG CCT AAG
del_seq_13_1	AAG AGG GAT GTT TCG TCC AGC
del_seq_13_2	GGC GAA GAA ATC AAG CCA GG
del_seq_14_1	GTT GGT TCA CCT TCG CCA A
del_seq_14_2	GCA GGT TGT TGA TGG ACT TGT
del_seq_15_1	ACC GAC ATC AAT TAA GGC GTT C
del_seq_15_10	GCC CAC CTT GAA ATC GTT GAA T
del_seq_15_2	ACT ACA ATG TTG GCT TCA GCA G
del_seq_15_3	TGC ATT ACT AGT TGT CAT GG
del_seq_15_4	CCA CAT GAT GTG TGC ACC
del_seq_15_5	GGT TCA GGA TAA TGG CAT CG
del_seq_15_6	AAG AAA TTA CCT AAT TCT TGT GTT TGA C
del_seq_15_7	TGA AAG CCG GTA TAC AAC ATC ATG
del_seq_15_8	CTG ATT TGA TAA TAG GGT GAT TTG G
del_seq_15_9	CTG TCA TAC CGT TAG CG
del_seq_16_1	TCT ACC TAA TGC TAC GGG GTG
del_seq_16_2	GAT GCA GTA CAA TTC ACT CCT AGC
del_seq_16_3	CAT TTA AGA TCA TGA GAG GCG AAG C
del_seq_2_1	TTG ACG CCT ATT AAA CCA GAT GC
del_seq_2_2	AGG GTG AAT CTA CAA GAC CAG G
del_seq_3_1	TGT ATC TGT ACC AAC GAA GTC ACC
del_seq_3_2	AGG TGA ATT GTG CAT TGG TGG
del_seq_4_1	TGC TCT AAG AGA GTG TCC ACC
del_seq_4_2	CAA TTA AGA GTA TCG GCC ACA CC
del_seq_5_1	TGT TAG AAA TCA CTG TCC TCG
del_seq_5_2	TGT AAG CGT TTC CTT GTA GTT
del_seq_6_1	AGT GAT CCA CGT GTT CAA GTC
del_seq_6_2	GAT GCG ATG ATT AAA CCC GTG
del_seq_7_1	TCT ACA AGG TTA GCT CGA GTG
del_seq_7_2	TAA CAG GCA AAC CTA ACA CAC
del_seq_772_1	GTG TAT AAA TCG GTG TGG CTT GCG
del_seq_772_2	GAG TCG CTT GAT ACG TAT GAG TGT
del_seq_8_1	ATC CAG TGG CAA GTG ATC GTG
del_seq_8_2	TTG GTC TCA CTG GTT GGG AAC

Fortsetzung nächste Seite

Bezeichnung	Sequenz (5'→3') ¹
del_seq_9_1	TTA TGA CGA TAG CCA CAC CTG
del_seq_9_10	GAA GCT AAG AAT GAT ACT AAG TTC GCA AC
del_seq_9_2	AAG TAC TCG GCA CTT ACT CAG
del_seq_9_3	CTG AGT AAG TGC CGA GTA CTT
del_seq_rightend-1	CGT TTA CCA GCA GTG TAA AGT TCC
del_seq_rightend-2	GTA CAG ATG TGA ACT ATG GTG CG
del_seq_15R	AAA TAG TTC ATA CAA CCT TCT TTA GTT T
del_seq_15R-2	CGC GTT TAC CAG CAG TGT AAA
del_seq_15R-3	ATC CTC TAC AAC ACC GAC
IS.intern-f.1029	GCT TGC GCA TCA TTG GAT G
IS.intern-r.279	CTC ATA ATA GCC ATT TCG TTG
RIF4_F3-2	GAC TTC CTA AAA GAT GTC GAA GG
RIF4_F3-3	ATG ACT AAA TCT TTT CCT GAA AGC
RIF4_F3-4	AGC ATC CCT CAC CG
SCC<i>mec</i>-Multiplex-Primer	
CIF2-F2	TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G
CIF2-R2	ATT TAC CAC AAG GAC TAC CAG C
DCS-F2	CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC
DCS-R1	CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG
IS431-P4	CAG GTC TCT TCA GAT CTA CG
KDP-F1	AAT CAT CTG CCA TTG GTG ATG C
KDP-R1	CGA ATG AAG TGA AAG AAA GTG G
MECA-P4	TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G
MECA-P7	CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG
MECI-P2	ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC
MECI-P3	GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC
pT181-R1	GAA GAA TGG GGA AAG CTT CAC
pUB110-R1	GAG CCA TAA ACA CCA ATA GCC
RIF4-F3	GTG ATT GTT CGA GAT ATG TGG
RIF4-R9	CGC TTT ATC TGT ATC TAT CGC
RIF5-F10	TTC TTA AGT ACA CGC TGA ATC G
RIF5-R13	GTC ACA GTA ATT CCA TCA ATG C

¹Die Schnittstelle für Faktor Xa ist kursiv, die Promotorsequenz der T7-RNA-Polymerase halbfett gedruckt.

2.6. Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklaven	H+P Varioklav Integra Bioscience
Brutschränke	Heraeus B5050E (37°C) Mettler Tv40b (30°C, 43°C)
Elektrophoresekammern	Roth BioRad
Elektroporations-Gerät	BioRad Gene Pulser
Entwickler	Agfa Curix 60
FastPrep	Savant BIO101 F120
Feinwaage	IL-180 Chyo Balance Corp. Ohaus Navigator
Heizblöcke	Eppendorf Liebisch
Hybridisierungsöfen	Hybaid Mini 10
Microarray-Scanner	Molecular Dynamics Genepix 4000B
Mikroliterpipetten	Eppendorf Gilson
Mikroskop	Leitz
Mikrowellengerät	Siemens
Netzteile	Pharmacia EPS600, BioRad PowerPac 300
PCR-Thermocycler	Biometra T3 Peqlab
pH-Meter	WTW pH525
Phosphorimager	Amersham Bioscience Typhoon 4600
Photometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 3000
PFGE-Kammer	BioRad CHEF-DR® III
Schüttler	Innora 4300, Bühler WS 5
Sequenzierer	Perkin Elmer ABI Prism 3100 MWG-Biotech LiCor Modell 4000
Sonicator	Bandelin Sonoplus HD70
Speedvac-Konzentrator	Savant SC110
Sterilbank	Nuaire II Type A/B3
UV-Fotoanlage	BioRad GelDoc2000, Intas
UV-Crosslinker	BioRad GS GeneLinker
Videodrucker	Intas
Vortexer	Scientific Industries Vortex-Genie 2
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Beckmann J2-HC mit JA10 und JA20 Rotoren Heraeus Sepatech Megafuge1.OR Heraeus Sepatech Biofuge 13R Eppendorf 5415C

2.7. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Amersham, Appllichem, BioRad, Boehringer, Difco, Invitrogen, Machery-Nagel, MBI-Fermentas, Merck, New England Biolabs, Oxoid, Peqlab, Pharmacia, Promega, Qiagen, Roth, Roche, Serva, Sigma und Stratagene bezogen. Verbrauchsmaterial lieferten ABgene, BioRad, Eppendorf, Falcon, Greiner, Millipore, Nunc International, Nalgene, Peqlab, Sarstedt und Schleicher & Schüll.

2.8. Größenstandards

Um die Länge von DNA-Fragmenten in Agarosegelen zu bestimmen, wurde die „Generuler®“ 1-kb DNA-Leiter (Abb. 2.1 A) von MBI Fermentas verwendet. Als Längenstandard bei denaturierenden Agarosegelen für Northern Blotting wurde die 0.24-9.49-kb RNA-Leiter von Invitrogen verwendet (Abb. 2.1 B). Die Größe von Proteinen wurde in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen mittels Rainbowmarker von Amersham Pharmacia bestimmt (Abb. 2.1 C).

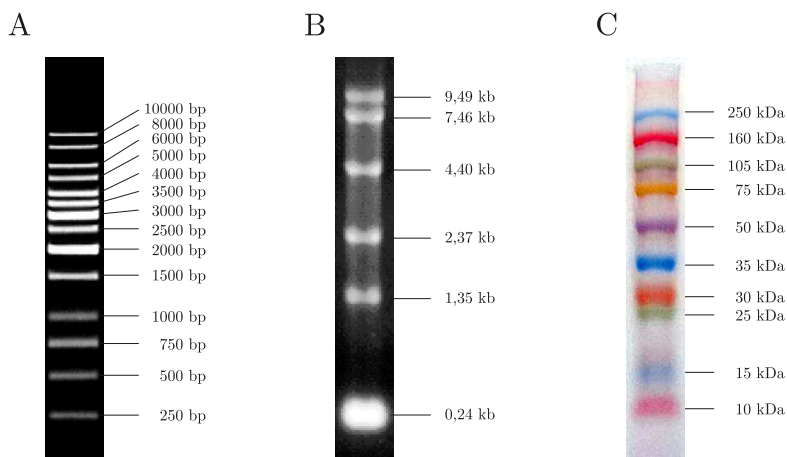


Abbildung 2.1.: Größenstandards. (A) „Generuler®“ 1-kb DNA-Leiter (MBI Fermentas); (B) 0.24-9.49-kb RNA-Leiter (Invitrogen); (C) Rainbowmarker (Amersham Biosciences).

3. Methoden

3.1. Arbeiten mit DNA

3.1.1. Plasmid-Isolierung im kleinen Maßstab aus *E. coli*

Die Bakterien werden über Nacht unter Selektionsdruck eines Antibiotikums in 4 ml LB-Medium bei 37°C unter Schütteln angezogen. In einem Reaktionsgefäß werden 1,5 ml der Kultur 5 min bei 6000 *g* zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 150 µl Puffer I resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Puffer II wird der Ansatz gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Um chromosomale DNA und Proteine zu fällen, werden 150 µl Puffer III zupipettiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz für 15 min bei 20000 *g* zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 vol. Isopropanol versetzt, um die Plasmide zu fällen. Diese werden für 15 min bei 20000 *g* pelletiert. Das Plasmid-Pellet wird mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und bei RT getrocknet. Zuletzt nimmt man das Pellet in 50 µl Tris/HCL (10 mM, pH 7,5) auf und kann es bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahren. Um die Plasmide weiter für eine Sequenzierreaktion zu verwenden, muss die DNA aufgereinigt werden. Dazu wird das „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen benutzt (siehe 3.1.15).

3.1.2. Plasmid-Isolierung im mittleren Maßstab aus *E. coli*

Größere Mengen an Plasmid werden mit dem „Plasmid Midi Kit“ (Qiagen) isoliert. Die Bakterienzellen werden dabei nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aufgebrochen, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. 25 ml einer Übernachtskultur werden bei 6000 *g* abzentrifugiert und in 4 ml Puffer I resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer II inkubiert man für 5 min bei RT. Mit 4 ml Puffer III werden chromosomale DNA und Proteine gefällt. Man zentrifugiert den Ansatz für 30 min bei 20000 *g* und 4°C. Anschließend reinigt man die Plasmide über eine Säule. Diese wird zunächst mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert, bevor man den Überstand des Zentrifugations-Schrittes darauf gibt. Es folgen zwei Waschschrte mit je 10 ml Puffer QC. Nach der Elution mit 5 ml Puffer QF, werden die Plasmide durch Isopropanol (3,5 ml) gefällt. Nach Zentrifugation (15000 *g*, 4°C, 30 min) und Waschen mit Ethanol (70 %), löst man das Pellet in 50 µl Tris/HCL (10 mM, pH 7,5) und bewahrt es bei -20°C auf. Diese Methode erlaubt eine Ausbeute von bis zu 20–100 µg Plasmid.

3.1.3. Plasmid-Isolierung im kleinen und mittleren Maßstab aus *Staphylococcus spp.*

Die Plasmid-Isolierung aus Staphylokokken geschieht im Wesentlichen in gleicher Weise wie bei *E. coli*. Nachdem das Zellpellet in 150 μ l (4 ml) Puffer I resuspendiert wurde, fügt man dem Ansatz 10 μ l (50 μ l) Lysostaphin (2 mg/ml) hinzu und inkubiert für 30 min bei 37°C. Durch diesen Schritt wird die dickere Zellwand der Staphylokokken zerstört und die Bakterien lassen sich lysieren. Der weitere Aufschluss erfolgt wie in 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben.

3.1.4. Isolierung chromosomaler DNA aus Staphylokokken

Die Bakterien werden bei 37°C unter Schütteln über Nacht in LB-Medium (+ 1% Glycin) angezogen. Von der Kultur werden 2 ml in einem Reaktionsgefäß für 5 min bei 6000 *g* zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml TE-Puffer gewaschen und in 100 μ l TS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15 μ l EDTA (0,5 M, pH 8,0) und 10 μ l Lysostaphin (2 mg/ml) wird der Ansatz für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 375 μ l TE-Puffer, 225 μ l SDS (10%) und 10 μ l Proteinase K (10 mg/ml) zupipettiert und für 50 min bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von 150 μ l Natriumperchlorat (5 M) und 0,5 vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wird der Ansatz mind. 1,5 h kräftig auf einem Tischrüttler geschüttelt. Durch Zentrifugation für 15 min bei 20000 *g* werden Zellbestandteile und Proteine in der Interphase angereichert. Der Überstand wird abgenommen und mit 0,7 vol. Ethanol (100%) versetzt. Durch vorsichtiges Mischen fällt die chromosomale DNA aus und wird für 15 min bei 15000 *g* pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 500 μ l Ethanol (70%) gewaschen. Nach Trocknen bei RT wird die DNA in 50 μ l Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) aufgenommen und bei mindestens 12 h bei 4°C gelöst.

3.1.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Aktivität von Restriktionsenzymen wird in *units* (U) gemessen. Dabei entspricht 1 U der Enzymmenge, die benötigt wird, um 1 μ g DNA in einer Stunde vollständig zu spalten. Als Reaktionspuffer hat sich der One-Phor-All-Puffer der Firma Amersham bewährt. Die Menge des eingesetzten Enzyms sollte 1/10 des Reaktionsvolumens nicht überschreiten, da das im Aufbewahrungspuffer enthaltene Glycerin die Reaktion beeinflussen könnte. Üblicherweise wird ein Reaktionsvolumen von 20 μ l verwendet. 0,5–2 μ g DNA werden mit 10 U Enzym, Reaktionspuffer und H₂O_{dest} auf 20 μ l aufgefüllt und ca. 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 4 μ l DNA-Probenpuffer beendet. Die entstandenen Fragmente der Spaltung können nun auf einem Agarosegel überprüft werden. Soll die DNA weiter verwendet werden, müssen die Fragmente aufgereinigt werden (s. Abschn. 3.1.15).

3.1.6. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Mit 0,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α beimpft man 200 ml LB-Medium und lässt die Kultur bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 0,6 wachsen. Anschließend werden die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt und in vorgekühlten Rörchen abzentrifugiert (10 min, 4°C, 5000 g). Das Pellet wird in 100 ml eiskalter, steriler CaCl₂-Lösung (0,1 M) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Man zentrifugiert die Bakterien erneut und resuspendiert sie in CaCl₂/Glyzerin-Lösung (CaCl₂: 0,1 M; Glyzerin: 15 % (v/v)). Nach Inkubation von 15 min auf Eis können die kompetenten Zellen in Aliquots von 250 μ l in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -70°C eingefroren werden.

3.1.7. Transformation von *E. coli*

Ein Aliquot (200 μ l) kompetenter *E. coli* DH5 α wird auf Eis aufgetaut. Die Zellen werden mit 50–100 ng Plasmid-DNA oder 10 μ l Ligationsansatz versetzt und für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation erhitzt man den Ansatz für 2 min auf 42°C und kühlt ihn danach sofort auf Eis wieder ab. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium werden die transformierten Zellen für 45 min bei 37°C geschüttelt, damit die auf dem Plasmid codierte Antibiotika-Resistenz exprimiert wird. Danach plattiert man zuerst 100 μ l der Zellen auf geeigneten Agarplatten aus und zentrifugiert den Rest der Kultur vorsichtig ab. Das Pellet wird in 100 μ l LB-Medium resuspendiert und auf einer zweiten Agarplatte ausplattiert. Beide Platten werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.1.8. Transformation von Staphylokokken

Zur Transformation von DNA in Staphylokokken werden 25 ml BHI-Medium mit 100 ml einer Übernachtskultur angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 2 inkubiert. Die Kultur wird erst 15 min auf Eis abgekühlt und dann für 10 min bei 8000 g zentrifugiert. Das Pellet wird dreimal mit eiskaltem sterilen Wasser gewaschen und dann in 50 μ l sterilem Wasser gelöst. Die Zellsuspension wird mit 50 μ l (5 μ g) DNA gemischt, kurz auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Puls (1,8 kV, 2,5 ms) elektroporiert. Die transformierten Zellen werden mit 1 ml BHI-Medium, welches Saccharose (0,5 M) und Chloramphenicol in einer subinhibitorischen Konzentration (< 10 mg/ml) enthält, gemischt und für 2,5 h bei 30°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen auf BHI-Agar mit 10 mg/ml Chloramphenicol ausplattiert und für 48 h bei 30°C inkubiert.

3.1.9. Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten

Bei der Spaltung eines Vektors mit nur einem Enzym muss, um eine Religation zu verhindern, die Phosphatgruppe des 5'-Endes abgespalten werden. Zu einem 20 μ l-Ansatz pipettiert man 1 μ l Antarctic Phosphatase (New England Biolabs) und 2 μ l Reaktionspuf-

3. Methoden

fer (10×). Die Reaktion wird für 30 min bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend Hitze-inaktiviert (15 min, 65°C). Der Ansatz kann gleich für eine Ligation weiter verwendet werden.

3.1.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Quick T4 DNA Ligase (New England Biolabs) ermöglicht die Ligation von DNA-Fragmenten (Vektor und Insert) mit kohäsiven oder stumpfen Enden. Dabei wird das 5'-Phosphat-Ende des einen Stranges mit der freien 3'-OH-Gruppe kovalent verknüpft. Entscheidend für den Erfolg der Ligation ist das molare Verhältnis der Fragment-Enden. Dabei sollte das Insert in einem Überschuss von 3:1 vorliegen. Die Molarität der Fragment-Enden berechnet sich nach der Formel:

$$M(\text{Enden}) = \frac{c_{\text{End}}(\text{Fragment})}{bp \cdot 650 \text{ Dalton}} \cdot 2 \text{ Enden}$$

Somit ergibt sich bei einem Ansatz von 20 µl als einzusetzende Menge an Insert:

$$m(\text{Insert}) = \frac{3 \cdot bp(\text{Insert}) \cdot m(\text{Vektor})}{bp(\text{Vektor})}$$

Für die Ligation werden 50 ng Vektor und ein 3-facher molarer Überschuss an Insert mit 10 µl Quick-Ligation-Puffer (2×) und 1 µl Quick-Ligase in einem Volumen von 20 µl vermischt. Der Ansatz wird für 5 min bei RT inkubiert und anschließend entweder sofort transformiert, oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.1.11. Phenolextraktion

Verunreinigte Nukleinsäuren können durch die Phenolextraktion von Proteinen und Salzen gereinigt werden. Die DNA- oder RNA-Lösung wird mit einem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohollösung (25:24:1) vermischt und mindestens 15 min auf einem Tischrüttler geschüttelt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 30000 g wird die wässrige Phase mit DNA (bzw. RNA) abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Die wässrige Phase wird nach erneutem Schütteln und Zentrifugieren in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann mit Ethanol gefällt werden.

3.1.12. Ethanolfällung

Nukleinsäuren in Lösung können durch Ethanol gefällt, und somit umgepuffert oder konzentriert werden. Die Nukleinsäure-Lösung wird mit 0,1 vol. NaAc (3 M, pH 4,8) versetzt, um ein saures Milieu zu schaffen. Es werden 2,5 vol. Ethanol (100%) zupipettiert und gut gemischt. Der Ansatz wird für mindestens 2 h bei -80°C inkubiert und die gefällte DNA/RNA

für 30 min bei 4°C und 30000 g pelletiert. Nach der Trocknung kann das Pellet in einem geeigneten Volumen Puffer oder H₂O wieder gelöst werden.

3.1.13. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung wird die Extinktion einer DNA- oder RNA-Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Menge an Nukleinsäure kann folgendermaßen berechnet werden: 1 Einheit bei OD₂₆₀ entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml oder einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt dabei den Reinheitsgrad der DNA an und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen, da Proteine in der zu messenden Lösung störend wirken können.

3.1.14. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten dar. Durch einen Zyklus von Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation kann DNA mit einer hitzestabilen Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* für analytische Zwecke vervielfältigt werden. In einem PCR-Reaktionsgefäß wird folgender Mix angesetzt:

Master-Mix	45 µl
DNA (200 ng)	2 µl
Primer 1 (100 µM)	1 µl
Primer 2 (100 µM)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1 µl

Anschließend erfolgt die Amplifikation, wobei die Bedingungen je nach Länge des Fragments und der Schmelztemperatur der Primer zu wählen sind. Nach initialer Denaturierung von 5 min bei 94°C folgen 35 Zyklen mit

Denaturierung	30 s	94°C
Annealing	30 s	T _m + 3°C
Elongation	1 min	72°C

Abschließend dient ein letzter Schritt von 10 min 72°C zur vollständigen Fertigstellung aller PCR-Fragmente. Der Ansatz wird nun mit 5 µl Ladepuffer versetzt und davon 10 µl auf ein 1%iges Agarosegel zur Kontrolle aufgetragen.

Pfx-Polymerase Für exakte Amplifikationen, bei welchen die Genauigkeit der *Taq*-Polymerase nicht ausreicht, wird die *Pfx*-Polymerase (Invitrogen) verwendet, da sie *proof-reading*-Aktivität besitzt. Sie bildet jedoch *blunt ends* bei der Reaktion, sodass für die Klonierung in den pGEM-T-Easy-Vektor noch ein Adenosin am 3'-Ende angehängt werden muss. Dies geschieht mit der *Taq*-Polymerase. Dazu werden 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl *Taq*-Reaktionspuffer (10×), 0,2 µl dATP (10 mM), 0,5 µl *Taq*-Polymerase, 0,4 µl MgCl₂ (50 mM)

3. Methoden

und 3,3 µl H₂O versetzt und für 30 min bei 70 °C inkubiert. Der Ansatz kann anschließend direkt für eine Ligation verwendet werden (s. Abschn. 3.1.10).

Phusion-Polymerase Um schwierige Fragmente (hoher GC-Gehalt, *repeats*, ...) zu amplifizieren, kann die Phusion-Polymerase (Finnzymes) verwendet werden. Sie besitzt eine 50-fach niedrigere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase. Zur Klonierung in pGEM-T Easy muss auch hier Adenosin am 3'-Ende angefügt werden (s. Abs. 3.1.14). In ein PCR-Reaktionsgefäß wird dazu folgender Mix angesetzt:

HF-Puffer (5×)	10 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
DNA (200 ng)	1 µl
Primer 1 (25 µM)	1 µl
Primer 2 (25 µM)	1 µl
Phusion	0,5 µl
H ₂ O	35,5 µl

Nach initialer Denaturierung von 30 s bei 98 °C folgen 25–35 Zyklen mit

Denaturierung	5–10 s	98 °C
Annealing	10–30 s	T _m + 3 °C
Elongation	20 s je kb	72 °C

Amplifikation langer PCR-Fragmente Für die Herstellung langer PCR-Fragmente, wie sie für die Sequenzierung des Deletionsbereiches benötigt werden, benutzt man den Elongase™ Enzyme Mix (Invitrogen). Er besteht aus einem Polymerase-Mix, der auch die Fähigkeit zum Korrekturlesen besitzt. Ein Reaktionsansatz enthält:

200 µM	je dNTP
200 nM	je Oligonukleotid
≥100 ng	DNA
60 mM	Tris/SO ₄ (pH 9,0)
18 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
1,0 mM	MgSO ₄
1 µl	eLONGASE Enzym-Mix
ad 50 µl	H ₂ O _{dest}

Die Temperaturzyklen werden wie bei der Standard-PCR durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die Elongationstemperatur 68 °C beträgt.

3.1.15. Aufreinigung von PCR-Produkten

Um nach der PCR die DNA von nicht mehr benötigten Salzen, Oligonukleotiden und Enzymen zu reinigen, wird das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip des Anionenaustauschers. Dabei bindet die DNA zunächst unter Niedrigsalzbedingungen an eine Anionenaustauschersäule. Nach mehreren Waschschritten kann die DNA mit einem Puffer hoher Ionenkonzentration wieder von der Säule eluiert und mit Isopropanol gefällt werden. Die genaue Durchführung ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

3.1.16. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nachdem die DNA im Agarosegel aufgetrennt und mit EtBr angefärbt wurde, schneidet man die gewünschte Bande unter UV-Licht aus, und überführt das Gel-Stück in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Man bestimmt das Gewicht und fügt die dreifache Menge Puffer QG hinzu. Anschließend erhitzt man den Ansatz für ca. 10 min auf 50 °C, bis sich die Agarose aufgelöst hat. Zur Aufreinigung überführt man die Lösung auf ein QIAquick-Säulchen und zentrifugiert für 1 min bei 8000 *g*, sodass die DNA an die Matrix bindet. Die DNA wird mit 750 µl Puffer PE gewaschen und kann anschließend mit Tris/HCl (10 mM, pH 7,5) eluiert und bei -20 °C aufbewahrt werden. Die exakte Vorgehensweise ist dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

3.1.17. Sequenzierung

Beide Sequenzierungsmethoden beruhen auf der Didesoxy-Methode nach Sanger. Neben normalen Desoxynukleotiden, die eine fortlaufende Strangbildung ermöglichen, befinden sich auch Didesoxynukleotide im Ansatz, welche einen Kettenabbruch verursachen. Während das LiCor-System mit einem Farbstoff markierte Oligonukleotide verwendet, kommen im ABI-System mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte Didesoxynukleotide zum Einsatz.

Sequenzierung mit dem LiCor-Sequenzierer von MWG Für die Sequenzierung benötigt man vier Ansätze, je einen pro Base, da hier nur der Primer markiert ist. In jedem Reaktionsgemisch befinden sich neben den vier dNTPs noch entweder ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP, welche den Kettenabbruch bewirken. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange Fragmente, welche in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können. Für eine Sequenzierung wird folgender Ansatz verwendet:

3. Methoden

Sequenzier-Puffer	5 μ l
Primer (10 μ M)	1 μ l
ddNTP-Reagenz	2 μ l
DNA (200 ng)	2 μ l

Es folgen 30 Zyklen je:

Denaturierung	30 s	94 °C
Annealing	30 s	$T_m + 3$ °C
Elongation	45 s	70 °C

Nach der PCR fügt man je Ansatz 3 μ l Stopp-Puffer hinzu und trägt die Proben auf das Sequenziergel auf. Ein Laser detektiert die Signale der einzelnen Banden und erstellt ein virtuelles Gel-Bild, anhand dessen sich die Sequenz direkt ablesen, oder komfortabler mit dem Rechner auswerten lässt.

Sequenzierung mit dem ABI-Sequenzierer von Perkin Elmer Einfacher und schneller ist die Methode, bei der markierte Didesoxynukleotide eingesetzt werden. Man benötigt nur einen Ansatz, da vier unterschiedliche Farbstoffe verwendet werden. 2 μ l Premix, 2 μ l Reaktionspuffer (5 \times), 1 μ l Primer (15 ng/ μ l) werden mit 5 μ l (200 ng) zu sequenzierender DNA vermischt und mit Paraffinöl überschichtet. Der Ansatz wird für 10 min bei 96 °C denaturiert, bevor folgender Zyklus 25 mal wiederholt wird:

Denaturierung	15 s	94 °C
Annealing	15 s	50 °C
Elongation	4 min	60 °C

Nach Ende der Reaktion wird der Ansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 80 μ l H₂O_{dest}, 10 μ l Natriumacetat (3 M, pH 4,8) und 250 μ l Ethanol (100 %) die DNA gefällt. Nach Inkubation auf Eis für 10 min wird die DNA bei 4 °C für 20 min bei 30000 g pelletiert, mit 250 μ l Ethanol (70 %) gewaschen und das Pellet für 2 min in der Speed-Vac getrocknet. Für die automatische Sequenzierung werden die Proben in 25 μ l Ladepuffer (Formamid (50 %); EDTA (2,5 mM, pH 8,0)) resuspendiert. Nach maschineller Analyse kann die Sequenz überprüft und ausgewertet werden.

3.1.18. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung sehr großer DNA-Fragmente (bis zu 700 kb). Sie dient unter anderem dazu, Bakterien-Stämme zu charakterisieren und analysieren. Die Auftrennung findet nicht in einem konstanten elektro-magnetischen Feld statt, sondern in einem Wechselfeld, dessen Elektroden hexagonal angebracht sind. Diese Anordnung ermöglicht es auch bei langsam wandernden DNA-Fragmenten eine sichtbare Wanderung zu erkennen.

Präparation chromosomaler DNA aus Staphylokokken Um die empfindliche chromosomale DNA vor Scherkräften und anderen schädlichen Einflüssen zu schützen, werden die Bakterienzellen vor der Behandlung in Agarose-Blöckchen eingebettet.

2 ml einer 10-ml-Übernachtkultur (LB-Medium + 1% Glycin) werden abzentrifugiert (5 min, 5000 g) und zweimal in je 1 ml SE-Puffer gewaschen, bevor man sie in 500 µl SE-Puffer aufnimmt. Während 2%ige LGT-Agarose zum Schmelzen gebracht wird, erwärmt man die Bakteriensuspension auf 37°C und mischt anschließend beide nach Zugabe von 20 µl Lysostaphin (2 mg/ml) im Verhältnis 1:1 (je 500 µl). Danach wird der Ansatz sofort in einen vorbereiteten Gießstand für Agaroseblöckchen gegeben. Sind sie erkaltet, schneidet man die Blöckchen in 2 mm × 3 mm große Stückchen, gibt diese in 3 ml EC-Puffer und inkubiert sie unter Schütteln für 1 h bei 37°C. Der Puffer wird anschließend durch 3 ml neuen EC-Puffer (+ 1 mg/ml Proteinase K) ersetzt und über Nacht im Wasserbad geschüttelt. Um die Proteinase K vollständig aus den Blöckchen zu entfernen, werden sie am nächsten Tag viermal für 15 min mit je 10 ml TE-Puffer gewaschen. Die Blöckchen können dann sofort bei 4°C aufbewahrt werden (Mindestens eine Woche vor der ersten Verwendung).

Restriktionsspaltung der DNA Da Staphylokokken ein AT-reiches Genom besitzen, haben sich die Enzyme *SmaI* und *SstII* bewährt, da sie nur selten schneiden und somit ein deutliches Bandenmuster erzeugen können. Ein Blöckchen wird in 500 µl des Restriktionspuffers für 1 h bei 50°C vorinkubiert. Danach wird der Puffer entfernt und durch 100 µl frischen Puffer ersetzt. Es werden 20 U des entsprechenden Enzyms zugegeben und für 4 h bei 25°C (*SmaI*) bzw. 37°C (*SstII*) inkubiert.

Gießen des Gels und Elektrophorese Zum Gießen des Gels wird zunächst der Kamm für die Taschen waagrecht gestellt und die Blöckchen vorsichtig an ihm angebracht. Als Längenstandard wird entweder der „Lambda Ladder PFG Marker“ oder mit *SmaI* geschnittene DNA des kartierten Stammes *S. aureus* 8325/4 verwendet. In die Gießvorrichtung wird ein 1%iges Agarose-Gel (0,5×TBE) gegossen. Bevor das Gel erstarrt ist, setzt man vorsichtig den Kamm mit den Blöckchen ein. Ist das Gel erkaltet, zieht man den Kamm heraus und legt das Gel in die Elektrophorese-Apparatur. Hier wird das „CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis System“ von BIO-RAD verwendet. Das verwendete Programm richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Kleinere Fragmente werden besser bei kurzen Pulszeiten, größere Fragmente bei längeren getrennt.

Normale Auftrennung:	10 h	5–40 s
	10 h	0,5–10 s
Auftrennung größerer Fragmente:	16 h	5–40 s
	6 h	0,5–10 s
Auftrennung kleinerer Fragmente:	18 h	1–10 s

3.1.19. Southern Blot-Analyse

Mittels Southern Blot wird die elektrophoretisch aufgetrennte DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran übertragen und kann mit einer geeigneten Sonde analysiert werden.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten Die chromosomale DNA wird zunächst mit einem geeigneten Enzym (z. B. *EcoRI*) über Nacht geschnitten und in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem angelegten Lineal unter UV-Licht fotografiert. Anschließend spült man das Gel kurz in Wasser und schwenkt es für 15 min in der Depurinierungslösung. Es folgen 15 min Denaturierungslösung und 15 min Neutralisierungslösung. Das Gel wird kurz gewässert und der Blot aufgebaut.

Southern Blot Ca. 500 ml Transferpuffer werden in eine Wanne gegeben und diese mit einer Glasplatte abgedeckt. Über die Platte legt man einen Streifen Whatmanpapier, der mindestens so breit wie das Gel ist, und an beiden Seiten in den Transferpuffer eintaucht. Darauf legt man luftblasenfrei das Gel. Dieses wird nun mit einer, auf die richtige Größe zugeschnittenen Nylonmembran, sowie drei weiteren Whatmanpapierstücken bedeckt. Darüber einen 10 cm hohen Stapel Papiertücher und eine Glasplatte zur besseren Gewichtsverteilung. Den Abschluss bildet ein ca. 500 g schweres Gewicht. Über Nacht werden nun die DNA-Fragmente durch die Kapillarkräfte auf die Membran transferiert und am nächsten Tag nach dem Trocknen mit dem UV-Crosslinker fixiert. Die Membran kann nun mit einer geeigneten Sonde hybridisiert werden.

Herstellung der Sonde Die Detektion spezifischer Banden geschieht mit dem **Enhanced Chemiluminescent Labeling System** der Firma Amersham. Dabei werden komplett denaturierte DNA- oder RNA-Sonden mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und zur Hybridisierung verwendet. Das Enzym ist hierbei an einen Polymer gekoppelt, der zunächst durch ionische Wechselwirkungen an die DNA bindet und mit Glutaraldehyd kovalent verknüpft wird. Für die Sondenherstellung werden 200–400 ng DNA verwendet (in 20 µl H₂O), die für 5 min bei 100°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis stabilisiert wird. Dann werden 10 µl Labeling Reagenz zugegeben, gemischt und mit 10 µl Glutaraldehyd versetzt. Die Sonde wird 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Hybridisierung, Waschen und Entwickeln der Membran Zunächst wird die Membran vorhybridisiert. Dazu schwenkt man sie kurz in SSC (5×) und gibt sie mit 20 ml Hybridisierungspuffer in ein Hybridisierungsröhrchen und inkubiert sie für 2 h bei 42°C im Hybridisierungssofen. Dadurch werden alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran besetzt

und die Sonde kann anschließend nur an die DNA binden. Nach der Vorhybridisierung wird die markierte Sonde zugegeben und über Nacht weiter inkubiert. Man verwirft den Hybridisierungspuffer und wäscht die Membran zweimal für 10 min bei 55 °C mit Waschpuffer I (0,4% SDS, 0,1–1× SSC). Der Anteil an SSC bestimmt die Stringenz des Signals. Je geringer die Konzentration an SSC im Waschpuffer ist, desto stringenter. Anschließend wird die Membran zweimal für 5 min bei Raumtemperatur mit Waschpuffer II (2× SSC) gewaschen. Die Waschlösung wird entfernt und die Membran mit der Detektionslösung überschichtet. Die Lösung wird im Verhältnis 1:1 aus zwei Einzellösungen gemischt. Detektionslösung I zerfällt dann in Wasserstoffperoxid, das der Meerrettich-Peroxidase als Substrat dient. Das Luminol in Detektionslösung II wird oxidiert, wobei Licht emittiert wird, welches auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

3.1.20. Dot-Blot

Der Dot-Blot bietet die Möglichkeit, eine DNA-Lösung direkt auf einer Nylonmembran zu fixieren. Auf diese Weise lassen sich eine größere Anzahl an Stämmen auf das Vorhandensein bestimmter Genabschnitte überprüfen. Die Nylonmembran wird in eine Apparatur eingespannt, an der ein Vakuum anliegt, sodass die Probenflüssigkeit und der Transferpuffer SSC (10×) hindurch gesaugt werden können. Die DNA wird anschließend mit UV-Licht auf der Membran fixiert und kann wie in 3.1.19 beschrieben detektiert werden.

3.1.21. Elution markierter Sonden von Nylonmembranen

Zur nochmaligen Verwendung von Nylonmembranen, können die markierten Sonden durch stringentes Waschen entfernt werden. Um eine irreversible Bindung der Sonden an die Oberfläche zu verhindern, darf die Membran zu keinem Zeitpunkt ausgetrocknet sein. Die Nylonmembran wird zur Elution für 15 min mit heißem Elutionspuffer gewaschen. Dafür werden 200 ml Puffer [SSC (0,05×), EDTA (10 mM, pH 8,0)] aufgekocht und mit 2 ml SDS (10%) versetzt. Anschließend folgt ein zweiter Waschschritt mit 200 ml heißem Puffer ohne Zusatz von SDS. Zuletzt wird die Membran in SSC (0,01×) für 10 min bei RT inkubiert und anschließend auf Whatmanpapier getrocknet. Danach kann sie für weitere Hybridisierungen verwendet werden.

3.2. Arbeiten mit RNA

3.2.1. Isolierung der Gesamt-RNA aus Staphylokokken

20 ml TSB-Medium werden mit 50 µl einer Übernachtskultur beimpft und 3–4 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert ($OD_{550} \approx 2$). Die Kultur wird anschließend mit der gleichen Menge *RNAprotect* (Qiagen) versetzt, sofort gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Dabei

3. Methoden

werden die Zellen fixiert und weitere RNA-Transkription verhindert. Der Ansatz wird für 10 min bei 8000 *g* zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen können nun für bis zu 2 Wochen bei -20°C aufbewahrt werden.

Zur Isolierung der RNA wird das Pellet in 1,5 ml RLT-Puffer resuspendiert und in ein FastPrep-Röhrchen mit vorbereiteten Glaskügelchen gegeben. Nun werden die Zellen für zweimal 30 s auf Stufe 6,5 in der FastPrep aufgebrochen und sofort auf Eis abgekühlt. Um die Glaskügelchen aus dem Ansatz zu entfernen, wird das Röhrchen für 10 s bei 30000 *g* zentrifugiert und der Überstand (ca. 1 ml) mit dem gleichen Volumen Ethanol (70 %) versetzt. Das Lysat wird auf eine *RNeasy* Mini-Säule gegeben und 15 s bei 8000 *g* zentrifugiert. Da das maximale Beladungsvolumen der Säulchen 700 µl beträgt, wird dieser Schritt dreimal wiederholt. Anschließend wird die gebundene RNA zweimal mit je 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Die RNA kann nun mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert werden.

3.2.2. Northern Blot-Analyse

Beim Umgang mit RNA ist besonders darauf zu achten, dass während der Arbeit keine Kontamination mit RNasen auftritt. Deshalb sollten ständig Handschuhe getragen, und RNase-freies Wasser verwendet werden. Um RNasen aus destilliertem Wasser zu entfernen wird es mit 0,1 % DEPC versetzt, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend 30 min autoklaviert.

Elektrophoretische Auftrennung von RNA-Fragmenten Zunächst wird das Gel hergestellt. Dazu kocht man 2,1 g Agarose in 150 ml RNase-freiem Wasser auf und kühlt sie im Wasserbad auf 60°C ab. Nun werden 5,25 ml Formaldehyd (37 %) und 17 ml MOPS-Puffer (10×) zupipettiert, gut gemischt und unter dem Abzug in die Gießvorrichtung gegossen. Nach Erkalten und Entfernen des Kamms muss das Gel für 30 min in MOPS-Puffer äquilibrieren. Währenddessen werden die RNA-Proben vorbereitet. Um für den Blot eine ausreichende Menge zu haben, werden 10–15 mg RNA mit RNA-Probenpuffer (5×) versetzt und 5 min bei 65°C gekocht. Nach Abkühlen auf Eis für 1 min werden die Proben kurz zentrifugiert und sofort aufgetragen. Als Längenstandard wurde die 0,24 kb–9,5 kb RNA Ladder (Invitrogen) benutzt. Die Elektrophorese findet bei 120 V für ca. 3 h statt. Danach wird das Gel 30 min in RNase-freiem Wasser gewässert, mit SybrGreen II (Sigma) gefärbt und im Typhoon zur Kontrolle eingescannt.

Transfer auf die Nylonmembran Der Transfer auf eine Nylonmembran geschieht im Wesentlichen genauso, wie beim Southern Blot, nur entfallen hier Depurinierung, Denaturierung und Neutralisation. Das Gel wird 5 min in RNase-freiem Wasser, anschließend 5 min in SSC (2×) geschwenkt und der Kapillar-Blot wie beschrieben aufgebaut. Als Puffer wird

hier jedoch SSC (10×) verwendet. Am nächsten Tag wird der Blot abgebaut, die Membran kurz in SSC (5×) geschwenkt und im UV-Crosslinker kovalent gebunden. Die Membran wird getrocknet und kann nun mit einer Sonde hybridisiert werden.

3.2.3. *In-vitro*-Transkription mit T7-RNA-Polymerase

Für die Herstellung von RNA-Sonden wird zunächst der Bereich, welcher als Sonde verwendet werden soll, mittels PCR amplifiziert. Dabei wird ein Primer am 5'-Ende mit der Promotor-Sequenz der T7-RNA-Polymerase (CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA) versehen. Das PCR-Fragment wird in einen passenden Vektor kloniert und in *E. coli* DH5α transformiert. Mit der Plasmid-Mini-Präparation kann eine genügend große Menge isoliert werden. Zur *in-vitro*-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase (New England Biolabs) werden zunächst 1 µg Plasmid-DNA, 4 µl Transkriptions-Puffer (5×), 4 µl Labeling-Mix, 2 µl T7-RNA-Polymerase, 1 µl RNaseOUT (Invitrogen) und RNase-freies Wasser in einem Volumen von 20 µl gemischt. Der Ansatz wird 1 h bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung der DNA nach der Transkription werden 2 µl DNase I (Roche) zugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 2 µl EDTA (200 mM, pH 8,0) abgestoppt. Anschließend wird die RNA mit 2,5 µl LiCl (4 M) und 75 µl Ethanol (96 %) über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wird die RNA für 15 min bei 4°C und 30000 g pelletiert. Das Pellet wird mit 100 µl Ethanol (70 %) gewaschen und 1 min in der SpeedVac getrocknet. Das Pellet wird in 100 µl RNase-freiem Wasser und 1 µl RNaseOUT aufgenommen.

3.2.4. PCR mit cDNA (RT-PCR)

Bevor RNA für die cDNA-Synthese verwendet werden kann, muss sichergestellt sein, dass sich keine chromosomale DNA mehr im Ansatz befindet. Dazu werden 30 µl der RNA mit 10 µl RNase-freiem Wasser, 5 µl One-Phor-All-Puffer (Pharmacia) und 5 µl DNase I (Roche) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend reinigt man die RNA mit dem RNeasy Kit von Qiagen auf, wie vom Hersteller beschrieben, und eluiert die gereinigte RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser. Mit Hilfe des Photometers bestimmt man die Konzentration der gereinigten RNA. Für die folgende cDNA-Synthese mit der Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) werden 2 µg der RNA eingesetzt. Mit 1 µl Random Hexamer Primer (1 mg/ml, Pharmacia), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und RNase-freiem Wasser wird ein Volumen von 13 µl eingestellt. Der Ansatz wird für 5 min auf 65°C erhitzt und danach mindestens 1 min auf Eis abgekühlt. Nach Hinzufügen von 4 µl First-Strand-Puffer (5×), DTT (100 mM), 1 µl RNaseOUT und 1 µl Superscript III Reverse Transkriptase wird der Ansatz für 5 min bei 25°C, dann 45 min bei 55°C inkubiert. Im Anschluss daran wird eine alkalische Hydrolyse durchgeführt. Es werden 5 µl NaOH (1 M) zugegeben und 10 min bei 65°C inkubiert. Durch Zugabe von 12,5 µl Tris/HCl (1 M, pH 7,5) wird die Hydrolyse gestoppt. Für die nun folgende PCR werden 1 µl der cDNA verwendet.

3.2.5. Bestimmung der Enden von RNA-Transkripten

Primer Extension zur Bestimmung des 5'-Endes von RNAs

Nachdem die Gesamt-RNA aus Bakterien isoliert worden ist, kann durch die *Primer Extension* der Transkriptions-Startpunkt bestimmt werden. Das mit einem Infrarot-Farbstoff markierte Oligonukleotid wird so gewählt, dass die cDNA-Synthese in Richtung des 5'-Endes der mRNA stattfindet. Die cDNA-Synthese bricht am 5'-Ende der mRNA ab und es entstehen gleich lange markierte cDNA-Fragmente. Für die reverse Transkription wird die Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) benutzt. 5 µg Gesamt-RNA (DNA-frei) werden mit 4 pmol des Oligonukleotids in einem Volumen von 15 µl angesetzt. Um eine optimale Hybridisierung zu erreichen, wird die RNA zunächst 2 min auf 90 °C erhitzt und dann schrittweise abgekühlt: je 7 min 80 °C, 65 °C, 45 °C und 30 °C. Die cDNA-Synthese wird durch Zugabe von 5 µl dNTPs (20 mM), 6 µl First-Strand-Puffer (5×), 1,5 µl DTT (100 mM) und 1,5 µl Superscript III Reverse Transkriptase gestartet. Nach Inkubation für 1,5 h bei 54 °C wird die Reaktion mit 4 µl RNase-Puffer und 20 min bei 37 °C gestoppt. Die Proteine werden mit 0,1 vol. NaAc (2,5 M, pH 4,8) denaturiert. Die cDNA fällt nach Zugabe von 3 vol. Ethanol (100 %) und 1 h bei -20 °C aus. Die DNA wird 15 min bei 30000 g pelletiert und mit Ethanol (70 %) gewaschen. Das bei RT getrocknete Pellet wird in 1 µl Wasser gelöst und mit 3 µl Sequenzier-Puffer versetzt.

Mit dem gleichen markierten Oligonukleotid wird eine Sequenzierreaktion des Bereiches um den vermuteten Transkriptionsstart durchgeführt. Trägt man beide Proben, die cDNA und die sequenzierte DNA, nebeneinander auf ein Sequenz-Gel auf, läuft die Bande der cDNA auf Höhe der Base, welche den Transkriptionsstart bezeichnet.

5'- und 3'-RACE

Mit der Methode der **R**apid **A**mplification of **c**DNA-**E**nds (RACE) lassen sich auf einfache Weise das 5'- und 3'-Ende von RNAs bestimmen. Beide Protokolle beruhen darauf, dass die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben wird. Aus dieser kann mit spezifischen Oligonukleotiden in einer PCR ein Fragment amplifiziert werden, welches den Beginn, bzw. das Ende des RNA-Transkripts enthält und sequenziert werden kann. In dieser Arbeit wurde das „5'/3' RACE Kit 2nd Generation“ der Firma ROCHE verwendet.

5'-RACE Die Bestimmung des 5'-Endes von RNA-Strängen ist etwas aufwändiger, da mehrere Schritte bis zur Sequenzierung notwendig sind. Zunächst wird mit Hilfe eines spezifischen Oligonukleotids, welches komplementär zur RNA ist und in Richtung deren 5'-Ende weist, durch reverse Transkription cDNA synthetisiert. Diese besitzt nun einen bekannten Startpunkt (das Oligonukleotid) und ein unbekanntes Ende (komplementär zum 5'-Ende der RNA). Das Enzym *Terminale Transferase* kann an das 3'-Ende der cDNA

Poly(A) anfügen. Dieser Poly(A)-Schwanz dient jetzt als Bindungsstelle für einen Oligo-d(T)-Primer (5'-GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTT TTT TTT TTT TTT TTV-3').¹ Mit diesem und dem spezifischen Oligonukleotid kann eine PCR durchgeführt werden, welche ein Produkt ergibt, an dessen einem Ende nun die Sequenz des Oligo-d(T)-Oligonukleotids zu finden ist. An dieser Stelle befindet sich das 5'-Ende des RNA-Transkripts. Die genaue Vorgehensweise ist dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

3'-RACE Da vor allem eukaryontische, aber auch prokaryontische RNAs als Schutz vor Degradation am 3'-Ende einen mehr oder weniger langen Poly(A)-Schwanz besitzen, ist für die Bestimmung des 3'-Endes keine Addition von Poly(A) notwendig. Die cDNA-Synthese kann direkt mit dem Oligo-d(T)-Primer stattfinden. Anschließend wird erneut mit einem spezifischen Oligonukleotid und einem zur Sequenz des Oligo-d(T)-Primers komplementären Oligonukleotid eine PCR durchgeführt und das entstandene Produkt sequenziert. Analog kann somit das 3'-Ende des RNA-Transkript bestimmt werden.

3.2.6. Elektrophoretischer Mobilitäts-*Shift*-Assay (EMSA)

Werden Nucleinsäuren von Proteinen gebunden, so verändert sich ihre Wanderungsgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel. Protein-Nucleinsäure-Komplexe wandern langsamer als die Nucleinsäure alleine. Auf diese Weise kann man die Eigenschaft von Proteinen zur Bindung von DNA oder RNA untersuchen. Für die Analyse von RNA wird zunächst der Bereich, welcher interessiert, mit Hilfe von T7-RNA-Polymerase-Primern amplifiziert, sodass man eine genügend große Menge an RNA-Transkript erhält (siehe Abschnitt 3.2.3). 2 fmol RNA und 2 pmol Hfq werden mit RNA-Bindungspuffer in einem Volumen von 20 µl für 10 min bei 37°C inkubiert, bevor der Ansatz mit 2 µl Ladepuffer auf ein 5%iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und in TBE-Puffer (0,5 ×) für 2–3 h bei 150 V elektrophoretisch aufgetrennt wird. Nach dem Lauf wird die Nucleinsäure durch Elektroblob auf eine Nylonmembran übertragen (siehe Abschnitt 3.3.3) und kann mit einer ECL-Sonde identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.1.19).

3.3. Arbeiten mit Protein

3.3.1. Isolierung His-markierter Proteine aus *E. coli*

Zur Isolierung des Hfq-Proteins aus *S. epidermidis* wurde das „QIAexpressionist Kit“ der Firma Qiagen benutzt. Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise ist im Handbuch zu finden. Mit 10 ml einer Übernachtskultur impft man 400 ml LB-Medium (100 mg/ml Amp, 25 mg/ml Km) an und inkubiert die Kultur unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 0,6. Nach Induktion der Expression wird durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration

¹V steht für A, C oder G. Verwendet wird ein Mix aus den drei Kombinationen

3. Methoden

1 mM) die Kultur für weitere 4 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen werden durch Zentrifugation (8000 g, 20 min) pelletiert und in 10 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Man fügt 1 ml Lysozym (10 mg/ml) hinzu und inkubiert 30 min auf Eis. Anschließend werden die Zellen durch Sonifikation (6 × 30 s, 300 W, 4°C) aufgeschlossen. Das Lysat wird für 30 min bei 30000 g zentrifugiert und der Überstand bei 4°C aufbewahrt.

Über eine Ni-NTA-Säule kann nun das His-markierte Protein aufgereinigt und konzentriert werden. Die genaue Vorgehensweise ist im Handbuch des Herstellers (Machery-Nagel) nachzulesen.

3.3.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen nutzt man 10–15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele. Zur guten Auftrennung des nur ca. 9 kDa kleinen Hfq-Proteins wird ein 15%iges Trenngel folgender Zusammensetzung verwendet:

H ₂ O	1,1 ml
Tris/HCl (1 M, pH 8,8)	1,3 ml
SDS (10 %)	50 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	2,5 ml
APS (10 %)	50 µl
TEMED	2 µl

Das Trenngel wird nach Zugabe des Radikalbildners TEMED zwischen zwei Glasplatten gegossen, die mit 1 mm breiten *spacern* auseinander gehalten werden. Das Gel überschichtet man sofort mit Wasser oder Isopropanol, um eine gerade, luftblasenfreie Kante zu erhalten. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, kann der Isopropanol entfernt, und das Sammelgel gegossen werden:

H ₂ O	1,7 ml
Tris/HCl (1 M, pH 6,8)	0,8 ml
SDS (10 %)	30 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	0,5 ml
APS (10 %)	30 µl
TEMED	3 µl

Anschließend setzt man den Kamm in das noch flüssige Gel und lässt es auspolymerisieren. Das fertige Gel setzt man in die Elektrophoresekammer ein und spült die Kammern mit Laufpuffer aus. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei konstanten 150 V. Um die Proteine sichtbar zu machen, färbt man das Gel für ca. 20 min mit Comassie-Lösung. Den überschüssigen Farbstoff entfernt man aus dem Gel durch sanftes Schwenken in Entfärbelösung für ca. 30 min.

3.3.3. Western Blot-Analyse

Zum Nachweis des His-markierten Hfq-Proteins werden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. His-Hfq kann immunologisch mittels His-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Zunächst erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Es werden zwei Gele auf die gleiche Weise beladen. So kann eines angefärbt werden, um den korrekten Lauf zu überprüfen, während das andere direkt für den Western Blot verwendet wird. Proteine aus Polyacrylamidgelen werden im elektrischen Feld zwischen zwei Graphitplatten auf die Membran übertragen. Auf die mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ befeuchtete Anodenplatte werden sechs mit Anodenpuffer I und drei mit Anodenpuffer II getränkte Whatmanpapiere gelegt und mit der ebenfalls in Anodenpuffer II angefeuchteten Nitrocellulosemembran luftblasenfrei überdeckt. Darauf platziert man, ebenfalls ohne Luftblasen, das Gel sowie drei in Kathodenpuffer getränkte Whatmanpapiere und die feuchte Kathodenplatte. Der Transfer erfolgt nun für 1 h bei konstanten 44 mA.

Die Membran wird zweimal für 10 min in TBS-Puffer bei RT gewaschen und anschließend für 1 h in Blockpuffer (3 % BSA (w/v) in TBS-Puffer) bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Nach weiteren Waschschritten in TBST-Puffer (2×10 min, RT) und TBS-Puffer (10 min, RT) hybridisiert man den Blot über Nacht bei 4 °C mit dem primären (α -His-)Antikörper (1/1500-Verdünnung in Blockpuffer). Am nächsten Tag wäscht man die Membran zweimal für 10 min in TBST-Puffer und anschließend für weitere 10 min in TBS-Puffer bei RT. Nach Zugabe des sekundären (α -Maus-)Antikörpers, an welchen das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, inkubiert man eine weitere Stunde bei RT. Zuletzt entfernt man den zweiten Antikörper und wäscht die Membran viermal für 10 min in TBST-Puffer bei RT und detektiert die Signale mit Hilfe des ECL-Systems wie in Abschnitt 3.1.19 beschrieben.

3.3.4. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Roti-Nanoquant beruht auf einer Modifikation der Bradford-Methode (Bradford 1976; Zor u. Selinger 1996). Mit ihr lassen sich Proteinmengen ab 200 ng bestimmen. Zunächst wird eine Eichkurve mit definierten BSA-Konzentrationen von 1–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erstellt. Dazu mischt man je 200 μl Standard mit 800 μl Roti-Nanoquant und misst die Optische Dichte gegen reines Wasser bei 590 nm und 450 nm. Der Quotient $\text{OD}_{590}/\text{OD}_{450}$ wird gegen die eingesetzte Proteinmenge in ein Koordinatensystem aufgetragen. Die Proteinmenge der Probe kann nun analog bestimmt werden. 200 μl der Proteinlösung werden mit 800 μl Roti-Nanoquant vermischt und die OD_{590} sowie OD_{450} gemessen. Anhand des errechneten Quotienten $\text{OD}_{590}/\text{OD}_{450}$ kann aus dem Eichdiagramm die Proteinmenge abgelesen werden.

3.4. Phänotypische Tests

Adhärenztest zur Biofilmbildung

Eine einfache Möglichkeit zur Analyse der Fähigkeit, Biofilm zu bilden, stellt der Adhärenztest dar. Von einer Übernachtskultur stellt man eine Verdünnung in entsprechendem Medium her, welches die zu untersuchenden Bedingungen (Minimalmedium, Salzstress, osmotischer Stress, ...) bietet. Nun befüllt man eine Spalte (8 Wells) einer 96-Well-Mikrotiterplatte je Kultur (200 μ l pro Well). Als Positivkontrolle wird der starke Biofilmbildner *S. epidermidis* RP62A, als Negativkontrolle *S. carnosus* TM300 verwendet. Die Platte inkubiert über Nacht bei entsprechender Temperatur. Am nächsten Tag verwirft man den Überstand und wäscht die Mikrotiterplatte dreimal mit PBS (1x). Nachdem der Biofilm bei 60°C hitzefixiert wurde, färbt man vorhandenen Biofilm mit Kristallviolett-Lösung. Mittels ELISA-Reader kann man die Dichte des Biofilms bei 530 nm messen. Werte unter 0,12 ($3\times$ Negativkontrolle) gelten als nicht adhärent, zwischen 0,12 und 0,24 als schwach und Werte über 0,24 als stark adhärent.

3.5. Genomvergleich durch Microarrayanalyse

3.5.1. Indirekte Markierung chromosomaler DNA

Microarrays lassen sich nicht nur zur Transkriptomanalyse verwenden. Sie können auch für Genomvergleiche benutzt werden. Dazu stellt man markierte DNA-Sonden her, die das ganze Genom umfassen. Zunächst werden die Sonden hergestellt. Dazu löst man 2 μ g chromosomale DNA in einem Volumen von 24 μ l H_2O_{dest} . Für die Markierung wird das „Bio-prime Labeling Kit“ der Firma Invitrogen verwendet. Dabei werden in die entstehenden Sonden Aminoallyl-dUTP-Moleküle eingebaut. Diese können später mit einem entsprechenden Farbstoff gekoppelt werden. Die DNA wird für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt, um eine Rehybridisierung der Stränge zu verhindern. Danach fügt man 1 μ l High-Fidelity-Klenow und 5 μ l dNTP-Mix hinzu und inkubiert für 1 h bei 37°C. Durch Zugabe von 5 μ l EDTA (0,5 M, pH 8,0) stoppt man die Reaktion ab.

Die markierten Sonden werden über eine Säule des „QIAquick PCR Purification Kits“ aufgereinigt. Der Markierungsansatz wird mit 45 μ l H_2O_{dest} aufgefüllt, mit 500 μ l Puffer PB (Qiagen) versetzt, auf die Säule gegeben und für 1 min bei 20000 *g* zentrifugiert. Die gebundenen Sonden werden mit 750 μ l Phosphatpuffer gewaschen (1 min, 20000 *g*). Um Reste des Waschpuffers zu entfernen wird die Säule anschließend nochmals für 1 min zentrifugiert. Mit 30 μ l erwärmten H_2O_{dest} wird die DNA von der Säule eluiert (1 min, 20000 *g*) und in der SpeedVac getrocknet.

Die folgenden Schritte müssen, da die Farbstoffe Cy3 (grün) und Cy5 (rot) lichtempfindlich sind, möglichst im Dunkeln geschehen. Zumindest nicht im direkten Sonnenlicht. Das

getrocknete DNA-Pellet wird in 4,5 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgenommen und mit 4,5 μl des entsprechenden Farbstoffes vermischt. Der Ansatz wird für 1 h bei RT inkubiert. Die Reaktion stoppt man durch Zugabe von 4,5 μl Hydroxylamin (4 M) und inkubiert für 15 min. Anschließend müssen die fertigen Sonden wieder aufgereinigt werden. Dies geschieht im Prinzip wie oben beschrieben. Der Ansatz wird mit 87 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgefüllt und mit 500 μl Puffer PB vermischt. Für den Waschschrift verwendet man jedoch den im Kit enthaltenen Puffer PE. Die Sonde wird mit 30 μl warmem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ eluiert und mit 0,5 μl Hefe-tRNA (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt. Bevor nun die Sonden vereinigt werden, überprüft man auf einem Agarosegel, ob die Markierung erfolgreich war. Dann trocknet man die Ansätze in der SpeedVac und löst beide Sonden in Formamidpuffer in einem Endvolumen von 50 μl .

3.5.2. Hybridisierung und Auswertung des Microarrays

Die Probe wird für 2 min auf 95 °C erhitzt und anschließend sofort auf den, bereits in der Hybridisierungskammer liegenden Array gegeben und mit einem entsprechenden Deckglas bedeckt. Die Kammer wird verschlossen und für 72 h bei 43 °C inkubiert. Dies kann entweder im Wasserbad, oder in einem Brutschrank erfolgen.

Nach der Hybridisierung muss der Microarray gewaschen werden um nicht gebundene Sonden und Puffer zu entfernen. Dazu schwenkt man den Array für je 10 min bei RT in den Waschpuffern 1 (0,2% SDS, 2 \times SSC), 2 (2 \times SSC), 3 (0,2 \times SSC) und 4 (0,1 \times SSC). Anschließend trocknet man den Microarray in einer Zentrifuge für 5 min bei geringer Geschwindigkeit, bevor er mit dem GenePix-Scanner (Axon) eingelesen werden kann.

3.6. Rechner-gestützte Analyse-Methoden

Für Genom-Vergleiche wird das *Basic Local Alignment Tool* (BLAST) verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, (Altschul *et al.* 1990)). Die grafische Darstellung der Vergleiche wird durch das *Artemis Comparison Tool* (<http://www.sanger.ac.uk/Software/ACT/>) realisiert, die Annotation des Deletionsbereiches mit *Artemis* (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>). Die Analyse und Bearbeitung der Sequenzen und Alignments wurde mit *BioEdit* durchgeführt (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Die Primer werden mit *FastPCR* entworfen. (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/fastpcr.htm). Sekundärstrukturen wurden mit *mfold* vorhergesagt [<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>, (Zuker 2003)].

4. Ergebnisse

4.1. Sequenzierung und Beschreibung der Deletion von *S. epidermidis* 307/9

4.1.1. Sequenzierung des Deletionsbereiches

Wie bereits von Lößner (2002) beschrieben, führt die Transposition des mobilen Elements IS256 zur Inaktivierung der Biofilmbildung durch Insertion in das *icaADBC*-Operon. IS256 ist jedoch auch an einem weiteren Mechanismus zum Verlust der Biofilmbildung beteiligt. Während es im ersten Fall aktiv im Genom von einer Stelle an eine andere transponiert, ist es bei letzterem passiv involviert, wobei durch homologe Rekombination zweier IS256-Kopien Teile des Genoms deletieren. I. Lößner konnte in ihrer Arbeit mehrere *ica*-Deletionsmutanten identifizieren. Der größte Deletionsbereich von ca. 260 kb Länge sollte im Rahmen dieser Arbeit sequenziert und annotiert werden.

Dazu wurde zunächst in einer Cosmid-Genbank des Stammes *S. epidermidis* 307 nach Klonen gesucht, auf welchen das *icaADBC*-Operon enthalten war. Durch Dot-Blot-Analyse mit spezifischen Sonden konnten bereits vor Beginn dieser Arbeit sechs Cosmid-Klone (10, 40, 114, 130, 1015, 1072) identifiziert werden, die einen Teil des Deletionsbereiches enthielten (Lößner 2002). Anhand des veröffentlichten Genoms des pathogenen *S.-epidermidis*-Stammes RP62A konnten die Cosmid-Fragmente angeordnet werden. Die noch fehlende Lücke von ca. 4,7 kb zwischen den Fragmenten 130 und 114 wurde mit Hilfe von PCRs mit den Primern Cos130R und Cos114L, sowie dem Elongase-Enzym-Mix amplifiziert und anschließend sequenziert. Gleiches wurde für die 2,3-kb-Lücke zwischen den Fragmenten 114 und 1015 durchgeführt, die mittels der Primer Cos114R und Cos1015L amplifiziert werden konnte. In Zusammenarbeit mit Agowa (Berlin) wurden die sechs Cosmid-Klone sequenziert, sodass ca. 160 kb Sequenz vollständig und zusammenhängend ermittelt werden konnten.

Im Anschluss an das Cosmid-Fragment 1072, welches den Deletionsbereich bisher am rechten Rand abschloss, konnten mit der Dot-Blot-Analyse keine weiteren Cosmid-Klone gefunden werden. Deshalb wurden, ausgehend von der Sequenz von *S. epidermidis* RP62A, Oligonukleotide für sich überlappende PCR-Fragmente von ca. 10 kb Länge ausgewählt (,del_seq_1‘ bis ,del_seq_16‘), die sich an die Sequenz des Cosmid-Klons 1072 anschlossen. Die PCRs wurden mit dem Elongase-Enzym-Mix amplifiziert. Dabei ergaben die

4. Ergebnisse

Reaktionen von ‚del_seq_12‘ bis ‚del_seq_14‘ und ‚del_seq_16‘ keine Fragmente. Das ‚del_seq_15‘-Fragment war kürzer als erwartet. Eine genaue Analyse des Bereiches im Genom von RP62A zeigte, dass in dem Bereich von del_seq_12_1 bis del_seq_14_2 die Gene für die beiden Proteine Bhp und Aap liegen. Bap in *S. aureus* und das homologe Protein Bhp in *S. epidermidis* sind in die Biofilmbildung bei Staphylokokken involviert. Das *accumulation associated protein* (Aap) trägt zu Bildung eines proteinogenen Biofilms bei. Durch PCR mit den Primern Bap_left und Bap_right konnte jedoch gezeigt werden, dass das *bhp*-Gen in *S. epidermidis* 307 nicht vorhanden ist. Anschließend wurde eine Elongase-PCR mit den Primern del_seq_12_1 und del_seq_14_2 durchgeführt, die in einem Produkt der Länge von ca. 16–17 kb resultierte (‚del_seq_12-14‘). Die Fragmente ‚del_seq_1‘ bis ‚del_seq_9‘ und ‚del_seq_12-14‘ wurden ebenfalls von Agowa sequenziert. ‚del_seq_10‘, ‚del_seq_11‘ und ‚del_seq_15‘ wurden selbst sequenziert.

Cosmid-Fragment 10 wurde anhand von Hybridisierung der Dot-Blots mit IS256-spezifischen Sonden identifiziert. Das Insert war jedoch nur ca. 8 kb groß (s. Abb. 4.1). Die Sequenzierung ergab, dass das Transposon Tn4001 vollständig auf dem Cosmid-Klon vorhanden war. Es befanden sich zusätzlich weitere 2,7 kb am 5‘-Ende und 100 bp am 3‘-Ende des Transposons. Ein BLAST-Vergleich dieser beiden Sequenzabschnitte mit allen bekannten Sequenzen ergab zunächst keine Homologien zu bekannten Sequenzen. Erst mit der Veröffentlichung der vollständigen Genomsequenz von *S. haemolyticus* JCSC1435 (Takeuchi *et al.* 2005) konnte eine Übereinstimmung des 2,7 kb großen Sequenzbereichs gefunden werden. Die beiden weiteren auf dem Cosmid-Fragment codierten Gene CDS 1 und CDS 2 stimmten exakt mit der Sequenz von *S. haemolyticus* überein.

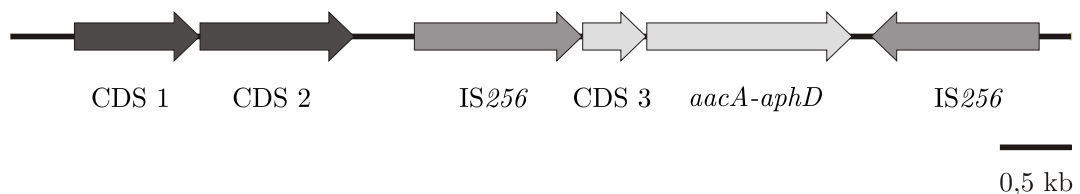


Abbildung 4.1.: Insert des Cosmids Nr. 10 (ca. 8 kb). Neben den Genen des Transposons Tn4001 weisen die beiden Leseraster CDS 1 und CDS 2 eine hohe Ähnlichkeit zur Genomsequenz von *S. haemolyticus* JCSC1435 auf.

Eine genauere Betrachtung der Umgebung des entsprechenden Bereichs im Genom von *S. haemolyticus* JCSC1435 offenbarte, dass dieser in der so genannten *orfX-ΨSCCh1-ΨSCCh2-SCCh1435-ΨSCCh3-ΨSCCmec(h1435)-ΨSCCh4*-Region lokalisiert ist. Sie ist aus fragmentierten SCC-Inseln zusammengesetzt, und besitzt nur noch eine CcrC-Rekombinase. Das *ccrC*-Gen liegt bei *S. haemolyticus* JCSC1435 ca. 10 kb stromaufwärts der zwei auf dem Cosmid-Insert vorhandenen Gene. Durch eine PCR mit den Primern *ccrC1* und *ccrC2*

konnte das *ccrC*-Gen auch in *S. epidermidis* 307 nachgewiesen werden (s. Abb. 4.4). Die PCR mit den Primern *ccrC2* und *Cos10L* lieferte ein ca. 11 kb großes Fragment, welches die Region zwischen der Rekombinase und dem Transposon *Tn4001* enthielt.

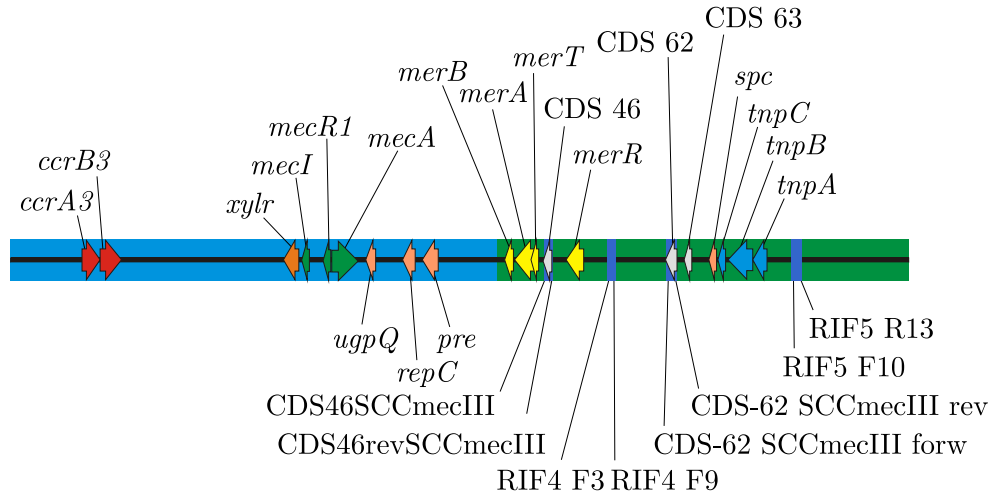


Abbildung 4.2.: *SCCmec*-Insel vom Typ III [GenBank-Nr. AB037671 (Ito *et al.* 2001)]. Es sind nur bekannte, sowie für die Sequenzierung notwendige Gene und Oligonukleotid-Bindungsstellen eingezeichnet. Chongtrakool *et al.* (2006) konnten kürzlich zeigen, dass dieses Element aus zwei kleineren, Typ 3 A *SCCmec* (blau) und *SCCmercury* (grün) besteht.

Der Stamm *S. epidermidis* RP62A besitzt eine *SCCmec*-Insel vom Typ II. Die verschiedenen *SCCmec*-Typen lassen sich anhand spezifischer PCR-Produkte in einer Multiplex-PCR bestimmen (Oliveira u. de Lencastre 2002). Für den untersuchten Stamm 307 führte die PCR zu zwei Banden, welche für *SCCmec* Typ III sprechen (Fragmente E [RIF4-F3, RIF4-R9, Länge: 243 bp] und F [RIF5-F10, RIF5-R13, Länge: 414 bp]); allerdings fehlt wiederum ein anderes, welches ebenso spezifisch für Typ III ist (Fragment C [MECI-P2, MECI-P3, Länge: 209 bp]). Auch das *mecA*-Gen ist in *S. epidermidis* 307 nicht vorhanden. Daher wurde vermutet, dass es sich hierbei um ein neuartiges SCC-Element ohne *mecA* und nur mit einer einzelnen Rekombinase *ccrC* handelt. Ausgehend von den zwei PCR-Fragmenten E und F wurde die veröffentlichte Sequenz des *SCCmec*-Typ-III-Elements näher untersucht (Abb. 4.2). Das zwischen den beiden Fragmenten E und F liegende offene Leseraster CDS62 konnte mit PCR (CDS-62_SCCmecIII-forw, CDS-62_SCCmecIII-rev) nachgewiesen werden. Eine PCR mit den Primern CDS46forSCCmecIII und CDS46revSCCmecIII resultierte im Wildtyp 307 in einem positiven Ergebnis, nicht aber in der Deletionsmutante 307/9. Eine PCR mit den Primern RIF4-F3 und CDS-62_SCCmecIII-rev, sowie CDS-62_SCCmecIII-forw und RIF5-R13 führte zu sich überlappenden Fragmenten, die beide sequenziert wurden. Um die Verbindung zur bekannten Sequenz ab *ccrC* herzustellen, wurden zwei PCRs mit

4. Ergebnisse

(i) RIF5-F10 und *ccrC*-out, bzw. (ii) RIF4-F9 und *ccrC*-out durchgeführt. Im ersten Fall resultierte die Amplifikation in einem Fragment von ca. 7 kb Länge. Nach der Sequenzierung konnten die einzelnen Fragmente zusammengesetzt werden und führten zu ca. 25 kb bisher in *S. epidermidis* noch nicht beschriebener Sequenz am 3'-Ende der Deletion (s. Abb. 4.3).

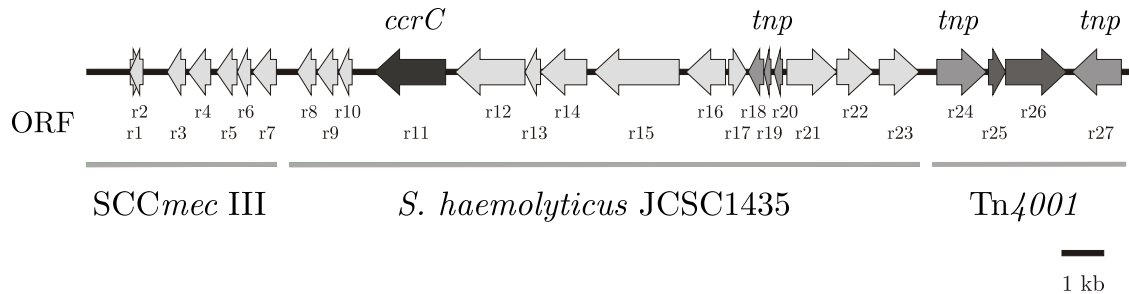


Abbildung 4.3.: Rechter Rand der Deletion (ca. 25 kb). Die CcrC-Rekombinase und das fragmentierte IS431 stammen aus *S. haemolyticus* JCSC1435. Tn4001 stellt den rechten Rand der Deletion dar. Die Annotation der einzelnen Gene ist in Anh. A aufgelistet.

Anhand der Microarray Genomvergleiche, die in Abschnitt 4.2 beschrieben sind, konnten weitere Gene identifiziert werden, die sich im noch nicht sequenzierten Deletionsbereich befanden. Mittels PCR konnten die Gene *mgo-4* (*mgo-4*-for, *mgo-4*-rev), SERP2421 (*SERP2421*-for, *SERP2421*-rev), SERP2426 (*SERP2426*-for, *SERP2426*-rev), *arsC-2* (*arsC-2*-for, *arsC-2*-rev), im Genom von *S. epidermidis* 307 nachgewiesen werden (s. Abb. 4.4).

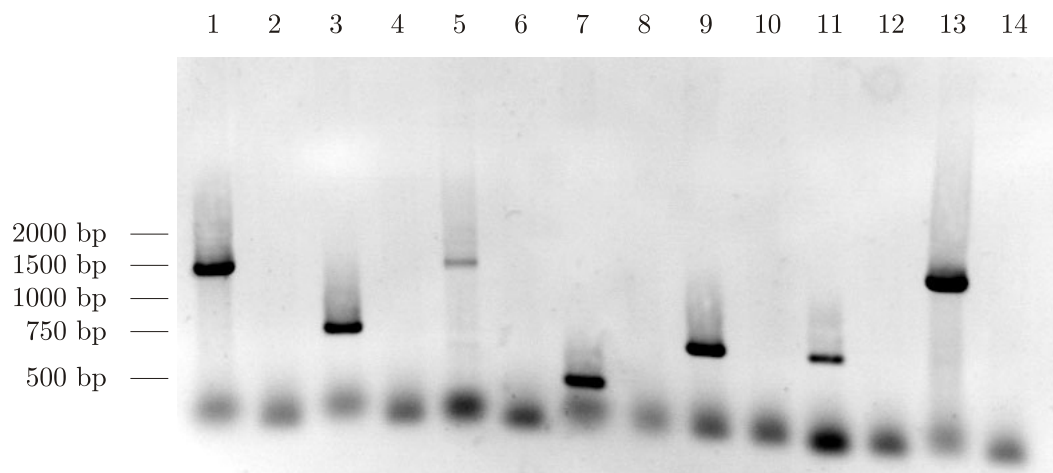


Abbildung 4.4.: PCRs zum Nachweis der deletierten Gene in *S. epidermidis* 307 WT und 307/9. 1 u. 2, *mgo-4*; 3 u. 4, SERP2421; 5 u. 6, SERP2426; 7 u. 8, *arsC-2*; 9 u. 10, CDS46 (*SCCmecIII*); 11 u. 12, CDS62 (*SCCmecIII*); 13 u. 14, *ccrC*.

4.1. Sequenzierung und Beschreibung der Deletion von *S. epidermidis* 307/9

Im Fall der Deletionsmutante 307/9 waren die PCR-Reaktionen negativ. Durch PCRs mit dem Elongase-Enzym-Mix und den Primern (i) *del_seq_15R-2* und *mqo-4-for*, (ii) *mqo-4-rev* und *SERP2421-for*, (iv) *SERP2426-rev* und *arsC-2-rev*, (v) *arsC-2-for* und *CDS46forSCCmecIII*, sowie (vi) *CDS46revSCCmecIII* und *RIF4R9-2* konnten sich überlappende Fragmente amplifiziert werden. Mit den Primern *SERP2421-rev* und *SERP2426-for* konnte mit dem Elongase-Enzym-Mix kein Fragment amplifiziert werden. Daher wurde die Phusion-Polymerase eingesetzt (s. Abschn. 3.1.14), die für schwierig zu vervielfältigende Sequenzen geeignet ist. Auf diese Weise konnte das letzte Fragment (iii) erhalten werden. Die Fragmente i–vi deckten den restlichen Bereich von ca. 45 kb ab (s. Abb. 4.5).

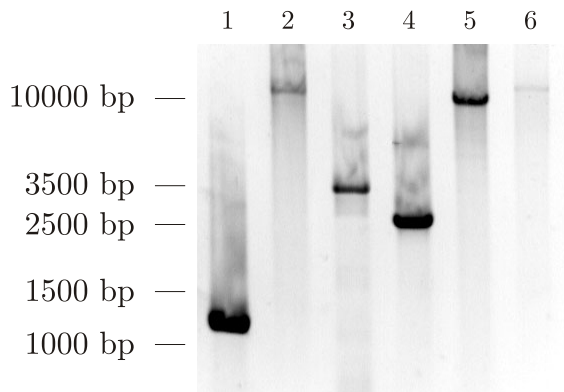


Abbildung 4.5.: PCR-Fragmente, welche linken und rechten sequenzierten Deletionsbereich verbinden. 1, i (*del_seq_15R-2*, *mqo-4-for*); 2, ii (*mqo-4-rev*, *SERP2421-for*); 3, iii (*SERP2421-rev*, *SERP2426-for*); 4, iv (*SERP2426-rev*, *arsC-2-rev*); 5, v (*arsC-2-for*, *CDS46forSCCmecIII*); 6, vi (*CDS46revSCCmecIII*, *RIF4R9-2*).

Das Fragment i enthielt die restliche Sequenz des *mqo-4*-Gens. Fragment iv Teile des *ars*-Operons das die Arsenat-Resistenz kodiert, wobei im Vergleich zu RP62A die Gene *arsA* und *arsD* fehlen. Da es im Rahmen der Arbeit technisch nicht möglich war, die PCR-Fragmente ii, iii, v und vi zu sequenzieren, ist die Sequenz der deletierten Region nicht vollständig.

4.1.2. Annotation der deletierten Region und Bioinformatik

Allgemeine Beschreibung

Insgesamt ergab sich somit eine Länge von ca. 260 kb für den Deletionsbereich. Aufgrund der starken Ähnlichkeit der Sequenz am rechten Rand der Deletion zum *SCCmercury*-Teil der *SCCmec III* Insel (s. Abb. 4.3 und Abb. 4.2) ist jedoch anzunehmen, dass homologe Gene in diesem Bereich lokalisiert sind.

Der GC-Gehalt der sequenzierten ca. 225 kb beträgt 32,67%. Er stimmt also mit dem GC-Gehalt der beiden vollständig sequenzierten *S.-epidermidis*-Stämme RP62A (32,97%) und ATCC 12228 (32,1%) überein. Der Deletionsbereich von *S. epidermidis* 307 liegt in der Region um den *oriC*, einem Bereich mit einer hohen Rekombinationsfrequenz. Im Stamm RP62A und anderen Staphylokokken-Spezies befinden sich in der ‚*oriC*-environ‘-Region auch die *SCC*-Elemente (Takeuchi *et al.* 2005).

Bioinformatik

Die Annotation des Deletionsbereiches wurde mit dem Programm Vector NTI 10.0.1 (Invitrogen) durchgeführt. Zunächst sollte die Anzahl der offenen Leseraster ermittelt werden. Für die Erkennung wurden folgende Parameter festgelegt. Start-Codons: ATG, GTG und TTG; Stopp-Codons: TAA, TGA und TAG; die minimale ORF-Länge wurde auf 300 nt gesetzt. Es konnten auf diese Weise 173 offene Leseraster identifiziert werden.

Um die Gene des Deletionsbereiches effizient zu annotieren, wurden die Vergleiche auf einem lokalen Rechner unter Microsoft WindowsXP[®] durchgeführt. Da bereits 13 Staphylokokken-Genome vollständig annotiert vorlagen, wurden diese als Basis für die Annotation verwendet. Für den Vergleich wurde das Paket `blast-2.2.14-ia32-win32` (Altschul *et al.* 1990) des NCBI verwendet, welches unter <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/LATEST/> (13.06.2006) bezogen werden kann.

Für die Annotation des Deletionsbereiches sollten die Proteinsequenzen der kodierenden Gene mit allen bereits annotierten Staphylokokken-Genomen verglichen werden. Dazu wurden zuerst alle Proteinsequenzen aus den vollständig annotierten Genomen von:

- *S. epidermidis* RP62A (CP000029.1) und ATCC 12228 (AE015929.1), sowie
- *S. aureus* COL (CP000046.1), MRSA252 (BX571856.1), MSSA467 (BX571857.1), Mu50 (BA000017.4), MW2 (BA000033.2), N315 (BA000018.3), NCTC8325 (CP000253.1), RF122 (AJ938182.1), USA300 (CP000255.1),
- *S. haemolyticus* JCSC1435 (AP006716.1),
- *S. saprophyticus* ATCC 15305 (AP008934.1) und der
- SCC*mec*-Insel vom Typ III (AB037671.1)

in einer BLAST-Datenbank erfasst. Die Proteinsequenzen mussten hierfür zunächst in eine ASCII-Datei im FASTA-Format überführt werden (`proteins.aa`). Anschließend konnte die Datenbank mit dem Befehl

```
formatdb -i proteins.aa -p T -o T
```

für die Verwendung mit `blastp` formatiert werden.¹ Die Sequenzen der innerhalb des Deletionsbereiches kodierten Proteine wurden ebenso in einer FASTAformatierten Datei gespeichert (`proteins-deletion.aa`). Für den Vergleich wurde das Programm `blastp` aus der BLAST-Suite verwendet:

```
blastall -p blastp -d proteins.aa -i proteins-deletion.aa  
-e 0.0001 -o blastp.out2
```

¹`formatdb`-Optionen. `-i`, die zu formatierende Datenbank; `-p T/F`, Proteinsequenz (j/n); `-o T/F`, Sequenz-ID analysieren und Index erstellen (j/n).

²`blastall`-Optionen. `-p`, verwendetes BLAST-Programm; `-d`, Datenbank; `-i`, Anfragedatei; `-e expectation value cut-off`; `-m` Ausgabeformat; `-o`, Ausgabedatei.

Um die in der Datei `blastp.out` gespeicherten Daten über ähnliche Proteine und den Grad der Ähnlichkeit zu extrahieren, wurde das Perl-Programm `formatblast.pl` entwickelt (s. Anh. C), mit dessen Hilfe sich die gewünschten Informationen in einer Tabelle zusammenfassen ließen (s. Anh. A). Für die im Deletionsbereich kodierten Proteine von *S. epidermidis* 307 konnte so die Ähnlichkeit zu den bekannten Staphylokokken-Stämmen ermittelt werden.

4.1.3. Deletierte Metabolismus-Operons

Von der Deletion sind in *S. epidermidis* 307 einige Operons betroffen, die eine wichtige Rolle im Metabolismus der Zelle spielen. Im Folgenden werden einige von ihnen näher betrachtet.

arc-Operon (ORF 4-6, 92, 93). Die Produkte der *arc*-Operons (ArcA, ArcB-1, ArcB-2, ArcC, ArcD) sind Faktoren des Arginin-Metabolismus und Teil des Harnstoff-Zyklus. Das Operon ist notwendig für pH-Homöostase (NH₃-Produktion) und Energiegewinnung durch ATP-Bildung. ArcA spaltet Arginin in Citrullin und NH₃. Citrullin wird durch ArcB in Ornithin und Carbamoylphosphat umgewandelt. Die Carbamat-Kinase ArcC überträgt zuletzt das Phosphat auf ADP. Auf diese Weise ist es anderen grampositiven Vertretern, wie *B. licheniformis* möglich anaerob Energie zu gewinnen, sowie Arginin als Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle zu benutzen (Ramaley u. Bernlohr 1965; Broman *et al.* 1978). Reguliert wird das Operon durch den Arginin-Repressor ArgR (Maghnouj *et al.* 1998).

Während in *Bacillus* und *Streptococcus* die Gene des *arc*-Operons in direkter Abfolge hintereinander liegen, sind sie in *S. epidermidis* 307 auf zwei durch ca. 118 kb getrennte Abschnitte aufgeteilt, die beide innerhalb des Deletionsbereiches liegen. Der Repressor *argR* (ORF 7), liegt vor den ersten drei Genen *arcD*, *arcB-1* und *arcA* (ORFs 4-6).

Histidin- und Biotin-Biosynthese-Operons. Die 11 Reaktionen, welche zur Synthese von Histidin notwendig sind, werden bei *E. coli* von acht Enzymen katalysiert. HisD, HisB und HisIE sind bifunktional; Operonstruktur und Enzymfunktion wurden intensiv untersucht (Winkler *et al.* 1978; Carlomagno *et al.* 1988). In *S. epidermidis* sind ebenfalls acht Enzyme an der Synthese beteiligt. Außer *hisC* sind die Gene in einem Cluster organisiert (ORF 49–55), das im Deletionsbereich liegt. Deshalb ist *S. epidermidis* 307/9 nicht in der Lage Histidin selbst zu synthetisieren.

Biotin – Vitamin H – kann von Mikroorganismen selbst synthetisiert werden. Die notwendigen Gene sind ein oder mehreren Operons organisiert. In *S. epidermidis* liegt *bioB* (ORF 89) entfernt vom eigentlichen bio-Operon mit *bioD*, *bioA*, *bioF* (SERP2394) und *bioW* (ORF 130–133). Da auch Biotin von der Deletionsmutante nicht selbst hergestellt werden kann, muss es wie Histidin aus dem Medium aufgenommen werden.

4. Ergebnisse

Acetoin-Decarboxylase. Die Gene von ORF 69–72 kodieren für das Enzym, welches an der Umwandlung von Acetoin zu Diacetyl beteiligt ist, wobei Reduktionsäquivalente gebildet werden. Es besteht aus drei Untereinheiten E1 α / β (SERP2326, SERP2325) E2 (SERP2324) und E3 (SERP2327). Die Acetoin-Katabolismus wurde bereits in *B. subtilis* biochemisch und molekular aufgeklärt (Huang *et al.* 1999). Das Operon besteht aus den fünf Genen *acoA* (E1 α), *acoB* (E1 β), *acoC* (E2), *acoL* (E3) und *acoR* (Regulator). In *S. epidermidis* 307 ist die Reihenfolge der Gene unterschiedlich. *acoL* liegt vor *acoA*, *acoB* und *acoC*. Der Regulator *acoR* fehlt vollständig. Daher muss die Aktivierung des *aco*-Operons auf eine andere Art und Weise stattfinden.

Glycerol-Abbau. Die Umwandlung von Glycerol zu Dihydroxyaceton-Phosphat geschieht über Dihydroxyaceton und wird von zwei Enzymen katalysiert, der Glycerol-Dehydrogenase (ORF 88) und der Dihydroxyaceton-Kinase (ORF 87). Das entstandene Dihydroxyaceton-Phosphat kann anschließend die Triosephosphat-Isomerase in Glyceraldehyd-3-Phosphat überführt werden. Es ist daher der Mutante 307/9 nicht möglich, Glycerol über Dihydroxyaceton-Phosphat zu fixieren.

Mannose-Phosphotransferase-System. Das Mannose-PTS von *S. epidermidis* besteht insgesamt aus vier Komponenten. Die Transferase (ORF 16), transportiert die Mannose in die Zelle und phosphoryliert sie dabei. Die Mannose-6-Phosphat-Isomerase (ORF 17) übernimmt die Umwandlung in Fruktose-6-Phosphat und das Einschleusen in den Zuckerstoffwechsel. Während HPr (*ptsH*) und EI (*ptsI*) im Zytoplasma lokalisiert sind und für alle PTS gleichermaßen arbeiten, ist die EII-Komponente spezifisch für eine Substratklasse (Kotrba *et al.* 2001). *S. epidermidis* besitzt 12 EII-Komponenten u. a. Fruktose, Laktose und Saccharose (Gill *et al.* 2005).

Sec-Transportsystem. Das Sec-Translokations-System besteht aus den Untereinheiten SecYEG, SecDF/YajC, YidC und SecAB, von denen *S. epidermidis* alle bis auf das Chaperon SecB besitzt. Im Bereich der Deletionsregion liegen in *S. epidermidis* 307 zwei Gene, die zur SecA- bzw. SecY/Sec61 α -Familie gehören (ORF 29, 32). Sie liegen sehr wahrscheinlich auf einem polycistronischen Transkript welches von ORF 27–32 reicht, wobei sich zwischen ORF 29 und 30 ein Pseudogen befindet. Eventuell stellt dieses Operon ein weiteres Sekretionssystem dar, wenn auch nicht mehr intakt. Da jedoch die anderen Gene – außer einer Glycosyltransferase – keine Ähnlichkeiten mit bekannten besitzen, ist eine Funktionsbeschreibung nicht möglich.

Phosphonat-Transportsystem. Die Gene des Operons von ORF 35–38 kodieren für den Phosphonat-Transporter PhnECD. Phosphonate sind organische Phosphorverbindungen,

die eine starke C-P-Bindung besitzen. Diese kann in der Natur ausschließlich von Mikroorganismen gespalten werden und somit stellen Phosphonate eine wichtige Phosphor- und Energiequelle für Bakterien dar. In *E. coli* ist das Aufnahme- und Abbausystem für Phosphonat sehr gut untersucht und besteht aus 14 Genen (Metcalf u. Wanner 1991; Huang *et al.* 2005). Das *phnECD*-Operon ist in *S. epidermidis* 307 jedoch nicht, wie in *E. coli*, mit den Genen für die Abbaureaktionen verknüpft.

Weitere ABC-Transporter. Von der Deletion sind auch einige ATP-getriebene Transportsysteme betroffen. Ein Aminosäure-Transporter (ORF 96–99) mit Ähnlichkeiten zu Glycin/Betain/Prolin- und Opu-Transportern. Des Weiteren ein Peptid-ABC-Transporter (ORF 109–113) und eine Oligopeptid-Permease (Opp) von ORF 118–123. Diese Oligopeptid-Transporter sind sowohl in grampositiven, als auch in gramnegativen Bakterien vorhanden und dienen vielfältigen Funktionen wie (i) Nährstoff-Aufnahme in *Lactococcus lactis* (Charbonnel *et al.* 2003; Juillard *et al.* 1995) und *Streptococcus thermophilus* (Garault *et al.* 2002), (ii) Recycling von Zellwandbestandteilen in *Salmonella typhimurium* und *E. coli* (Goodell u. Higgins 1987), (iii) von extrazellulären Signalmolekülen in *B. subtilis* (Lazazera *et al.* 1999) und *Enterococcus faecalis* (Leonard *et al.* 1996) oder (iv) Wachstum bei niedrigen Temperaturen in *Listeria monocytogenes* (Borezee *et al.* 2000).

4.1.4. Pathogenitäts-assoziierte Gene im Deletionsbereich

Von den in Gill *et al.* (2005) für *S. epidermidis* RP62A beschriebenen Virulenzfaktoren befinden sich ca. ein Drittel auch im Deletionsbereich.

icaADBC-Operon. Im *icaADBC*-Operon (ORF 43–46) sind die Proteine für die PIA-Synthese und deren Regulator IcaR (ORF 42) kodiert. Funktion und Wirkungsweise der einzelnen Komponenten wurden bereits in Abschn. 1.1 erläutert. Die Biofilmbildung ist in *S. epidermidis* der Haupt-Pathogenitätsfaktor und durch das Fehlen des *ica*-Operons wird ist die Virulenz stark eingeschränkt.

Proteasen. Deletiert wurden die Gene der Cystein-Protease Staphopain B (*sspB*, ORF 128), deren Inhibitor Staphostatin B (*sspC*, ORF 129) und eine Serin-Protease (SERP2401, ORF138). Das *sspA*-Gen (SERP1397) für die Serin-Protease Staphopain A liegt hingegen nicht im Deletionsbereich. In *S. aureus* sind die *ssp*-Gene in einem Operon organisiert. Proteasen dienen zur Abwehr der Immunantwort, dem Abbau von Wirtsgewebe, oder der Regulation der bakteriellen Adhäsion. Die Präproform von SspB wird sekretiert und dabei prozessiert (Dubin 2003).

Lipasen/Elastase/Hämolyisin. Die Gene der Lipasen *lip* (ORF 79), *geh-1* (ORF 47), *geh-2* (ORF 127) und den Vorläufer für die extrazelluläre Elastase *sepA* (ORF 8) sind von der

4. Ergebnisse

Deletion ebenfalls betroffen. Die beiden anderen Lipase-Gene *geh* (SERP0018) und *lipA* (SERP0309) sind in der Deletionsmutante noch vorhanden. Lipasen spielen eine wichtige Rolle im bakteriellen Stoffwechsel und während der Pathogenese (Rosenstein u. Götz 2000), da sie die Phospholipide der Zellmembran hydrolysieren und somit die Invasion des Wirtsgewebes ermöglichen. Ein putatives Hämolyysin (ORF 14) ist im Deletionsbereich lokalisiert.

Phenol-lösliche Moduline (PSM). Zwei Phenol-lösliche Moduline (ORFs 134 und 137) liegen in der deletierten Region. PSM besitzen entzündungsfördernde Aktivität und sind wahrscheinlich in die Auflösung des Biofilms involviert. Sie sind möglicherweise wichtige Determinanten für die Aggressivität der Infektion (Yao *et al.* 2005a).

Drp35. Zuletzt fehlt in der Mutante 307/9 das Gen *drp35* (ORF 63), das für eine Lactonase kodiert und somit zur β -Laktamresistenz beiträgt. Drp35 ist – außer bei Bacitracin – nicht direkt an der Resistenz beteiligt, aber einige Antibiotika (u. a. Oxacillin, Vancomycin, Fosfomycin) induzieren die *drp35*-Transkription (Murakami *et al.* 1999). Morikawa *et al.* (2005) konnten zeigen, dass Drp35 das bakterielle Gegenstück zu den Proteinen der Paraoxonase-Familie ist und bei Störungen der Zellmembran induziert wird. Nicht nur durch Antibiotika, sondern auch durch Detergenzien. Dies weist auf eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der Zelle hin.

4.1.5. Neues SCC-Element

Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, weist der rechte Rand der Deletion eine starke Ähnlichkeit zur Sequenz von *S. haemolyticus* JCSC1435 auf (s. Abb. 4.3). Ein Teil der Region *orfX*- Ψ SCC*h1*- Ψ SCC*h2*-SCC*h1435*- Ψ SCC*h3*- Ψ SCC*mec(h1435)*- Ψ SCC*h4* konnte bereits auf Cosmid 10 identifiziert werden (s. Abb. 4.1). Jedoch war nur ein Teil mit dem Rekombinase-Gen *ccrC* (ORF r11) und einem inaktiven IS₄₃₁ (ORFs r18–r20) in der Umgebung vorhanden. Zurzeit ist das Gen für *ccrC* nur in Zusammenhang mit dem SCC*mec*-Element vom Typ V und III bekannt. Diese Kassetten besitzt jedoch ebenfalls das Gen *mecA* für die Methicillin-Resistenz. Da dieses Gen im Falle des Stammes *S. epidermidis* 307 nicht vorhanden ist, kann vermutet werden, dass es sich hier um einen neuen Typ von SCC-Element handelt.

Wie kürzlich von Chongtrakool *et al.* (2006) beschrieben, besteht das SCC*mec*-Element vom Typ III aus zwei kleineren Teilen. SCC*mercury* ohne *mecA* aber mit der CcrC-Rekombinase, und dem eigentlichen SCC*mec* mit *ccrAB* und dem *mec*-Operon. SCC*mercury* besitzt jedoch auch das Transposon Tn554, welches im Stamm 307 nicht vorkommt. Daher ist auszuschließen, dass *S. epidermidis* 307 das SCC*mercury* besitzt. Hingegen besitzt die SCC*mec*-Insel vom Typ IVc das Transposon Tn4001 (Ito *et al.* 2003). Dieses ist auch Teil des neuen SCC-Elements von *S. epidermidis* 307. Darüber hinaus besteht jedoch keine

Übereinstimmung zwischen beiden Elementen.

SCC-Inseln sind immer an einem charakteristischen Locus im Genom inseriert, dem *orfX* (Ito *et al.* 1999). Dabei handelt es sich um ein Gen von unbekannter Funktion. Während der Microarray-Genomvergleiche (s. Abschn. 4.2) konnte gezeigt werden, dass *orfX* (s. Anh. B, ID 769) sowohl im Wildtyp *S. epidermidis* 307, als auch in der Deletionsmutante 307/9 vorhanden ist. Dies weist darauf hin, dass sich Teile des neuen SCC-Elements jenseits des Transposons *Tn4001* befinden. Wie groß der Abstand zwischen *Tn4001* und *orfX* ist, konnte jedoch noch nicht bestimmt werden.

4.1.6. *in-silico*-Vergleich der Stämme RP62A, ATCC 12228 und des Deletionsbereiches

Vergleich des Deletionsbereiches mit RP62A und ATCC 12228

In Staphylokokken ist die Variabilität des Genoms durch zahlreiche mobile Elemente erhöht. Deshalb sollte zunächst durch einen Vergleich des sequenzierten Deletionsbereiches und den entsprechenden Regionen des pathogenen Stammes RP62A und des apathogenen Stammes ATCC 12228 eventuelle größere Übereinstimmungen oder Abweichungen beschrieben werden. Mit dem BLAST-Algorithmus wurden die Ähnlichkeiten der Nukleotidsequenzen bestimmt und mit Hilfe des *Artemis Comparison Tools* (ACT) (Carver *et al.* 2005) graphisch dargestellt (s. Abb. 4.6). Anschließend wurden die Nukleotidsequenzen von *S. epidermidis* RP62A und ATCC 12228 in je einer ASCII-Datei im FASTA-Format gespeichert und danach mit dem Befehl

```
formatdb -d RP62A.nt -p F -o T
```

bzw.

```
formatdb -d ATCC 12228.nt -p F -o T
```

für den Vergleich mit der Sequenz des Deletionsbereiches formatiert. Diese wurde ebenfalls im FASTA-Format gespeichert (*deletion.nt*). Mit Hilfe des *blastn*-Befehls der BLAST-Suite konnten die Nukleotidsequenzen verglichen werden:

```
blastall -p blastn -d RP62A.nt -i deletion.nt -m 8  
-o RP62A.out
```

bzw.

```
blastall -p blastn -d ATCC12228.nt -i deletion.nt -m 8  
-o ATCC12228.out
```

4. Ergebnisse

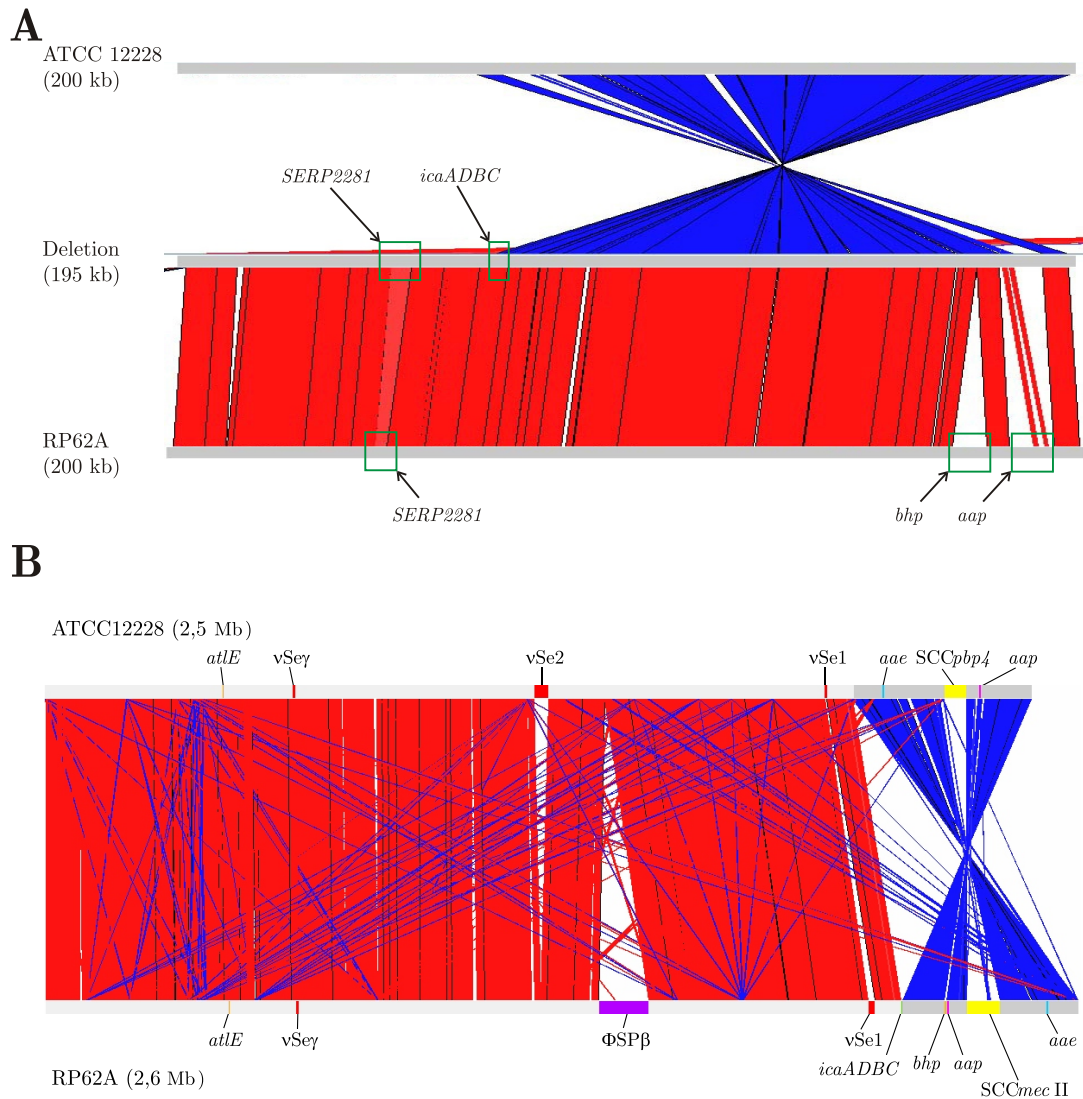


Abbildung 4.6.: A, Vergleich des Deletionsbereiches mit den Sequenzen von *S. epidermidis* ATCC 12228 (oben) und RP62A (unten). In rot dargestellt sind Bereiche direkter Ähnlichkeit, in blau Bereiche inverser Ähnlichkeit. Im Vergleich mit dem Stamm 307 und RP62A ist ein großer Teil von ATCC 12228 invertiert. B, Genomvergleich der beiden *S.-epidermidis*-Stämme RP62A und ATCC 12228. Bereiche direkter Ähnlichkeit sind rot, inverser blau dargestellt. *atLE*, *aae*, Autolysine; *bhp*, Bap homologes Protein; *aap*, Akkumulation-assoziiertes Protein; *icaADBC*, Interzelluläres-Adhesin-Cluster; Φ SP β Bakteriophage; *vSe γ* , *vSe1*, *vSe2*, Pathogenitätsinseln.

bhp und **aap**. Die Sequenzierung des Deletionsbereiches wies zum großen Teil eine sehr hohe Ähnlichkeit zur bereits bekannten Sequenz des pathogenen Stammes *S. epidermidis* RP62A auf. Das Bap-homologe Protein Bhp ist in *S. epidermidis* 307 nicht vorhanden. Das *accumulation associated protein* Aap ist hingegen noch fragmentiert erhalten (s. Abb. 4.7). Allerdings ist der dazwischen liegende Bereich mit den Genen *bioW*, SERP2394, *bioA* und *bioD*, die Proteine der Biotin-Biosynthese kodieren, vollständig erhalten und weist in der Genomstruktur eher eine Ähnlichkeit zum Stamm ATCC 12228 auf, dem ebenfalls das *bhp*-Gen fehlt.

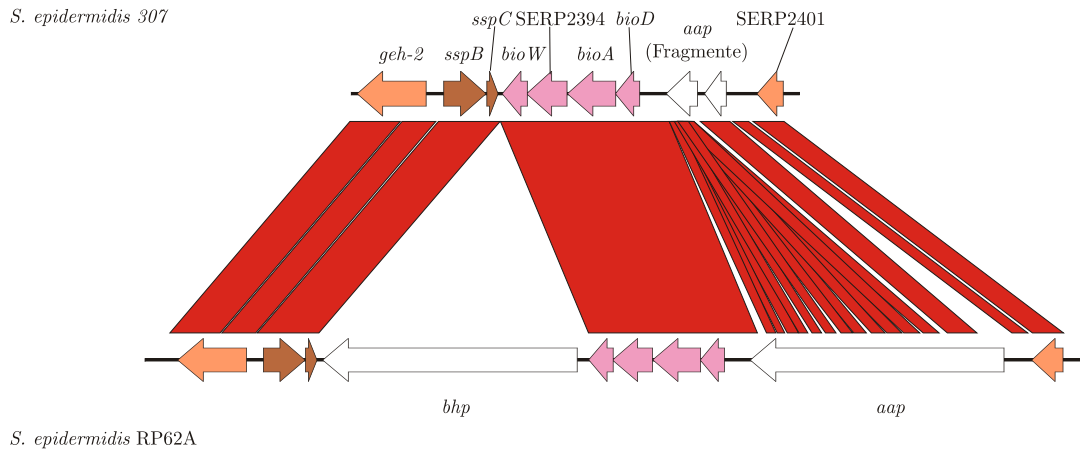


Abbildung 4.7.: Region um *bhp* und *aap* im Vergleich der Stämme 307 (oben) und RP62A (unten). *bhp* fehlt bei 307 vollständig, *aap* ist noch als Fragment vorhanden.

Serin-Threonin-reiches Antigen. Das 7323 nt lange Gen des Serin-Threonin-reichen Antigens SERP2281 (ORF 33) ist im Stamm 307 um 1713 nt länger, als im Stamm RP62A (5610 nt). Eine genauere Analyse der Struktur des Proteins zeigt, dass diese Verlängerung im Bereich einer hoch repetitiven Region liegt. Die Proteinsequenzen bis zur mutmaßlichen Ig-Domäne *He PIG*, sowie in der Umgebung der Transmembrandomäne sind hingegen identisch (s. Abb. 4.8). Auch das entsprechende Gen SE2249 (6933 nt) im Stamm ATCC 12228 besitzt eine verkürzte, hoch repetitive Region, obwohl diese länger als im Stamm RP62A ist.

Das Serin-Threonin-reiche Antigen zeigt eindeutige Ähnlichkeiten zu den Proteinen *platelet binding protein* (*gspB*) und *streptococcal hemagglutinin* (*hsa*) aus *Streptococcus gordonii*. Beide sind 1202 bzw. 308 Aminosäuren länger und besitzen das LPXTG-Motiv der Zellwand-Oberflächen-Ankerproteine. *GspB* und *Hsa* dienen zur Anheftung der Zellen an Thrombozyten und Sialinsäure (Bensing u. Sullam 2002; Takahashi *et al.* 2002). Dem Pro-

4. Ergebnisse

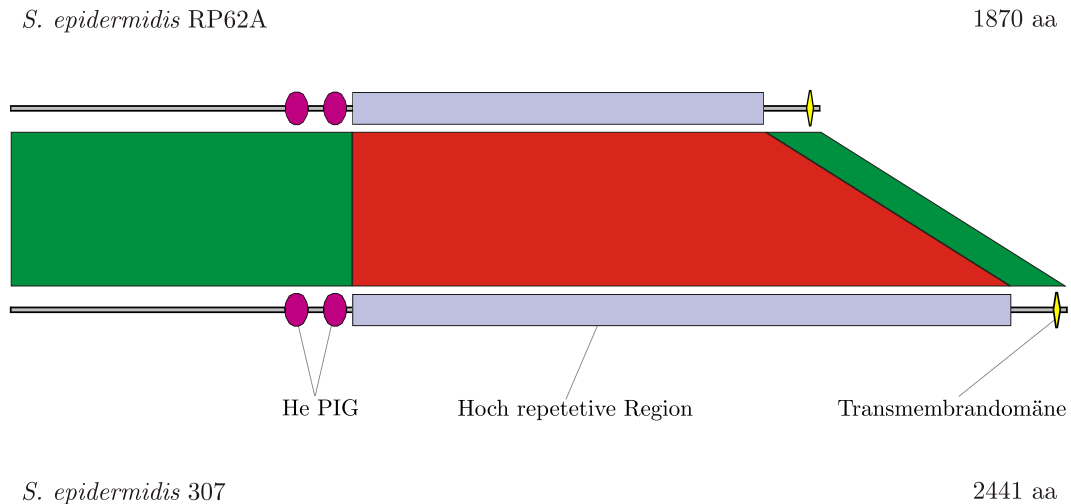


Abbildung 4.8.: Serin-Threonin-reiches Antigen (SERP2281) bei *S. epidermidis* RP62A und 307. Die hoch repetitive Region (grau) ist im Stamm 307 um 571 aa länger. Identische Bereiche sind grün, abweichende rot dargestellt.

tein SERP2281 fehlt ein eindeutiges LPXTG-Motiv, jedoch besteht eine Ähnlichkeit von ca. 40% zwischen den Proteinen von *S. epidermidis* und *S. gordonii*. Dies deutet darauf hin das SERP2281 ein Staphylokokken eine ähnliche Aggregationsfunktion besitzen könnte.

***icaADBC*-Insertion?** Für die Biofilmbildung in Staphylokokken ist in erster Linie das *icaADBC*-Operon notwendig. Im Stamm 307 liegt dieses im Bereich der Deletion. Vergleicht man die Region, welche das *ica*-Operon umgibt, mit dem Stamm ATCC 12228 (s. Abb. 4.9), so findet man eine Übereinstimmung exakt bis zum Thr-tRNA-Gen der intergenischen IGR_{ica}. Die Sequenz stromabwärts ist wieder in beiden Stämmen ähnlich. Während jedoch das Genom stromaufwärts des *ica*-Operons direkt homolog ist (rot), weist es stromabwärts eine inverse Homologie auf (blau). Das Vorhandensein der *ica*-Region in der Nähe eines tRNA-Gens, sowie die Inversion eines Teils des Genoms, könnte auf einen Inversionsvorgang im Zuge der Integration oder Exzision der *ica*-Region hinweisen. Diese Hypothese bedarf jedoch noch näherer Untersuchung.

TagF. Die offenen Leseraster 137 (mutmaßliches Teichonsäure-Biosynthese-Protein TagF), 138 (Alkoholdehydrogenase) und 139 (mutmaßliche 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-Synthase) weisen nur eine geringe Ähnlichkeit zu den Genen SERP0198 SERP0197 und SERP0196 von *S. epidermidis* RP62A bzw. SE0321, SE0320 und SE319 vom Stamm ATCC 12228 auf, obwohl sie in gleicher Orientierung und ähnlicher Länge vorliegen. Eine stärkere Übereinstimmung von 68,1–78,3% konnte stattdessen im Vergleich mit dem

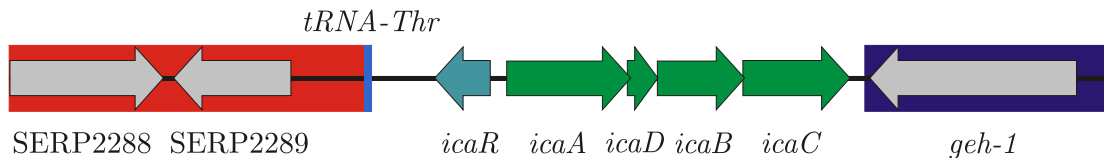


Abbildung 4.9.: *icaADBC*-Operon mit Umgebung. Der Bereich direkter Ähnlichkeit von *S. epidermidis* 307 zu ATCC 12228 ist rot, inverser Ähnlichkeit blau dargestellt. Die Thr-tRNA stellt die Grenze zum *ica*-Operon dar.

Stamm *S. aureus* COL (SACOL0242, SACOL0241, SACOL0240) festgestellt werden. Die Struktur lässt vermuten, dass sie als Operon organisiert sind und als ein Primärtranskript transkribiert werden. Eventuell wurden sie durch horizontalen Gentransfer zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* übertragen.

***In-silico*-Vergleich der Stämme RP62A und ATCC 12228**

Als Hauptbestandteil der normalen und nützlichen Hautflora verhindert *S. epidermidis* das Eindringen pathogener Keime über Haut und Mucosa. Unter bestimmten Bedingungen kann *S. epidermidis* jedoch auch selbst ein Pathogen werden. Dies liegt an der starken genetischen Variabilität innerhalb der Spezies. Um einen Überblick über die Genomstruktur von *S. epidermidis* zu gewinnen und um zu verstehen, welche Rolle mobile genetische Elemente bei der Adaptation an unterschiedliche Habitate spielen, wurden zunächst die beiden sequenzierten Genome der Stämme RP62A (klinisches Isolat; pathogen) und ATCC 12228 (Haut-Stamm; apathogen) miteinander verglichen.

Zuerst wurden die beiden Sequenzen in FASTA-formatierten Datei gespeichert. Zur verbesserten Darstellung war es nötig, die Sequenz, welche in der FASTA-Datei linear vorliegt, umzustellen. Hierfür wurden bei RP62A die ersten 165 423 Nukleotide (bei ATCC 12228 die ersten 279 539) entfernt und am Ende angefügt. Mit dem Befehl `formatdb` wurden die Sequenzen analog zu Abschnitt 4.1.6 für die weitere Verarbeitung vorbereitet. Der BLAST-Algorithmus diente für den Vergleich der beiden Sequenzen:

```
blastall -p blastn -d RP62A-re.nt -i ATCC12228-re.nt -m 8
-o blastn-re.out
```

Die grafische Darstellung erfolgte wiederum mit ACT (s. Abb. 4.6 B), wobei rote Balken direkte Ähnlichkeiten repräsentieren, blaue Balken Bereiche inverser Übereinstimmung.

Beide Genome stimmten erwartungsgemäß zum Großteil überein. Die Sequenz des Stammes *S. epidermidis* ATCC 12228 ist um ca 100 kb kürzer, als die von RP62A, was in erster Linie durch die Integration eines Φ SP β -ähnlichen-Phagen erklärt werden kann. Φ SP β infiziert *B. subtilis*, ein ebenfalls grampositives Bakterium, sodass beide Phagen wahrscheinlich der gleichen Gruppe zugeordnet werden können.

4. Ergebnisse

Obwohl *S. epidermidis* ATCC 12228 ein kommensales Isolat ist, besitzt es verschiedene genomische Inseln. In beiden Stämmen ist ν SeY vorhanden, auf welcher Phenol-lösliche Module codiert sind, die antibakteriell wirken. Die Insel ν Se1 ist in RP62A ca. vier Mal größer als im Saprophyten und enthält das Cadmium-Efflux-System *cadCD*. An gleicher Stelle ist in ATCC 12228 ein ORF unbekannter Funktion lokalisiert. Ausschließlich im Stamm ATCC 12228 kommt ν Se2 vor. Auf ihr sind u. a. eine Sortase, sowie zwei Oberflächen-assoziierte Proteine mit LPXTG-Motiv codiert (Gill *et al.* 2005).

Genom-Inversion. Der auffälligste Unterschied besteht aber in der Inversion einer großen Region am rechten Rand der linearisierten Sequenzen, die fast 20 % des Genoms beträgt. In ihr befinden sich bei RP62A viele der bekannten Pathogenitätsfaktoren, wie das Bap-homologe Protein Bhp, das *accumulation associated protein* Aap, das Autolysin/Adhäsin Aae sowie das mobile Element *SCCmec* vom Typ II, welches das *mecA*-Gen enthält. Das *icaADBC*-Operon liegt genau an der Grenze zwischen direkt und invers ähnlichen Bereichen, während das Autolysin-Gen *atlE* in der stabilen Region lokalisiert ist.

Sowohl in *S. epidermidis* RP62A als auch in ATCC 12228 wurde von Gill *et al.* (2005) ein neues IS-Element beschrieben, *ISSep1*. Durch die vergleichende Analyse der beiden Genome konnte *ISSep1* an den Grenzen des invertierten Bereichs in ATCC 12228 identifiziert werden. Allerdings nur auf der rechten Seite im Genom von RP62A. *ISSep1* ist in *S. epidermidis* über das gesamte Chromosom verteilt (RP62A: 13 Kopien; ATCC 12228: 14 Kopien) und scheint keine Präferenz für eine bestimmte Region zu besitzen. Ist anzunehmen, dass oben beobachtete Inversion durch homologe Rekombination zweier *ISSep1*-Elemente verursacht worden ist.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.1

- Der deletierte Bereich in *S. epidermidis* 307 stimmt zum Großteil mit dem des annotierten Stammes RP62A überein.
- Einige Gene wie *bhp* oder *aap* fehlen, andere sind verlängert (SERP2281).
- *S. epidermidis* 307 besitzt eine neuartige SCC-Kassette ohne *mecA*, aber mit einer Rekombinase *ccrC*.
- Der rechte Teil des Deletionsbereiches enthält DNA von *S. haemolyticus* JCSC1435.
- Die meisten Pathogenitätsfaktoren von *S. epidermidis* liegen in der Region der homologen Rekombination.
- Homologien im Bereich des *tagF*-Gens zur Sequenz von *S. aureus* COL weisen auf einen horizontalen Gentransfer zwischen *S. epidermidis* und *S. aureus* hin.
- Homologe Rekombination zwischen den zwei *ISSep1*-Elementen in ATCC 12228 hat sehr wahrscheinlich zur Inversion des dazwischen liegenden Bereiches geführt.

4.2. Microarray-basierter Genomvergleich

Für die Untersuchung, welche Faktoren für die Pathogenität von *S. epidermidis* verantwortlich sind, wurde ein Genomvergleich verschiedener Stämme durchgeführt. Voll-Genom-Microarrays bieten die Möglichkeit, neben Expressionsanalysen auch Genomvergleiche auf Grundlage von DNA-DNA-Hybridisierung anzustellen. Mit dieser Methode können Stämme miteinander verglichen werden, auch wenn deren Genom nicht sequenziert ist. Ein Nachteil des Microarray-basierten Genomvergleichs besteht jedoch darin, dass er immer nur auf denjenigen Stamm bezogen werden kann, auf dem der Chip basiert. Zurzeit existieren nur Microarrays für *S. epidermidis*, welche auf dem Genom von RP62A beruhen. In dieser Arbeit wurde ein PCR-basierter Chip, der Firma Scienion (Berlin) verwendet, welcher 2081 der 2526 annotierten Protein-kodierenden Gene von Chromosom und Plasmid enthält (82,4%).

Auswahl der Stämme. Es sollten neben RP62A ein weiteres klinisches Isolat (307), dessen Deletionsmutante (307/9), sowie drei Isolate von gesunden Personen (P4: Klinik-Personal; 195, 197: Studenten) untersucht werden. Die Stämme RP62A und 307 sind *ica*-positiv, 307/9, P4, 195 und 197 *ica*-negativ. Von allen sechs Stämmen wurde die chromosomale DNA isoliert, wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben. Nach der Markierung mit den Farbstoffen Cy3 oder Cy5 und Hybridisierung (siehe Kap. 3.5.1) wurden die Microarrays mit dem GenePix 4000B Scanner von Molecular Dynamics eingelesen.

Microarray-Analyse. Für jeden Stamm wurden die Hybridisierungen dreimal (195, 197, RP62A) oder viermal (307, 307/9, P4) mit Wechsel des Farbstoffes wiederholt. Bei der Analyse der Signale wurden folgende Kriterien festgelegt. Die Intensität eines einzelnen *spots* musste fünfmal stärker sein, als das Signal des umgebenden Hintergrundes, da bei Hybridisierungen mit markierter chromosomaler DNA stärkere Signale auftreten, als bei Expressionsanalysen. Waren beide Signale eines ORFs auf einem Microarray vorhanden, wurde das entsprechende Gen als existent gewertet. Bei teilweisem oder vollständigem Fehlen beider *spots* wurde das Gen als nicht vorhanden gewertet. Anhand der Anzahl an positiven Werten (0–4), konnte auf diese Weise eine Wahrscheinlichkeit berechnet werden, dass Gene vorhanden oder nicht vorhanden waren. In Tabelle B ist die Auswertung zusammengestellt. Abbildung 4.10 gibt einen graphischen Überblick der Analyse.

Das annotierte Genom von *S. epidermidis* RP62A enthält 2668 Gene. Davon sind 2635 (98,8%) chromosomal und 33 (1,2%) Plasmid-kodiert. Von diesen 2635 waren 2039 Gene (76,4%) auf dem Microarray enthalten. So konnte anhand des Microarrays nur über drei Viertel der RP62A-Gene eine Aussage gemacht werden. In der folgenden Aufstellung sind die Prozentangaben auf die Gesamt-Genzahl von RP62A bezogen (s. Tab. 4.1).

Für 629 Gene (23,6%) konnte keine direkte Aussage über Fehlen oder Vorhandensein

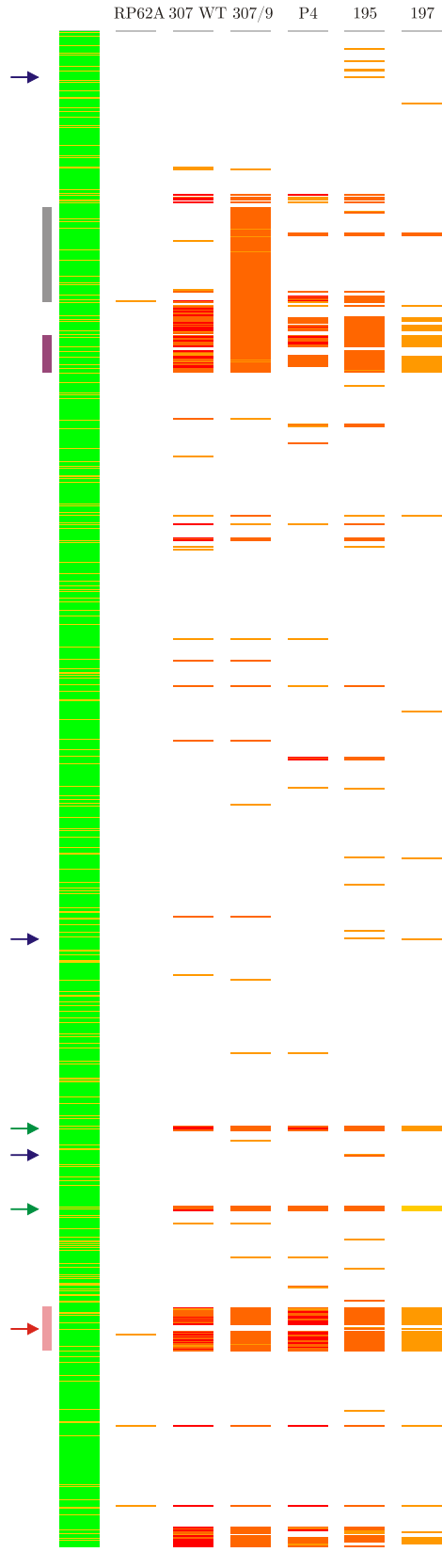


Abbildung 4.10.: Microarray-Genomvergleich. Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse. Legende:

- gespottete ORFs
- nicht gespottete ORFs
- Deletionsbereich
- *SCC_{mec}*
- Φ SP β -ähnlicher Phage
- *IS₂₅₆*
- *Tn₅₅₄*
- *Tn₄₀₀₁*
- fehlend (P=50 %)
- fehlend (P=60–75 %)
- fehlend

4. Ergebnisse

	RP62A		307 WT		307/9		P4		195		197	
vorhanden	2035	76,3 %	1861	69,8 %	1716	64,3 %	1882	70,5 %	1842	69,0 %	1914	71,7 %
fehlend (P=50 %)	0	0,0 %	21	0,8 %	0	0,0 %	20	0,7 %	0	0,0 %	4	0,1 %
fehlend (P=66 %)	0	0,0 %	0	0,0 %	17	0,6 %	0	0,0 %	22	0,8 %	0	0,0 %
fehlend (P=75 %)	0	0,0 %	76	2,8 %	0	0,0 %	97	3,6 %	0	0,0 %	0	0,0 %
fehlend (P=100 %)	4	0,1 %	80	3,0 %	305	11,4 %	39	1,5 %	174	6,5 %	120	4,5 %
fehlend (Total)	4	0,1 %	177	6,6 %	322	12,1 %	156	5,8 %	196	7,3 %	124	4,6 %

Tabelle 4.1.: Auswertung des Microarray-Genomvergleichs. Aufgelistet ist die Anzahl der vorhandenen und fehlenden Gene bei den untersuchten Stämmen, sowie der Anteil an der Gesamt-Genzahl (incl. rRNA- und tRNA-Genen) von RP62A.

getroffen werden. Da jedoch oft ein ganzes Operon bzw. Region fehlten, war es möglich, anhand benachbarter Gene eine Vorhersage zu machen. Wie in Abb. 4.10 und 4.11 zu sehen ist, kann – abgesehen vom Deletionsbereich und der mobilen genetischen Elemente – zwischen pathogenen und kommensalen *S.-epidermidis*-Stämmen kein großer Unterschied in Bezug auf die Gen-Anzahl festgestellt werden.

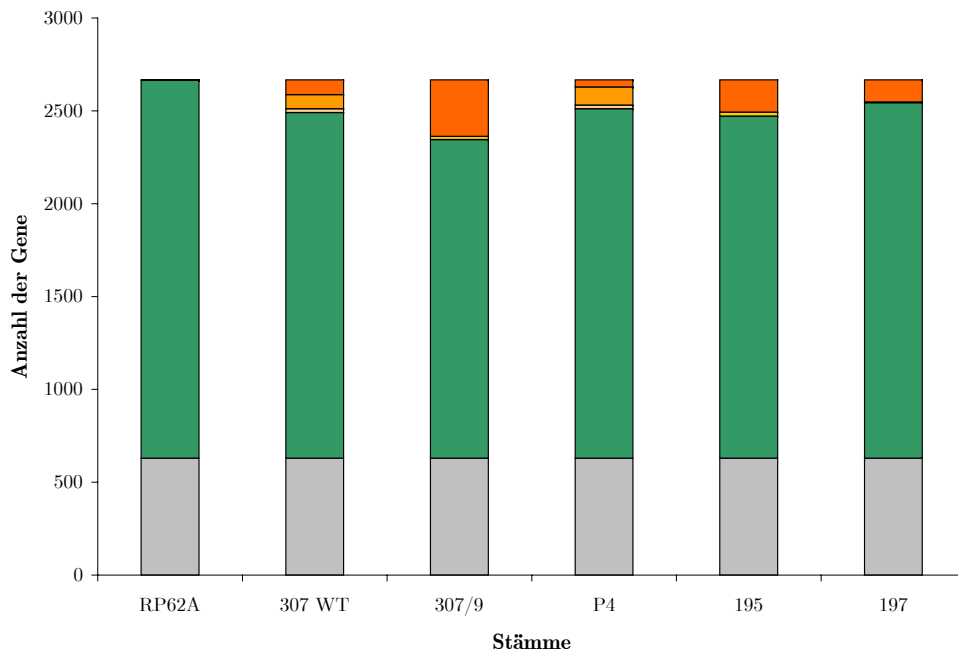


Abbildung 4.11.: Übersicht über die Anzahl der in den untersuchten Stämmen vorhandenen oder fehlenden Gene. ■, nicht gespottet; ■, vorhanden; ■, fehlend (P=50 %); ■, fehlend (P=66 %); ■, fehlend (P=75 %).

Deutlich zu erkennen ist der Deletionsbereich (ca. ORF 372–726) in Stamm *S. epidermidis* 307/9, der in Kapitel 4.1 bereits beschrieben wurde und mit diesem gut übereinstimmt. Am Ende der Deletion sind auch im Wildtyp-Stamm 307 einige fehlende Gene zu beobachten. An dieser Stelle sitzt im Genom von *S. epidermidis* RP62A die Typ-II-SCC mec -Insel.

Wie im vorhergehenden Kapitel erläutert, konnte durch Sequenzierung des Deletionsbereiches nachgewiesen werden, dass dort ein neuer Typ von SCC-Insel lokalisiert ist und *S. epidermidis* 307 keine Typ-II-SCC*mec*-Kassette besitzt.

Während das Cadmium-Efflux-System *cadCD* neben RP62A auch in den kommensalen Stämmen P4 und 197 vorkommt, ist es im klinischen Isolat 307 nicht vorhanden. Ausschließlich in pathogenen Stämmen konnte das für die Biofilmbildung notwendige *icaADBC*-Operon nachgewiesen werden. Das Arsenresistenz-Operon *arsDARBC* (ORF 641–645) ist in den saprophytischen Stämmen ebenso vorhanden wie auch der angrenzende Bereich (ORF 637–676). Im Stamm *S. epidermidis* 307 fehlt das Operon hingegen. In beiden Stämmen P4 und 197 konnten Teile der Rekombinase-Region von Typ-II-SCC*mec* (ORF 722–739; u. a. *ccrB2*) identifiziert werden. Stamm P4 besitzt als einziger neben RP62A das *mecA*-Gen (ORF 759). Es ist also anzunehmen, dass *S. epidermidis* P4 ebenfalls eine SCC*mec*-Insel besitzt.

Das Transposon Tn554 ist nur in RP62A vorhanden und konnte deshalb bei allen anderen untersuchten Stämmen nicht identifiziert werden. Auch ausschließlich in *S. epidermidis* RP62A vorhanden ist der Φ SP β -ähnliche Bakteriophage. Tn4001, welches in RP62A innerhalb der Phagenregion lokalisiert ist, war außer in 195 und 197 auch in allen anderen Stämmen nachweisbar. Für diejenigen ORFs, welche bei RP62A auf einem Plasmid (pSERP) liegen, konnte in den meisten Fällen kein Signal detektiert werden, was sich daraus erklären lässt, dass die getesteten Stämme dieses Plasmid nicht besitzen. Das Vorhandensein einiger Plasmid-spezifischer Gene, wie z. B. der Replikase in Stamm 197 deuten auf die Anwesenheit eines möglicherweise anderen Plasmids hin.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Experimenten schließen, dass die Pathogenität von *S. epidermidis* neben der Biofilmbildung in erster Linie auf der Fähigkeit beruht, mithilfe mobiler genetischer Elemente (IS, SCC, ...) eine flexible Genomstruktur zu schaffen. Durch Umordnungen im Genom, Aktivierung/Inaktivierung von Genen und den Austausch größerer Bereiche kann sich *S. epidermidis* schnell an veränderte Umweltbedingungen adaptieren und diese Faktoren weitergeben.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.2

- *S. epidermidis* RP62A besitzt, im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen, exklusiv das Transposon Tn554, den Φ SP β -ähnlichen Phagen sowie das Plasmid pSERP.
- Klinische Isolate unterscheiden sich in erster Linie durch das Vorhandensein des *ica*-Operons, IS256 und SCC-Kassetten von den kommensalen Isolaten.
- Das Krankenhauspersonal-Isolat P4 besitzt zwar nicht das *ica*-Operon, aber dennoch das IS256-Element und eine SCC mec -Kassette.

4.3. Identifizierung eines RNA-Transkripts stromaufwärts des *ica*-Operons

Im Verlauf der Sequenzierung des Deletionsbereiches und der *in-silico*-Genomvergleiche wurde zwischen dem hypothetischen Transporter SERP2289 und dem Regulator des *ica*-Operons, *icaR*, eine 1439 bp lange intergenische Region identifiziert (*IGR_{ica}*). Da bakterielle Genome in der Regel wenige nicht-kodierende Bereiche aufweisen und die Gene dicht gepackt vorliegen, sollte untersucht werden, ob diese intergenische Region Gene für möglicherweise ein oder mehrere bisher nicht beschriebene Transkripte enthält. Da in diesem Bereich kein Hinweis auf einen ORF vorliegt, könnte es sich um eine untranslatierte RNA handeln.

Sowohl in Eukaryonten als auch in Prokaryonten sind solche nicht-translatierten RNAs beschrieben, die dort in intergenischen Regionen lokalisiert sind. Vielfach üben sie eine regulatorische Funktion aus [Siehe hierzu den Übersichtsartikel von Storz *et al.* (2005)]. Die *ica*-positiven Stämme *S. epidermidis* RP62A und 307 besitzen stromaufwärts des *icaADBC*-Operons zwischen den beiden Genen SERP2289 und *icaR* die 1434 bp bzw. 1439 bp lange intergenische Region *IGR_{ica}*. Der GC-Gehalt liegt mit 24,6% deutlich niedriger, als der durchschnittliche GC-Gehalt von 32,1%. Innerhalb dieser Region wurden neben einem mutmaßlichen Thr-tRNA-Gen noch zwei weitere kleine offene Leseraster vorhergesagt (SERP2290 und SERP2291), die jedoch keine bekannten Proteine kodieren.

4.3.1. Analyse der *IGR_{ica}*-Region durch Southern-Hybridisierung

Bei der Annotation des Deletionsbereiches wurde dieser auch mit den annotierten Genomen von *S. epidermidis* RP62A und ATCC 12228 verglichen (4.1.6). Die *IGR_{ica}* des Stammes 307 ist nahezu identisch mit der von RP62A, zeigt jedoch deutliche Unterschiede zur *IGR_{ica}* von ATCC 12228. Bis ungefähr zur Hälfte der *IGR_{ica}*-Region stimmen beide überein (676 bp). Exakt nach dem Thr-tRNA-Gen bricht die Übereinstimmung ab und in den Stämmen RP62A und 307 folgen 758 bp bis zu *icaR*, im Stamm ATCC 12228 jedoch nur 149 bp bis SE2260.

Zunächst sollte mittels Southern-Analyse untersucht werden, ob dieser Unterschied in den *IGR_{ica}*-Regionen auch bei weiteren *ica*-positiven bzw. *ica*-negativen Stämmen zutrifft. Hierfür wurde chromosomale DNA von drei *ica*-positiven (O-47, 307, RP62A) und drei *ica*-negativen (195, 196, 197) *S.-epidermidis*-Stämmen isoliert, mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten und die Fragmente auf einem 1%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA durch Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran übertragen und mit UV-Licht fixiert. Der Blot wurde ÜN bei 42°C mit einer Sonde hybridisiert, die durch PCR mit den Oligonukleotiden Inter1 und Inter4 hergestellt wurde, und die *IGR_{ica}* vollständig abdeckt. Unterschiedliche Signale für *ica*-positive und *ica*-negative Stämme deuten

4. Ergebnisse

darauf hin, dass die intergenische Region bei diesen zwei Gruppen differiert, innerhalb der Gruppen jedoch gleichartig ist (s. Abb. 4.12).

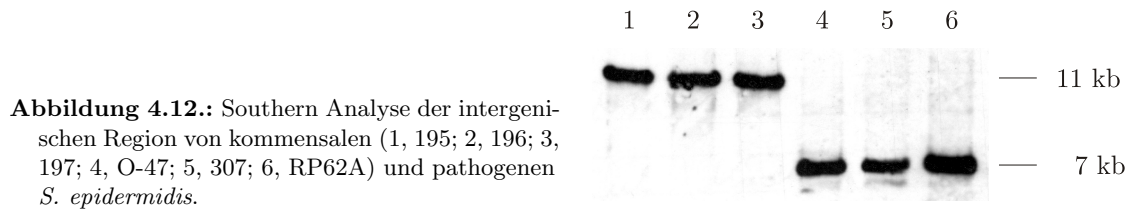


Abbildung 4.12.: Southern Analyse der intergenischen Region von kommensalen (1, 195; 2, 196; 3, 197; 4, O-47; 5, 307; 6, RP62A) und pathogenen *S. epidermidis*.

Eine Sequenzierung der sechs IGR mit dem Primern Inter1 und Inter3 konnte dies bestätigen. Die *ica*-negativen Stämme stimmten mit der Sequenz von ATCC 12228 überein, die *ica*-positiven mit der von RP62A. Die innerhalb der Gruppe von *ica*-positiven bzw. *ica*-negativen Stämme nahezu identische IGR-Sequenz der untersuchten Stämme weist darauf hin, dass die IGR_{*ica*} in allen *ica*-positiven *S. epidermidis* vorkommt, in *ica*-negativen Stämmen hingegen nicht.

4.3.2. Northern Analyse der Gesamt-RNA von *S. epidermidis*

Mittels Northern-Hybridisierung sollte festgestellt werden, ob innerhalb der IGR_{*ica*} überhaupt ein Transkript gebildet wird. *S. epidermidis* 195, 197, RP62A, O-47, 567 und 307 wurden in TSB-Medium bei 37°C kultiviert und die Gesamt-RNA bei OD₅₅₀ ≈ 2 isoliert, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Die RNA wurde denaturiert und im 1,2%igen MOPS-Agarosegel aufgetrennt und anschließend mittels Kapillar-Blot auf eine Nylon-Membran übertragen und mit UV-Licht fixiert. Für die Hybridisierung wurde eine DNA-Sonde verwendet, die mit den Primern Inter1 und Inter4 hergestellt worden war. Nach Hybridisierung der Membran ÜN bei 42°C wurde bei den *ica*-positiven Stämmen ein Signal bei ca. 450 nt detektiert (Abb. 4.13). Die *ica*-negativen Stämme 195 und 197 zeigten kein Signal. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die IGR_{*ica*} von *ica*-positiven Stämmen ein RNA-Transkript enthält.

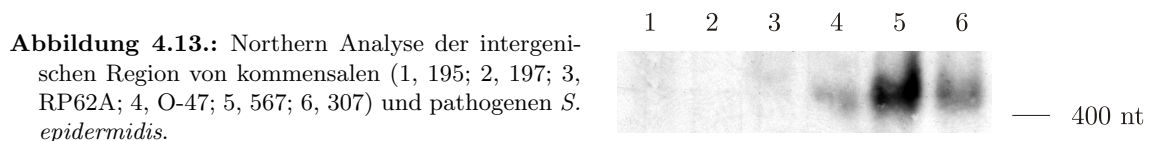


Abbildung 4.13.: Northern Analyse der intergenischen Region von kommensalen (1, 195; 2, 197; 3, RP62A; 4, O-47; 5, 567; 6, 307) und pathogenen *S. epidermidis*.

Da auf alle Spuren dieselbe RNA-Menge aufgetragen wurde, lassen sich aufgrund der Stärke des Signals unterschiedliche Transkriptmengen feststellen. Die stärkste Expression war im Stamm 567 nachweisbar. Dieser Stamm bildet somit eine größere Menge an RNA-Transkript. Der starke Biofilmbildner RP62A wies nur ein sehr schwaches Signal auf. *S. epidermidis* 567 bildet ohne Induktion keinen Biofilm aus. Somit kann eine Korrelation zwischen der Biofilmbildung und der Stärke des RNA-Transkripts vermutet werden.

4.3.3. Bioinformatische Analyse der intergenischen Region IGR_{ica}

Zur eingehenderen Untersuchung des IGR_{ica}-Transkripts musste die Orientierung und Länge bestimmt werden. Dafür sollten zunächst mögliche Promotoren und Transkriptionsterminatoren im Bereich der IGR_{ica} mittels bioinformatischer Methoden vorhergesagt werden. Durch die *neural network promoter prediction* (Reese 2001) wurden eine Anzahl an möglichen Promotoren für IGR_{ica} vorhergesagt, von denen jedoch nur diejenigen ausgewählt wurden, die eine Promotor-Wertungszahl von 1,0 besaßen. Der Algorithmus *TransTerm* (Ermolaeva *et al.* 2000) erlaubt die Vorhersage Rho-unabhängiger Transkriptionsterminatoren. Auf diese Weise konnten sechs Promotoren auf dem direkten Strang (P1d–P6d), vier auf dem komplementären Strang (P1r–P4r) und zwei Terminatoren (T1, T2) gefunden werden (s. Tab. 4.2). Die beiden Transkriptionsterminatoren T1 und T2 können in beiden Leserichtungen aktiv sein, da in beiden Orientierungen eine Folge von mehreren Thymidin-Resten an die Haarnadelschleife anschließt. In Abb. 4.14 sind die sich aus den Promotoren und Terminatoren ergebenden Transkripte dargestellt.

Bezeichnung	Start	Stopp	Sequenz
P1d	79	124	taagttttcaaattttcatcttcctcaaatattaatctca [†] aaagttttca
P2d	132	177	tattttcatgtaataatattaagacaatttatgatgactt [†] gatataaagc
P3d	205	250	aattgatttaattttgataaataaaattgaaatattcatga [‡] ataatgtca
P4d	316	361	tttttaataactcgacaataattatctttaaattcatt [†] taagtttga
P5d	531	576	tgttgctttacaaaaccttcgatatattatatgatattaa [†] tgttgaaat
P6d	1053	1098	gtaagttttcaaaatataaaataagcacctatacttaatt [†] agtatagtg
P1r	1294	1249	GCTAAATATTTTTATGTGCAAATACATTTATAATAAAAT [†] TATAAAAATA
P2r	1158	1113	TTTTGCGAATTTTAAAGGAATAATGATTGTTTTCTTTCAT [†] TATGTTTGT
P3r	1070	1025	TATTTTATTTTTGAAAACTTACTATAAACGCGAAATATT [†] TATATTCTCA
P4r	474	429	AAATATACAATTTGGACTGTGATTATCATTCAATCAAAAT [†] TAATCACAAC
T1	677	736	TATTGATAAAA <i>TGGCCTGAGACGA</i> TAAA <i>TTGTCTCAGGCCA</i> TTTAACGTTTATGCA
T2	1062	1118	ATATAAAATAA <i>GCACCTATACT</i> TAATT <i>AGTATAGATGC</i> TTTTATTTATACAAA

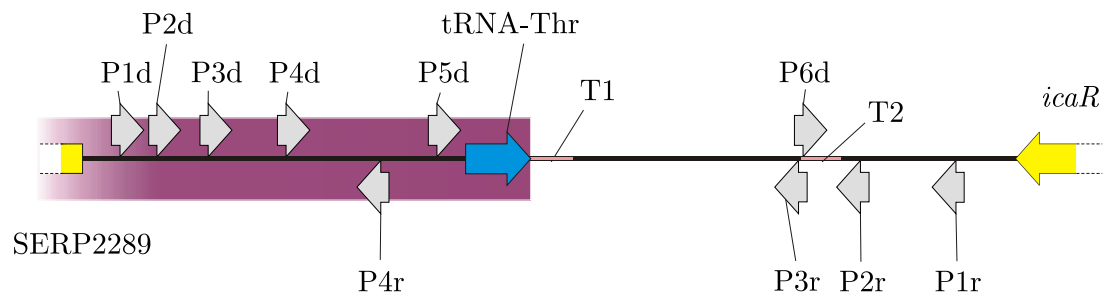
Tabelle 4.2.: Vorhergesagte Promotorstrukturen und Transkriptionsterminatoren in IGR_{ica}. Die vergrößerten Buchstaben kennzeichnen den Transkriptionsstart. Promotoren auf dem reversen Strang sind in Versalien gedruckt. Die Rho-unabhängigen Transkriptionsterminatoren können in beiden Leserichtungen aktiv sein. Die Nukleotide der Haarnadel sind kursiv gedruckt.

4.3.4. Bestimmung der Transkript-Orientierung

Die Orientierung eines RNA-Transkripts lässt sich durch die Verwendung von einzelsträngigen RNA-Sonden überprüfen. Dafür wurde zunächst die Gesamt-RNA von *S. epidermidis* 307 bei OD₅₅₀ ≈ 2 in TSB-Medium isoliert, in einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen (s. Abschn. 4.3.2).

Zur Herstellung der Sonden wurde ein Bereich innerhalb der IGR_{ica} ausgewählt, wel-

4. Ergebnisse

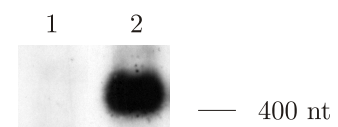


	P1d	P2d	P3d	P4d	P5d	P6d	P1r	P2r	P3r	P4r
T1	618 nt	565 nt	492 nt	381 nt	146 nt	—	568 nt	442 nt	354 nt	—
T2	1000 nt	947 nt	874 nt	763 nt	548 nt	—	193 nt	—	—	—

Abbildung 4.14.: IGRica des sequenzierten pathogenen Stammes *S. epidermidis* RP62A mit den vorhergesagten Promotoren (P), Transkriptionsterminatoren (T) und der hypothetischen Threonyl-tRNA. Violett hinterlegt ist jener Bereich, der eine signifikante Ähnlichkeit zu *S. epidermidis* ATCC 12228 aufweist. Die Tabelle zeigt mögliche Transkriptlängen der RNA, die sich durch Kombination der Promotoren und Terminatoren ergeben.

cher mit vielen der möglichen Transkripte überlappt. Mit den Oligonukleotid-Paaren (i) IGR-transkr_1 und IGR-transkr_2_T7 bzw. (ii) IGR-transkr_1_T7 und IGR-transkr_2 wurden PCR-Fragmente amplifiziert, welche je an einem Ende mit dem Promotor der T7-RNA-Polymerase versehen waren. Dies erlaubte die *in-vitro*-Transkription von RNA-Sonden, die komplementär zu den beiden Strängen sind. Nach Synthese und Aufreinigung der RNA-Sonden wurden sie mit dem ECL-System markiert und für die Hybridisierung der Membran ÜN bei 42°C benutzt. Als Positiv-Kontrolle wurde chromosomale DNA von *S. epidermidis* 307 verwendet. Ein Signal mit Sonde ii (Abb. 4.15) wies auf die Kodierung am Gegenstrang hin; das entspricht der gleichen Orientierung wie die beiden Gene *icaR* und SERP2289.

Abbildung 4.15.: Northern-Blot-Analyse mit zwei komplementären RNA-Sonden zur Bestimmung der Orientierung der IGRica-RNA von *S. epidermidis* 307. 1, Sonde i; 2, Sonde ii.



4.3.5. Ermittlung der Transkriptlänge

Bestimmung des 5'-Endes. Zur Bestimmung von Länge und Transkriptions-Startpunkt der IGRica-RNA wurde zum einen die Methode des *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) benutzt (s. Abschn. 3.2.5); des Weiteren *primer extension* als Alternative zur Ermittlung des 5'-Endes. Für die *primer-extension*-Analyse wurde die Gesamt-RNA aus *S.*

4.3. Identifizierung eines RNA-Transkripts stromaufwärts des *ica*-Operons

epidermidis 307 gewonnen, wie im Material-Teil beschrieben. Parallel zur cDNA-Synthese unter Verwendung des Primers IGR_prim-ext-3, wurde der Bereich der intergenischen Region mit dem Primern Inter1 und Inter4 amplifiziert und in den Vektor pGEM-T Easy kloniert. Die Sequenzierreaktion wurde anschließend mit IGR_prim-ext-3 durchgeführt und zusammen mit der cDNA auf das Sequenziergel aufgetragen (Abb. 4.16). Die beiden Methoden zur Bestimmung des 5'-Endes lieferten unterschiedliche Transkriptstartpunkte. Die *primer-extension*-Methode zeigte ein um 5 Nukleotide längeres RNA-Transkript als die 5'-RACE. Jedoch konnte dieses Ergebnis durch Wiederholung bestätigt werden. Das IGR_{*ica*}-Transkript beginnt also 343 nt nach Ende des *icaR*-Gens.

Bestimmung des 3'-Endes. Nicht nur eukaryontische RNAs besitzen an ihrem 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz. Auch prokaryontische Transkripte sind oft 3'-polyadenyliert; allerdings sind nur ca. 10–20 Nukleotide angefügt. So ist es möglich, die Methode des RACE ebenso für das 3'-Ende zu verwenden. Im Falle des IGR_{*ica*}-Transkripts wurde cDNA-Synthese mit dem Oligo-d(T)-Primer-Mix (s. Abschn. 3.2.5) und anschließend eine PCR mit den Primern SP_3'_RACE und PCR-Anchor-Primer durchgeführt. Das amplifizierte Produkt wurde mit dem Primer SP_3'_RACE sequenziert. Anhand der im PCR-Anchor-Primer enthaltenen 16 Adenosin-Reste konnte das 3'-Ende der IGR_{*ica*}-RNA eindeutig identifiziert werden. Es überlappt 70 nt mit der Thr-tRNA, die ihrerseits 93 nt lang ist. Daher könnte die IGR_{*ica*}-RNA auch als *antisense*-RNA die Expression der Thr-tRNA regulieren. Ausgehend vom ermittelten 5'- und 3'-Ende der IGR_{*ica*}-RNA ergibt sich somit eine Gesamtlänge von 487 nt. Die Lage der RNA (unterstrichen) und der Thr-tRNA (kursiv) in der IGR_{*ica*} ist in Abb. 4.16 dargestellt.

Bestimmung des Promotors. Ausgehend vom ermittelten Transkriptionsstartpunkt konnte ein mutmaßlicher Promotor bestimmt werden (s. Abb. 4.17). Sowohl die -10-Box, als auch die -35-Box sind untypisch für grampositive Promotoren und zeigen keine Übereinstimmung mit den in Gertz *et al.* (2000) und Novick (1991) beschriebenen grampositiven Promotoren. Der experimentell bestimmte Transkriptionsstart stimmt nicht mit einem der vorhergesagten Promotoren (s. Tab. 4.2) überein. Der Startpunkt des am nächsten liegenden Promotors P2r war 31 bp weiter entfernt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine post-transkriptionelle Prozessierung am 5'-Ende der IGR_{*ica*}-RNA, wie sie auch für die 4,5S-RNA und die tmRNA beschrieben wurde (Luirink u. Dobberstein 1994; Williams u. Bartel 1998).

4.3.6. Sekundärstruktur der IGR_{*ica*}-RNA

Für die Funktion kleiner regulatorischer RNAs ist die Sekundärstruktur oft von entscheidender Bedeutung. Deshalb sollte sie mit dem *mfold*-Algorithmus (Mathews *et al.* 1999;

4. Ergebnisse

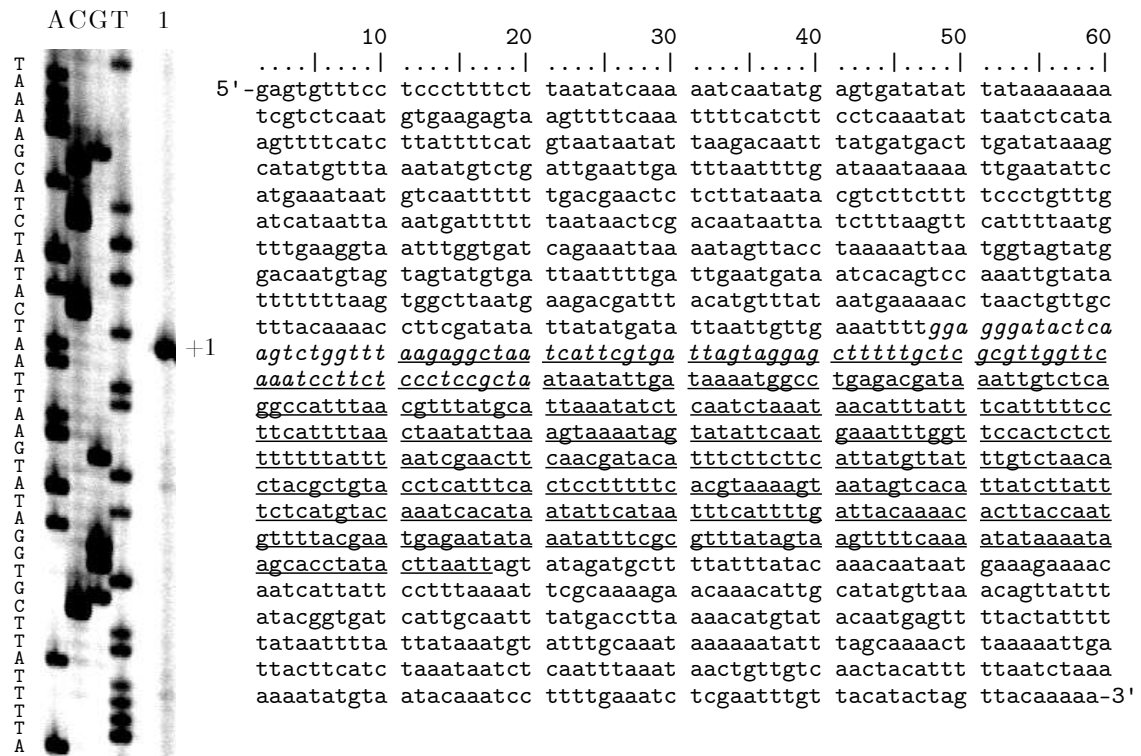


Abbildung 4.16.: *primer-extension*-Analyse der IGRica-RNA. Das Produkt der *primer-extension*-Reaktion (1) wurde parallel zur Sequenzierung aufgetragen, welche mit demselben Primer durchgeführt wurde. In der Sequenz der intergenischen Region ist die IGRica-RNA unterstrichen (komplementäre Sequenz), die Thr-tRNA kursiv dargestellt.

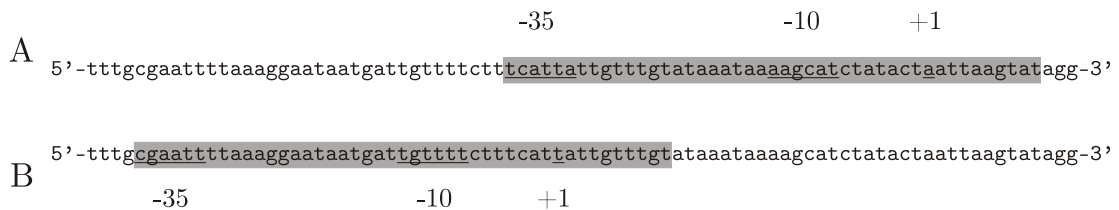


Abbildung 4.17.: Promotor-Vergleich des ermittelten und vorhergesagten Promotors für die IGRica-RNA. A, durch *primer extension* ermittelter Promotor; B, vorhergesagter Promotor P2r. Die jeweiligen Transkriptions-Startpunkte liegen 31 bp voneinander entfernt.

Zuker 2003)) vorhergesagt werden. Die stabilste Sekundärstruktur dieser Analyse ist in Abb. 4.18 dargestellt.

Die verschiedenen, für die IGR \dot{i} ca-RNA vorhergesagten Sekundärstrukturen mit unterschiedlichen freien Energien, stimmen in vielen Bereichen überein. Eine sehr stabile Region stellt die lange Haarnadel am Beginn des Transkripts (Basen 36–136, rot markiert) dar. Die beiden, mehrere Haarnadeln umfassenden Bereiche in der Mitte und am Ende der RNA variieren (Basen 150–333 und 355–450, blau markiert), sind jedoch in den meisten der vorhergesagten Strukturen vorhanden. Die mögliche Hfq-Bindungsstelle, sowie der Rho-unabhängige Transkriptionsterminator sind in der Abbildung grün markiert. In der Konformation mit der geringsten freien Energie (s. Abb. 4.18) sind zwei Bereiche mit dicht aufeinander folgenden Haarnadeln zu sehen (blau markiert). Die ungepaarten Basen in den Schleifen könnten möglicherweise mit Zielsequenzen interagieren und Ribosomen-Bindestellen blockieren, oder andere RNAs in thermodynamisch ungünstigeren Konformationen stabilisieren. Insgesamt zeigt die Analyse, dass es sich bei dem IGR \dot{i} ca-Transkript durchaus um eine regulatorische RNA handeln könnte.

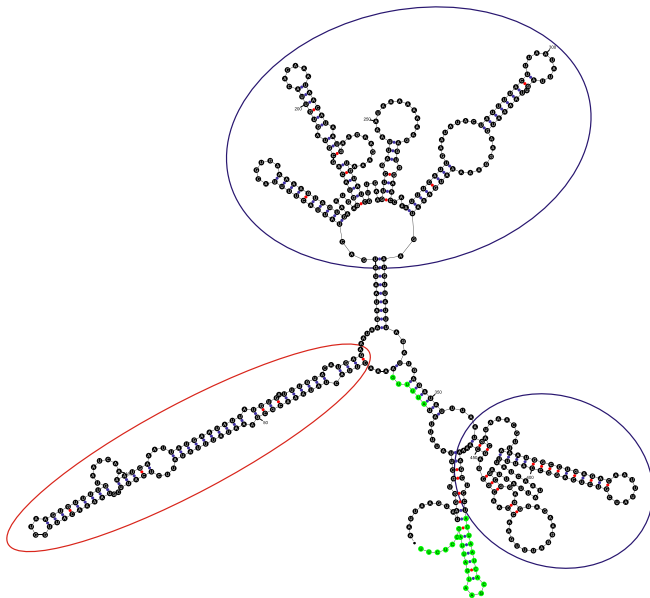


Abbildung 4.18.: Vorhersage der Sekundärstruktur der IGR \dot{i} ca-RNA durch *mfold*. $\delta G = -403,06 \text{ kJ/mol}$. Die potentielle Hfq-Bindestelle am Beginn der RNA sowie die Haarnadelschleife für Rho-unabhängige Transkriptionstermination sind grün hinterlegt. Stabile Strukturen sind rot bzw. blau hinterlegt.

4.3.7. RT-PCR-Analyse

In der Northern-Analyse konnte nur ein schwaches Signal für die IGR \dot{i} ca-RNA detektiert werden. Da die Methode der RT-PCR geeignet ist, auch sehr geringe Mengen von RNA nachzuweisen, sollte sie dazu verwendet werden, zu überprüfen, ob die IGR \dot{i} ca-RNA konstitutiv, oder nur zu bestimmten Zeitpunkten des Wachstums exprimiert wird. Zunächst wurde wie bei der Northern-Analyse RNA der Stämme 567 und 307 isoliert. Nach dem DNaseI-Verdau konnte die reverse Transkription wie in Abschn. 3.2.4 beschrieben durch-

4. Ergebnisse

geführt werden. Mit der erhaltenen cDNA wurde anschließend eine Standard-PCR mit den Primern IGRtr-1_RT und IGRtr-2_RT durchgeführt. So konnte das IGRica-RNA-Transkript in den Stämmen 307 und 567 mittels RT-PCR nachgewiesen werden (s. Abb. 4.19).

Abbildung 4.19.: Qualitative RT-PCR-Analyse der IGRica-RNA. 1, Positiv-Kontrolle: DNA von RP62A; 2, Negativ-Kontrolle: RNA von 567; 3, cDNA von 567; 4, Negativ-Kontrolle: RNA von 307; 5, cDNA von 307.



Im Folgenden wurde der Stamm *S. epidermidis* 307 bei 37°C in TSB-Medium kultiviert und die RNA an unterschiedlichen Punkten der Wachstumskurve ($OD_{550} \approx 1-6$) isoliert. Durch RT-PCR mit den Primern IGRtr-1_RT und IGRtr-2_RT war es möglich, zu allen untersuchten Zeitpunkten ein Transkript nachzuweisen (s. Abb. 4.20). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die IGRica-RNA konstitutiv exprimiert wird.

Abbildung 4.20.: Qualitative RT-PCR-Analyse der IGRica-RNA von *S. epidermidis* 307 im Verlauf des Wachstums. 1, $OD_{550} \approx 1$; 2, $OD_{550} \approx 2$; 3, $OD_{550} \approx 3$; 4, $OD_{550} \approx 4$; 5, $OD_{550} \approx 5$; 6, $OD_{550} \approx 6$.



4.3.8. Untersuchungen zu Hfq

Das Gen *hfq*, das für den Wirtsfaktor HF-1 kodiert, wurde zuerst für *E. coli* beschrieben (Franze de Fernandez *et al.* 1968). Es ist in den meisten annotierten mikrobiellen Genomen vorhanden, so auch in den bis jetzt 13 sequenzierten und annotierten Staphylokokken-Genomen. Hfq dient unter anderem als Chaperon zur Stabilisierung der mRNA-Transkripte, ist aber auch mit vielen kleinen regulatorischen sRNAs assoziiert und notwendig für deren Aktivität.

Ein Vergleich der Sequenzen zeigt sowohl auf Nukleotid-, als auch auf Proteinebene eine sehr hohe Ähnlichkeit innerhalb des Genus *Staphylococcus*. *hfq* ist ebenso in anderen bakteriellen Gruppen wie den Alpha- und Gammaproteobakterien oder andern Mitgliedern der Familie *Firmicutes* vertreten. Eine *ClustalW*-Analyse zeigt, dass in allen betrachteten Proteinsequenzen ein Motiv (KHAIST) im Bereich der letzten beiden β -Faltblättern $\beta 4$ und $\beta 5$ konserviert ist (s. Abb. 4.21). Dies entspricht exakt den Aminosäuren, die in der zentralen Höhlung des Hfq-Hexamers liegen, und die RNA binden.

Zum Nachweis des *hfq*-Gens in weiteren klinischen und kommensalen Stämmen von *S. epidermidis* wurde eine PCR mit den Primern Hfq_1 und Hfq_2 und der chromosomalen DNA der Stämme *S. epidermidis* 195, 196, 197, O-47, 307, 567 und CSF41498 durchgeführt.

4.3. Identifizierung eines RNA-Transkripts stromaufwärts des *ica*-Operons

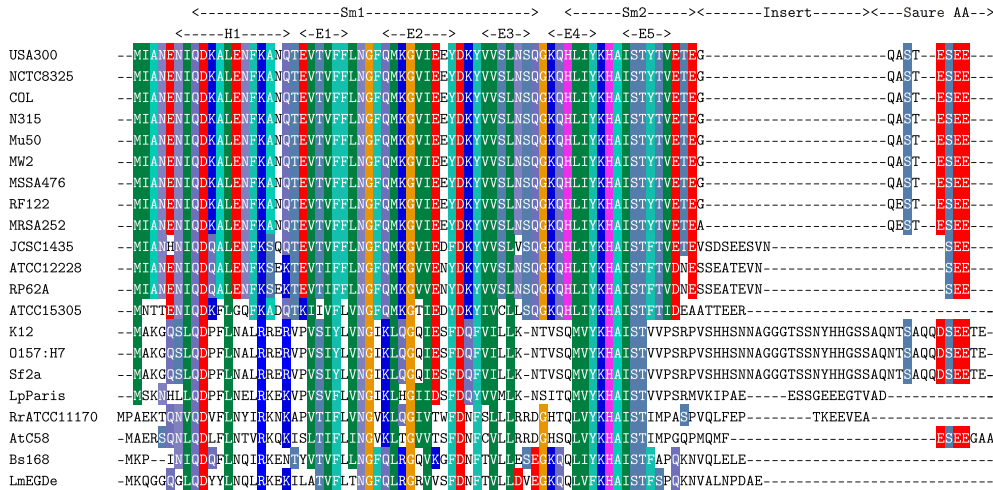
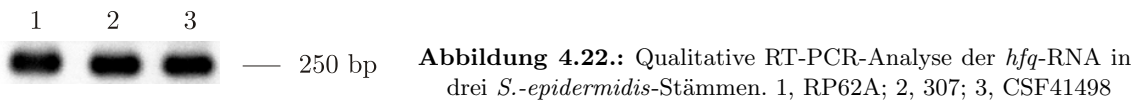


Abbildung 4.21.: Vergleich von Hfq-Proteinsequenzen aus *Firmicutes* und *Proteobacteria*. *S. aureus* – USA300, NCTC8325, COL, N315, Mu50, MW2, MSSA476, RF122, MRSA252; *S. haemolyticus* – JCSC1435; *S. epidermidis* – ATCC 12228, RP62A; *S. saprophyticus* – ATCC 15305; *E. coli* – K12, O157:H7; *Shigella flexneri* 2a; *Legionella pneumophila* (Paris); *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170; *Agrobacterium tumefaciens* C58; *Bacillus subtilis* 168; *Listeria monocytogenes* EGDe

Sämtliche getesteten Stämme waren positiv für *hfq*. Ob das *hfq*-Gen auch in *S. epidermidis* exprimiert wird, sollte durch RT-PCR untersucht werden. Dazu wurde die Gesamt-RNA der Stämme *S. epidermidis* 307, CSF41498 und RP62A bei $OD_{550} \approx 2$ in TSB-Medium isoliert und nach der cDNA-Synthese eine PCR mit den Primern Hfq_1 und Hfq_2 durchgeführt. Bei allen drei Stämmen konnte ein Signal detektiert werden (s. Abb. 4.22). Damit konnte gezeigt werden, dass *hfq* auch in *S. epidermidis* transkribiert wird.



Für die Untersuchung, ob die IGR-ica-RNA Hfq-bindende Eigenschaften besitzt, wurde das Hfq-Protein aus *S. epidermidis* 307 kloniert, in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt. Zur Expression wurde das QIAexpressionist-Kit der Firma QIAGEN verwendet wie im Methodenteil beschrieben. Zunächst wurde ein PCR-Fragment mit den Primern Hfq_start_BamHI_FXa und Hfq_end_HindIII amplifiziert, welches neben dem *hfq*-Gen auch eine Faktor-Xa-Schnittstelle, sowie Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III besitzt. Der Vektor pQE30 und das PCR-Produkt wurden beide mit genannten Enzymen gespalten und anschließend ligiert (s. Abb. 4.23). Nach der Transformation in *E. coli* M15 und Re-Isolierung konnte durch Sequenzierung mit den Primern M13forward und M13reverse die korrekte Insertion des *hfq*-Gens in pQE30 bestätigt werden. Der resultierende Vektor wurde pME16 genannt. Er besitzt hinter dem *lac*-Operator im richtigen

4. Ergebnisse

Leserahmen einen His-tag, eine Faktor-Xa-Schnittstelle und das *hfq*-Gen.

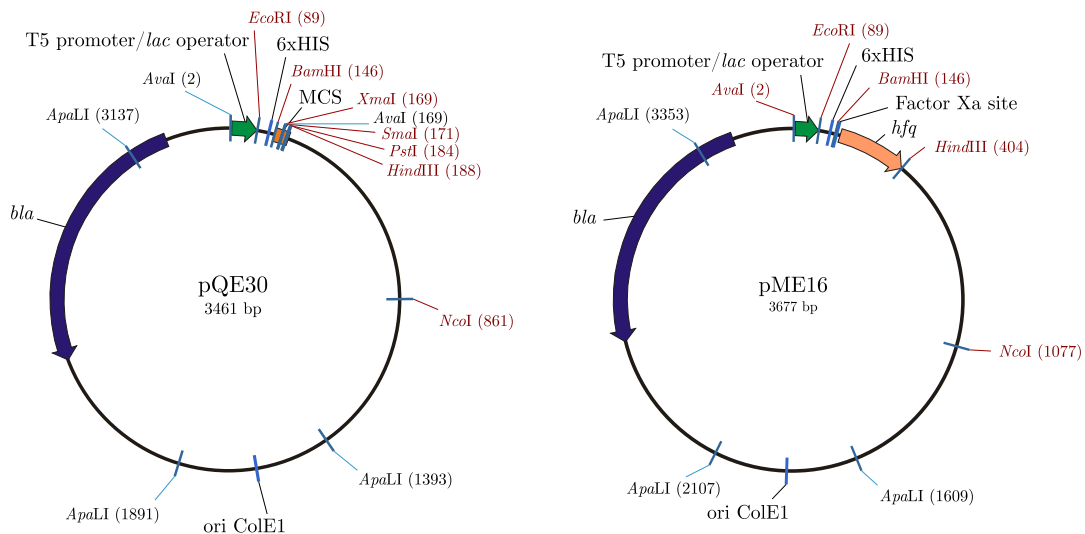


Abbildung 4.23.: Klonierung von Hfq in pQE30. Der Expressionsvektor pQE30 besitzt vor der *multiple cloning site* einen His-tag. pME16 enthält das *hfq*-Gen im richtigen Leseraster und mit einer Faktor-Xa-Schnittstelle.

Als erstes sollte der optimale Zeitpunkt für die Isolierung von Hfq ermittelt werden. Dazu wurde *E. coli* M15 (pREP4, pME16) in LB-Medium kultiviert und mit IPTG (1 mM) induziert. Im Abstand von je einer Stunde wurden Proben genommen und das Rohextrakt in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau-G250 Lösung angefärbt. Bereits eine Stunde nach der Induktion war eine deutliche Bande bei ca. 10 kDa sichtbar, welches in etwa dem Molekulargewicht von 6xHis-Hfq entspricht. Auch nach längerer Induktionszeit wurde die Bande nicht intensiver. Um zu testen, ob sich Hfq in der löslichen oder unlöslichen Fraktion der Zellproteine befindet, wurden die Zellen drei Stunden nach der Induktion geerntet, sonifiziert und abzentrifugiert. Der Überstand repräsentierte die lösliche Fraktion, das Pellet die unlösliche. Beide wurden im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt. Die Hfq-Bande war hauptsächlich in der löslichen Fraktion sichtbar; zu einem kleinen Teil jedoch auch in der unlöslichen.

Für die Aufreinigung von Hfq wurden 25 ml Kultur von *E. coli* M15 (pREP4, pME16) bei $OD_{550} \approx 0,7$ induziert und 3 h bei 37°C kultiviert. Nach Inkubation mit Lysozym und Sonifikation wurde das Lysat auf eine Ni-NTA-Säule gegeben und Hfq über Affinitätschromatographie gereinigt wie im Material-Teil beschrieben. Auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurden die einzelnen Fraktionen aufgetrennt und angefärbt (s. Abb. 4.24).

Nach der Elution des Hfq-Proteins von der Säule, trat nicht wie erwartet eine starke Bande auf Höhe des Hfq-Monomers auf (10 kDa), stattdessen bei ca. 54 kDa. Dies weist darauf hin, dass sich Hfq *in vitro* trotz His-tag als Hexamer formiert. Um zu überprüfen, ob die-

4.3. Identifizierung eines RNA-Transkripts stromaufwärts des *ica*-Operons

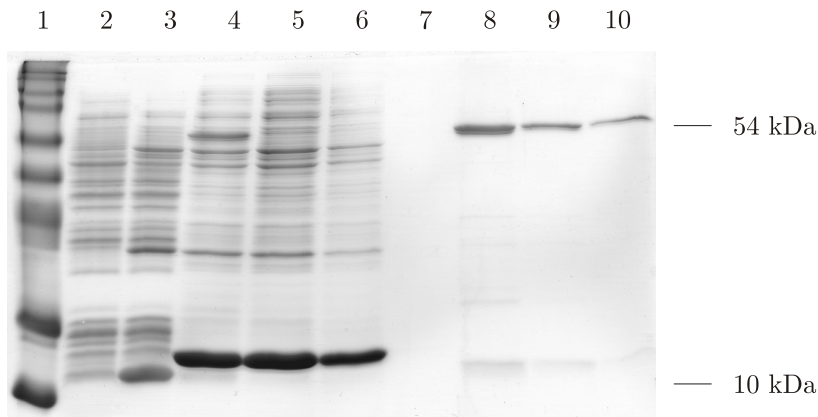


Abbildung 4.24.:
Aufreinigung des Hfq-Proteins. 1, Marker; 2, nicht induziert (Kontrolle); 3, induziert (3 h); 4, Lysat; 5, Durchfluss; 6-7, Waschschrirte; 8-10, Elutionsschrirte.

se Bande wirklich His-markiertem Hfq entspricht, wurde eine Western Analyse mit einem α -His-Antikörper durchgeföhrt. Ein deutliches Signal an Stelle der Bande im Coomassiegefärbten Gel zeigt, dass es sich um ein Histidin-reiches Protein handelt. Wenn auch unwahrscheinlich, so bestand die Möglichkeit, dass es sich um ein Histidin-reiches Protein aus *E. coli* handelt und nicht um das His-markierte Hfq. Damit das ausgeschlossen werden konnte, wurde die gleiche Isolationsmethode bei *E. coli* M15 ohne pQE30 angewandt. Hier erschien keine 54-kDa-Bande. Nach der Aufreinigung von Hfq wurde die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford bestimmt (s. Abschn. 3.3.4).

In den vorangegangenen Experimenten konnte somit bestätigt werden, dass *hfq* in *S. epidermidis* 307 transkribiert wird und heterolog in *E. coli* exprimiert werden kann. Wie die 54-kDa-Bande im Polyacrylamidgel zeigt, lagern sich die gereinigten Hfq-Monomere aus *S. epidermidis* 307 offenbar *in vitro* spontan zu einem Hexamer zusammen.

4.3.9. Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay

Die IGR_{ica}-RNA weist in in der Nähe des 5'-Endes eine mutmaßliche Hfq-Bindestelle auf (s. Abb 4.18). Die Basenfolge 5'-AUUUUG-3' (Nukleotide 26-31) stimmt annähernd mit der RNA-Sequenz 5'-AUUUUG-3' überein wie sie von Schumacher *et al.* (2002) für das *S. aureus* Hfq beschrieben und untersucht wurde. Allgemein existiert für Hfq keine exakte Konsensus-Sequenz; vielmehr bieten A/U-reiche Regionen der RNA mögliche Bindungsstellen für das Hfq-Hexamere. Solche Bereiche sind in der IGR_{ica}-RNA häufig vorhanden. Deshalb sollte zur näheren Betrachtung ein *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) durchgeföhrt werden (s. Abschn. 3.2.6, mit dem es möglich ist, die eventuelle Bindung von Proteinen an Nukleinsäuren zu untersuchen. Bindet ein Protein an DNA oder RNA, so verändert es deren Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Freie RNA wandert schneller, als an ein Protein gebundene.

Hierzu wurde aufgereinigtes Hfq verwendet, wie in Abschnitt 4.3.8 beschrieben. Um

4. Ergebnisse

ausreichende Mengen an *IGRica*-RNA für die Experimente zur Verfügung zu haben, wurde diese *in vitro* transkribiert. Dazu wurde ein PCR-Fragment mit der chromosomalen DNA von *S. epidermidis* 307 und den Primern IGRtr1-T7 und IGRtr2 amplifiziert, welches die vollständige Sequenz der *IGRica*-RNA und einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase umfasst. Nach der *in-vitro*-Transkription wurde die RNA aufgereinigt, in Wasser gelöst und die Konzentration im Photometer bestimmt.

Um unspezifische Bindung der *IGRica*-RNA auszuschließen, wurde für den EMSA eine Kompetitor-RNA eingesetzt, die aus Poly(A) bzw. OxyS-RNA aus *E. coli* bestand. Hfq wurde im molaren Verhältnis von 1000/1 verglichen mit *IGRica*-RNA eingesetzt wie in Zhang *et al.* (1998) für die OxyS-RNA bei *E. coli* beschrieben. Nach Auftrennung der RNA im nativen Polyacrylamidgel wurde die RNA elektrophoretisch auf eine Nylonmembran übertragen und dort mit einer ECL-markierten Sonde hybridisiert. Diese bestand aus dem PCR-Produkt für die *in-vitro*-Transkription. Wie in Abb. 4.25 zu sehen ist, tritt keine Verschiebung der *IGRica*-RNA-Bande auf.

Es konnte daher aufgrund dieses Experimentes keine Bindung der *IGRica*-RNA an Hfq nachgewiesen werden. Allerdings kann sie auch nicht ausgeschlossen werden, falls eine Interaktion andere Bedingungen benötigt.

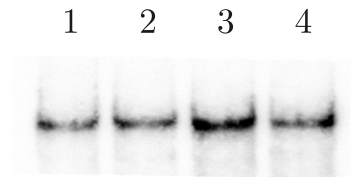


Abbildung 4.25.: *electrophoretic mobility shift assay.* 1, *IGRica*-RNA; 2, *IGRica*-RNA mit Hfq; 3-4, *IGRica*-RNA mit Hfq und Kompetitor-RNA Poly(A) bzw. OxyS-RNA.

4.3.10. Nachweis von IS256-Insertionen in der *IGRica*

Während der Analyse Biofilm-negativer Phasenvarianten in *S. epidermidis* (Löfner 2002) traten auch solche auf, welche noch ein intaktes *icaADBC*-Operon besaßen, jedoch die Fähigkeit zur Biofilmbildung verloren hatten. Zunächst sollten die Varianten, die keine Deletionen aufwiesen, nochmals im Adhärenztest untersucht werden. Eine ÜNK des jeweiligen Stammes in TSB-Medium wurde 1/100 verdünnt und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte überführt (100 µl pro well). Nach Inkubation der Platte für 18–24 h bei 37 °C wurde die Absorption des gebildeten Biofilms bestimmt, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben (s. Abb. 4.26). Bereits mit bloßem Auge ließen sich zwei Phasenvarianten ermitteln, die zwar auf Kongorot-Agar als PIA-negativ identifiziert wurden, aber im Adhärenztest eine abgeschwächte Biofilmbildung zeigten (307/50 und 307/58).

IS256 ist ein sehr aktives Element. Daher sollte untersucht werden, ob es nicht nur an den *ica*-Deletionen beteiligt ist, sondern auch durch Insertion in die *IGRica* bei den zwei Varianten 307/50 und 307/58 eventuell zur Abschwächung des Biofilms beiträgt. Dies würde

4.3. Identifizierung eines RNA-Transkripts stromaufwärts des *ica*-Operons

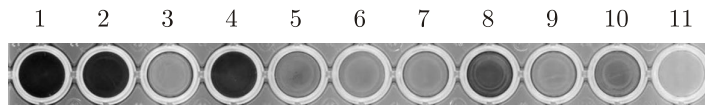


Abbildung 4.26.: Adhärenztest mit Phasenvarianten von *S. epidermidis* 307. 1, RP62A; 2, O-47; 3, *S. carnosus* TM300; 4, 307 WT; 5, 307/9; 6, 307/40; 7, 307/43; 8, 307/50; 9, 307/54; 10, 307/58; 11, Leerwert.

auf eine mögliche Rolle des Transkripts an der Biofilmregulation hindeuten. Durch eine PCR mit den Primern Inter1 und Inter4, wurde die *IGRica* amplifiziert. Allerdings wurde statt der normalen Elongationszeit von 1,5 min eine um die Größe des *IS256*-Elements verlängerte verwendet (3 min), da im Falle einer Integration eine Länge von ca. 2,7 kb zu erwarten wäre. Nach der Auftrennung im Agarosegel war eine Verschiebung der *IGRica*-Bande um exakt 1,3 kb zu beobachten (s. Abb. 4.27).

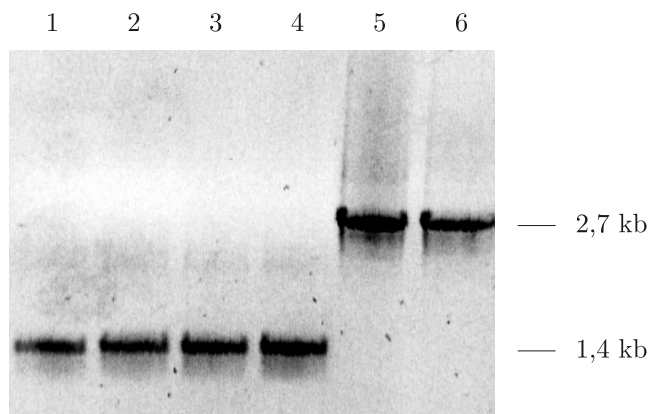


Abbildung 4.27.: *IGRica*-PCR mit verlängerter Elongationszeit bei *S. epidermidis*-Stämmen und Phasenvarianten von 307. 1, RP62A; 2, O-47; 3, 307 WT; 4, 307/43; 5, 307/50; 6, 307/58.

Eine anschließende Sequenzierung des Fragments mit den Primern *IS.intern-f.1029* und *IS.intern-r.279*, die aus dem *IS256* heraus weisen, konnte die Insertion von *IS256* eindeutig bestätigen. Des Weiteren ergab die Sequenzanalyse, dass die *IS256*-Kopien in den beiden Varianten jeweils in komplementärer Richtung integriert sind (s. Abb. 4.28). In *S. epidermidis* 307/50 weist die Transposase in Richtung der *IGRica*-RNA, in der Variante 307/58 in Richtung von *icaR*. Auf diese Weise könnten auch die in *IS256* enthaltenen Promotoren *P* und *P_{out}* die Transkription der *IGRica*-RNA beeinflussen.

4.3.11. Untersuchungen zu weiteren *IS256*-Insertionen in Biofilm-negativen Phasenvarianten

Da eine Integration von *IS256* in der *IGRica* möglicherweise die Biofilmbildung beeinflusst, sollten weitere Biofilm-negative Phasenvarianten hinsichtlich der Inaktivierung von Regu-

4. Ergebnisse

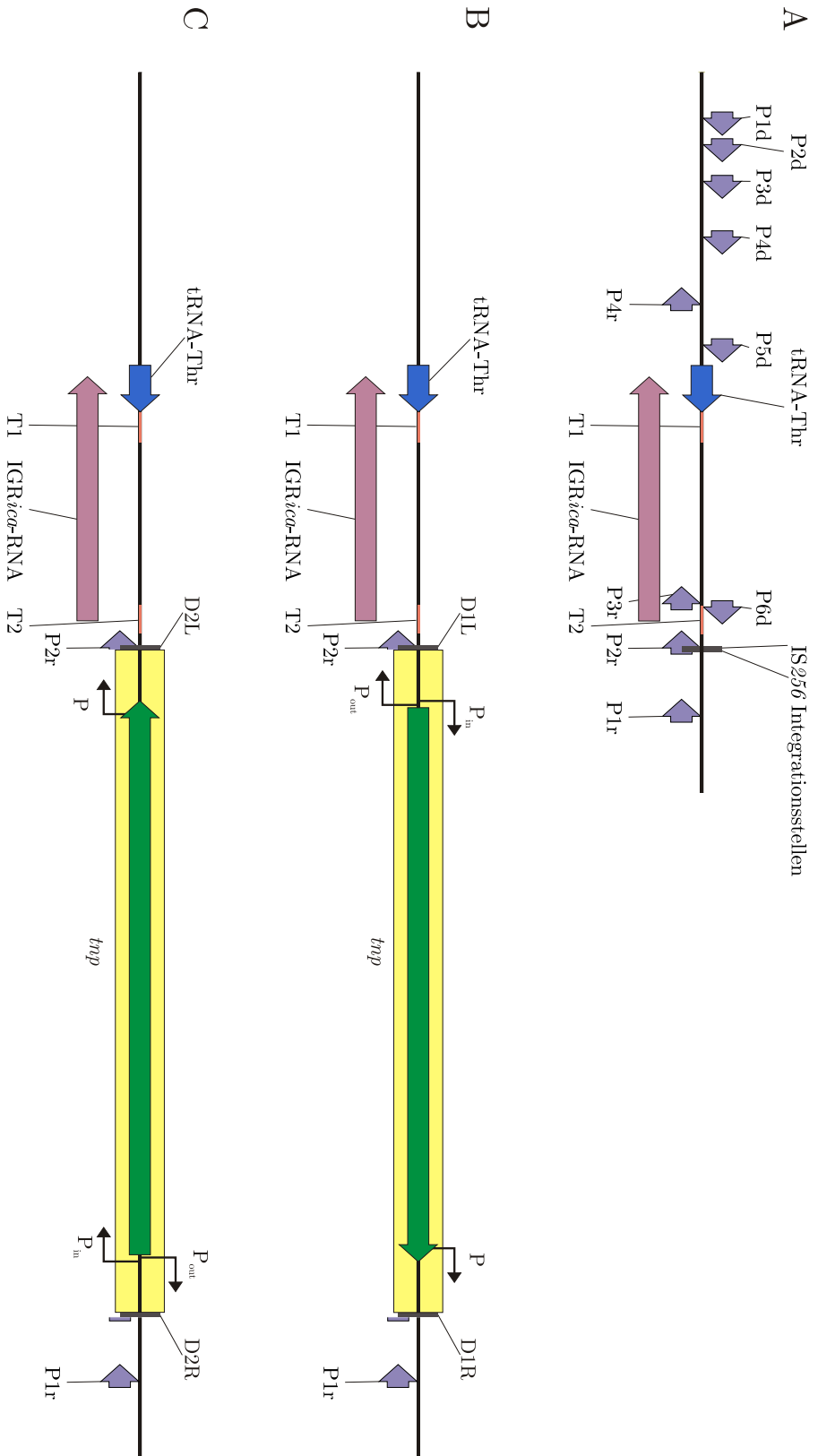


Abbildung 4.28: Insertionen von IS₂₅₆ in der IGR_{ica} von *S. epidermidis* 307 WT; **B**, 307/50 mit IS₂₅₆-Insertion; **C**, 307/58 mit IS₂₅₆ in reverser Orientierung. Abk.: Promotoren (P), Terminatoren (T) und direct repeats (DR).

4.3. Identifizierung eines RNA-Transkripts stromaufwärts des *ica*-Operons

latores durch IS256 untersucht werden. Neben den Genen *icaA* und *icaC*, welche häufig als Insertionsstellen dienen, wurden neben der IGR_{*ica*} auch wichtige Regulatoren der Biofilmbildung wie *sarA*, *rsbU* und *rnaIII* ausgewählt. Um auf eine Integration von IS256 zu testen, wurde eine Standard-PCR für die entsprechenden Gene [Primer: *icaA* (*icaA1*, *icaA2*), *icaC* (*icaC* upper, *icaC* lower), IGR_{*ica*}(Inter1, Inter4), *sarA* (SEsarA1, SEsarA2), *rsbU* (*rsbU* for, *rsbU* rev neu), *rnaIII* (*agr* fwd, *agr* rev)] durchgeführt, jedoch mit um 1,5 min verlängerter Elongationszeit (s. Tab. 4.3).

Phasenvariante	<i>icaA</i>	<i>icaC</i>	IGR _{<i>ica</i>}	<i>sarA</i>	<i>rsbU</i>	<i>rnaIII</i>
5	-	-	-	+	+	+
9	-	-	-	+	+	+
15	-	-	-	+	+	+
29	-	-	+	+	+	+
30	IS256	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+
44	+	IS256	+	+	+	+
46	+	IS256	+	+	+	+
47	-	-	-	+	+	+
50	+	+	IS256	+	+	+
54	+	+	+	+	+	+
58	+	+	IS256	+	+	+
59	+	+	+	+	+	+
61	+	+	+	IS256	+	-
63	+	IS256	+	+	+	+
69	+	+	+	+	+	+
80	+	+	IS256	+	+	+
103	+	+	+	+	+	+

Tabelle 4.3.: IS256-Insertionen Biofilm-negativer Phasenvarianten von *S. epidermidis* 307 in IGR_{*ica*} und Genen, die für Biofilmbildung notwendig sind oder diese regulieren.

In den Mutanten *S. epidermidis* 307/5, 307/9, 307/15, 307/29 und 307/47 konnte keine IS256-Insertion in den Regulator-Genen *sarA*, *rsbU* und *rnaIII* nachgewiesen werden. Die Gene für die Biofilmbildung sind durch homologe Rekombination zweier IS256-Elemente deletiert, wie bereits von Lößner (2002) gezeigt werden konnte; deshalb konnte auch kein PCR-Produkt amplifiziert werden. Außer im Stamm 307/29 ist in den vier anderen Deletionsmutanten auch die intergenische Region IGR_{*ica*} deletiert. Neben den beiden oben beschriebenen IGR_{*ica*}-Insertionsvarianten (307/50 und 307/58) konnte noch eine weitere identifiziert werden (307/80). In dieser Mutante lag das IS256-Element jedoch an derselben Stelle, wie bei der Mutante 307/50. Vier der untersuchten Phasenvarianten waren durch direkte Insertion von IS256 in die für die PIA-Produktion notwendigen Gene *icaA*

4. Ergebnisse

(307/30) und *icaC* (307/44, 307/46, 307/63) integriert. In einem Fall (307/61) war neben einer IS256-Insertion im *sarA*-Gen zusätzlich das Gen für die RNA III-RNA deletiert.

Durch die Integration von IS256 in Biofilm-assoziierte oder -regulierende Gene kann die Biofilmbildung beeinflusst werden. Neben der Transposition in *icaA* und *icaC* konnte durch diese Analyse gezeigt werden, dass IS256 auch in der IGR_{*ica*} integrieren kann. Da der Mutante 307/61 neben der in dieser Untersuchung einzigen IS256-Insertion im *sarA*-Gen auch das *rnaIII*-Gen fehlt, ist sie für weitere Untersuchungen interessant.

4.3.12. Konstruktion einer IGR_{*ica*}-Mutante

Da eine IS256-Insertion in der IGR_{*ica*} zu einen abgeschwächten Biofilm beiträgt, ist zu vermuten, dass die IGR_{*ica*}-RNA an der Regulation der Biofilmbildung beteiligt ist. Mit Hilfe einer Deletionsmutante sollte die Funktion des Transkripts näher untersucht werden. Der Bereich, in dem die IGR_{*ica*}-RNA lokalisiert ist, sollte vollständig deletiert, und durch die Insertion einer Erythromycin-Resistenzkassette (*ermB*) inaktiviert werden.

Konstruktion der IGR_{*ica*}-RNA-Deletion. Dazu wurden zunächst die beiden links und rechts angrenzenden Bereiche mit SERP2289 bzw. *icaR* amplifiziert und kloniert. Eine PCR von DNA des Stammes 567 mit den Primern *mdr-mut-left-BamHI* und *mdr-mut-right-KpnI*, sowie der Pfx-Polymerase (wie auch in allen folgenden PCRs dieses Abschnitts) zur korrekten Replikation, resultierte in einem 1910 bp langen Fragment. Dieses enthielt das Gen SERP2289 mit den Schnittstellen für *BamHI* und *KpnI*. Analog hierzu wurde eine PCR mit den Primern *icaR-mut-left-PstI-HindIII* und *icaR-mut-right-SacI-BamHI* durchgeführt, welche ein 790 bp langes Fragment mit dem *icaR*-Gen ergab. Das SERP2289-Fragment wurde direkt in den *E.-coli*-Klonierungsvektor pGEM-T Easy ligiert und in *E. coli* transformiert. In diesem Plasmid sollte auch die weitere Konstruktion des Konstrukts erfolgen. Der entstandene Vektor wurde mit *PstI* und *SacI* linearisiert, sodass in einer Ligations-Reaktion das *icaR*-Fragment neben dem SERP2289-Fragment inseriert werden konnte. Das konstruierte Plasmid wurde pME14 genannt.

Das 1461 bp lange *ermB*-Gen wurde aus dem Vektor pEC1 (Brückner 1997) mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *KpnI* ausgeschnitten und über Gel-Extraktion aufgereinigt. Nach der Linearisierung des Plasmids pME14 mit *HindIII* und *KpnI* konnte die Resistenzkassette *ermB* zwischen die Gene SERP2289 und *icaR* kloniert werden. Der neue Vektor wurde pME14a genannt.

Klonierung in pBT2. Um den Transfer in *S. epidermidis* zu ermöglichen, wurde ein *shuttle*-Vektor benötigt, der sowohl einen Replikationsursprung für gramnegative als auch für grampositive Bakterien besitzt. Für Mutagenesen in Staphylokokken hat sich das Plasmid pBT2 (Brückner 1997) bewährt, welches für die Selektion in *E. coli* eine Ampicillin-

4.3. Identifizierung eines RNA-Transkripts stromaufwärts des *ica*-Operons

Resistenzkassette und für die Selektion in Staphylokokken eine Chloramphenicol-Resistenzkassette besitzt. Das Konstrukt sollte in die *Bam*HI-Stelle des Vektors kloniert werden. Es war jedoch nicht möglich, das Konstrukt für die Mutation aus pME14a auszuschneiden, da sich in der *ermB*-Kassette eine *Bam*HI-Schnittstelle befand. Deshalb wurde das gesamte Fragment mit den Primern IGR-mut-NheI-left und IGR-mut-NheI-right amplifiziert. Das entstandene Fragment (4,1 kb) wurde ebenso wie pBT2 mit dem Enzym *Nhe*I verdaut. Nach Dephosphorylierung des linearisierten Vektors konnte das Insert durch Ligation integriert werden. Das entstandene Konstrukt wurde pME15 genannt.

Transfer in *S. aureus* RN4220. Bevor eine Transformation in *S. epidermidis* möglich war, musste die pME15-DNA Staphylokokken-spezifisch modifiziert werden. Der Vektor wurde aus *E. coli* DH5 α isoliert und durch Elektroporation in den restriktionsnegativen Stamm *S. aureus* RN4220 überführt, wie in Abschn. 3.1.8 beschrieben. Anschließend wurde pME15 durch Midi-Präparation (s. Abschn. 3.1.2) wieder gewonnen und konnte für die Transformation genutzt werden.

Transfer in *S. epidermidis* 567. Für die Elektroporation wurden 25 ml BHI-Medium mit einer ÜNK von *S. epidermidis* 567 angeimpft und die Zellen bei 37°C bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 2 unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend dreimal mit sterilem, eiskaltem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 50 μ l sterilem Wasser aufgenommen und mit 1–5 μ g pME15 in einem Endvolumen von 100 μ l vermischt. Nach dem Elektroporations-Puls (1,8 kV, 2,5 ms) wurden die transformierten Zellen mit 1 ml BHI-Medium, Saccharose (0,5 M) und einer subinhibitorischen Konzentration von Chloramphenicol (0,05–0,1 μ g/ml) versetzt und für 2 h bei 30°C inkubiert. Nach dem Ausplattieren auf BHI-Agar, der mit Saccharose (0,5 M) und Chloramphenicol (10 μ g/ml) supplementiert war, wurden die Zellen für 24–48 h bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

Es konnten jedoch auch nach wiederholten Versuchen keine Transformanten identifiziert werden. Da *S. epidermidis* 567 grundsätzlich transformierbar ist (Batzilla *et al.* 2006), muss angenommen werden, dass das Plasmid pME15 zu groß, oder nicht verträglich ist. Daher sind weiterführende Experimente mit anderen, kleineren *shuttle*-Vektoren oder Transformationsmethoden, wie Protoplastenfusion bzw. Phagentransduktion Erfolg versprechend, konnten aber im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

4. Ergebnisse

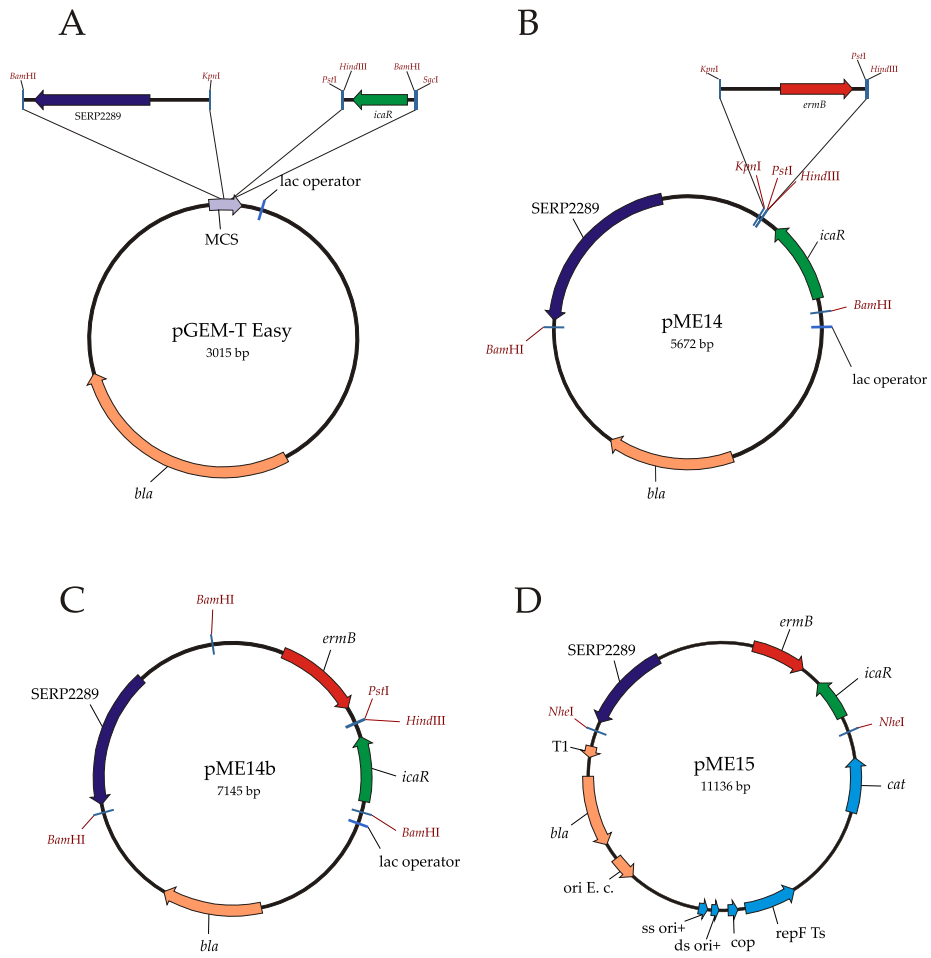


Abbildung 4.29.: Konstruktion der IGRica-Mutante. A, Klonierung der von IGRica-RNA stromauf- und stromabwärts liegenden Bereiche in pGEM-T Easy; B, C, Einsetzen der ermB-Kassette über KpnI- und HindIII-Schnittstelle; D, Klonierung des Konstrukts in die NheI-Schnittstelle des Shuttle-Vektors pBT2.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 4.3

- In der intergenischen Region *IGR_{ica}* stromaufwärts befindet sich eine 487 nt lange RNA.
- Sie wird wahrscheinlich nicht translatiert, da sich auf ihr weder größere ORFs, noch Ribosomen-Bindestellen befinden.
- Abgeschwächte Biofilmbildner besitzen *IS256*-Insertionen im Promotor-Bereich der *IGR_{ica}*-RNA.
- Das *hfq*-Gen wird in *S. epidermidis* exprimiert und bildet bei heterologer Expression in *E. coli* Hexamere.
- Für die *IGR_{ica}*-RNA lies sich unter den getesteten Bedingungen keine Hfq-Bindung im *Mobility-Shift-Assay* nachweisen.

5. Diskussion

Als häufigster Teil der menschlichen Haut- und Mucusflora wurde *S. epidermidis* sehr lange als harmlose Kontamination bei nosokomialen Infektionen von *S.-aureus*-Isolaten eingestuft. Es zeigte sich jedoch in der vergangenen Jahren, dass *S. epidermidis* durch seine Fähigkeit, mehrschichtige Biofilme auf abiotischen Oberflächen zu formen und Antibiotikaresistenzen auszubilden, eine starke Bedrohung für immungeschwächte Patienten darstellt. Biofilmbildung ist bei Bakterien weit verbreitet und bietet vielfältige Vorteile. In Davey u. O'Toole (2000) und Dunne (2002) ist dies ausführlich dargestellt. Biofilme bieten Schutz und Abgrenzung gegenüber der Umgebung. Kanäle innerhalb des Biofilms erlauben die schnelle Verteilung von Nährstoffen und den raschen Austausch von Metaboliten. Durch den direkten Kontakt der Bakterien untereinander, wird der horizontale Gentransfer zwischen den Zellen vereinfacht. Klinisch relevant sind vor allem die Biofilme von *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* sowie *E. coli* und *Streptococcus spp.*

In *S. epidermidis* ist die Biofilmbildung in erster Linie mit dem *icaADBC*-Operon assoziiert. Der Biofilm besteht zum Großteil aus Polysaccharid-Interzellulärem-Adhäsion (PIA), ein β -1,6-verknüpftes Polysaccharid (Heilmann *et al.* 1996; Mack *et al.* 1996a, b). Daneben sind das *accumulation associated protein* Aap und das Bap-homologe Protein Bhp wichtige, proteinogene Bestandteile des Biofilms (Hussain *et al.* 1997; Cucarella *et al.* 2001; Tormo *et al.* 2005). Bei der wiederholten Passage von *S. epidermidis* treten spontane Biofilmnegative Varianten auf, von denen einige IS256-Insertionen in Genen des *ica*-Operons aufwiesen, andere zeigten einen vollständigen Verlust des Operons, sowie großer Teile des Chromosoms (Löfner 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die längste dieser Deletionen – welche ca. 10% des Genoms umfasst – sequenziert und annotiert.

Ein *in-silico*-Vergleich der beiden Genome von *S. epidermidis* RP62A und ATCC 12228, eines *ica*-positiven und eines *ica*-negativen Stammes zeigt, dass im Wesentlichen nur geringe Unterschiede bestehen. Um weitere Stämme auf mögliche Pathogenitätsfaktoren hin zu analysieren, wurde ein Genomvergleich mittels Microarrays durchgeführt. Es konnte bestätigt werden, dass sich klinische und saprophytische Isolate hauptsächlich durch das *ica*-Operon und mobile genetische Elemente unterscheiden. IS-Elemente, Transposons oder das *staphylococcal cassette chromosomes* (SCC) tragen wesentlich zur Plastizität des Genoms und damit zur schnellen Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen bei.

Stromaufwärts des *ica*-Operons befindet sich eine intergenische Region, IGR_{ica}, die mit einer Länge von 1434 bp sehr groß ist. In bakteriellen Genomen sind die Gene in der

5. Diskussion

Regel dicht gepackt und besitzen kaum nicht-kodierende Bereiche. Während der letzten Jahre wurden in diesen intergenischen Regionen häufig kleine nicht-translatierte RNAs gefunden, die meist regulatorische oder stabilisierende Funktion besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der IGR*ica*-Region eine sehr wahrscheinlich nicht-translatierte RNA lokalisiert ist, die eventuell einen Einfluss bei der Regulation der Biofilmbildung besitzt.

Der Stamm *S. epidermidis* 307, der für die Experimente zur Analyse der Deletion und der IGR*ica*-RNA verwendet wurde, ist ein Klinik-Isolat, das einige wichtige Besonderheiten aufweist. Untersuchungen zur phylogenetischen Verwandtschaft durch *multilocus sequence typing* (MLST) zeigten, dass *S. epidermidis* 307 Teil eines großen klonalen Komplexes ist (Kozitskaya *et al.* 2005). Der Sequenztyp ST27, dem der Stamm 307 angehört, stellt die größte Gruppe innerhalb der untersuchten 118 Isolate dar. Ihm gehören ausschließlich *ica*-positive Stämme an. Die hauptsächlich klinischen Isolate besitzen häufig SCC*mec*-Elemente und das IS256-Element. Es ist nicht bekannt, weshalb ST27 der vorherrschende Keim in der Krankenhaus-Umgebung ist, jedoch erzeugt die Verwendung von Antibiotika und Desinfektionsmitteln einen großen Selektionsdruck. Die Stämme des ST27 scheinen sich am besten an die Krankenhaus-Umgebung anpassen zu können.

ST27 und andere *ica*-positive Stämme werden kaum außerhalb der Klinik isoliert und Patienten werden schnell von den multiresistenten Biofilmbildnern kolonisiert. Kürzlich wurde von Rohde *et al.* (2004) eine Studie von Knochenmarks-Transplantaten veröffentlicht, die zeigte, dass diese Patienten mit *ica*-, SCC*mec*- und IS256-positiven Stämmen als Kommensale kolonisiert waren. Als Vertreter dieser Krankenhauskeime und des wichtigen ST27 wurde *S. epidermidis* 307 zur Untersuchung der Genomflexibilität in der vorliegenden Arbeit verwendet.

5.1. Analyse der Deletion in *S. epidermidis* 307

5.1.1. Homologe Rekombination von IS256 in *S. epidermidis* 307 führt zu großen Deletionen im Genom

Die Deletion eines ca. 260 kb großen Genomabschnitts im Klinik-Isolat *S. epidermidis* 307 wurde durch homologe Rekombination zweier IS256-Elemente verursacht, von denen eines Teil des Transposons Tn4001 ist. In früheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Deletionsmutante 307/9 keinen Wachstumsunterschied zum Wildtyp 307 aufweist, weder in TSB-Medium, noch in chemisch definiertem Medium (Löbner 2002). Dies ist um so erstaunlicher, als der Mutante ein Zehntel ihres Genoms fehlt.

Takeuchi *et al.* (2005) konnten zeigen, dass im Genom von *S. haemolyticus* ebenfalls Deletionen auftreten, die zumindest teilweise auch durch IS-Elemente (ISSha1, IS431) verursacht werden. Nicht immer fanden sich dabei jedoch IS-Elemente an beiden Seiten der Deletion. Die Region, in welcher Deletionen im *S.-haemolyticus*-Genom auftreten, deckt

sich dabei mit derjenigen, die in *S. epidermidis* 307 von Deletionen betroffen ist, wie aus den Genom-Sequenzierungen, -vergleichen und Microarray-Analysen der vorliegenden Arbeit übereinstimmend hervorgeht. Es handelt sich dabei um den ‚*oriC*-environ‘-Bereich, welcher bei *orfX* beginnt und ca. 10–23 % des Genoms umfasst. Er umfasst in *S. aureus* N315 365 847 bp, 247 508 bp in *S. epidermidis* ATCC 12228 und 630 237 bp in *S. haemolyticus* JCSC1435. Der Bereich unterscheidet sich zwischen einzelnen Staphylokokken-Spezies, ist aber innerhalb einer Spezies relativ ähnlich.

In der ‚*oriC*-environ‘-Region befinden sich artspezifische und pathogenitäts-assoziierte Gene. Im linken Teil des ‚*oriC*-environ‘ liegen die integrierten SCC-Elemente, die sich auf Spezies-Ebene unterscheiden. Der rechte Teil des ‚*oriC*-environ‘ ist innerhalb einer Art ähnlich. Er umfasst nur 6–20 % des Chromosoms, enthält aber 15–30 % des Spezies-spezifischen Gene. Darunter sind Protein A (*spa*), Koagulase (*coa*), das Kapsel-Synthese-Operon (*capA–P*) und wichtige Virulenzdeterminanten. Sehr wahrscheinlich ist die ‚*oriC*-environ‘-Region auch in anderen Bakterien-Spezies vorhanden. In drei verschiedenen *Bacillus*-Spezies konnten artspezifische Regionen stromabwärts des *oriC* identifiziert werden (Takeuchi *et al.* 2005).

Von der großen Deletion des Stamm *S. epidermidis* 307 sind ebenfalls viele pathogenitäts-assoziierte Gene betroffen. Neben dem *icaADBC*-Operon wurden einige Transportsysteme, Proteasen, Lipasen, eine Elastase, sowie ein Hämolysin deletiert. Es ist daher anzunehmen, dass die ‚*oriC*-environ‘-Region tatsächlich einen *hot spot* für die Integration von Pathogenitäts- und Virulenz-Genen, und einen Ort genomischer Rekombination und Flexibilität darstellt. Da dieser Bereich auch in anderen Genera der Firmicutes vorhanden ist, kann vermutet werden dass die ‚*oriC*-environ‘ gewissermaßen als Modul für den Austausch fremder DNA-Sequenzen fungiert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der ‚*oriC*-environ‘ von *S. epidermidis* 307 DNA aus *S. haemolyticus* und *S. aureus* integriert ist. Das gemeinsame Vorkommen von Resistenzgenen und Pathogenitätsfaktoren in einer Region des Genoms die durch häufige Rekombinationen und Integration fremder DNA u. a. durch SCC-Elemente gekennzeichnet ist, kann den sprunghaften und raschen Austausch und Erwerb dieser Faktoren innerhalb der verschiedenen Staphylokokken-Stämme und Spezies erklären.

5.1.2. *S. epidermidis* 307 besitzt einen neuen Typ von SCC-Insel

Wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte, besitzt *S. epidermidis* 307 eine Rekombinase (*ccrC*), wie sie für SCC*mec*-Inseln vom Typ III und V beschrieben ist (Ito *et al.* 2004; Chongtrakool *et al.* 2006). In allen bis zum damaligen Zeitpunkt beschriebenen SCC-Elementen treten die Rekombinasen immer als Paar *ccrA* und *ccrB* auf, die für die korrekte Exzision und Integration der Kassetten notwendig sind. Alleine die CcrC-Rekombinase scheint beide Schritte ausführen zu können. Die SCC*mec*-Typ-V-Inseln

5. Diskussion

besitzen aber zusätzlich das *mecA*-Gen, das im Genom von *S. epidermidis* 307 nicht vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, dass der Stamm 307 ein neues *staphylococcal cassette chromosome* enthält. Die SCC-Insel ist, wie auch die bereits beschriebenen, am Beginn der ‚*oriC*-environ‘-Region lokalisiert. Sie konnte jedoch noch nicht vollständig sequenziert werden, da *orfX* (s. Anh. B, ID 769) außerhalb des Deletionsbereiches liegt. Durch den Deletionsvorgang wurde das neue SCC-Element fragmentiert. Die Rekombinase, das IS₄₃₁ und viele andere, unbekannte Gene wurden deletiert. So stellt dieses Beispiel dar, wie in dieser Region durch Deletion und Rekombination neue SCC-Elemente gebildet werden können, da dort auch fremde DNA-Fragmente integriert werden.

Hanssen u. Ericson Sollid (2006) beschreiben in ihrem Übersichtsartikel den Aufbau der verschiedenen SCC*mec*-Typen. Diese sind sehr unterschiedlich. Merkmale, die in allen Inseln vorkommen, sind das *mecA*-Gen, sowie IS₄₃₁ und die Rekombinase(n). Daneben sind bis jetzt fünf nicht-MecA-kodierende SCC-Elemente beschrieben worden. SCC*cap1* enthält das Kapsel-Polysaccharid 1 als Virulenzfaktor, welches dem Träger Resistenz gegen Phagozytose verleiht (Luong *et al.* 2002). *S. hominis* ATCC 27844 enthält ein SCC-Element, welches *ccrAB1* enthält, jedoch keinerlei Resistenz oder sonstige mobile genetische Elemente (Katayama *et al.* 2003). Die zwei weiteren SCC-Elemente befinden sich in *S. epidermidis* ATCC 12228 (Mongkolrattanothai *et al.* 2004). Das SCC*composite island* enthält zwei Rekombinase-Paare *ccrAB2* und *ccrAB4*. Es beherbergt außerdem ein weiteres SCC-Element SCC*pbp4*, welches neben einem homologen Penicillin-Bindeprotein PBP4 auch für das Teichonsäure-Biosynthese-Protein TagF kodiert. SCC476 kodiert das Fusidinsäure-Resistenzprotein Far1 und besitzt Rekombinasen vom AB-Typ (Katayama *et al.* 2003).

Das mit 67 kb bisher längste SCC*mec*-Element des Typs III (Ito *et al.* 2001) ist eigentlich eine Komposit-Insel und besteht aus den zwei kleineren eigenständigen SCC-Elementen SCC*mercury* und SCC*mec*-Typ 3A (Chongtrakool *et al.* 2006). Während SCC*mec*-Typ 3A das Rekombinase-Paar *ccrA3* und *ccrB3* besitzt (Hiramatsu *et al.* 2002), ist in SCC*mercury* das Rekombinase-Gen *ccrC* vorhanden. Sie war vorher nur in SCC*mec*-Elementen des Typs V beschrieben (Ito *et al.* 2004), aber bereits als CZ072 im SCC*mec*-Typ III annotiert. SCC*mercury* kodiert eine Quecksilber-Resistenz. Früher wurde Quecksilberchlorid (HgCl₂) als Antiseptikum verwendet. Möglicherweise haben KNS diese Resistenzdeterminante erworben und in ein SCC-Element integriert (Chongtrakool *et al.* 2006).

Neue Nomenklatur für SCC*mec*-Elemente

Zurzeit werden in regelmäßigen Abständen neue SCC*mec*-Elemente beschrieben. Dabei offenbart sich, dass die aktuell verwendete Unterteilung, basierend auf der *mec*-Klasse und dem Typ der Rekombinasen (*ccr*), ungenügend ist. Kürzlich veröffentlichten Chongtrakool *et al.* (2006) den Vorschlag einer neuen Klassifizierung für SCC*mec*-Elemente. Sie baut auf einer zusammengesetzten, feiner gegliederten Nomenklatur auf, als dies bisher mit den

römischen Ziffern möglich war. Zunächst werden der *ccr*-Typ und die *mec*-Klasse mit einer Zahl und einem Großbuchstaben angegeben. Der zweite Teil beschreibt Unterschiede in der J1- und den J2–J3-Regionen. Die Nummer 1B.1.2 besitzt folglich ein Rekombinasen-Paar des Typs 1 und eine *mec*-Region der Klasse B. In der J1-Region liegt das *pls*-Gen und in den Regionen J2 und J3 trägt das Element ein integriertes Plasmid pUB110. Auf diese Weise ist es möglich jederzeit neue SCC*mec*-Elemente zu beschreiben. Für neue Unterschiede kann eine weitere Ziffer oder Buchstabe vergeben werden. Diese neue Nomenklatur ist jedoch noch nicht international akzeptiert und wird gegenwärtig intensiv diskutiert.

5.1.3. Horizontaler Gentransfer zwischen Staphylokokken-Spezies

Während der Annotation des Deletionsbereiches von *S. epidermidis* 307/9 wurden bei der Sequenzierung von Cosmid 10, welches den rechten Rand der Deletion mit Tn4001 enthält, Sequenzen identifiziert, die mit keinem der beiden *S.-epidermidis*-Genome Übereinstimmungen zeigt. Nach Veröffentlichung des Genoms von *S. haemolyticus* JCSC1435 (Takeuchi *et al.* 2005) konnten diese jedoch eindeutig zugeordnet werden (siehe r8 bis r23 in Abb. 4.3). Die vier offenen Leseraster 139–142 weisen eine höhere Übereinstimmung mit *S. aureus* COL auf, als mit den homologen Genen der Stämme *S. epidermidis* RP62A und ATCC 12228.

Dies weist auf einen Gentransfer zwischen den verschiedenen Staphylokokken-Spezies hin. Sie sind besonders durch die rasche Entwicklung und Übertragung von Antibiotika-Resistenzen gekennzeichnet. Der Erwerb von Resistenzen geschieht entweder durch Mutationen in einzelnen Genen, oder durch lateralen Transfer von Resistenzgenen. Die Aufnahme fremder DNA erlaubt eine schnellere Adaptation an wechselnde Umweltbedingungen, als das durch Punktmutationen möglich ist (Normark u. Normark 2002).

Kürzlich konnte von Wang *et al.* (2004) gezeigt werden, dass *E. coli* ein β -1,6-verknüpftes Polysaccharid bildet. Die dafür notwendigen Proteine sind im *pgaABCD*-Lokus kodiert. Durch BLAST-Analyse konnten homologe *pga*-Gene in anderen Eubakterien identifiziert werden. Zum Teil waren die Loci vollständig vorhanden (u. a. *E. coli* O157:H7, *Xanthomonas axonopodis*, *Pseudomonas fluorescens*), zum Teil nur unvollständig (u. a. *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*). Auch in grampositiven Spezies wie *Lactococcus lactis* waren Homologe von *pgaB* und *pgaC* (*icaB* und *icaA* in Staphylokokken) vorhanden (Wang *et al.* 2004).

Das zu *pgaABCD* homologe *hmsHFRS*-Operon von *Y. pestis* ist notwendig für Biofilmbildung *in vitro* (Hare u. McDonough 1999) und *in vivo* (Darby *et al.* 2002). Bei *Y. pestis* ist das *hmsHFRS*-Operon in einer instabilen Region des Genoms lokalisiert (Fetherston *et al.* 1992), wie auch das *icaADBC*-Operon in *Staphylococcus spp.* Das Vorkommen von *ica*-Homologen in unterschiedlichen Spezies, auch außerhalb der Staphylococcaceae, und die Lokalisierung in instabilen Bereichen des Genoms, weist auf einen horizontalen Transfer dieser Gene hin.

5. Diskussion

Neben replikativen Plasmiden tragen auch Prophagen, Transposons, Integrons und genomische Inseln zur Übertragung von Resistenzen bei. So konnte gezeigt werden, dass der *vanB*-Lokus von *Enterococcus faecium* auf einem konjugativen Transposon (Tn5382) liegt, welches selbst wiederum Teil eines größeren genetischen Elements ist (Carias *et al.* 1998). Das Komposit-Transposon Tn4001 von *S. epidermidis* vermittelt Aminoglycosid-Resistenz, die Gruppe der SCC*mec*-Elemente kodieren alternative Penicillin-Bindeproteine, welche eine Resistenz gegen Methicillin bewirken (Lyon *et al.* 1984; Ito *et al.* 2001).

Bakteriophagen sind ein wichtiger Faktor für die genetische Flexibilität von Staphylokokken. In den meisten Fällen werden durch lysogene Phagen erworbene Gene ebenso schnell wieder verloren. Unter bestimmten Umweltbedingungen können sie ihrem Träger jedoch zu einem Selektionsvorteil gegenüber den Konkurrenten verhelfen. Dies sind vor allem schnell veränderliche Umgebungen, wie die Körperoberfläche des Wirtes oder dichte Wirtspopulationen (Brüssow *et al.* 2004). Phagen können einen bestimmten Zeitraum außerhalb von Zellen überdauern, sodass sie einen idealen Vektor bieten, um Gene weit zu verbreiten.

In *S. aureus* konnte der Phage $\Phi 80\alpha$ beschrieben werden, der als Überträger von Pathogenitäts-Inseln dient (Lindsay *et al.* 1998; Ruzin *et al.* 2001). Die 15 kb große Insel SaPI1, die das Gen für das *toxic shock syndrome toxin 1* trägt, besitzt eine eigene Integrase und kann autonom replizieren. SaPI1 interferiert mit dem Wachstum des Phagen $\Phi 80\alpha$ und wird auf diese Weise in spezielle, im Verhältnis zur kürzeren DNA kleinere Virusköpfe verpackt. Nach der Übertragung auf den neuen Wirt integriert die PAI wieder über die SaPI1-Integrase an der spezifischen Stelle im Genom. Der Phage Φ PVL enthält die beiden Gene *lukS* und *lukF*, die das Zwei-Komponenten-Zytotoxin Panton-Valentin-Leukocidin bilden (Kaneko *et al.* 1998). Das Enterotoxin A (*sea*) von *S. aureus* ist ebenfalls in der Nähe der *attachment site* des Phagen PS42-D lokalisiert (Betley u. Mekalanos 1985).

Somit dienen Bakteriophagen häufig als Überträger von Pathogenitäts-assoziierten Genen. In vielen Fällen lassen sich die Prophagen aber nicht länger induzieren, da sie durch Punktmutationen oder Insertionen von IS-Elementen inaktiviert wurden. Dies ist auch der Fall bei Φ SP β von *S. epidermidis* RP62A. Dennoch ist Evolution durch horizontalen Gentransfer mittels mobiler Elemente wie Phagen um ein vielfaches schneller als die vertikale Evolution durch schrittweise Adaptation und kann als ‚Schnell-Modus‘ der Evolution bezeichnet werden (Brüssow *et al.* 2004).

Die aus den Experimenten in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestärken die Bedeutung von *S. epidermidis* als einen ernst zu nehmenden Krankheitserreger. Der ungewöhnlich hohe Austausch von DNA mit anderen Spezies durch horizontalen Gentransfer, die Flexibilität des Genoms durch mobile Elemente und die Möglichkeit, viele Gene auf ein Mal auf SCC-Inseln weiter zu geben, machen *S. epidermidis* zu einem Reservoir für Resistenzentwicklung und -weitergabe. Daher sollten *S. epidermidis* und andere Koagulase-negative Staphylokokken Krankenhaus-hygienisch ebenso überwacht werden wie MRSA.

5.2. Saprophytische und klinische Isolate von *S. epidermidis* unterscheiden sich in erster Linie durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung

5.2.1. Genomische Variabilität im Vergleich von pathogenen und saprophytischen Stämmen von *S. epidermidis*

Koagulase-negative Staphylokokken wurden sehr lange als Kontamination von *S.-aureus*-Isolaten in Krankenhäusern gesehen, da sie Bestandteil der gesunden Hautflora des Menschen sind. Seit einigen Jahren stellen sie, vor allem durch die Fähigkeit Biofilme zu formen und rasch Antibiotika-Resistenzen zu bilden, ein wachsendes Problem in der Klinik dar. Mittels *in-silico*-Analyse wurden in dieser Arbeit zunächst die beiden vollständig sequenzierten und annotierten Genome eines pathogenen und eines apathogenen Stammes von *S. epidermidis* auf Nukleotid-Ebene verglichen. RP62A besitzt mit 2 616 530 bp ein um 117 251 bp längeres Genom als ATCC 12228 (2 499 279 bp), jedoch nur 75 mehr annotierte Gene. Der GC-Gehalt ist mit 32,15 % (RP62A) und 32,1 % (ATCC 12228) nahezu identisch.

Nach Gill *et al.* (2005) sind die 346 (RP62A) bzw. 332 (ATCC 12228) Stamm-spezifischen Gene hauptsächlich auf die unterschiedlichen genomischen Inseln zurückzuführen; das konnte bestätigt werden (s. Abschn. 4.1.6). Die Genom-Inseln ν Se γ und ν Se1 sind in beiden Stämmen vorhanden, wenngleich ν Se1 von RP62A ca. vier Mal so groß ist wie in ATCC 12228 und das *cadCD*-Operon besitzt. Der Hauptunterschied besteht jedoch darin, dass RP62A den Φ SP β -ähnlichen-Phagen besitzt, während ATCC 12228 eine weitere genomische Insel ν Se2 enthält. Das SCC*pbp4*-Element, als Teil des SCC*composite island*, kodiert für das alternative Penicillin-Bindeprotein PBP4. In RP62A existiert ebenfalls ein SCC-Element (Typ II), jedoch besitzt es das *mecA*-Gen. Die meisten bisher beschriebenen *staphylococcal cassette chromosomes* enthalten das *mecA*-Gen, das für die Methicillin-Resistenz kodiert (Hanssen u. Ericson Sollid 2006).

5.2.2. Genom-Inversion durch homologe Rekombination von IS*Sep1*

Betrachtet man die Umgebung des *icaADBC*-Operons aus Abb. 4.6 B in *S. epidermidis* RP62A genauer, so ist zu erkennen, dass stromauf- und stromabwärts Bereiche liegen, die Ähnlichkeiten zum Stamm ATCC 12228 aufweisen (s. Abb. 4.9). Exakt an der Grenze der gemeinsamen Region (rot) liegt das Gen für eine Thr-tRNA. Die Lipase *geh-1* ist auch in beiden Stämmen vorhanden (blau), wenn auch in beiden Stämmen jeweils in entgegengesetzter Orientierung. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Pathogenitäts-Inseln häufig von tRNA-Genen begrenzt werden (Hacker *et al.* 1997). Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich im Falle des *icaADBC*-Operons um eine ähnliche Struktur handeln könnte. Allerdings befinden sich keine mobilisierenden Faktoren (IS-Elemente, Rekombinasen, Transposasen,

5. Diskussion

o. ä.) in der näheren Umgebung, sodass dies fraglich erscheint.

Der invertierte Bereich im Stamm ATCC 12228 ist auf beiden Seiten mit dem von Gill *et al.* (2005) neu beschriebenen mobilen Element *ISSep1* begrenzt. Die beiden Kopien liegen in umgekehrter Orientierung vor. In *S. epidermidis* RP62A befindet sich das *ISSep1*-Element nur am rechten Rand der Inversion. Wie Daveran-Mingot *et al.* (1998) für *Lactococcus lactis* zeigten, kann eine homologe Rekombination zweier Insertions-Elemente zu einer Inversion von Teilen des Chromosoms führen. In diesem Fall führte die homologe Rekombination zweier defekter, invers orientierter *IS905*-Elemente zur Inversion des halben Chromosoms. Dabei blieb jedoch die *oriC-terC*-Symmetrie erhalten, sodass alle Gene nach der Inversion den selben Abstand zum Replikationsursprung beibehielten. Es ist daher möglich, dass die Inversion in *S. epidermidis* ATCC 12228 durch homologe Rekombination der zwei *ISSep1*-Elemente verursacht wurde (vgl. Abb. 5.1).

Takeuchi *et al.* (2005) vermuten, dass *S. haemolyticus* JCSC1435 und *S. epidermidis* RP62A kolinear zum gemeinsamen Vorfahren der drei Staphylokokken-Spezies sind und *S. aureus*, sowie *S. epidermidis* ATCC 12228 später eine chromosomale Inversion erfahren haben. In *S. epidermidis* liegt der *oriC* fast exakt in der Mitte des Inversionsbereichs. Dies würde mit den Beobachtungen von Daveran-Mingot *et al.* (1998) übereinstimmen. In *Pseudomonas aeruginosa* konnte kürzlich von Kresse *et al.* (2003) eine große chromosomale Inversion beschrieben werden, die durch *IS6100* verursacht wurde. Dabei sind zwei Mechanismen vorstellbar. (i) *IS6100* transponiert in einem zweistufigen Prozess als Kopie in ein Ziel-Gen; anschließend erfolgt die homologe Rekombination der Kopie mit dem ursprünglichen *IS6100*. (ii) In einem einstufigen Mechanismus transponiert das IS-Element in ein Ziel-Gen und das *crossover* wird bei der nächsten Replikation aufgelöst. Dieser Mechanismus wurde auch für eine Inversion bei *E. coli* durch *IS1* vorgeschlagen (Badía *et al.* 1998). Allerdings lassen sich beide Möglichkeiten nicht unterscheiden, da sie in identischen Rekombinationen resultieren. Da im Falle von *S. epidermidis* ATCC 12228 die beiden Kopien von *ISSep1* intakt scheinen, wäre es möglich, dass die Inversion im beschriebenen einstufigen Mechanismus erfolgt ist.

Hughes (2000) beschreibt gemeinsame Eigenschaften, die chromosomalen Umordnungen betreffend. (i) Chromosomale Umordnungen kommen auch in nahe verwandten Spezies vor. (ii) Sie sind normalerweise symmetrisch zur *oriC-terC*-Achse und (iii) kommen sehr häufig bei Pathogenen vor. Dies spiegelt die Fähigkeit wieder, sich schnell an das Immunsystem des Wirts anzupassen. Verantwortlich für die homologe Rekombination ist das RecA-Protein, welches normalerweise für die Reparatur beschädigter Stränge verantwortlich ist. Lange repetitive Sequenzen wie rRNA-Operons, Transposons und IS-Elemente können als Ausgangspunkt für eine homologe Rekombination dienen. Neben der Inversion können, wenn die homologen Bereiche in gleicher Orientierung vorliegen, auch Tandem-Duplikationen oder Translokationen auftreten. Die von Löffner (2002) beschriebenen Deletionen im Genom von

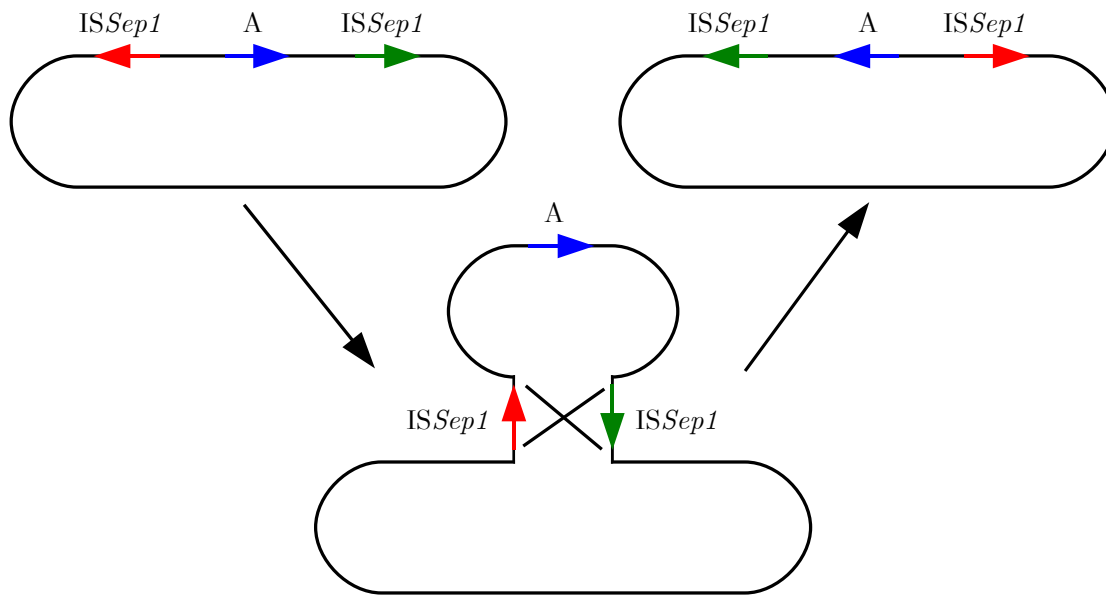


Abbildung 5.1.: Inversion eines Genomabschnitts durch homologe Rekombination zweier *IS_Sep1*-Elemente. Modifiziert nach Hughes (2000).

S. epidermidis 307 sind durch die fehlende Reintegration bei einem Translokations-Ereignis aufgetreten.

5.2.3. Genomvergleich durch Microarray-Analyse

Mit Hilfe Microarray-basierter Genomvergleiche wurden bereits eine Vielzahl von pathogenen Bakterien auf den Unterschied zu ihren apathogenen Verwandten untersucht. Für *Neisseria meningitidis* konnten so 55 Pathogen-spezifische Gene identifiziert werden (Stabler *et al.* 2005). Der Vergleich von Schaf- und Rinder-Isolaten von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ermöglichte die Entdeckung von drei großen Deletionen, welche eine Erklärung für die unterschiedliche Virulenz lieferten (Marsh *et al.* 2006). Auch für *Campylobacter* (Leonard *et al.* 2004) und *Salmonella* (Chan *et al.* 2003) wurden vergleichende Genomanalysen durchgeführt, die zur Identifizierung virulenzspezifischer Gene führten. Eine genügend große Auswahl an Stämmen vorausgesetzt, lassen sich auch phylogenetische Analysen durchführen (Dorrell *et al.* 2005).

Durch die Microarray-Analyse von *S.-epidermidis*-Isolaten konnte in den untersuchten Stämmen nur geringe Unterschiede festgestellt werden. Wie von Kozitskaya *et al.* (2004) und Ziebuhr *et al.* (1997) gezeigt werden konnte, sind *IS256* und das *ica*-Operon gute Virulenz-Determinanten für *S. epidermidis*. Als best untersuchter Pathogenitätsfaktor konnte für das *icaADBC*-Operon nur in Klinik-Stämmen RP62A und 307 ein Hybridisie-

5. Diskussion

nungssignal nachgewiesen werden. Das IS256-Element, welches häufiger in pathogenen *S. epidermidis* identifiziert wird, konnte auch in apathogenen Stämmen nachgewiesen werden. Andere Faktoren, die ebenfalls für die Pathogenität und Virulenz wichtig sind (*bhp*, *atlE*, Lipasen oder das Serin-reiche Protein), waren auch in den Saprophyten vorhanden, oder fehlten teilweise im Klinik-Isolat 307.

In einer von Yao *et al.* (2005b) veröffentlichten Studie wurden 20 kommensale Stämme und 22 pathogene Stämme von *S. epidermidis* auf einem Voll-Genom-Microarray basierend auf der Genomsequenz von RP62A analysiert und verglichen. Der Microarray enthielt 70-mer Oligonukleotide aller in RP62A gefundenen Gene. Durch die größere Anzahl an Stämmen und durch die Verwendung eines Chips, welcher das vollständige Genom von *S. epidermidis* RP62A abdeckt, konnte eine detailliertere und differenzierte Analyse der Unterschiede zwischen Pathogenen und Apathogenen erstellt werden, als dies hier möglich war. Viele der von Yao *et al.* häufiger in Klinik-Isolaten gefundenen Gene, wurden in der vorliegenden Arbeit auch in allen drei, von gesunden Personen isolierten Stämmen detektiert. Allerdings waren über die Hälfte der von Yao *et al.* (2005b) häufiger in invasiven Stämmen gefundenen Gene auch in mehr als 50 % der Kontroll-Stämmen vorhanden.

Das Serin-reiche Protein SERP2281 war in allen in dieser Arbeit verwendeten Stämme (außer 307/9) vorhanden, jedoch bei Yao *et al.* (2005b) nur in 5 von 20 kommensalen Stämmen. Da das Gen im Deletionsbereich von *S. epidermidis* 307/9 lag und sequenziert wurde, konnte es mit den bekannten Sequenzen von RP62A und ATCC 12228 verglichen werden. Die Proteinsequenz stimmt am N- und C-Terminus mit beiden überein, im Bereich der Hoch-repetitiven Region unterscheidet es sich von ihnen in der Länge (s. Abb. 4.8). Das könnte darauf hindeuten, dass diese Region sehr variabel, und – da es sich um ein Zell-Oberflächen-Protein handelt – von Bedeutung für die Abwehr des Immunsystems ist. Das *accumulation associated protein* wurde von Yao *et al.* (2005b) häufiger in kommensalen Isolaten gefunden. In dieser Arbeit kann darüber keine Aussage gemacht werden, da *aap* nicht auf dem Microarray vorhanden war. Auch für die häufiger in den Kontroll-Stämmen ermittelten Gene gilt die Aussage, dass über die Hälfte in mehr als 50 % der Klinik-Isolate ebenfalls nachgewiesen wurden.

Der Vorteil Microarray-basierter Genomvergleiche besteht darin, dass relativ schnell Genome unterschiedlicher Stämme oder Spezies verglichen werden können. Es können jedoch immer nur Gene detektiert werden, die auch auf den Array aufgebracht wurden. So werden diejenigen nicht ermittelt, welche zwar in der zu vergleichenden Probe vorhanden, aber nicht auf dem Chip gespottet sind. In der von Stabler *et al.* (2005) veröffentlichten Studie wurde bereits ein Microarray verwendet, welcher alle Gene der bis dahin vier sequenzierten *Neisseria*-Genome enthielt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Analyse von Yao *et al.* (2005b) mit mehreren Stämmen eine differenziertere Aussage über potentielle neue Virulenzfaktoren

zulässt, als das in dieser Arbeit möglich war. Neben neuen, bisher noch unbekannt Genen, die als mögliche Marker für Virulenz dienen könnten, wurden bekannte Faktoren wie *IS256*, oder das *ica*-Operon in den Klinik-Stämmen häufiger identifiziert. Yao *et al.* kommen jedoch ebenso wie die vorliegende Arbeit zu dem Schluss, dass *S. epidermidis* eine außerordentlich hohe Genomflexibilität besitzt. Diese Flexibilität stellt einen nicht unerheblichen Beitrag zur Pathogenität von *S. epidermidis* dar.

5.3. Die *IGRica*-RNA trägt möglicherweise zur Regulation der Biofilmbildung bei

5.3.1. Kleine regulatorische RNAs

Anfang der 1970er Jahre wurden, ermöglicht durch die Technik der ³²P-Markierung von RNA und der Verwendung von Polyacrylamid-Gelen, die ersten kleinen RNAs (sRNA) 4,5S und 6S entdeckt (Griffin 1971; Hindley 1967). Bis dahin kannte man nur die 5S-RNA der Ribosomen und tRNAs. Seitdem wurden in *E. coli* über 60 neue nicht-kodierende kleine RNAs beschrieben. Aufstellungen über die bekannten sRNAs sind in Hershberg *et al.* (2003) und unter <http://eclipse.nichd.nih.gov/nichd/cbmb/segr/e.coli.html> (30. Mai 2003) einsehbar. Die meisten sRNAs besitzen drei Gemeinsamkeiten (Gottesman 2005). Erstens sind sie in der Regel in intergenischen Regionen lokalisiert und überlappen die kodierenden Sequenzen nicht. Eine Ausnahme bildet hierbei die in Staphylokokken als erste beschriebene sRNA RNAIII, die am Gegenstrang des Hämolysegens *hld* im *agr*-Operon kodiert ist (Janzon *et al.* 1989; Vandenesch *et al.* 1991). Zweitens besitzen sie einen Rho-unabhängigen Transkriptionsterminator und drittens sind sie relativ klein, im Durchschnitt 100 bp (50-500 bp), jedoch kürzer als 1000 bp.

Bakterielle Genome sind in der Regel dicht gepackt und weisen nur geringe Lücken zwischen den Genen auf. *S. epidermidis* RP62A besitzt 68 intergenische Regionen (IGR), die größer als 600 bp sind. Davon erstrecken sich nur 9 über mehr als 1000 bp. Die längste IGR misst 1693 bp und liegt zwischen den beiden konservierten hypothetischen Proteinen SERP1623 und SERP1624. Stromaufwärts des *icaADBC*-Operons in *S. epidermidis* befindet sich zwischen SERP2289 und *icaR* eine 1434 bp lange intergenische Region. Da in ihr mehrere potentielle Promotoren und Rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren lokalisiert sind (s. Abb. 4.14), wurde sie im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Durch Northern-Blot- und qualitative RT-PCR-Analyse konnte ein RNA-Transkript identifiziert werden. Mittels *primer extension* und 3'-RACE wurden die Enden lokalisiert und eine Länge von 487 bp bestimmt.

Lange Zeit war in Staphylokokken nur RNAIII als regulatorische kleine RNA bekannt (Novick *et al.* 1993). Kürzlich wurde eine für die Regulation der Replikation von pSK41 verantwortliche Transkript, RNAI, beschrieben (Kwong *et al.* 2004). Ausgehend von sieben

5. Diskussion

(inzwischen neun) vollständig sequenzierten *S.-aureus*-Genomen, wurden von Pichon u. Felden (2005), in einem zunächst bioinformatischen Ansatz, 191 mögliche sRNA-Kandidaten ermittelt und anschließend mittels Microarray- und Northern-Blot-Analyse untersucht. Neben den bereits von *E. coli* bekannten vier sRNAs tmRNA, RNase-P-RNA, 4,5S-RNA, 6S-RNA und RNAIII aus *S. aureus* konnten sieben neue Transkripte beschrieben werden, die sich alle auf Pathogenitätsinseln (ν Sa β , Φ Sa3) befinden.

Für *S. epidermidis* wurden bisher außer RNAIII (Tegmark *et al.* 1998) keine weiteren kleinen regulatorischen RNAs beschrieben. In der veröffentlichten Genomsequenz von Stamm RP62A (Gill *et al.* 2005) sind die drei aus *E. coli* bekannten sRNAs (SeSRP1) tmRNA (SetmRNA1) und RNase-P-RNA (SernpB1) annotiert. Somit ist die neu entdeckte IGRica-RNA die fünfte, für *S. epidermidis* beschriebene sRNA. Das Transkript wird sehr wahrscheinlich nicht translatiert. Es besitzt keine Ribosomen-Bindungsstelle und das längste offene Leseraster beträgt nur 63 bp. Im Stamm ATCC 12228 ist das Transkript nicht vorhanden, wie auch in anderen *ica*-negativen *S. epidermidis*. Bei ATCC 12228 ist die intergenische Region nur 832 bp lang und der homologe Bereich endet exakt mit der Thr-tRNA von RP62A. Dort fehlt also ein großer Teil der IGRica-RNA, wenn auch die 70 bp, die mit der Thr-tRNA überlappen, vorhanden sind. Das *ica*-Operon ist quasi als Insel zwischen zwei Bereichen lokalisiert, die sowohl in *ica*-positiven als auch in *ica*-negativen Stämmen vorhanden sind (s. Abb. 4.9). Auch die IGRica-RNA liegt zum größten Teil in diesem Sequenzabschnitt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die IGRica-RNA generell nur in *ica*-positiven Stämmen von *S. epidermidis* vorhanden ist.

5.3.2. Wechselwirkungen regulatorischer RNAs

Kleine nicht-translatierte RNAs sind in die post-translationale Regulation vieler zellulärer Prozesse involviert (Wassarman *et al.* 1999). Neben Osmostress (OxyS), Proteinabbau (tmRNA) und Zellteilung (DicF) sind sRNAs auch an der Modifikation metabolischer Stoffwechselwege (6S-RNA) beteiligt. sRNAs können, obwohl vielfältig in ihrer Funktion, anhand ihrer Wirkungsweise in drei Gruppen eingeteilt werden; (i) Direkte RNA-RNA-Interaktion (OxyS, MicF, DicF, DsrA), (ii) RNA-Protein-Interaktion (4,5S, CsrB, OxyS, DsrA) und (iii) intrinsische Aktivität (tmRNA, RNase-P-RNA). Viele binden das RNA-Chaperon Hfq (Zhang *et al.* 2003a; Storz *et al.* 2004).

RNA-RNA-Interaktion

OxyS-RNA. Die 109 nt lange regulatorische RNA zählt zu der Gruppe von sRNAs, die von Hfq gebunden werden und wird bei oxidativem Stress exprimiert. OxyS-RNA inhibiert die Translation der mRNA von *fhla* und *rpoS* (siehe Abb. 1.4), indem sie die RBS bzw. zusätzliche Bindestellen auf der mRNA blockiert (Argaman u. Altuvia 2000; Zhang *et al.* 2002). Da Hfq auch für die Translation der *rpoS*-mRNA notwendig ist, beruht die Inhibition

5.3. Die IGRica-RNA trägt möglicherweise zur Regulation der Biofilmbildung bei

möglicherweise auch darauf, dass OxyS-RNA mit dieser um Hfq konkurriert (Zhang *et al.* 1998).

MicF-RNA. Verschiedene Stressfaktoren führen zur Expression der MicF-RNA. Temperaturänderungen von 24°C auf 37°C, eine hohe Salzkonzentration und Superoxid-Stress bewirken die Induktion der *micF*-Transkription. MicF-RNA inhibiert die Expression von OmpF, eines Proteins der Äußeren Membran, indem sie einen stabilen Duplex mit der *ompF*-mRNA bildet und deren Shine-Dalgarno-Sequenz blockiert (Mizuno *et al.* 1984; Wassarman *et al.* 1999).

DicF-RNA. Als Inhibitor der Zellteilung wurde die DicF-RNA identifiziert. Sie liegt innerhalb des *dicB*-Operons, welches ein Protein kodiert, das zusammen mit MicC einen Komplex am Septum bei der Zellteilung bildet und FtsZ inhibiert (Johnson *et al.* 2002). Die DicF-RNA wirkt bereits vor der Translation inhibierend, da sie eine starke Homologie zur Shine-Dalgarno-Sequenz der *ftsZ*-mRNA besitzt und an diese bindet (Tétart u. Bouché 1992). Der Mechanismus ist somit ähnlich dem der MicF-RNA.

DsrA-RNA. Eine weitere Hfq-bindende RNA ist die DsrA-RNA. Sie wirkt dereprimierend auf RcsA, das wiederum ein Regulator der Kapsel-Polysaccharid-Synthese ist (Sledjeski u. Gottesman 1995). Die nur 87 nt kurze sRNA induziert durch H-NS reprimierte Gene, und fungiert somit als ein *anti-silencer*, indem sie *hns*-mRNA bindet und die Transkriptmenge verringert (Lease *et al.* 1998). Gleichzeitig steigert sie die *rpoS*-Translation. DsrA-RNA bindet an die *rpoS*-mRNA und stabilisiert deren Sekundärstruktur (Majdalani *et al.* 1998). Wie OxyS-RNA bindet auch DsrA-RNA das Hfq-Protein und wirkt auf die Expression von *rpoS* ein, wenn auch unter verschiedenen Bedingungen und mit antagonistischen Effekten.

RNA-Protein-Interaktion

4,5S-RNA. Als Teil des *signal recognition particle* (SRP) wird die 114 nt lange 4,5S-RNA von einem Vorläufermolekül am 5'-Ende durch die Aktivität der RNase P prozessiert. Das Gen *ffs* (*four point five S*) ist essentiell, da der Verlust von 4,5S-RNA zur Inhibition der Proteinbiosynthese führt. Möglicherweise ist die sRNA also auch in die Funktion der Ribosomen involviert (Wassarman *et al.* 1999). Die 4,5S-RNA bildet zusammen mit p48 einen Ribonukleoprotein-Komplex, der an bakterielle Signalsequenzen bindet (Zheng u. Gierasch 1997).

6S-RNA. Die erste RNA, die weder als mRNA, rRNA noch tRNA in *E. coli* entdeckt wurde, ist die 184 nt lange 6S-RNA. Mutanten mit einem defekten *ssrS*-Gen (*small stable RNA*) besitzen keine Wachstumsdefekte (Lee *et al.* 1985). Deshalb dauerte es auch lange,

5. Diskussion

bis ihr eine Funktion zugewiesen werden konnte. Die 6S-RNA akkumuliert in der stationären Phase, bindet an den σ^{70} -Faktor der Standard-RNA-Polymerase und inhibiert diese. Die Menge des σ^S -Faktors nimmt zu (siehe Abb. 1.4). Auf diese Weise kann die Transkription in der stationären Phase durch Verwendung eines alternativen σ -Faktors umgestellt werden (Wassarman u. Storz 2000).

CsrB/C-RNAs. CsrA ist ein wichtiger Regulator im Kohlehydrat-Stoffwechsel, wo er Glykogen-Synthese, -Abbau, Gluconeogenese und Glykolyse beeinflusst. CsrA bindet *glgC*-mRNA und destabilisiert diese. CsrB-RNA inhibiert zusammen mit CsrC-RNA die Aktivität von CsrA, indem sie CsrA bindet. So führt die Bildung von CsrB-RNA zur positiven Regulation des Glykogen-Stoffwechsels (Majdalani *et al.* 2005).

Katalytische Aktivität

tmRNA. sRNAs können auch selbst katalytisch aktiv sein, wie die zwei folgenden Beispiele zeigen. Die 363 nt lange tmRNA wird aus einem Primärtranskript am 5'-Ende durch RNase P, am 3'-Ende durch RNaseIII prozessiert. Sie formt ein tRNA-Halbmolekül und ist so in der Lage, die Sperre blockierter Ribosomen zu beseitigen [Überblick in Gillet u. Felden (2001)]. Die tmRNA tritt in der A-Stelle des Ribosoms ein und versieht das noch unfertige Protein durch eine *trans*-Translations-Reaktion mit einer Markierung am C-Terminus der das Peptid für den Abbau kennzeichnet (s. Abb. 1.4). Die Deletion des *ssrA*-Gens ist nicht letal, führt jedoch zu vermindertem Wachstum und verstärkter Alp-Proteaseaktivität.

RNase-P-RNA. Interessanterweise besitzt das Schlüsselenzym der RNA-Prozessierung, die RNase P, selbst eine RNA in ihrem aktiven Zentrum (Frank u. Pace 1998). Das 377 nt lange Primärtranskript der RNase-P-RNA wird am 3'-Ende durch RNase E beschnitten (Kim *et al.* 1996). Die sRNA alleine besitzt *in vitro* bereits die Fähigkeit zur Substraterkennung und katalytische Aktivität. *In vivo* ist jedoch die Proteinkomponente C5 notwendig. Das Gen *rnpB* ist essentiell, was auf die bedeutende Rolle der RNase P hinweist (Wassarman *et al.* 1999).

IGRica-RNA als möglicher Regulator der Biofilmbildung

Wie durch den niedrigen GC-Gehalt der IGRica-RNA-Sequenz zu erwarten, wird durch den *mfold*-Algorithmus (Mathews *et al.* 1999; Zuker 2003) eine starke Sekundärstruktur ($\Delta G = -403.06 \text{ kJ/mol}$) vorhergesagt. Daher liegen die Nukleotide in den Schleifen der Haarnadeln exponiert, und könnten mit möglichen Ziel-Strukturen (z. B. mRNAs) interagieren. Dies konnte für die OxyS-RNA in *E. coli* bereits gezeigt werden (Argaman u. Altuvia 2000). Indem sie sich an die Shine-Dalgarno-Sequenz der *fhlA*-mRNA anlagert, verhindert sie

5.3. Die *IGRica*-RNA trägt möglicherweise zur Regulation der Biofilmbildung bei

die Translation des Transkriptionsaktivators. Die Bildung eines *kissing complex* an zwei unterschiedlichen Stellen führen zu einem stabilen *antisense*-Komplex.

Für die regulatorische RNAIII wurde experimentell in *S. aureus* ein Einfluss auf die Expression der *spa*-mRNA untersucht (Huntzinger *et al.* 2005). Zusammen mit der Endoribonuklease III wird die Translation *spa*-mRNA auf posttranskriptioneller Ebene inhibiert und abgebaut. Dabei geschieht die primäre Interaktion über die Bindung der ungepaarten Nukleotide in Haarnadel 13 der RNAIII (Huntzinger *et al.* 2005). RNAIII ist darüber hinaus an der Regulation von Genen für extrazelluläre (Induktion) und Oberflächen-Proteine (Repression) beteiligt, wobei der detaillierte Mechanismus nicht bekannt ist (Novick 2003).

Die OxyS-RNA von *E. coli* bindet wie viele sRNAs das Hfq-Chaperon (Zhang *et al.* 1998). Zurzeit ist für Staphylokokken noch keine RNA beschrieben, für die Hfq-Bindung nachgewiesen wurde. Vor wenigen Jahren konnte jedoch die Struktur des Hfq-Hexamers aus *S. aureus* aufgeklärt werden (Schumacher *et al.* 2002). In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die RNA sich im Inneren der Pore anordnet. Für die Bindungs-Experimente wurde das Heptanukleotid 5'-AUUUUUG-3' verwendet. In anderen Studien konnten AU-reiche Regionen als Hfq-Bindungsstellen identifiziert werden (Zhang *et al.* 2002; Møller *et al.* 2002; Geissmann u. Touati 2004; Brescia *et al.* 2003). Auch die *IGRica*-RNA besitzt eine putative Hfq-Bindungsstelle (Nukleotide 26–31). Mittels qualitativer RT-PCR-Analyse konnte in dieser Arbeit die Expression von *hfq*-mRNA in *S. epidermidis* RP62A, 307 und CSF41498 nachgewiesen werden. Das *hfq*-Gen aus dem Stamm 307 wurde in *E. coli* heterolog exprimiert und gereinigt. Die Hfq-Monomere lagerten sich bereits nach der Reinigung zu einem stabilen Hexamer zusammen. Durch Coomassie-Färbung und Western-Blot-Analyse konnte die Reinheit nach der Elution bestätigt werden.

Zur Untersuchung der Bindung von sRNAs an den Faktor Hfq, wurde ein *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) verwendet. Mit dieser Methode konnten bereits die Bindungseigenschaften von Hfq an OxyS-RNA (Zhang *et al.* 1998), DsrA-RNA (Brescia *et al.* 2003) oder Spot-42-RNA (Møller *et al.* 2002). Für die *IGRica*-RNA wurde keine Hfq-Bindung im EMSA nachgewiesen. In Ermangelung einer Positiv-Kontrolle für die Hfq-Bindung in *S. epidermidis* kann eine Interaktion jedoch nicht ausgeschlossen werden.

5.3.3. Einfluss von IS256 auf die Expression der *IGRica*-RNA

Während der Untersuchung von Biofilm-negativen Phasenvarianten von *S. epidermidis* 307 wurden einige Mutanten identifiziert, die auf Kongorot-Agar zwar rot wuchsen, aber im Adhärenztest nur einen abgeschwächten Biofilm bildeten. Es konnte für die beiden Phasenvarianten 307/50 und 307/55 mithilfe PCR und Sequenzierung gezeigt werden, dass eine IS256-Insertion innerhalb des putativen Promotors P2 vorlag. Eine Verschiebung der Insertionsstelle um nur vier Basenpaare deutet womöglich auf eine Präferenz für diesen Ort hin. Die internen Promotoren P und P_{out} könnten die Transkription der *IGRica*-RNA

5. Diskussion

aktivieren. Maki u. Murakami (1997) konnten in *S. aureus* zeigen, dass die Insertion von IS256 in der 3'-Region des *ilm*-Gens einen starken Hybrid-Promotor bildet. Dies führt zur deutlichen Aktivierung der Transkription und Bildung eines Proteins, welches die Resistenz gegenüber Methicillin erhöht. In einer *S.-sciuri*-Mutante wurde das IS256-Element stromaufwärts des *mecA*-Gens identifiziert und bildet dort einen Ersatz-Promotor. Dessen verstärkte Aktivität führt zu einer Überexpression des *mecA*-Gens und damit zu einem Methicillin-resistenteren Phänotyp (Couto *et al.* 2003).

Falls IS256-Insertionen im Promotorbereich der IGR_{ica}-RNA von *S. epidermidis* 307/50 und 307/55 zu einer verstärkten Transkription führen, und diese ein negativer Regulator der Biofilmbildung ist, würde das die verminderte Biofilmbildung erklären. IS256 transponiert in viele, für die Regulation der Biofilmbildung wichtige Gene. Conlon *et al.* (2004) konnten die Transposition von IS256 in *rsbU* und *sarA* bei *S. epidermidis* nachweisen. Für *sarA* wurde ebenfalls die präzise Exzision von IS256 beobachtet. Auch im Teicoplanin-Resistenzgen *tcaA* von *S. aureus*, sowie im *icaA*- und *icaC*-Gen von *S. epidermidis* wurde eine derartige reversible Inaktivierung beschrieben (Maki *et al.* 2004; Ziebuhr *et al.* 1999). Nicht nur in Staphylokokken sind Insertions-Elemente an der Inaktivierung von Genen beteiligt, auch in *Lactobacillus sakei* wurde eines von zwei Lactocin-S-Operons durch die Insertion von IS1520 abgeschaltet (Skaugen u. Nes 2000). Damit ist es durchaus möglich, dass IS256 auch hier über die Insertion im Promotorbereich der IGR_{ica}-RNA an der Regulation der *ica*-Expression beteiligt ist. Um hierzu einen endgültigen experimentellen Beweis zu erbringen, ist es notwendig, mit Hilfe einer IGR_{ica}-RNA-Mutante weitere Untersuchungen anzustellen.

5.4. Suche nach neuen regulatorischen RNAs

Für die systematische Suche nach noch nicht entdeckten regulatorischen RNA-Molekülen wurden bereits mehrere Ansätze verfolgt. Da kleine untranslatierte RNAs nicht direkt in der DNA-Sequenz erkennbar sind, wie Protein-kodierende Gene, ist es schwieriger, sie bioinformatisch zu identifizieren. Es existieren mehrere Algorithmen und Rechner-gestützte Anwendungen, um untranslatierte RNAs vorherzusagen. Mittels Profil-basierter Suche nach Promotoren und Terminatoren in IGR-Datenbanken von *E. coli* wurden 144 potentielle neue sRNA-Gene lokalisiert (Chen *et al.* 2002). Der QRNA-Algorithmus benutzt ein probabilistisches Modell von erwarteten Mutations-Mustern in paarweisen *alignments* um konservierte RNA-Sekundärstrukturen vom Hintergrund anderer konservierter Sequenzen zu unterscheiden. Dadurch konnten in *E. coli* 275 sRNA-Kandidaten ermittelt werden (Rivas *et al.* 2001). Einen Koordinaten-basierten Ansatz verfolgt das Programm ‚sRNAPredict‘. Basierend auf konservierten Sequenzen, vorhergesagten Rho-unabhängigen Terminatoren und individueller Eigenschaften, wurden in *Vibrio cholerae* 32 Sequenzen für neue sRNAs

identifiziert werden (Livny *et al.* 2005). In *S. aureus* konnten durch einen bioinformatischen Ansatz 191 IGR identifiziert werden, die mittels Microarray-Analyse überprüft wurden und zu 12 neuen sRNAs führten (Pichon u. Felden 2003, 2005).

Viele kleine regulatorische RNAs benötigen Hfq für ihre Aktivität. Diese Bindung kann man sich bei der Suche nach neuen sRNAs zunutze machen. Bei der Methode der Co-Immunopräzipitation benutzt man Antiserum gegen Hfq, und kann somit aus Zellextrakten diejenigen RNAs über eine Säule aufreinigen, welche an das Hfq-Protein binden. Wassarman *et al.* (2001) und Zhang *et al.* (2003a) konnten mit dieser Vorgehensweise neue regulatorische sRNA-Moleküle in *E. coli* beschreiben. Microarrays, auf denen auch, oder nur die intergenischen Regionen vorhanden sind, bieten eine weitere Möglichkeit, mit Gesamt-RNA bisher noch nicht entdeckte sRNAs zu identifizieren. Pichon u. Felden (2005) benutzten einen Microarray, welcher speziell auf den durch bioinformatische Analyse ermittelten 191 Kandidaten-IGR beruhte. Wassarman *et al.* (2001) verwendeten für die Analyse der Transkripte in den IGR von *E. coli* einen Voll-Genom-Microarray, der alle offenen Leseraster und intergenischen Regionen enthält.

Zwei neue Vorgehensweisen entwickelten Liang *et al.* (2006) um die Spezifität der RNA-Bindung von Aminoglycosiden zu untersuchen. (i) Aus den Zellen wurde die RNA isoliert und mit Tobramycin beschichteten Magnet-Kügelchen vermischt. So konnten die an Tobramycin gebundenen RNA-Moleküle aus dem RNA-Gemisch entfernt werden und auf DNA-Microarrays untersucht und bestimmt werden. (ii) im anderen Fall wurde die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben, markiert und die Hybridisierung in Gegenwart oder Abwesenheit von Tobramycin durchgeführt.

5.5. Ausblick

Zusammenfassend kann aus den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten festgestellt werden, dass der Stamm *S. epidermidis* 307 ein typischer Vertreter der Hospitalflora ist. Er besitzt das *icaADBC*-Operon, mehrere Kopien des mobilen Elements IS256 und – wie im Verlauf der Sequenzierung und Annotation des Deletionsbereiches entdeckt – ein neues SCC-Element. Wie auch bei RP62A, ATCC 12228 und *S. haemolyticus* JCSC1435 stellt die ‚*oriC*-environ‘-Region einen instabilen, von Rekombination und Deletion gekennzeichneten Bereich im Genom von *S. epidermidis* 307 dar. Durch die Genomvergleiche und *in-silico*-Analysen konnte gezeigt werden, dass sich Klinik-Isolate und kommensale Stämme von *S. epidermidis* nur wenig voneinander unterscheiden. Hingegen spielen die mobilen Elemente eine maßgebliche Rolle bei der Adaptation an neue Umweltbedingungen, dem Erwerb von Resistenzen, Austausch von DNA und der Flexibilität des Genoms.

Während der Analyse der Umgebung des *ica*-Operons wurde in der vorliegenden Arbeit ein kleines, möglicherweise regulatorisch wirkendes RNA-Transkript identifiziert. Kleine

5. Diskussion

nicht-kodierende RNAs stellen eine bisher noch wenig beachtete und untersuchte Klasse von regulatorischen Molekülen dar, die an der Feineinstellung des Metabolismus nicht unwesentlich beteiligt sind. Mittels bioinformatischer Vorhersage und anschließender Analyse der Kandidaten, lassen sich somit bisher noch nicht beschriebene RNAs identifizieren. In den letzten Jahren wurden auf diese Weise vor allem für *E. coli* eine Vielzahl neuer sRNAs entdeckt (Gottesman 2005). Ein großer Teil dieser sRNAs hat regulatorische Eigenschaften. Wie der Ansatz von Pichon u. Felden (2005) zeigt, besitzen auch Staphylokokken viele bisher noch nicht entdeckte kleine RNAs. Daher kann die Kenntnis ihrer Funktion zum tieferen Verständnis der Regulation von Biofilmbildung und Metabolismus beitragen.

A. Annotation des Deletionsbereiches von *S. epidermidis* 307/9

Die annotierten Sequenzen des Deletionsbereiches sind auf der CD beigelegt.

ORF	Start	Stopp	Länge	Annotation	Ähnlichkeit		
					Prozent	zu	von
1	491	1663	1172	Transposase von IS256	100,0 %	Thp	RP62A
2	2336	1713	623	Tributyryl-esterase EstA (putativ)	100,0 %	SE2213	ATCC12228
3	3315	2629	686	Transkriptionsregulator (Crp/Fnr-Familie)	100,0 %	SE2214	ATCC12228
4	4937	3534	1403	Arginin/Ornithin-Antiporter	92,5 %	SE2215	ATCC12228
5	6208	5201	1007	Ornithin-Carbamoyltransferase	100,0 %	ArcB-1	RP62A
6	7554	6313	1241	Arginindeiminase	100,0 %	ArcA	RP62A
7	8348	7887	461	Transkriptionsregulator (ArgR-Familie)	91,5 %	SERP2251	RP62A
8	10385	8865	1520	extrazelluläre Elastase (Vorläufer)	100,0 %	SepA	RP62A
9	12062	10818	1244	Peptidase (M20/M25/M40-Familie)	97,1 %	SE2220	ATCC12228
10	12465	12902	437	konserviertes hypothetisches Protein	100,0 %	SERP2254	RP62A
11	13107	14021	914	konserviertes hypothetisches Protein	92,1 %	SE2222	ATCC12228
12	14125	15027	902	Lipoprotein (putativ)	100,0 %	SE2223	ATCC12228
13	16370	15582	788	Oxidoreduktase (Dehydrogenase/Reduktase-Familie)	94,3 %	SERP2257	RP62A
14	16661	16795	135	Hämolyisin (putativ)	100,0 %	SERP2258	RP62A
15	17110	18981	1871	Transkriptions-Antiterminator (BglG-Familie)	96,8 %	SERP2259	RP62A
16	19069	21009	1940	PTS-System (Fruktose-spezifisch IIABC-Komponente)	92,0 %	SERP2260	RP62A
17	21025	21975	950	Mannose-6-Phosphat-Isomerase (Klasse I)	96,2 %	SERP2261	RP62A
18	25150	22286	2864	<i>phage infection protein</i>	93,4 %	SERP2262	RP62A
19	25432	27399	1967	Protein mit N-Acetylmuramoyl-L-Alanin-Amidase-Domäne	92,1 %	SE2231	ATCC12228
20	29797	27767	2030	<i>cell wall surface anchor family protein</i>	81,8 %	SE2232	ATCC12228
21	30047	30475	428	Resistenzprotein gegen organisches Wasserstoffperoxid	100,0 %	SE2233	ATCC12228
22	32403	31714	689	konserviertes hypothetisches Protein	99,4 %	SE2236	ATCC12228
23	33737	32565	1172	Protein der <i>major-facilitator</i> -Superfamilie	92,1 %	SERP2270	RP62A
24	34078	34434	356	conserved hypothetical protein	76,3 %	SERP2271	RP62A
25	35061	34582	479	Peptid-Methionin-Sulfoxid-Reduktase	100,0 %	SERP2272	RP62A
26	35578	35231	347	konserviertes hypothetisches Protein	80,9 %	SERP2273	RP62A
27	37024	35684	1340	konserviertes hypothetisches Protein	98,2 %	SERP2274	RP62A
28	38525	37017	1508	Glycosyltransferase (Gruppe 1)	99,6 %	SE2243	ATCC12228
29	40933	38543	2390	Protein der SecA-Familie	98,4 %	SERP2276	RP62A
30	43053	41485	1568	konserviertes hypothetisches Protein	100,0 %	SERP2278	RP62A
31	44590	43034	1556	konserviertes hypothetisches Protein	100,0 %	SERP2279	RP62A
32	45807	44608	1199	Protein der SecY/SecE1- α -Familie	91,7 %	SERP2280	RP62A
33	53272	45950	7322	Serin-Threonin-reiches Antigen	81,4 %	SERP2281	RP62A
34	54994	53693	1301	hypothetisches Protein	78,3 %	SE2252	ATCC12228
35	56085	55270	815	Phosphonat-ABC-Transporter (Permease)	86,7 %	SERP2283	RP62A
36	56882	56082	800	Phosphonat-ABC-Transporter (Permease)	90,2 %	SERP2284	RP62A
37	57657	56884	773	Phosphonat-ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	99,2 %	SERP2285	RP62A
38	58727	57771	956	Phosphonat-ABC-Transporter (Phosphonat-bindendes Protein)	82,4 %	SERP2286	RP62A
39	58962	60512	1550	konserviertes hypothetisches Protein	95,0 %	SERP2287	RP62A
40	60609	62144	1535	Protein der 5'-Nukleotidase-Familie	95,7 %	SERP2288	RP62A
41	63419	62244	1175	Transporter (putativ)	88,2 %	SE2259	ATCC12228
42	65416	64859	557	IcaR	98,9 %	IcaR	RP62A
43	65581	66819	1238	IcaA	94,4 %	IcaA	RP62A
44	66783	67088	305	IcaD	84,2 %	IcaD	RP62A
45	67085	67954	869	IcaB	95,8 %	IcaB	RP62A
46	67941	69008	1067	IcaC	100,0 %	IcaC	RP62A
47	71270	69204	2066	Lipase	96,2 %	Geh-1	RP62A
48	71676	72461	785	Protein der N-Acetyltransferase-Familie	100,0 %	SERP2299	RP62A

Fortsetzung nächste Seite

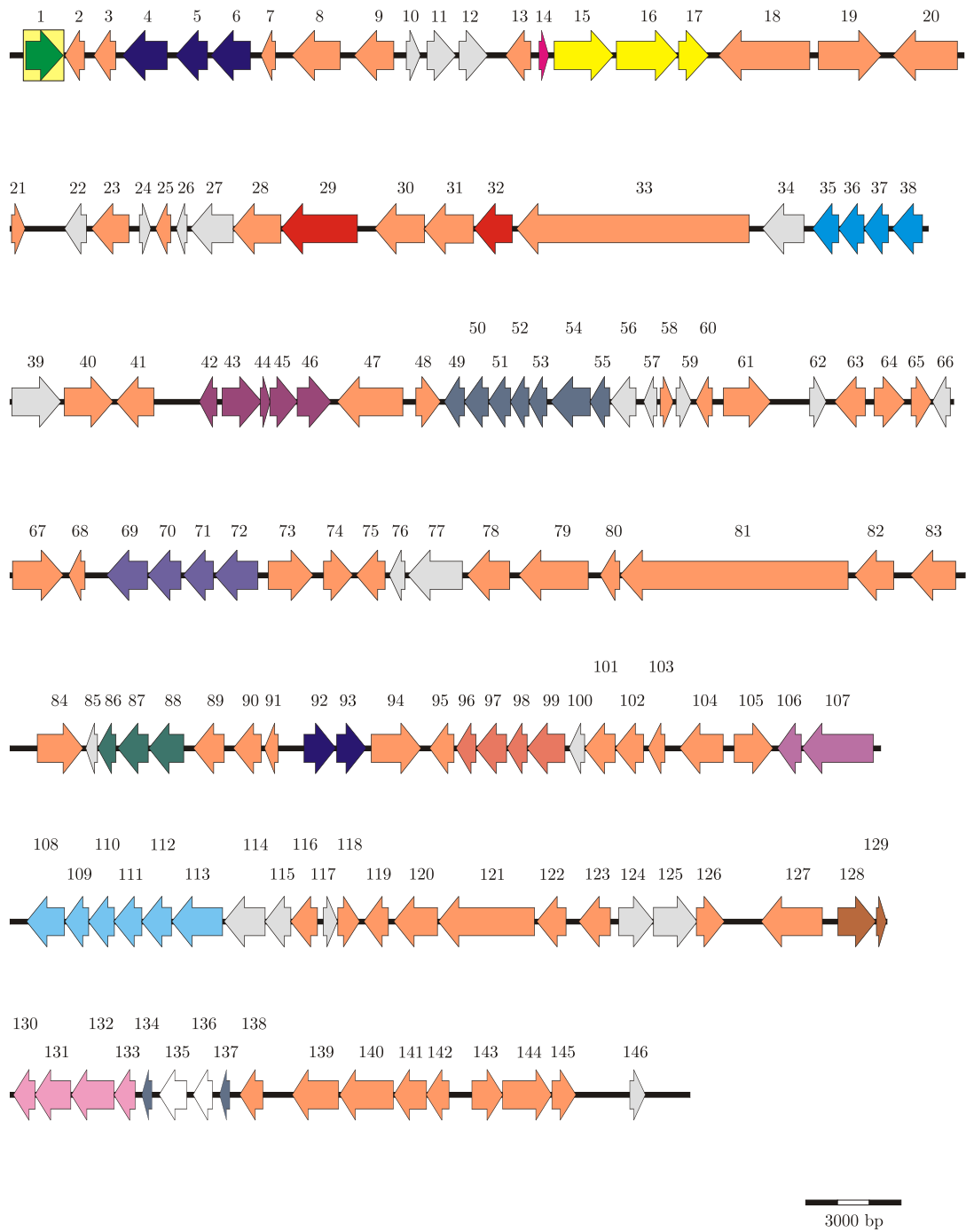
A. Annotation des Deletionsbereiches von *S. epidermidis* 307/9

ORF	Start	Stopp	Länge	Annotation	Ähnlichkeit		
					Prozent	zu	von
49	73205	72570	635	Phosphoribosyl-AMP-Pyrophosphatase	100,0 %	HisIE	RP62A
50	73960	73202	758	Imidazolglyzerinphosphat-Synthase (Cyclase-Untereinheit)	100,0 %	HisF	RP62A
51	74661	73957	704	Phosphoribosylformimino-5-Aminoimidazol-Carboxamid-Ribotid-Isomerase	100,0 %	HisA	RP62A
52	75232	74654	578	Amidotransferase	99,5 %	HisH	RP62A
53	75807	75229	578	Imidazolglyzerinphosphat-Dehydratase	100,0 %	HisB	RP62A
54	77167	75923	1244	Histidinol-Dehydrogenase	100,0 %	HisD	RP62A
55	77774	77160	614	ATP-Phosphoribosyltransferase	94,1 %	HisG	RP62A
56	78611	77799	812	konserviertes hypothetisches Protein	100,0 %	SERP2307	RP62A
57	79264	78848	416	konserviertes hypothetisches Protein	100,0 %	SERP2308	RP62A
58	79367	79777	410	Transkriptionsregulator (AsnC-Familie)	100,0 %	SERP2309	RP62A
59	79875	80347	472	konserviertes hypothetisches Protein		SERP2310	RP62A
60	81011	80493	518	Acetyltransferase (GNAT-Familie)	100,0 %	SERP2311	RP62A
61	81363	82859	1496	Malat:Quinon-Oxidoreduktase	100,0 %	Mqo-3	RP62A
62	84079	84594	515	konserviertes hypothetisches Protein	100,0 %	SERP2314	RP62A
63	85831	84854	977	Drp35	99,1 %	Drp35	RP62A
64	86114	87076	962	Protein mit RhdA-ähnlicher Domäne	100,0 %	SE0262	ATCC12228
65	87270	87908	638	Pyrrolidon-Carboxylat-Peptidase	100,0 %	SE0261	ATCC12228
66	88502	87942	560	hypothetisches Protein	100,0 %	SE0260	ATCC12228
67	88683	90275	1592	Cholin/Carnitin/Betain-Transporter	86,8 %	SERP2320	RP62A
68	90952	90440	512	immunodominantes Antigen B (putativ)	100,0 %	SERP2321	RP62A
69	92912	91635	1277	Acetoin-Dehydrogenase (E2-Komponente, Dihydrolipoamid-Acetyltransferase)	95,8 %	SERP2324	RP62A
70	93966	92926	1040	Acetoin-Dehydrogenase (E1-Komponente, beta-Untereinheit)	96,0 %	SERP2325	RP62A
71	94990	94037	953	Acetoin-Dehydrogenase (E1-Komponente, alpha-Untereinheit)	91,5 %	SERP2326	RP62A
72	96384	95032	1352	Acetoin-Dehydrogenase (E3-Komponente, Dihydrolipoamid-Dehydrogenase)	100,0 %	SERP2327	RP62A
73	96709	98127	1418	Anionen-Transporter	93,0 %	SERP2328	RP62A
74	98455	99366	911	Protein der Thiamin-Biosynthese (putativ)	89,8 %	SERP2330	RP62A
75	100379	99474	905	RarD	100,0 %	RarD	RP62A
76	101014	100511	503	konserviertes hypothetisches Protein	95,8 %	SERP2332	RP62A
77	102806	101103	1703	konserviertes hypothetisches Protein	99,6 %	SERP2333	RP62A
78	104301	102961	1340	Protein der <i>major-facilitator</i> -Superfamilie	90,6 %	SERP2334	RP62A
79	106766	104580	2186	Lipase (putativ)	100,0 %	SE0245	ATCC12228
80	107760	107137	623	Protein der 4-Phosphopantetheinyl-Transferase-Familie	87,0 %	SE0244	ATCC12228
81	114933	107770	7163	Peptidsynthetase	98,6 %	SE0243	ATCC12228
82	116372	115131	1241	Transporter (putativ)	100,0 %	SERP2339	RP62A
83	118312	116894	1418	Transporter (EmrB/QacA-Familie)	97,2 %	SERP2340	RP62A
84	119453	120901	1448	Transporter (putativ)	90,5 %	SERP2342	RP62A
85	121355	120981	374	konserviertes hypothetisches Protein	100,0 %	SERP2343	RP62A
86	121934	121359	575	Protein mit DAK2-Domäne	100,0 %	SERP2344	RP62A
87	122951	121989	962	Protein der Dihydroxyacetonkinase-Familie	95,9 %	SERP2345	RP62A
88	124070	122967	1103	Glyzerin-Dehydrogenase	100,0 %	GldA	RP62A
89	125340	124375	965	Biotin-Synthetase	99,7 %	BioB	RP62A
90	126505	125630	875	Säure-Phosphatase (putativ)	98,6 %	SERP2348	RP62A
91	127041	126613	428	Fosfomycin-Resistenz-Protein	98,6 %	FosB	RP62A
92	127854	128855	1001	Ornithin-Carbamoyltransferase	100,0 %	ArcB-2	RP62A
93	128878	129810	932	Carbamatkinase	95,5 %	ArcC	RP62A
94	129975	131540	1565	Membranprotein (putativ)	94,0 %	SERP2353	RP62A
95	132578	131811	767	Tributyryltransferase EstA (putativ)	98,4 %	SE0226	ATCC12228
96	133266	132643	623	Aminosäure-ABC-Transporter (Permease)	86,5 %	SERP2355	RP62A
97	134228	133269	959	Aminosäure-ABC-Transporter (Aminosäure-bindendes Protein)	100,0 %	SERP2356	RP62A
98	134882	134247	635	Aminosäure-ABC-Transporter (Permease)	78,2 %	SE0223	ATCC12228
99	136066	134879	1187	Aminosäure-ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	96,5 %	SERP2358	RP62A
100	136689	136201	488	konserviertes hypothetisches Protein	99,4 %	SE0221	ATCC12228
101	137651	136686	965	Protein der 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Familie	100,0 %	SERP2360	RP62A
102	138547	137651	896	konserviertes hypothetisches Protein	99,7 %	SERP2361	RP62A
103	139222	138683	539	Transkriptionsregulator (TetR-Familie)	100,0 %	SERP2362	RP62A
104	141046	139688	1358	Trägerprotein für Transportsystem verzweigter Aminosäure-Ketten	89,4 %	BrnQ-2	RP62A
105	141400	142617	1217	Peptidase (M20/M25/M40-Familie)	100,0 %	SERP2364	RP62A
106	143511	142756	755	Pyruvat-Formiat-Lyase-aktivierendes Enzym	99,6 %	PfIA	RP62A
107	145779	143533	2246	Formiat-Acetyltransferase	98,3 %	PfIB	RP62A
108	147710	146520	1190	Transporter (putativ)	99,7 %	SERP2367	RP62A
109	148471	147722	749	Peptid-ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	100,0 %	SERP2368	RP62A
110	149279	148464	815	Peptid-ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	90,4 %	SERP2369	RP62A

Fortsetzung nächste Seite

ORF	Start	Stopp	Länge	Annotation	Ähnlichkeit		
					Prozent	zu	von
111	150144	149266	878	Peptid-ABC-Transporter (Permease)	95,5 %	SERP2370	RP62A
112	151076	150141	935	Peptid-ABC-Transporter (Permease, putativ)	94,5 %	SERP2371	RP62A
113	152687	151089	1598	Peptid-ABC-Transporter (Peptid-bindendes Protein)	97,7 %	SERP2372	RP62A
114	154030	152738	1292	konserviertes hypothetisches Protein	99,8 %	SERP2373	RP62A
115	154838	154023	815	konserviertes hypothetisches Protein	99,6 %	SERP2374	RP62A
116	155674	154835	839	Protein der Diaminopimelat-Epimerase-Familie	100,0 %	SERP2375	RP62A
117	155862	156308	446	Protein mit konservierter Domäne	73,0 %	SERP2377	RP62A
118	156323	157012	689	ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	99,6 %	SERP2378	RP62A
119	157913	157140	773	Oxidoreduktase (Dehydrogenase/Reduktase-Familie)	94,6 %	SERP2379	RP62A
120	159458	158082	1376	Transporter (putativ)	87,6 %	SERP2380	RP62A
121	162504	159487	3017	NADH:Flavin-Oxidoreduktase/Fumarat-Reduktase (putativ)	97,6 %	SERP2381	RP62A
122	163504	162587	917	Protein der ApbE-Familie	100,0 %	SERP2382	RP62A
123	164901	163906	995	ABC-Transporter (Substrate-bindendes Protein)	83,1 %	SERP2383	RP62A
124	165158	166264	1106	konserviertes hypothetisches Protein	95,9 %	SERP2384	RP62A
125	166258	167640	1382	Protein mit konservierter Domäne	97,0 %	SERP2385	RP62A
126	167510	168491	881	Cobalamin-Synthese-Protein (putativ)	100,0 %	SERP2386	RP62A
127	171578	169647	1931	Lipase	88,2 %	Geh-2	RP62A
128	172069	173256	1187	SspB	100,0 %	SspB	RP62A
129	173274	173591	317	SspC	98,1 %	SE0183	ATCC12228
130	174385	173699	686	6-Carboxyhexanoat-CoA-Ligase	98,2 %	BioW	RP62A
131	175511	174378	1133	Aminotransferase (Klasse II)	97,1 %	SERP2394	RP62A
132	176877	175522	1355	Adenosylmethionin-8-Amino-7-Oxononanoat-Aminotransferase	99,1 %	BioA	RP62A
133	177541	176870	671	Dethiobiotin-Synthase	99,1 %	BioD	RP62A
134	178035	177883	153	Phenol-lösliches Modulin β 1	100,0 %	SERP2397	RP62A
135	179164	178292	872	<i>accumulation associated protein</i> (Fragment)	71,6 %	SE0175	ATCC12228
136	179968	179357	611	<i>accumulation associated protein</i> (Fragment)	95,5 %	SE0175	ATCC12228
137	180609	180457	153	Phenol-lösliches Modulin β 1	100,0 %	SERP2400	RP62A
138	181561	180827	734	Serinprotease	99,3 %	SE0172	ATCC12228
139	183942	182485	1457	Glycosyltransferase (putativ)	52,1 %	SACOL1043	COL
140	185663	183975	1688	Teichonsäure-Biosynthese-Protein (putativ)	68,1 %	SACOL0242	COL
141	186707	185682	1025	Alkoholdehydrogenase	78,3 %	SACOL0241	COL
142	187416	186700	716	4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol-Synthase (putativ)	73,9 %	SACOL0240	COL
143	188138	189112	974	Eisen-ABC-Transporter (Eisen-bindendes Protein, putativ)	93,2 %	SERP2404	RP62A
144	189109	190647	1538	Sensor-Histidin-Kinase	96,1 %	SERP2405	RP62A
145	190659	191414	755	DNA-bindender Responseregulator (AraC-Familie)	100,0 %	SERP2406	RP62A
146	193109	193603	494	konserviertes hypothetisches Protein	84,8 %	SERP2408	RP62A
r1	1334	1011	323	CDS54_SCCmecIII	100,0 %	CDS_54	SCCmec III
r2	1026	1328	302	CDS55_SCCmecIII	69,0 %	CDS_55	SCCmec III
r3	2341	1898	443	CDS57_SCCmecIII	86,4 %	CDS_57	SCCmec III
r4	2930	2403	527	CDS58_SCCmecIII	74,9 %	CDS_58	SCCmec III
r5	3553	3065	488	CDS59_SCCmecIII	83,3 %	CDS_59	SCCmec III
r6	3877	3569	308	CDS61_SCCmecIII	83,3 %	CDS_61	SCCmec III
r7	4488	3916	572	CDS62_SCCmecIII (verkürzt)	85,5 %	CDS_62	SCCmec III
r8	5415	4969	446	Protein mit RadC-Domäne	100,0 %	CDS_67	SCCmec III
r9	5942	5436	506	hypothetisches Protein	99,4 %	CDS_68	SCCmec III
r10	6269	5958	311	hypothetisches Protein	98,1 %	CDS_69	SCCmec III
r11	8485	6809	1676	site-spezifische Rekombinase CcrC	94,8 %	CcrC	JCSC1435
r12	10353	8710	1643	hypothetisches Protein	99,3 %	CDS_72	SCCmec III
r13	10721	10350	371	hypothetisches Protein	73,0 %	SH0054	JCSC1435
r14	11823	10714	1109	hypothetisches Protein	93,0 %	SH0053	JCSC1435
r15	14005	11993	2012	hypothetisches Protein	92,1 %	SH0052	JCSC1435
r16	15096	14167	929	hypothetisches Protein	99,4 %	SH0050	JCSC1435
r17	15177	15605	428	hypothetisches Protein	100,0 %	SH0049	JCSC1435
r18	15665	15916	252	Transposase von IS431 (Frag.)		SH0048	JCSC1435
r19	15938	16030	93	Transposase von IS431 (Frag.)		SH0047	JCSC1435
r20	16196	16339	144	Transposase von IS431 (Frag.)		SH0046	JCSC1435
r21	16550	17740	1190	hypothetisches Protein	92,7 %	SH0045	JCSC1435
r22	17727	18593	866	hypothetisches Protein	98,6 %	SH0044	JCSC1435
r23	18729	19676	947	hypothetisches Protein	93,0 %	SH0043	JCSC1435
r24	20093	21265	1172	Transposase von IS256	100,0 %	Tnp	RP62A
r25	21322	21714	392	Acetyltransferase (GNAT-Familie)	100,0 %	SERP1586	RP62A
r26	21715	23154	1439	Acetyltransferase/Phosphotransferase	97,5 %	AacA	RP62A
r27	24456	23284	1172	Transposase von IS256	100,0 %	Tnp	RP62A

A. Annotation des Deletionsbereiches von *S. epidermidis* 307/9



B. Vergleichende Genomanalyse

In der folgenden Tabelle ist die Auswertung der Microarray-Genomvergleiche aufgestellt. Als Positiv-Kontrolle dient der Stamm RP62A. Die Spalte ID bezeichnet die ORF-Nummerierung wie sie von der Genom-Annotation für den Chip stammt. In der zweiten Spalte ist die Gen-Nummer der veröffentlichten RP62A-Sequenz aufgeführt. Für die einzelnen Stämme von *S. epidermidis* gilt jeweils ■ als vorhanden und □ als nicht vorhanden. ◇ stellt eine 50%ige Wahrscheinlichkeit dar, dass das Gen vorhanden ist (auf der Hälfte der hybridisierten Microarrays vorhanden). ∇ bezeichnet 60%-ige und △ 75%-ige Wahrscheinlichkeit für das Fehlen des ORFs. RP bezeichnet den Stamm RP62A, /9 die Deletionsmutante 307/9.

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
1	SERP1935	■	■	■	■	■	■	69	SERP1992	■	■	■	■	■	■
2	SERP1937	■	■	■	■	■	■	71	SERP1994	■	■	■	■	■	■
3	SERP1938	×	×	×	×	×	×	73	SERP1995	×	×	×	×	×	×
4	SERP1939	■	■	■	■	■	■	74	SERP1996	■	■	■	■	■	■
5	SERP1940	■	■	■	■	■	■	75	SERP1997	■	■	■	■	■	■
6	SERP1941	■	■	■	■	■	■	76	SERP1998	■	■	■	■	■	■
8	SERP1942	■	■	■	■	■	■	77	SERP1999	■	■	■	■	∇	■
10	SERP1944	■	■	■	■	■	■	78	SERP2000	■	■	■	■	■	■
11	SERP1945	×	×	×	×	×	×	80	SERP2001	■	■	■	■	∇	■
12	SERP1946	■	■	■	■	■	■	82	SERP2002	×	×	×	×	×	×
13	SERP1947	■	■	■	■	■	■	83	SERP2003	■	■	■	■	■	■
14	SERP1948	■	■	■	■	■	■	84	SERP2004	■	■	■	■	■	■
16	SERP1949	■	■	■	■	■	■	85	SERP2005	■	■	■	■	■	■
17	SERP1950	■	■	■	■	■	■	88	SERP2007	■	■	■	■	■	■
19	SERP1951	■	■	■	■	■	■	90	SERP2008	■	■	■	■	■	■
20	SERP1952	■	■	■	■	■	■	92	SERP2009	■	■	■	■	■	■
21	SERP1953	■	■	■	■	■	■	93	SERP2010	■	■	■	■	■	■
22	SERP1954	■	■	■	■	■	■	95	SERP2011	■	■	■	■	∇	■
23	SERP1955	■	■	■	■	■	■	96	n. a.	■	■	■	■	■	■
26	SERP1956	■	■	■	■	■	■	97	SERP2012	■	■	■	■	■	■
27	SERP1957	■	■	■	■	■	■	98	SERP2013	■	■	■	■	■	■
28	SERP1958	■	■	■	■	■	■	101	SERP2014	■	■	■	■	■	■
29	SERP1959	×	×	×	×	×	×	102	SERP2015	■	■	■	■	■	■
30	SERP1960	■	■	■	■	■	■	103	SERP2016	×	×	×	×	×	×
31	SERP1961	■	■	■	■	■	■	104	SERP2017	■	■	■	■	■	■
32	SERP1962	■	■	■	■	■	■	105	SERP2018	■	■	■	■	■	■
33	SERP1963	■	■	■	■	□	■	106	SERP2019	×	×	×	×	×	×
34	SERP1964	■	■	■	■	■	■	108	SERP2021	■	■	■	■	■	■
39	SERP1966	■	■	■	■	■	■	109	SERP2022	■	■	■	■	■	■
40	SERP1967	■	■	■	■	■	■	110	SERP2023	■	■	■	■	■	■
42	SERP1968	■	■	■	■	■	■	111	SERP2024	■	■	■	■	■	■
43	SERP1968	■	■	■	■	■	■	112	SERP2025	■	■	■	■	■	■
44	SERP1969	■	■	■	■	■	■	114	SERP2026	■	■	■	■	■	■
46	SERP1972	×	×	×	×	×	×	115	SERP2027	■	■	■	■	■	■
47	SERP1973	■	■	■	■	■	■	117	SERP2028	■	■	■	■	■	■
48	SERP1974	■	■	■	■	■	■	118	SERP2029	■	■	■	■	■	■
50	SERP1976	×	×	×	×	×	×	119	SERP2030	■	■	■	■	■	■
51	SERP1977	■	■	■	■	■	■	120	SERP2031	■	■	■	■	■	■
52	SERP1978	■	■	■	■	■	■	121	SERP2032	■	■	■	■	■	■
53	SERP1979	■	■	■	■	■	■	122	SERP2033	×	×	×	×	×	×
55	SERP1980	■	■	■	■	■	■	123	SERP2034	■	■	■	■	■	■
57	SERP1981	■	■	■	■	■	■	125	SERP2035	■	■	■	■	■	■
58	SERP1982	■	■	■	■	■	■	126	SERP2036	■	■	■	■	■	■
59	SERP1983	■	■	■	■	■	■	127	SERP2037	■	■	■	■	■	■
60	SERP1984	■	■	■	■	□	■	128	SERP2038	■	■	■	■	■	■
61	SERP1985	■	■	■	■	■	■	130	SERP2039	■	■	■	■	■	■
62	SERP1986	■	■	■	■	■	■	131	SERP2040	■	■	■	■	■	■
63	SERP1987	■	■	■	■	■	■	132	SERP2041	■	■	■	■	■	■
65	SERP1988	■	■	■	■	■	■	133	SERP2042	■	■	×	■	■	×
66	SERP1989	■	■	■	■	■	■	134	SERP2043	×	×	×	×	×	×
67	SERP1990	■	■	■	■	■	■	137	SERP2045	■	■	■	■	■	■

Fortsetzung nächste Seite

B. Vergleichende Genomanalyse

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
138	SERP2046	■	■	■	■	■	■	269	SERP2146	×	×	×	×	×	×
139	SERP2047	■	■	■	■	■	■	271	SERP2147	■	■	■	■	■	■
140	SERP2048	■	■	■	■	■	■	273	SERP2148	■	■	■	■	■	■
141	SERP2049	■	■	■	■	■	■	276	SERP2150	■	■	■	■	■	■
144	SERP2051	■	■	■	■	■	■	277	SERP2151	■	■	■	■	■	■
145	SERP2052	■	■	■	■	■	□	278	SERP2152	■	■	■	■	■	■
146	SERP2053	■	■	■	■	■	□	279	SERP2153	■	■	■	■	■	■
147	SERP2054	■	■	■	■	■	■	282	SERP2154	■	■	■	■	■	■
148	SERP2055	■	■	■	■	■	■	283	SERP2155	■	■	■	■	■	■
150	SERP2056	■	■	■	■	■	■	284	SERP2156	■	■	■	■	■	■
151	SERP2057	■	■	■	■	■	■	288	SERP2157	■	■	■	■	■	■
152	SERP2058	■	■	■	■	■	■	289	SERP2158	■	■	■	■	■	■
153	SERP2059	■	■	■	■	■	■	291	SERP2159	■	■	■	■	■	■
155	SERP2060	×	×	×	×	×	×	293	SERP2160	■	■	■	■	■	■
156	SERP2061	■	■	■	■	■	■	296	SERP2163	■	◇	■	■	■	■
157	SERP2063	■	■	■	■	■	■	299	SERP2165	×	×	×	×	×	×
158	SERP2064	■	■	■	■	■	■	300	SERP2166	■	■	■	■	■	■
159	SERP2065	■	■	■	■	■	■	301	SERP2167	■	◇	▽	■	■	■
160	n. a.	×	×	×	×	×	×	303	SERP2168	■	■	■	■	■	■
161	SERP2065	■	■	■	■	■	■	304	SERP2169	■	■	■	■	■	■
162	SERP2066	■	■	■	■	■	■	305	SERP2170	■	■	■	■	■	■
163	SERP2067	■	■	■	■	■	■	306	SERP2172	■	■	■	■	■	■
165	SERP2068	■	■	■	■	■	■	308	SERP2173	■	■	■	■	■	■
167	SERP2069	■	■	■	■	■	■	309	SERP2174	■	■	■	■	■	■
169	SERP2070	■	■	■	■	■	■	311	SERP2175	■	■	■	■	■	■
170	SERP2071	■	■	■	■	■	■	313	SERP2176	■	■	■	■	■	■
171	SERP2072	■	■	■	■	■	■	314	SERP2177	■	■	■	■	■	■
172	SERP2073	×	×	×	×	×	×	317	SERP2178	■	■	■	■	■	■
173	SERP2074	■	■	■	■	■	■	318	SERP2179	■	■	■	■	■	■
174	SERP2075	■	■	■	■	■	■	320	SERP2180	■	■	■	■	■	■
175	SERP2076	■	■	■	■	■	■	322	SERP2182	■	■	■	■	■	■
177	SERP2077	■	■	■	■	■	■	323	SERP2183	■	■	■	■	■	■
179	SERP2079	■	■	■	■	■	■	325	SERP2185	■	■	■	■	■	■
180	SERP2080	■	■	■	■	■	■	326	SERP2186	■	■	■	■	■	■
181	SERP2081	■	■	■	■	■	■	327	SERP2187	■	■	■	■	■	■
183	SERP2082	■	■	■	■	■	■	328	SERP2188	■	■	■	■	■	■
184	SERP2083	■	■	■	■	■	■	329	SERP2189	■	■	■	■	■	■
187	SERP2084	■	■	■	■	■	■	330	SERP2190	■	■	■	■	■	■
190	SERP2086	■	■	■	■	■	■	331	SERP2191	■	■	■	■	■	■
191	SERP2087	■	■	■	■	■	■	333	SERP2192	■	■	■	■	■	■
192	SERP2088	×	×	×	×	×	×	335	SERP2194	■	■	■	■	■	■
194	SERP2089	■	■	■	■	■	■	336	SERP2195	■	■	■	■	■	■
195	SERP2090	■	■	■	■	■	■	337	SERP2196	■	■	■	■	■	■
198	SERP2092	×	×	×	×	×	×	339	SERP2198	■	■	■	■	■	■
199	SERP2094	■	■	■	■	■	■	342	SERP2201	■	■	■	■	■	■
200	SERP2095	■	■	■	■	■	■	344	SERP2203	■	■	■	■	■	■
201	SERP2096	■	■	■	■	■	■	345	SERP2204	■	■	■	■	■	■
206	SERP2099	■	■	■	■	■	■	346	SERP2205	■	■	■	■	■	■
208	SERP2100	■	■	■	■	■	■	347	SERP2206	■	■	■	■	■	■
209	SERP2101	■	■	■	■	■	■	350	SERP2208	×	×	×	×	×	×
210	SERP2102	■	■	■	■	■	■	351	SERP2209	■	■	■	■	■	■
211	SERP2103	■	■	■	■	■	■	353	SERP2210	■	■	■	■	■	■
213	SERP2105	■	■	■	■	■	■	356	SERP2212	■	■	■	■	■	■
214	SERP2106	■	■	■	■	■	■	359	n. a.	■	■	■	■	■	■
215	SERP2107	■	■	■	■	■	■	364	SERP2215	×	×	×	×	×	×
218	SERP2109	■	■	■	■	■	■	365	SERP2216	×	×	×	×	×	×
219	SERP2110	■	■	■	■	■	■	367	SERP2217	■	□	□	□	□	□
220	SERP2111	■	■	■	■	■	■	368	SERP2218	×	×	×	×	×	×
222	SERP2112	■	■	■	■	■	■	371	SERP2219	■	■	■	■	■	■
223	SERP2113	■	■	■	■	■	■	372	SERP2220	■	■	□	◇	■	■
226	SERP2114	■	■	■	■	■	■	374	SERP2221	■	△	□	■	□	■
228	SERP2115	■	■	■	■	■	■	375	SERP2222	■	□	□	■	□	■
229	SERP2116	■	■	■	■	■	■	379	SERP2225	■	□	□	◇	□	■
230	SERP2117	■	■	■	■	■	■	383	SERP2228	■	□	□	◇	□	■
232	SERP2118	■	■	■	■	■	■	387	SERP2230	×	×	×	×	×	×
233	SERP2119	■	■	■	■	■	■	389	SERP2231	×	×	×	×	×	×
235	SERP2120	■	■	■	■	■	■	390	SERP2232	×	×	×	×	×	×
236	SERP2121	■	■	■	■	■	■	391	SERP2233	■	□	□	◇	□	■
237	SERP2122	■	■	■	■	■	■	397	SERP2237	×	×	×	×	×	×
238	SERP2123	■	■	■	■	■	■	398	SERP2239	■	■	■	■	■	■
242	SERP2125	×	×	×	×	×	×	400	SERP2240	■	■	■	■	■	■
243	SERP2126	■	■	■	■	■	■	402	SERP2241	■	■	■	■	■	■
244	SERP2127	■	■	■	■	■	■	403	SERP2242	■	■	■	■	■	■
246	SERP2128	■	■	■	■	■	■	406	SERP2244	■	■	■	■	■	■
248	SERP2129	■	■	■	■	■	■	407	SERP2245	■	■	■	■	■	■
250	SERP2131	■	■	■	■	■	■	408	SERP2246	■	■	□	■	■	■
251	SERP2132	■	■	■	■	■	■	409	SERP2247	■	■	□	■	■	■
252	SERP2133	■	■	■	■	■	■	411	SERP2249	■	■	□	■	■	■
253	SERP2134	■	■	■	■	■	■	412	SERP2250	■	■	□	■	■	■
255	SERP2136	■	■	■	■	■	■	414	SERP2251	■	■	□	■	■	■
258	SERP2137	■	■	■	■	■	■	417	SERP2252	■	■	□	■	■	■
260	SERP2138	■	■	■	■	■	■	418	SERP2253	■	■	□	■	▽	■
263	SERP2140	■	■	■	■	■	■	420	SERP2255	■	■	□	■	□	■
264	SERP2141	■	■	■	■	■	■	421	SERP2256	■	■	□	■	□	■
265	SERP2142	■	■	■	■	■	■	423	SERP2257	■	■	□	■	■	■
266	SERP2143	■	■	■	■	■	■	426	SERP2259	■	■	□	■	■	■
267	SERP2144	×	×	×	×	×	×	427	SERP2260	■	■	□	■	■	■
268	SERP2145	■	■	■	■	■	■	428	SERP2261	■	■	□	■	■	■

Fortsetzung nächste Seite

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
430	SERP2262	■	■	□	■	■	■	555	SERP2364	■	■	□	■	■	■
432	SERP2263	■	■	□	■	■	■	556	SERP2365	■	■	□	■	■	■
433	SERP2264	■	■	□	■	■	■	557	SERP2366	■	■	□	■	■	■
434	SERP2265	■	■	□	■	■	■	561	SERP2367	×	×	×	×	×	×
438	SERP2268	×	×	×	×	×	×	562	SERP2368	■	■	□	■	■	■
439	SERP2269	■	■	□	■	■	■	563	SERP2369	■	■	□	■	■	■
440	SERP2270	■	■	□	■	■	■	564	SERP2370	■	■	□	■	■	■
443	SERP2271	■	■	□	■	■	■	565	SERP2371	■	■	□	■	■	■
444	SERP2272	×	×	×	×	×	×	566	SERP2372	■	■	□	■	■	■
445	SERP2273	■	■	□	■	■	■	567	SERP2373	■	■	□	■	■	■
446	SERP2274	■	■	□	■	■	■	568	SERP2374	■	■	□	■	■	■
447	SERP2275	■	■	□	■	■	■	569	SERP2375	■	■	□	■	■	■
448	SERP2276	■	■	□	■	■	■	570	SERP2377	■	■	□	■	■	■
449	SERP2277	■	■	□	■	■	■	571	SERP2378	×	×	×	×	×	×
450	SERP2278	■	■	□	■	■	■	572	SERP2379	■	■	□	■	■	■
451	SERP2279	■	■	□	■	■	■	574	SERP2380	×	×	×	×	×	×
452	SERP2280	■	■	□	■	■	■	575	SERP2381	■	■	□	■	■	■
453	SERP2281	■	■	□	■	■	■	576	SERP2382	■	■	□	■	■	■
455	SERP2283	■	■	□	■	■	■	578	SERP2383	■	■	□	■	■	■
456	SERP2284	×	×	×	×	×	×	580	SERP2384	■	■	□	■	■	■
457	SERP2285	■	■	▽	■	■	■	581	SERP2385	■	■	□	■	■	■
458	SERP2286	■	■	□	■	■	■	582	SERP2386	■	■	□	■	■	■
459	SERP2287	■	■	□	■	■	■	584	SERP2387	■	◇	□	■	■	■
460	SERP2288	■	■	□	■	■	■	585	SERP2388	■	■	□	■	■	■
461	SERP2289	■	■	□	■	■	■	587	SERP2390	■	■	□	■	■	■
466	SERP2292	■	■	□	△	□	□	588	SERP2391	■	■	□	■	■	■
467	SERP2293	■	■	□	△	□	□	589	SERP2392	■	△	□	△	□	■
468	SERP2294	■	■	□	△	□	□	591	SERP2393	■	■	□	■	■	■
469	SERP2295	■	■	□	□	□	□	592	SERP2394	■	■	□	■	■	■
470	SERP2296	■	■	□	△	□	□	593	SERP2395	×	×	×	×	×	×
471	SERP2297	■	■	□	■	■	■	594	SERP2396	■	■	□	■	■	■
474	SERP2299	■	■	▽	■	■	■	597	SERP2398	×	×	×	×	×	×
475	SERP2300	■	■	□	■	■	■	600	SERP2401	■	■	□	□	□	■
476	SERP2301	■	■	□	■	■	■	606	SERP2404	■	■	□	□	□	■
477	SERP2302	■	■	□	■	■	■	607	SERP2405	■	■	□	△	□	■
478	SERP2303	■	■	□	■	■	■	608	SERP2406	■	■	□	□	□	■
479	SERP2304	■	■	□	■	■	■	609	SERP2407	■	■	□	△	□	■
481	SERP2305	■	◇	□	■	■	■	610	SERP2407	■	■	□	△	□	■
482	SERP2306	■	■	□	■	■	■	612	SERP2408	■	■	□	■	■	■
483	SERP2307	■	■	□	■	■	■	613	SERP2409	□	□	□	□	□	■
484	SERP2308	■	■	□	■	■	■	615	SERP2409	■	■	□	■	■	■
485	SERP2309	■	■	□	■	■	■	617	SERP2411	■	△	□	◇	□	■
486	SERP2310	■	■	□	■	■	■	620	SERP2412	×	×	×	×	×	×
487	SERP2311	■	■	□	■	■	■	621	SERP2413	■	■	□	■	■	■
488	SERP2312	■	■	□	■	■	■	628	SERP2418	■	■	□	■	■	■
491	SERP2314	■	■	□	■	■	■	633	SERP2421	■	■	□	■	■	■
494	SERP2315	■	■	□	■	■	■	635	SERP2422	■	△	□	△	□	□
495	SERP2316	■	■	□	■	■	■	637	SERP2423	■	◇	□	◇	□	■
497	SERP2317	■	■	□	■	■	■	639	SERP2425	■	△	□	■	■	■
500	SERP2320	■	■	□	■	■	■	640	SERP2426	■	△	□	■	■	■
501	SERP2321	■	■	□	■	■	■	641	SERP2427	■	△	□	■	■	■
503	SERP2323	×	×	×	×	×	×	642	SERP2428	■	□	□	■	■	■
505	SERP2324	■	■	□	■	■	■	643	SERP2429	■	□	□	■	■	■
507	SERP2325	■	■	□	■	■	■	644	SERP2430	■	△	□	■	■	■
508	SERP2326	■	■	▽	■	■	■	645	SERP2431	■	■	□	■	■	■
509	SERP2327	■	■	□	■	■	■	646	SERP2432	■	□	□	■	■	■
511	SERP2328	■	■	□	■	■	■	647	SERP2433	■	□	□	■	■	■
513	SERP2330	■	■	□	■	■	■	648	SERP2434	■	△	□	■	■	■
514	SERP2331	■	■	□	■	■	■	649	SERP2435	■	△	□	■	■	■
515	SERP2332	■	■	□	■	■	■	652	SERP2437	■	■	□	■	■	■
516	SERP2333	■	■	□	■	■	■	653	SERP2438	■	■	□	■	■	■
518	SERP2334	■	■	□	■	■	■	654	SERP2439	■	□	□	■	■	■
519	SERP2336	■	■	□	■	■	■	655	SERP2440	×	×	×	×	×	×
520	SERP2337	■	■	□	■	■	■	657	SERP2441	■	■	□	■	■	■
521	SERP2338	■	■	□	■	■	■	659	SERP2443	■	△	□	□	□	■
523	SERP2339	■	■	□	■	■	■	662	SERP2445	■	△	□	△	□	□
525	SERP2340	■	■	□	■	■	■	663	SERP2446	■	■	□	△	□	■
529	SERP2342	×	×	×	×	×	×	664	SERP2447	■	△	□	△	□	□
530	SERP2343	■	■	□	■	■	■	665	SERP2448	×	×	×	×	×	×
531	SERP2344	■	■	□	■	■	■	666	SERP2449	■	△	□	△	□	■
532	SERP2345	■	■	□	■	■	■	667	SERP2450	■	△	□	△	□	□
533	SERP2346	■	■	□	■	■	■	668	SERP2450	×	×	×	×	×	×
534	SERP2347	■	■	□	■	■	■	669	SERP2450	■	□	□	△	□	■
536	SERP2348	■	■	□	■	■	■	670	SERP2451	■	□	□	■	■	■
538	SERP2349	■	■	□	■	■	■	673	SERP2453	■	□	□	■	□	■
540	SERP2351	■	■	□	■	■	■	676	SERP2454	■	△	□	■	□	■
541	SERP2352	■	■	□	■	■	■	678	SERP2455	■	△	□	△	□	□
542	SERP2353	■	■	□	■	■	■	679	SERP2456	■	□	□	△	□	□
543	SERP2354	■	■	□	■	■	■	680	SERP2457	■	△	□	△	□	□
544	SERP2355	■	■	□	■	■	■	681	SERP2458	■	□	□	□	□	□
545	SERP2356	■	■	□	■	■	■	682	SERP2459	■	△	□	△	□	□
546	SERP2357	■	■	□	■	■	■	683	SERP2460	■	□	□	△	□	□
547	SERP2358	■	■	□	■	■	■	684	SERP2461	■	□	□	△	□	□
548	SERP2359	■	■	□	■	■	■	685	SERP2462	■	□	□	△	□	□
549	SERP2360	■	■	□	■	■	■	686	SERP2463	■	□	□	△	□	□
550	SERP2361	■	■	□	■	■	■	689	SERP2464	×	×	×	×	×	×
551	SERP2362	■	■	□	■	■	■	690	SERP2465	■	△	□	■	□	■
553	SERP2363	■	■	□	■	■	■	693	SERP2467	■	◇	□	■	□	■

Fortsetzung nächste Seite

B. Vergleichende Genomanalyse

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
694	SERP2468	■	△	□	■	□	■	815	SERP0006	■	■	■	■	■	■
695	SERP2469	■	□	□	■	□	■	818	SERP0009	■	■	■	■	■	■
697	SERP2470	■	■	□	■	□	■	819	SERP0010	■	■	■	■	■	■
699	SERP2471	x	x	x	x	x	x	820	SERP0011	x	x	x	x	x	x
700	SERP2472	■	△	□	△	□	□	821	SERP0012	■	■	■	■	■	■
702	SERP2474	x	x	x	x	x	x	825	SERP0014	x	x	x	x	x	x
703	SERP2475	■	□	□	□	□	□	826	SERP0015	■	■	■	■	■	■
704	SERP2476	x	x	x	x	x	x	827	SERP0016	■	■	■	■	■	■
705	SERP2477	■	△	□	△	□	□	829	SERP0018	■	■	■	■	■	■
707	SERP2479	■	□	□	△	□	□	831	SERP0020	■	■	■	■	■	■
708	SERP2480	■	△	□	△	□	□	832	SERP0021	■	■	■	■	■	■
709	SERP2481	■	□	□	△	□	□	835	SERP0024	x	x	x	x	x	x
710	SERP2482	■	□	□	□	□	□	836	SERP0025	■	■	■	■	■	■
711	n. a.	■	□	□	△	□	□	839	SERP0026	■	■	■	■	■	■
712	SERP2483	■	△	□	□	□	□	840	SERP0027	■	■	■	■	■	■
713	SERP2484	■	□	□	△	□	□	841	SERP0028	■	■	■	■	■	■
714	SERP2485	■	△	□	□	□	□	846	SERP0032	■	■	■	■	■	■
715	SERP2486	■	△	□	△	□	□	848	SERP0033	■	■	■	■	■	■
716	SERP2487	■	△	□	△	□	□	849	SERP0034	■	■	■	■	■	■
718	SERP2489	■	□	□	△	□	□	850	SERP0035	■	■	■	■	■	■
719	SERP2490	x	x	x	x	x	x	851	SERP0036	■	■	■	■	■	■
720	n. a.	x	x	x	x	x	x	852	SERP0037	■	■	■	■	■	■
722	SERP2491	■	■	□	■	■	■	854	SERP0038	■	■	■	■	■	■
724	SERP2493	■	■	□	■	■	■	855	SERP0039	■	■	■	■	■	■
725	SERP2493	■	■	□	■	■	■	856	SERP0040	■	■	■	■	■	■
726	SERP2493	■	■	□	■	■	■	857	SERP0041	■	■	■	■	■	■
728	SERP2494	x	x	x	x	x	x	858	SERP0042	■	■	■	■	■	■
729	SERP2495	■	□	□	■	□	■	859	SERP0043	■	■	■	■	■	■
730	SERP2496	x	x	x	x	x	x	860	SERP0044	■	■	■	■	■	■
732	SERP2498	x	x	x	x	x	x	861	SERP0045	■	■	■	■	■	■
733	SERP2499	■	△	□	■	□	■	862	SERP0046	■	■	■	■	■	■
736	SERP2501	■	◇	□	■	□	■	868	SERP0049	■	■	■	■	■	■
738	SERP2503	■	◇	□	■	□	■	870	SERP0051	■	■	■	■	■	■
739	SERP2504	■	◇	□	■	□	■	871	SERP0052	■	■	■	■	■	■
740	SERP2505	■	□	□	△	□	■	874	SERP0054	■	■	■	■	■	■
741	SERP2506	■	□	□	△	□	□	876	SERP0057	■	■	■	■	■	■
742	SERP2507	x	x	x	x	x	x	878	SERP0059	■	■	■	■	■	■
743	SERP2508	■	□	□	△	□	□	879	SERP0060	■	■	■	■	■	■
744	SERP2509	■	□	□	△	□	□	881	SERP0061	■	■	■	■	■	■
745	SERP2510	■	□	□	△	□	□	882	SERP0062	■	■	■	■	■	■
746	n. a.	■	△	□	△	□	■	884	SERP0063	■	■	■	■	■	■
748	SERP2512	■	△	▽	△	□	□	885	SERP0064	■	△	▽	■	■	■
749	SERP2513	■	△	□	△	□	□	887	SERP0065	■	■	■	■	■	■
750	SERP2514	■	□	□	△	□	□	888	SERP0066	■	■	■	■	■	■
751	SERP2515	■	◇	▽	△	□	□	891	SERP0067	x	x	x	x	x	x
752	SERP2516	■	□	□	△	□	□	892	SERP0068	■	■	■	■	■	■
753	SERP2516	■	□	□	△	□	□	893	SERP0069	■	■	■	■	■	■
754	SERP2517	■	△	□	△	□	□	895	SERP0070	■	■	■	■	■	■
755	SERP2518	x	x	x	x	x	x	897	SERP0071	■	■	◇	□	■	■
757	SERP2519	■	△	□	△	□	□	898	SERP0072	■	■	◇	□	■	■
758	SERP2520	■	□	□	△	□	□	899	SERP0072	■	■	△	□	■	■
759	SERP2521	■	□	□	□	□	□	900	SERP0072	■	■	■	■	■	■
760	SERP2522	■	□	□	■	□	□	902	SERP0074	■	■	■	◇	□	■
761	SERP2523	■	△	□	■	□	□	907	SERP0078	■	■	■	■	■	■
762	SERP2524	x	x	x	x	x	x	912	SERP0080	■	■	■	■	■	■
763	SERP2525	■	△	□	■	□	□	915	SERP0084	■	■	■	■	■	■
765	SERP2526	■	■	■	■	▽	■	916	SERP0085	x	x	x	x	x	x
766	SERP2527	■	■	■	■	■	■	917	SERP0087	■	■	■	■	■	■
767	SERP2528	■	△	□	■	□	□	919	SERP0089	■	■	■	■	■	■
769	SERP2529	■	■	■	■	■	■	920	SERP0090	■	■	■	■	■	■
772	SERP2530	■	■	■	■	■	■	922	SERP0092	■	■	■	■	■	■
774	SERP2531	x	x	x	x	x	x	924	SERP0093	■	■	■	■	■	■
775	SERP2532	■	■	■	■	■	■	925	SERP0094	■	■	■	■	■	■
776	SERP2533	■	■	■	■	■	■	926	SERP0095	■	■	■	■	■	■
777	SERP2534	■	■	■	■	■	■	928	SERP0097	■	■	■	■	■	■
782	SERP2536	■	■	■	■	■	■	929	SERP0098	■	■	■	■	■	■
783	SERP2537	■	■	■	■	■	■	930	SERP0099	■	■	■	■	■	■
785	SERP2538	■	■	■	■	■	■	934	SERP0100	■	■	■	■	■	■
786	SERP2539	■	■	■	■	■	■	936	SERP0101	■	■	■	■	■	■
787	SERP2540	■	■	■	■	■	■	938	SERP0102	■	■	■	■	■	■
788	SERP2541	■	■	■	■	■	■	939	SERP0103	■	■	■	■	■	■
790	SERP2542	■	■	■	■	■	■	941	SERP0105	■	■	■	■	■	■
791	SERP2543	■	■	■	■	■	■	942	SERP0106	■	■	■	■	■	■
793	SERP2544	■	■	■	■	■	■	943	SERP0107	■	■	■	■	■	■
794	SERP2545	■	■	■	■	■	■	944	SERP0108	■	■	■	■	■	■
795	n. a.	x	x	x	x	x	x	945	SERP0108	■	■	■	■	■	■
797	SERP2547	■	■	■	■	■	■	946	SERP0109	■	■	■	■	■	■
799	SERP2548	■	■	■	■	■	■	947	SERP0110	■	■	◇	■	■	■
800	SERP2549	■	■	■	■	■	■	948	SERP0111	■	■	△	■	■	■
801	SERP2550	■	■	■	■	▽	■	951	SERP0113	■	■	■	■	■	■
802	SERP2551	■	■	■	■	■	■	952	SERP0114	■	■	■	■	■	■
804	SERP2552	■	■	■	■	■	■	953	SERP0115	■	■	■	■	■	■
806	SERP2553	■	■	■	■	■	■	954	SERP0116	■	■	■	■	■	■
810	SERP0001	■	■	■	■	■	■	956	n. a.	■	■	■	■	■	■
811	SERP0002	■	■	■	■	■	■	960	<i>rrsA</i>	■	■	■	■	■	■
812	SERP0003	■	■	■	■	■	■	962	<i>rrsA</i>	■	■	■	■	■	■
813	SERP0004	■	■	■	■	■	■	969	<i>rrlA</i>	x	x	x	x	x	x
814	SERP0005	■	■	■	■	■	■	971	<i>rrlA</i>	■	■	■	■	■	■

Fortsetzung nächste Seite

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
973	SERP0118	■	■	■	■	■	■	1107	SERP0200	■	■	■	■	■	■
974	SERP0119	■	■	■	■	■	■	1108	SERP0201	■	■	■	■	■	■
975	SERP0120	■	■	■	■	■	■	1109	SERP0202	■	■	■	■	■	■
976	SERP0121	■	■	■	■	■	■	1110	SERP0203	■	■	■	■	■	■
977	SERP0122	■	■	■	■	■	■	1111	SERP0204	■	■	■	■	■	■
978	SERP0123	■	■	■	■	■	■	1112	SERP0205	■	■	■	■	■	■
979	SERP0124	■	■	■	■	■	■	1113	SERP0206	■	■	■	■	■	■
980	SERP0125	■	■	■	■	■	■	1115	SERP0207	×	×	×	×	×	×
981	SERP0126	■	■	■	■	■	■	1117	SERP0208	■	■	■	■	■	■
982	SERP0127	■	◇	■	■	■	■	1118	SERP0209	■	■	■	■	■	■
983	SERP0128	■	■	■	■	■	■	1119	SERP0210	■	◇	□	■	▽	□
984	SERP0129	■	■	■	■	■	■	1120	SERP0211	×	×	×	×	×	×
985	SERP0130	■	■	■	■	■	■	1121	SERP0212	■	■	■	■	■	■
986	SERP0131	■	■	■	■	■	■	1122	SERP0213	■	■	■	■	■	■
987	SERP0132	■	■	■	■	■	■	1123	SERP0214	■	■	■	■	■	■
989	SERP0133	■	■	■	■	■	■	1124	SERP0215	■	■	■	■	■	■
990	SERP0134	×	×	×	×	×	×	1126	SERP0216	■	■	■	■	■	■
991	SERP0135	■	■	■	■	■	■	1127	SERP0217	■	■	■	■	■	■
992	SERP0136	×	×	×	×	×	×	1128	SERP0218	■	■	■	■	■	■
995	SERP0137	■	■	■	■	■	■	1129	SERP0219	■	■	■	■	■	■
996	SERP0138	■	■	■	■	■	■	1130	SERP0220	■	■	■	■	■	■
998	SERP0139	■	■	■	■	■	■	1131	SERP0221	■	■	■	■	■	■
999	SERP0140	■	■	■	■	■	■	1132	SERP0222	×	×	×	×	×	×
1000	SERP0141	■	■	■	■	■	■	1133	SERP0223	■	□	□	◇	□	■
1001	SERP0142	■	■	■	■	■	■	1135	SERP0224	■	■	▽	■	■	■
1002	SERP0143	×	×	×	×	×	×	1137	SERP0225	×	×	×	×	×	×
1003	SERP0144	×	×	×	×	×	×	1138	SERP0226	■	■	■	■	■	■
1004	SERP0145	■	■	■	■	■	■	1139	SERP0227	■	■	■	■	■	■
1005	SERP0146	×	×	×	×	×	×	1140	SERP0228	■	■	■	■	■	■
1007	SERP0148	■	■	■	■	■	■	1141	SERP0229	■	■	■	■	■	■
1008	SERP0149	■	■	■	■	■	■	1142	SERP0230	■	■	■	■	■	■
1010	SERP0150	■	■	■	■	■	■	1143	n. a.	×	×	×	×	×	×
1012	SERP0151	■	■	■	■	■	■	1144	SERP0232	■	■	■	■	■	■
1014	SERP0152	■	■	■	■	■	■	1145	SERP0233	■	■	■	■	■	■
1015	SERP0153	■	■	■	■	■	■	1146	SERP0234	■	■	■	■	■	■
1016	SERP0154	■	■	■	■	■	■	1148	SERP0235	■	■	■	■	■	■
1017	SERP0155	■	■	■	■	■	■	1149	SERP0236	■	■	■	■	■	■
1019	SERP0156	■	■	■	■	■	■	1150	SERP0237	■	■	■	■	■	■
1024	<i>rrsB</i>	■	■	■	■	■	■	1152	SERP0238	■	■	■	■	■	■
1026	<i>rrsB</i>	×	×	×	×	×	×	1153	SERP0239	■	■	■	■	■	■
1033	<i>rrlB</i>	×	×	×	×	×	×	1154	SERP0240	■	■	■	■	■	■
1035	<i>rrlB</i>	■	■	■	■	■	■	1155	SERP0241	■	■	■	■	■	■
1039	<i>rrsC</i>	■	■	■	■	■	■	1157	SERP0242	■	■	■	■	■	■
1041	<i>rrsC</i>	×	×	×	×	×	×	1158	SERP0243	■	■	■	■	■	■
1048	<i>rrlC</i>	×	×	×	×	×	×	1160	SERP0244	■	■	■	■	■	■
1050	<i>rrlC</i>	■	■	■	■	■	■	1164	SERP0245	■	□	□	■	□	■
1052	SERP0157	■	■	■	■	■	■	1165	SERP0246	■	△	□	■	□	■
1053	SERP0158	■	■	■	■	■	■	1167	SERP0247	■	□	□	■	□	■
1054	SERP0159	■	■	■	■	■	■	1168	SERP0249	■	■	■	■	■	■
1055	SERP0160	×	×	×	×	×	×	1170	SERP0250	×	×	×	×	×	×
1056	SERP0161	■	■	■	■	■	■	1172	SERP0251	■	■	■	■	■	■
1058	SERP0162	■	■	■	■	■	■	1173	SERP0252	■	■	■	■	■	■
1059	SERP0163	■	■	■	■	■	■	1174	SERP0253	×	×	×	×	×	×
1060	SERP0164	■	■	■	■	■	■	1175	SERP0254	■	■	■	■	■	■
1061	SERP0165	■	■	■	■	■	■	1176	SERP0255	■	■	■	■	■	■
1063	SERP0166	■	■	■	■	■	■	1177	SERP0256	■	■	■	■	■	■
1064	SERP0167	■	■	■	■	■	■	1179	SERP0257	■	■	■	■	■	■
1066	SERP0168	■	■	■	■	■	■	1180	SERP0258	■	◇	■	■	▽	■
1068	SERP0169	■	■	■	■	■	■	1182	SERP0260	■	■	■	■	■	■
1069	SERP0170	■	■	■	■	■	■	1183	SERP0261	■	■	■	■	■	■
1070	SERP0171	■	■	■	■	■	■	1184	SERP0262	■	■	■	■	■	■
1071	SERP0172	■	■	■	■	■	■	1185	SERP0263	■	◇	■	■	■	■
1072	SERP0173	■	■	■	■	■	■	1186	SERP0264	■	■	■	■	■	■
1073	SERP0174	■	■	■	■	■	■	1189	SERP0266	■	■	■	■	■	■
1074	SERP0175	×	×	×	×	×	×	1190	SERP0267	■	■	■	■	■	■
1075	SERP0176	■	■	■	■	■	■	1191	SERP0268	■	■	■	■	■	■
1076	SERP0177	■	■	■	■	■	■	1192	SERP0269	■	■	■	■	■	■
1077	SERP0178	■	■	■	■	■	■	1194	SERP0270	■	■	■	■	■	■
1078	SERP0179	■	■	■	■	■	■	1196	SERP0272	■	■	■	■	■	■
1080	SERP0180	■	■	■	■	■	■	1197	SERP0273	■	■	■	■	■	■
1081	SERP0181	■	■	■	■	■	■	1198	SERP0274	■	■	■	■	■	■
1082	SERP0182	■	■	■	■	■	■	1201	SERP0276	■	■	■	■	■	■
1084	SERP0183	■	■	■	■	■	■	1203	SERP0279	■	■	■	■	■	■
1085	SERP0184	■	■	■	■	■	■	1204	SERP0280	■	■	■	■	■	■
1087	SERP0185	■	■	■	■	■	■	1206	SERP0281	■	■	■	■	■	■
1088	SERP0186	■	■	■	■	■	■	1207	SERP0282	■	■	■	■	■	■
1089	SERP0187	■	■	■	■	■	■	1208	SERP0283	■	■	■	■	■	■
1091	SERP0188	■	■	■	■	■	■	1209	SERP0284	■	■	■	■	■	■
1092	SERP0189	■	■	■	■	■	■	1210	SERP0285	■	■	■	■	■	■
1094	SERP0190	■	■	■	■	■	■	1211	SERP0286	■	■	■	■	■	■
1095	SERP0191	■	■	■	■	■	■	1212	SERP0287	■	■	■	■	■	■
1096	SERP0192	■	■	■	■	■	■	1215	SERP0289	■	■	■	■	■	■
1099	SERP0194	×	×	×	×	×	×	1217	n. a.	×	×	×	×	×	×
1102	SERP0195	■	■	■	■	■	■	1218	SERP0290	■	■	■	■	■	■
1103	SERP0196	■	■	■	■	■	■	1219	SERP0291	■	■	■	■	■	■
1104	SERP0197	×	×	×	×	×	×	1220	SERP0292	■	■	■	■	■	■
1105	SERP0198	■	■	■	■	■	■	1221	SERP0293	■	■	■	■	■	■
1106	SERP0199	■	■	■	■	■	■	1222	SERP0294	■	■	■	■	■	■

Fortsetzung nächste Seite

B. Vergleichende Genomanalyse

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
1223	SERP0295	■	■	■	■	■	■	1345	SERP0392	■	■	■	■	■	■
1224	SERP0296	■	■	■	■	■	■	1346	SERP0394	■	■	■	■	■	■
1225	SERP0297	■	■	■	■	■	■	1347	SERP0395	■	■	■	■	■	■
1226	SERP0298	■	■	■	■	■	■	1348	SERP0397	■	■	■	■	■	■
1227	SERP0299	■	■	■	■	■	■	1349	SERP0398	×	×	×	×	×	×
1228	SERP0300	■	■	■	■	■	■	1351	SERP0400	■	■	■	■	■	■
1233	SERP0303	■	■	■	■	■	■	1352	SERP0401	■	■	■	■	■	■
1235	SERP0304	■	■	■	■	■	■	1353	SERP0402	■	■	■	■	■	■
1237	SERP0305	■	■	■	■	■	■	1354	SERP0403	■	■	■	■	■	■
1238	SERP0306	■	■	■	■	■	■	1355	SERP0404	■	■	■	■	■	■
1240	SERP0307	■	■	■	■	■	■	1356	SERP0405	■	■	■	■	■	■
1242	SERP0308	×	×	×	×	×	×	1357	SERP0406	■	■	■	■	■	■
1244	SERP0309	■	■	■	■	■	■	1358	SERP0407	■	■	■	■	■	■
1246	SERP0310	■	■	■	■	■	■	1359	SERP0408	■	■	■	■	■	■
1247	SERP0311	■	■	■	■	■	■	1360	SERP0409	■	■	■	■	■	■
1248	SERP0312	■	■	■	■	■	■	1361	SERP0410	■	■	■	■	■	■
1249	SERP0313	■	■	■	■	■	■	1362	SERP0411	■	■	■	■	■	■
1251	SERP0314	■	■	■	■	■	■	1363	SERP0412	■	■	■	■	■	■
1252	SERP0315	■	■	■	■	■	■	1365	SERP0413	■	■	■	■	■	■
1254	SERP0316	■	■	■	■	■	■	1366	SERP0414	■	■	■	■	■	■
1255	SERP0317	■	■	■	■	■	■	1367	SERP0415	■	■	■	■	■	■
1256	SERP0318	■	■	■	■	■	■	1368	SERP0416	■	◇	▽	◇	■	■
1258	SERP0319	×	×	×	×	×	×	1369	SERP0417	■	■	■	■	■	■
1259	SERP0320	■	■	■	■	■	■	1370	SERP0418	■	■	■	■	■	■
1260	SERP0321	■	■	■	■	■	■	1371	SERP0419	■	■	■	■	■	■
1262	SERP0322	■	■	■	■	■	■	1374	SERP0420	■	■	■	■	■	■
1263	SERP0323	■	■	■	■	■	■	1375	SERP0421	■	■	■	■	■	■
1265	SERP0324	■	■	■	■	■	■	1376	SERP0422	■	■	■	■	■	■
1266	SERP0325	■	■	■	■	■	■	1378	SERP0423	■	■	■	■	■	■
1267	SERP0326	×	×	×	×	×	×	1379	SERP0424	■	■	■	■	■	■
1268	SERP0327	■	■	■	■	■	■	1382	SERP0426	■	■	■	■	■	■
1269	SERP0328	■	■	■	■	■	■	1383	SERP0427	■	■	■	■	■	■
1270	SERP0329	■	■	■	■	■	■	1384	SERP0428	×	■	■	■	■	■
1271	SERP0330	■	■	■	■	■	■	1385	SERP0429	×	×	×	×	×	×
1272	SERP0331	×	×	×	×	×	×	1386	SERP0430	■	■	■	■	■	■
1274	SERP0333	■	■	■	■	■	■	1387	SERP0431	■	■	■	■	■	■
1275	SERP0334	■	■	■	■	■	■	1388	SERP0432	■	■	■	■	■	■
1276	SERP0335	×	×	×	×	×	×	1389	SERP0433	■	■	■	■	■	■
1277	SERP0336	■	■	■	■	■	■	1390	SERP0434	■	■	■	■	■	■
1278	SERP0337	■	■	■	■	■	■	1391	SERP0435	■	■	■	■	■	■
1279	SERP0338	■	■	■	■	■	■	1392	SERP0436	■	■	■	■	■	■
1281	SERP0339	■	■	■	■	■	■	1394	SERP0438	■	■	■	■	■	■
1282	SERP0340	■	■	■	■	■	■	1398	SERP0441	■	■	■	■	■	■
1283	SERP0341	■	■	■	■	■	■	1399	SERP0442	■	■	■	■	■	■
1285	SERP0342	■	■	■	■	■	■	1400	SERP0443	■	■	■	■	■	■
1287	SERP0344	■	■	■	■	■	■	1401	SERP0444	■	■	■	■	■	■
1288	SERP0345	■	■	■	■	■	■	1402	SERP0445	■	■	■	■	■	■
1290	SERP0347	×	×	×	×	×	×	1404	SERP0446	■	■	■	■	■	■
1291	SERP0348	■	■	■	■	■	■	1405	SERP0447	■	■	■	■	■	■
1293	SERP0349	■	■	■	■	■	■	1406	SERP0448	■	■	■	■	■	■
1294	SERP0350	■	■	■	■	■	■	1407	SERP0449	■	■	■	■	■	■
1295	SERP0351	■	■	■	■	■	■	1408	SERP0450	×	×	×	×	×	×
1298	SERP0353	■	■	■	■	■	■	1409	SERP0451	×	×	×	×	×	×
1300	SERP0354	×	×	×	×	×	×	1412	SERP0453	■	△	□	■	■	■
1301	SERP0355	×	×	×	×	×	×	1413	SERP0453	■	■	■	■	■	■
1302	SERP0357	■	■	■	■	■	■	1415	SERP0455	■	■	■	■	■	■
1303	SERP0358	■	■	■	■	■	■	1423	SERP0458	■	■	■	■	■	■
1304	SERP0359	■	■	■	■	■	■	1424	SERP0460	■	■	■	■	■	■
1305	SERP0360	■	■	■	■	■	■	1431	SERP0463	■	■	■	■	■	■
1307	SERP0361	■	■	■	■	■	■	1433	SERP0465	■	■	■	■	■	■
1308	SERP0362	■	■	■	■	■	■	1435	SERP0466	■	■	■	■	■	■
1309	SERP0363	■	■	■	■	■	■	1438	SERP0467	■	■	■	■	■	■
1310	SERP0364	■	■	■	■	■	■	1439	SERP0468	■	■	■	■	■	■
1311	SERP0365	■	■	■	■	■	■	1440	SERP0469	■	■	■	■	■	■
1312	SERP0366	■	■	■	■	■	■	1442	SERP0471	■	■	■	■	■	■
1313	SERP0367	■	■	■	■	■	■	1443	SERP0472	×	×	×	×	×	×
1314	SERP0369	×	×	×	×	×	×	1444	n. a.	×	×	×	×	×	×
1316	SERP0370	■	■	■	■	■	■	1446	SERP0474	■	■	■	■	■	■
1317	SERP0371	■	■	■	■	■	■	1447	SERP0475	■	■	■	■	■	■
1318	SERP0372	■	■	■	■	■	■	1448	SERP0476	■	■	■	■	■	■
1319	SERP0373	■	■	■	■	■	■	1449	SERP0477	■	■	■	■	■	■
1321	SERP0374	■	■	■	■	■	■	1452	SERP0478	×	×	×	×	×	×
1322	SERP0375	■	■	■	■	■	■	1453	SERP0479	×	×	×	×	×	×
1323	SERP0375	■	■	■	■	■	■	1454	SERP0480	■	■	■	■	■	■
1325	SERP0377	×	×	×	×	×	×	1456	SERP0481	■	■	■	■	■	■
1326	SERP0378	■	■	■	■	■	■	1457	SERP0482	×	×	×	×	×	×
1329	SERP0379	■	■	■	■	■	■	1459	SERP0483	■	■	■	■	■	■
1331	SERP0380	■	■	■	■	■	■	1460	SERP0484	■	■	■	■	■	■
1333	SERP0382	■	■	■	■	■	■	1462	SERP0485	■	■	■	■	■	■
1335	SERP0383	■	■	■	■	■	■	1463	SERP0487	×	×	×	×	×	×
1336	SERP0384	■	■	■	■	■	■	1464	SERP0488	×	×	×	×	×	×
1337	SERP0385	■	■	■	■	■	■	1466	SERP0489	■	■	■	■	■	■
1338	SERP0386	■	■	■	■	■	■	1467	SERP0490	■	■	■	■	■	■
1339	SERP0387	■	■	■	■	■	■	1468	SERP0491	■	■	■	■	■	■
1340	SERP0388	■	■	■	■	■	■	1471	SERP0495	■	■	■	■	■	■
1341	SERP0389	■	■	■	■	■	■	1472	SERP0496	■	■	■	■	■	■
1342	SERP0390	■	■	■	■	■	■	1474	SERP0497	■	■	■	■	■	■
1343	SERP0391	×	×	×	×	×	×	1475	SERP0498	■	■	■	■	■	■

Fortsetzung nächste Seite

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
1938	SERP0879	■	■	■	■	■	■	2054	SERP0975	■	■	■	■	■	■
1939	SERP0880	×	×	×	×	×	×	2055	SERP0976	■	■	■	■	■	■
1942	SERP0882	■	■	■	■	■	■	2056	SERP0977	■	■	■	■	■	■
1943	n. a.	×	×	×	×	×	×	2057	SERP0978	■	■	■	■	■	■
1944	SERP0883	■	■	■	■	■	■	2058	SERP0979	■	■	■	■	■	■
1945	SERP0884	■	■	■	■	■	■	2059	SERP0980	■	■	▽	■	■	■
1946	SERP0885	■	■	■	■	■	■	2060	SERP0981	■	■	■	■	■	■
1947	SERP0886	■	■	■	■	■	■	2064	SERP0984	×	×	×	×	×	×
1948	SERP0887	■	■	■	■	■	■	2066	SERP0985	■	■	■	■	■	■
1949	SERP0888	■	■	■	■	■	■	2067	SERP0986	■	■	■	■	■	■
1950	SERP0889	■	■	■	■	■	■	2070	SERP0988	■	■	■	■	■	■
1952	SERP0891	×	×	×	×	×	×	2071	SERP0989	■	■	■	■	■	■
1953	SERP0892	×	×	×	×	×	×	2074	SERP0991	■	■	■	■	■	■
1954	SERP0893	■	■	■	■	■	■	2075	SERP0992	■	■	■	■	■	■
1956	SERP0895	■	■	■	■	■	■	2076	SERP0993	■	■	■	■	■	■
1957	SERP0896	■	■	■	■	■	■	2077	SERP0994	■	■	■	■	■	■
1958	SERP0897	■	■	■	■	■	■	2079	SERP0996	■	■	■	■	■	■
1959	SERP0898	■	■	■	■	■	■	2081	SERP0997	■	■	■	■	■	■
1960	SERP0899	■	■	■	■	■	■	2082	SERP0998	■	■	■	■	■	■
1961	SERP0900	■	■	■	■	▽	■	2083	SERP0999	■	■	■	■	■	■
1963	SERP0901	■	■	■	■	■	■	2084	SERP1000	■	■	■	■	■	■
1965	SERP0902	■	■	■	■	■	■	2085	SERP1001	■	■	■	■	■	■
1966	SERP0903	■	■	■	■	■	■	2086	SERP1002	■	■	■	■	■	■
1967	SERP0904	×	×	×	×	×	×	2087	SERP1003	■	■	■	■	■	■
1969	SERP0905	■	■	■	■	■	■	2088	SERP1004	×	×	×	×	×	×
1970	SERP0906	■	■	■	■	■	■	2089	SERP1005	■	■	■	■	■	■
1971	SERP0907	■	■	■	■	■	■	2090	SERP1006	■	■	■	■	■	■
1973	SERP0909	■	■	■	■	■	■	2091	SERP1007	■	■	■	■	■	■
1975	SERP0911	■	■	■	■	■	■	2092	SERP1008	■	■	■	■	■	■
1976	SERP0912	■	■	■	■	■	■	2094	SERP1009	×	×	×	×	×	×
1978	SERP0914	×	×	×	×	×	×	2096	SERP1010	×	×	×	×	×	×
1979	n. a.	■	■	■	■	▽	■	2098	SERP1011	×	×	×	×	×	×
1980	SERP0915	■	■	■	■	▽	□	2099	SERP1011	■	■	■	■	■	■
1981	SERP0916	■	■	■	■	■	■	2102	SERP1012	■	■	■	■	■	■
1982	SERP0917	■	■	■	■	■	■	2103	SERP1013	■	■	■	■	■	■
1983	SERP0918	■	■	■	■	■	■	2104	SERP1014	■	■	■	■	■	■
1984	SERP0919	■	■	■	■	■	■	2105	SERP1015	■	■	■	■	■	■
1985	SERP0920	■	■	■	■	■	■	2107	SERP1016	■	■	■	■	■	■
1989	SERP0921	■	■	■	■	■	■	2108	SERP1017	■	■	■	■	■	■
1990	SERP0922	■	■	■	■	■	■	2109	SERP1018	×	×	×	×	×	×
1991	SERP0923	■	■	■	■	■	■	2110	SERP1019	■	■	■	■	■	■
1993	SERP0924	■	■	■	■	■	■	2111	SERP1020	■	■	■	■	■	■
1994	SERP0925	■	■	■	■	■	■	2112	SERP1021	■	■	■	■	■	■
1995	SERP0926	■	■	■	■	■	■	2113	SERP1022	■	■	■	■	■	■
1996	SERP0927	■	■	■	■	■	■	2114	SERP1023	■	■	■	■	■	■
1997	SERP0928	■	■	■	■	■	■	2115	SERP1024	×	×	×	×	×	×
1998	SERP0929	■	■	■	■	■	■	2116	SERP1025	■	■	■	■	■	■
1999	SERP0930	■	■	■	■	■	■	2117	SERP1026	■	■	■	■	■	■
2000	SERP0931	■	■	■	■	■	■	2118	SERP1027	■	■	■	■	■	■
2001	SERP0932	■	■	■	■	■	■	2119	SERP1028	■	■	■	■	■	■
2002	SERP0933	×	×	×	×	×	×	2120	SERP1029	■	■	■	■	■	■
2006	SERP0935	■	■	■	■	■	■	2121	SERP1030	■	■	■	■	■	■
2007	SERP0936	■	■	■	■	■	■	2122	SERP1031	■	■	■	■	■	■
2010	SERP0937	■	■	■	■	■	■	2123	SERP1032	×	×	×	×	×	×
2011	SERP0938	■	■	■	■	■	■	2124	SERP1033	■	■	■	■	■	■
2012	SERP0939	■	■	■	■	■	■	2125	SERP1034	■	■	■	■	■	■
2013	SERP0940	×	×	×	×	×	×	2126	SERP1035	■	■	■	■	■	■
2014	SERP0941	■	■	■	■	■	■	2127	SERP1036	■	■	■	■	■	■
2015	SERP0942	■	■	■	■	■	■	2128	SERP1037	■	■	■	■	■	■
2016	SERP0943	■	■	■	■	■	■	2129	SERP1038	■	■	■	■	■	■
2017	SERP0944	■	■	■	■	■	■	2130	SERP1039	■	■	■	■	■	■
2018	SERP0946	■	■	■	■	■	■	2131	SERP1040	■	■	■	■	■	■
2019	SERP0947	■	■	■	■	■	■	2134	SERP1041	■	■	■	■	■	■
2021	SERP0948	■	■	■	■	■	■	2136	SERP1042	×	×	×	×	×	×
2022	SERP0949	■	■	■	■	■	■	2137	SERP1043	■	■	■	■	■	■
2023	SERP0950	×	×	×	×	×	×	2138	SERP1044	■	■	■	■	■	■
2024	SERP0951	×	×	×	×	×	×	2140	SERP1045	■	■	■	■	■	■
2025	SERP0952	×	×	×	×	×	×	2141	SERP1046	■	■	■	■	■	■
2026	SERP0953	×	×	×	×	×	×	2142	SERP1047	■	■	■	■	■	■
2028	SERP0954	■	■	■	■	■	■	2143	SERP1048	■	■	■	■	■	■
2029	SERP0955	■	■	■	■	■	■	2144	SERP1049	×	×	×	×	×	×
2030	SERP0956	■	■	■	■	■	■	2145	SERP1050	■	■	■	■	■	■
2031	SERP0957	■	■	■	■	■	■	2146	SERP1051	■	■	■	■	■	■
2032	SERP0958	■	■	■	■	■	■	2147	SERP1053	■	■	■	■	■	■
2033	SERP0959	■	■	■	■	■	■	2149	SERP1054	■	■	■	■	■	■
2034	SERP0960	■	■	■	■	■	■	2150	SERP1055	■	■	■	■	■	■
2037	SERP0961	■	■	■	■	■	■	2152	SERP1056	■	■	■	■	■	■
2038	SERP0962	■	■	■	■	■	■	2153	SERP1057	■	■	■	■	■	■
2040	SERP0963	■	■	■	■	■	■	2154	SERP1058	■	■	■	■	■	■
2041	SERP0964	■	■	■	■	■	■	2156	SERP1059	■	■	■	■	■	■
2042	SERP0965	■	■	■	■	■	■	2157	SERP1060	■	■	■	■	■	■
2043	SERP0966	■	■	■	■	■	■	2158	SERP1061	■	■	■	■	■	■
2044	SERP0967	■	■	■	■	■	■	2160	SERP1062	■	■	■	■	■	■
2045	SERP0968	■	■	■	■	■	■	2161	SERP1063	■	■	■	■	■	■
2046	SERP0969	■	■	■	■	■	■	2162	SERP1064	■	■	■	■	■	■
2047	SERP0970	■	■	■	■	■	■	2163	SERP1065	■	■	■	■	■	■
2052	SERP0973	■	◇	■	■	■	■	2164	SERP1066	■	■	■	■	■	■
2053	SERP0974	■	■	■	■	■	■	2166	SERP1067	■	■	■	■	■	■

Fortsetzung nächste Seite

B. Vergleichende Genomanalyse

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
2168	SERP1069	×	×	×	×	×	×	2269	SERP1163	■	■	■	■	■	■
2171	SERP1070	■	■	■	■	■	■	2270	SERP1164	■	■	■	■	■	■
2172	SERP1071	■	■	■	■	■	■	2271	SERP1165	■	■	■	■	■	■
2173	SERP1072	■	■	■	■	■	■	2272	SERP1166	■	■	■	■	■	■
2174	SERP1074	×	×	×	×	×	×	2273	SERP1167	■	■	■	■	■	■
2175	SERP1075	×	×	×	×	×	×	2274	SERP1168	■	■	■	■	■	■
2176	SERP1076	■	■	■	■	■	■	2275	SERP1169	×	×	×	×	×	×
2177	SERP1077	■	■	■	■	■	■	2276	SERP1170	■	■	■	■	■	■
2178	SERP1078	■	■	■	■	■	■	2277	SERP1171	■	■	■	■	■	■
2179	SERP1079	■	■	■	■	■	■	2278	SERP1172	■	■	■	■	■	■
2180	SERP1080	■	■	■	■	■	■	2281	SERP1173	×	×	×	×	×	×
2181	SERP1081	■	■	■	■	■	■	2283	SERP1174	■	■	■	■	■	■
2182	SERP1082	■	■	■	■	■	■	2284	SERP1175	■	■	■	■	■	■
2183	SERP1083	×	×	×	×	×	×	2285	SERP1176	■	■	■	■	■	■
2184	SERP1084	■	■	■	■	■	■	2286	SERP1177	■	■	■	■	■	■
2185	SERP1085	■	■	■	■	■	■	2287	SERP1178	■	■	■	■	■	■
2186	SERP1086	×	×	×	×	×	×	2288	SERP1179	■	■	■	■	■	■
2187	SERP1087	■	■	■	■	■	■	2289	SERP1180	×	×	×	×	×	×
2188	SERP1088	■	■	■	■	■	■	2290	SERP1181	■	■	■	■	■	■
2190	SERP1089	■	■	■	■	■	■	2291	SERP1182	■	■	■	■	■	■
2191	SERP1090	■	■	■	■	■	■	2292	SERP1183	■	■	■	■	■	■
2192	SERP1091	×	×	×	×	×	×	2293	SERP1184	■	■	■	■	■	■
2193	SERP1092	■	■	■	■	■	■	2294	SERP1185	■	■	■	■	■	■
2194	SERP1093	■	■	■	■	■	■	2295	SERP1186	■	■	■	■	■	■
2195	SERP1094	■	■	■	■	■	■	2297	SERP1187	■	■	■	■	■	■
2196	SERP1095	■	■	■	■	■	■	2299	SERP1189	■	■	■	■	■	■
2198	SERP1097	■	■	■	■	■	■	2300	SERP1190	■	■	■	■	■	■
2199	SERP1098	■	■	■	■	■	■	2301	SERP1191	■	■	■	■	■	■
2200	SERP1099	■	■	▽	◇	■	■	2304	SERP1192	■	■	■	■	■	■
2202	SERP1100	■	■	■	■	■	■	2305	SERP1193	■	■	■	■	■	■
2203	SERP1101	■	■	■	■	■	■	2306	SERP1194	■	■	■	■	■	■
2204	SERP1102	■	■	■	■	■	■	2307	SERP1195	■	■	■	■	■	■
2206	SERP1103	■	■	■	■	■	■	2308	SERP1196	■	■	■	■	■	■
2208	SERP1104	■	■	■	■	■	■	2311	SERP1198	■	■	■	■	■	■
2210	SERP1106	■	■	■	■	■	■	2312	SERP1199	■	■	■	■	■	■
2211	SERP1107	■	■	■	■	■	■	2314	SERP1200	×	×	×	×	×	×
2212	SERP1108	■	■	■	■	■	■	2315	SERP1201	■	■	■	■	■	■
2213	SERP1109	■	■	■	■	■	■	2316	SERP1202	■	■	■	■	■	■
2214	SERP1110	■	■	■	■	■	■	2317	SERP1203	■	■	■	■	■	■
2215	SERP1111	■	■	■	■	■	■	2318	SERP1204	×	×	×	×	×	×
2216	SERP1112	■	■	■	■	■	■	2319	SERP1205	■	■	■	■	■	■
2217	SERP1113	×	×	×	×	×	×	2320	SERP1206	■	■	■	■	■	■
2218	SERP1114	■	■	■	■	■	■	2321	SERP1207	■	■	■	■	■	■
2219	SERP1115	■	■	■	■	■	■	2322	SERP1208	■	■	■	■	■	■
2221	SERP1116	×	×	×	×	×	×	2323	SERP1209	■	■	■	■	■	■
2222	SERP1117	×	×	×	×	×	×	2324	SERP1210	■	■	■	■	■	■
2223	SERP1119	■	■	■	■	■	■	2325	SERP1211	■	■	■	■	■	■
2225	SERP1120	■	■	■	■	■	■	2326	SERP1212	■	■	■	■	■	■
2226	SERP1121	■	■	■	■	■	■	2327	SERP1213	■	■	■	■	■	■
2227	SERP1122	■	■	■	■	■	■	2330	SERP1215	■	■	■	■	■	■
2228	SERP1123	■	■	■	■	■	■	2333	SERP1218	■	△	□	△	□	□
2229	SERP1124	■	■	■	■	■	■	2335	SERP1219	×	×	×	×	×	×
2230	SERP1125	■	■	■	■	■	■	2336	SERP1220	■	□	□	△	□	□
2231	SERP1126	■	■	■	■	■	■	2337	SERP1221	■	□	□	□	□	□
2232	SERP1127	■	■	■	■	■	■	2338	SERP1222	×	×	×	×	×	×
2233	SERP1128	■	■	■	■	■	■	2339	SERP1223	×	×	×	×	×	×
2234	SERP1129	■	■	■	■	■	■	2340	SERP1224	■	△	□	△	□	□
2235	SERP1130	■	■	■	■	■	■	2341	SERP1225	■	■	■	■	■	■
2238	SERP1132	■	■	■	■	■	■	2342	SERP1226	■	■	■	■	■	■
2239	SERP1133	■	■	■	■	■	■	2344	SERP1227	■	■	■	■	■	■
2240	SERP1134	■	■	■	■	■	■	2345	SERP1228	■	■	■	■	■	■
2241	SERP1135	■	■	■	■	■	■	2347	SERP1229	■	■	■	■	■	■
2242	SERP1136	■	■	■	■	■	■	2348	SERP1230	■	■	■	■	■	■
2243	SERP1137	■	■	■	■	■	■	2350	SERP1231	■	■	■	■	■	■
2244	SERP1138	■	■	■	■	■	■	2351	SERP1232	■	■	■	■	■	■
2245	SERP1139	■	■	■	■	■	■	2352	SERP1233	■	■	■	■	■	■
2246	SERP1140	×	×	×	×	×	×	2353	SERP1234	■	■	■	■	■	■
2247	SERP1141	■	■	■	■	■	■	2354	SERP1235	■	■	■	■	■	■
2249	SERP1143	×	×	×	×	×	×	2355	SERP1236	■	■	■	■	■	■
2250	SERP1144	■	■	■	■	■	■	2357	SERP1237	■	■	■	■	■	■
2251	SERP1145	■	■	■	■	■	■	2358	SERP1238	■	■	■	■	■	■
2252	SERP1146	×	×	×	×	×	×	2359	SERP1239	■	■	■	■	■	■
2253	SERP1147	■	■	■	■	■	■	2361	SERP1240	■	■	▽	■	■	■
2254	SERP1148	■	■	■	■	■	■	2362	SERP1241	■	■	■	■	■	■
2255	SERP1149	■	■	■	■	■	■	2363	SERP1242	■	■	■	■	■	■
2256	SERP1150	■	■	■	■	■	■	2364	SERP1243	■	■	■	■	■	■
2257	SERP1151	■	■	■	■	■	■	2365	SERP1244	■	■	■	■	■	■
2258	SERP1152	■	■	■	■	■	■	2367	SERP1245	■	■	■	■	■	■
2259	SERP1153	■	■	■	■	■	■	2369	SERP1246	■	■	■	■	■	■
2260	SERP1154	■	■	■	■	■	■	2370	n. a.	×	×	×	×	×	×
2261	SERP1155	■	■	■	■	■	■	2371	SERP1247	■	■	■	■	■	■
2262	SERP1156	■	■	■	■	■	■	2372	SERP1248	■	■	■	■	■	■
2263	SERP1157	■	■	■	■	■	■	2373	SERP1249	■	■	■	■	■	■
2264	SERP1158	■	■	■	■	■	■	2375	SERP1250	■	■	■	■	■	■
2265	SERP1159	■	■	■	■	■	■	2376	SERP1251	×	×	×	×	×	×
2266	SERP1160	■	■	■	■	■	■	2377	SERP1251	×	×	×	×	×	×
2267	SERP1161	■	■	■	■	■	■	2378	SERP1252	■	■	■	■	■	■
2268	SERP1162	■	■	■	■	■	■	2379	SERP1253	■	■	■	■	■	■

Fortsetzung nächste Seite

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
2380	SERP1254	■	■	■	■	■	■	2488	SERP1346	×	×	×	×	×	×
2382	SERP1255	■	■	■	■	■	■	2489	SERP1347	■	□	□	△	□	◇
2383	SERP1256	■	■	■	■	■	■	2490	SERP1348	■	■	■	■	■	■
2384	SERP1257	■	■	■	■	■	■	2491	SERP1349	■	■	■	■	■	■
2385	SERP1258	■	■	■	■	■	■	2493	SERP1350	■	■	■	■	■	■
2386	SERP1259	■	■	■	■	▽	■	2494	SERP1351	■	■	■	■	■	■
2387	n. a.	■	■	■	■	□	■	2496	SERP1352	■	■	■	■	■	■
2389	SERP1260	■	■	■	■	■	■	2499	SERP1353	■	■	■	■	■	■
2390	SERP1261	■	■	■	■	■	■	2501	SERP1354	■	■	■	■	■	■
2391	SERP1262	■	■	■	■	■	■	2502	SERP1355	×	×	×	×	×	×
2392	SERP1263	■	■	■	■	■	■	2503	SERP1356	■	■	■	■	■	■
2393	SERP1264	■	■	■	■	■	■	2504	SERP1357	■	■	■	■	■	■
2394	SERP1265	■	■	■	■	■	■	2505	SERP1358	×	×	×	×	×	×
2396	SERP1266	■	■	■	■	■	■	2509	SERP1360	■	■	■	■	■	■
2397	SERP1267	■	■	■	■	■	■	2514	SERP1363	■	■	■	■	■	■
2398	SERP1268	■	■	■	■	■	■	2515	SERP1364	■	■	■	■	■	■
2399	SERP1269	■	■	■	■	■	■	2519	SERP1365	■	■	■	■	■	■
2400	SERP1270	■	■	■	■	■	■	2521	SERP1366	■	■	■	■	■	■
2401	SERP1271	■	■	■	■	■	■	2523	SERP1367	■	■	■	■	■	■
2402	SERP1272	■	■	■	■	■	■	2524	SERP1368	■	■	■	■	■	■
2403	SERP1273	■	■	■	■	■	■	2525	SERP1369	■	◇	▽	■	■	■
2405	SERP1274	×	×	×	×	×	×	2528	SERP1370	■	■	■	■	■	■
2406	SERP1275	■	■	■	■	■	■	2529	SERP1371	■	■	■	■	■	■
2407	SERP1276	■	■	■	■	■	■	2530	SERP1372	■	■	■	■	■	■
2408	SERP1277	×	×	×	×	×	×	2532	SERP1373	■	■	■	■	■	■
2410	SERP1278	■	■	■	■	■	■	2533	SERP1374	■	■	■	■	■	■
2411	SERP1279	■	■	■	■	■	■	2534	SERP1375	■	■	■	■	■	■
2412	SERP1280	■	■	■	■	■	■	2536	SERP1376	■	■	■	■	■	■
2413	SERP1281	■	■	■	■	■	■	2537	SERP1378	■	■	■	■	■	■
2415	SERP1282	■	■	■	■	■	■	2538	SERP1379	×	×	×	×	×	×
2417	SERP1284	■	■	■	■	■	■	2539	SERP1380	■	■	■	■	■	■
2419	SERP1285	■	■	■	■	■	■	2540	SERP1381	■	■	■	■	■	■
2420	SERP1286	■	■	■	■	■	■	2541	SERP1382	■	■	■	■	■	■
2421	SERP1287	■	■	■	■	■	■	2542	SERP1383	■	■	■	■	■	■
2422	SERP1288	■	■	■	■	■	■	2543	SERP1384	■	■	■	■	■	■
2423	SERP1289	■	■	■	■	■	■	2544	SERP1385	■	■	■	■	■	■
2424	SERP1290	■	■	■	■	■	■	2545	SERP1386	■	■	■	■	■	■
2425	SERP1291	■	■	■	■	■	■	2547	SERP1387	■	■	■	■	■	■
2426	SERP1292	■	■	■	■	■	■	2548	SERP1388	■	■	■	■	■	■
2427	SERP1293	×	×	×	×	×	×	2550	SERP1390	■	■	■	■	■	■
2429	SERP1294	■	■	■	■	■	■	2552	SERP1391	■	■	■	■	■	■
2430	SERP1295	■	■	■	■	■	■	2553	SERP1392	■	■	■	■	■	■
2432	SERP1296	■	■	■	■	■	■	2554	SERP1393	×	×	×	×	×	×
2433	SERP1297	■	■	■	■	■	■	2556	SERP1394	■	■	■	■	■	■
2435	SERP1299	■	■	■	■	■	■	2557	SERP1395	■	■	■	■	■	■
2436	SERP1300	×	×	×	×	×	×	2558	SERP1396	■	■	■	■	▽	■
2437	SERP1301	■	■	■	■	■	■	2559	SERP1397	■	■	■	■	■	■
2438	SERP1302	■	■	■	■	■	■	2565	<i>tRNA-Met-2</i>	×	×	×	×	×	×
2439	SERP1303	■	■	■	■	■	■	2571	<i>rrlD</i>	■	■	■	■	■	■
2440	SERP1304	■	■	■	■	■	■	2573	<i>rrlD</i>	×	×	×	×	×	×
2441	SERP1305	■	■	■	■	■	■	2579	<i>rrsD</i>	■	■	■	■	■	■
2442	SERP1306	■	■	■	■	■	■	2581	<i>rrsD</i>	×	×	×	×	×	×
2444	SERP1307	×	×	×	×	×	×	2583	<i>rrsD</i>	■	■	■	■	■	■
2445	SERP1308	■	■	■	■	■	■	2588	SERP1398	■	■	■	■	■	■
2446	SERP1309	■	■	■	■	■	■	2589	SERP1399	×	×	×	×	×	×
2447	SERP1310	■	■	■	■	■	■	2590	SERP1400	×	×	×	×	×	×
2448	SERP1311	■	■	■	■	■	■	2591	SERP1401	■	■	■	■	■	■
2449	SERP1312	■	■	■	■	■	■	2593	SERP1402	×	×	×	×	×	×
2450	SERP1313	■	■	■	■	■	■	2595	SERP1403	■	■	■	■	■	■
2452	SERP1315	■	■	■	■	■	■	2597	SERP1405	■	■	■	■	■	■
2453	SERP1316	■	■	■	■	■	■	2598	SERP1406	■	■	■	■	■	■
2455	SERP1317	■	■	■	■	■	■	2600	SERP1407	■	■	■	■	■	■
2456	SERP1318	■	■	■	■	■	■	2601	SERP1408	×	×	×	×	×	×
2457	SERP1319	■	■	■	■	■	■	2602	SERP1409	■	■	■	■	■	■
2458	SERP1320	■	■	■	■	■	■	2603	SERP1410	■	■	■	■	■	■
2459	SERP1321	■	■	■	■	■	■	2604	SERP1411	■	■	■	■	■	■
2460	SERP1322	■	■	■	■	■	■	2605	SERP1412	■	■	■	■	■	■
2462	SERP1323	■	■	■	■	■	■	2606	SERP1413	■	■	■	■	■	■
2463	SERP1324	■	■	■	■	■	■	2607	SERP1414	■	■	■	■	■	■
2464	SERP1325	■	■	■	■	■	■	2609	SERP1415	■	■	■	■	■	■
2465	SERP1326	■	■	■	■	■	■	2610	SERP1416	■	■	■	■	■	■
2466	SERP1327	■	■	■	■	■	■	2611	SERP1417	■	■	■	■	■	■
2467	SERP1328	■	■	■	■	■	■	2612	SERP1418	■	■	▽	◇	■	■
2469	SERP1329	■	■	■	■	■	■	2614	SERP1419	■	■	■	■	■	■
2471	SERP1330	■	■	■	■	■	■	2615	SERP1420	■	■	■	■	■	■
2472	SERP1331	■	■	■	■	■	■	2616	SERP1421	■	■	■	■	■	■
2474	SERP1333	■	■	■	■	■	■	2617	SERP1422	■	■	■	■	■	■
2475	SERP1334	■	■	■	■	■	■	2618	SERP1423	■	■	■	■	■	■
2476	SERP1335	■	■	■	■	■	■	2619	SERP1424	■	■	■	■	■	■
2477	SERP1336	■	■	■	■	■	■	2620	SERP1425	■	■	■	■	■	■
2479	SERP1338	■	■	■	■	■	■	2621	SERP1426	■	■	■	■	■	■
2480	SERP1339	■	■	■	■	■	■	2622	SERP1427	×	×	×	×	×	×
2481	SERP1340	■	■	■	■	■	■	2625	SERP1429	■	■	■	■	■	■
2482	SERP1341	■	△	□	△	□	◇	2626	SERP1430	■	■	■	■	■	■
2484	SERP1342	×	×	×	×	×	×	2628	SERP1431	■	■	■	■	■	■
2485	SERP1343	■	■	▽	△	□	◇	2629	SERP1432	■	■	■	■	■	■
2486	SERP1344	■	△	□	△	□	◇	2630	SERP1433	■	■	■	■	■	■
2487	SERP1345	×	×	×	×	×	×	2632	SERP1434	×	×	×	×	×	×

Fortsetzung nächste Seite

B. Vergleichende Genomanalyse

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
2634	SERP1435	■	■	■	■	■	■	2787	SERP1582	■	■	■	■	■	■
2635	SERP1436	■	■	■	■	▼	■	2788	SERP1583	■	■	■	■	■	■
2636	SERP1437	■	■	■	■	■	■	2789	SERP1584	■	■	■	■	▼	■
2637	SERP1438	■	■	■	■	■	■	2790	SERP1585	■	■	■	■	■	□
2638	SERP1439	■	■	■	■	■	■	2791	SERP1586	■	■	■	■	■	□
2639	SERP1440	■	■	■	■	■	■	2792	SERP1587	×	×	×	×	×	×
2640	SERP1441	■	■	■	■	■	■	2793	SERP1588	■	■	■	■	■	■
2641	SERP1442	■	■	■	■	■	■	2795	SERP1589	■	□	□	△	△	□
2642	SERP1443	■	■	■	■	■	■	2796	SERP1590	■	△	△	□	△	□
2643	SERP1444	■	■	■	■	■	■	2797	SERP1591	■	□	□	□	□	□
2644	SERP1445	×	×	×	×	×	×	2798	SERP1592	■	△	△	□	□	□
2645	SERP1446	■	■	■	■	■	■	2799	SERP1593	■	△	△	□	△	□
2646	SERP1447	■	■	■	■	■	■	2800	SERP1594	■	□	□	□	□	□
2647	SERP1448	×	×	×	×	×	×	2801	SERP1595	■	□	□	△	□	□
2649	SERP1449	■	■	■	■	■	■	2806	SERP1599	■	△	△	□	△	□
2650	SERP1450	■	■	■	■	■	■	2807	SERP1600	■	□	□	□	□	□
2653	SERP1451	×	×	×	×	×	×	2809	SERP1601	■	□	□	□	□	□
2654	SERP1452	■	■	■	■	■	■	2838	SERP1619	■	△	△	□	□	□
2655	SERP1453	■	■	■	■	■	■	2840	SERP1621	■	□	□	□	□	□
2656	SERP1454	■	■	■	■	■	■	2842	SERP1623	■	△	△	□	□	□
2657	SERP1455	■	■	■	■	■	■	2847	SERP1624	■	□	□	□	□	□
2658	SERP1456	×	×	×	×	×	×	2848	SERP1625	■	□	□	△	□	□
2659	SERP1457	■	■	■	■	■	■	2853	SERP1630	■	△	△	□	△	□
2660	SERP1458	×	×	×	×	×	×	2857	SERP1634	■	△	△	□	△	□
2661	SERP1459	×	×	×	×	×	×	2858	SERP1635	■	□	□	□	□	□
2662	SERP1460	×	×	×	×	×	×	2859	SERP1636	■	□	□	□	□	□
2663	SERP1461	×	×	×	×	×	×	2862	SERP1639	■	△	△	□	□	□
2664	SERP1462	■	■	■	△	■	■	2863	SERP1640	■	△	△	▼	△	□
2667	SERP1465	■	■	■	△	■	■	2865	SERP1641	■	△	△	□	△	□
2668	SERP1466	■	■	■	◇	■	■	2866	SERP1642	■	◇	□	△	□	□
2669	SERP1468	■	■	■	■	■	■	2869	SERP1645	×	×	×	×	×	×
2670	SERP1468	×	×	×	×	×	×	2872	SERP1648	■	△	△	□	□	□
2671	SERP1469	■	■	■	■	■	■	2873	SERP1649	■	△	△	□	△	□
2672	SERP1470	■	■	■	■	■	■	2874	SERP1650	■	△	△	□	△	□
2673	SERP1471	×	×	×	×	×	×	2878	SERP1653	■	□	□	△	□	□
2675	SERP1472	■	■	■	■	■	■	2879	SERP1654	■	△	△	□	△	□
2676	SERP1473	■	■	■	■	■	■	2880	SERP1655	■	■	■	■	■	■
2677	SERP1474	■	■	■	■	■	■	2882	SERP1657	×	×	×	×	×	×
2678	SERP1475	■	■	■	■	■	■	2884	SERP1658	■	■	■	■	■	■
2679	SERP1476	■	■	■	■	■	■	2887	SERP1660	■	■	■	■	■	■
2680	SERP1477	×	×	×	×	×	×	2888	SERP1661	■	■	■	■	■	■
2681	SERP1478	■	■	■	■	■	■	2889	SERP1662	■	■	■	■	■	■
2682	SERP1479	×	×	×	×	×	×	2890	SERP1663	■	■	■	■	■	■
2684	SERP1481	■	■	■	■	■	■	2891	SERP1664	■	■	■	■	■	■
2688	SERP1484	■	■	■	■	■	■	2892	SERP1665	■	■	■	■	■	■
2689	SERP1485	■	■	■	■	■	■	2893	SERP1666	■	■	■	■	■	■
2690	SERP1486	■	■	■	■	■	■	2894	SERP1667	×	×	×	×	×	×
2691	SERP1487	■	■	■	■	■	■	2895	SERP1668	■	■	■	■	■	■
2692	SERP1488	■	■	■	■	■	■	2896	SERP1669	■	■	■	■	■	■
2694	SERP1490	■	■	■	■	□	■	2897	SERP1670	■	■	■	■	■	■
2695	SERP1491	×	×	×	×	×	×	2898	SERP1671	■	■	■	■	■	■
2696	SERP1492	×	×	×	×	×	×	2899	SERP1672	■	■	■	■	■	■
2697	SERP1493	■	■	■	■	■	■	2900	SERP1673	■	■	■	■	■	■
2698	SERP1494	■	■	■	■	■	■	2903	<i>rrlE</i>	■	■	■	■	■	■
2699	SERP1495	■	■	■	■	■	■	2905	<i>rrlE</i>	×	×	×	×	×	×
2700	SERP1497	■	■	■	■	■	■	2911	<i>rrsE</i>	×	×	×	×	×	×
2701	SERP1498	■	■	■	■	■	■	2913	<i>rrsE</i>	■	■	■	■	■	×
2702	SERP1499	■	■	■	■	■	■	2918	SERP1675	■	■	■	■	■	■
2703	SERP1500	■	■	■	■	■	■	2919	SERP1676	■	■	■	■	■	■
2704	SERP1501	■	□	□	△	□	□	2920	SERP1677	■	■	■	■	■	■
2705	SERP1502	■	□	□	△	□	□	2921	SERP1678	■	■	■	■	■	■
2707	SERP1504	■	□	□	△	□	□	2922	SERP1679	■	■	■	■	■	■
2709	SERP1506	■	◇	□	◇	□	□	2924	SERP1680	■	■	■	■	■	■
2711	SERP1508	■	△	□	△	□	□	2925	SERP1681	■	■	■	■	■	■
2713	SERP1510	■	△	□	△	□	□	2926	SERP1682	■	■	■	■	■	■
2714	SERP1511	■	□	□	□	□	□	2927	SERP1683	■	■	■	■	■	■
2716	SERP1512	■	△	□	□	□	□	2928	SERP1684	■	■	■	■	■	■
2717	SERP1513	×	×	×	×	×	×	2929	SERP1685	■	■	■	■	■	■
2719	SERP1515	■	△	□	△	□	□	2930	SERP1686	■	■	■	■	■	■
2722	SERP1518	×	×	×	×	×	×	2931	SERP1687	■	■	■	■	■	■
2727	SERP1523	■	△	□	△	□	□	2933	SERP1688	■	■	■	■	■	■
2728	SERP1524	×	×	×	×	×	×	2935	SERP1689	■	■	■	■	■	■
2738	SERP1534	■	□	□	□	□	□	2936	SERP1690	■	■	■	■	■	■
2741	SERP1537	■	△	□	□	□	□	2939	SERP1691	■	■	■	■	■	■
2743	SERP1538	■	□	□	□	□	□	2940	SERP1692	×	×	×	×	×	×
2745	SERP1540	■	□	□	△	□	□	2941	SERP1693	■	■	■	■	■	■
2747	SERP1541	■	△	□	□	□	□	2942	SERP1694	■	■	■	■	■	■
2750	SERP1544	■	□	□	△	□	□	2943	SERP1695	■	■	■	■	■	■
2751	SERP1545	■	△	□	△	□	□	2944	SERP1696	■	■	■	■	■	■
2755	SERP1549	■	△	□	△	□	□	2945	SERP1697	■	■	■	■	■	■
2757	SERP1552	■	□	□	□	□	□	2946	SERP1698	■	■	■	■	■	■
2760	SERP1555	■	△	□	□	□	□	2947	SERP1699	■	■	■	■	■	■
2773	SERP1567	×	×	×	×	×	×	2948	SERP1700	■	■	■	■	■	■
2774	SERP1568	×	×	×	×	×	×	2949	SERP1701	×	×	×	×	×	×
2776	SERP1570	■	□	□	□	□	□	2950	SERP1702	■	■	■	■	■	■
2784	SERP1579	■	■	■	■	■	■	2951	SERP1703	■	■	■	■	■	■
2785	SERP1580	■	■	■	■	■	■	2953	SERP1704	■	■	■	■	■	■
2786	SERP1581	■	■	■	■	■	■	2955	SERP1705	■	■	■	■	■	■

Fortsetzung nächste Seite

B. Vergleichende Genomanalyse

ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197	ID	Gen	RP	307	/9	P4	195	197
3184	SERP1888	■	■	■	■	■	■	3243	SERP1934	■	■	■	■	■	■
3186	SERP1889	■	■	■	■	■	■	3245	SERP1935	■	■	■	■	■	■
3188	SERP1891	■	■	■	■	■	■	3246	SERP1937	■	■	■	■	■	■
3192	SERP1893	■	■	■	■	■	■	3247	SERP1938	■	■	■	■	■	■
3193	SERP1894	■	■	■	■	■	■	3248	SERPA0024	■	□	□	△	□	■
3194	SERP1895	■	■	■	■	■	■	3249	SERPA0025	■	□	□	△	□	■
3195	SERP1896	□	□	□	□	□	□	3251	SERPA0027	■	□	□	◇	□	■
3197	SERP1898	■	■	■	■	■	■	3253	SERPA0029	■	△	□	△	□	■
3198	SERP1899	■	■	■	■	■	■	3254	SERPA0030	■	□	□	□	□	■
3199	SERP1900	×	×	×	×	×	×	3257	SERPA0032	×	×	×	×	×	×
3200	SERP1901	■	■	■	■	■	■	3258	SERPA0032	■	■	■	■	▽	■
3201	SERP1902	■	■	■	■	■	■	3261	SERPA0033	■	△	□	■	▽	□
3202	SERP1904	■	■	■	■	■	■	3264	SERPA0001	■	△	□	■	▽	■
3204	SERP1906	■	■	■	■	■	■	3265	SERPA0002	■	■	■	■	■	■
3205	SERP1907	■	■	■	■	■	■	3266	SERPA0003	×	×	×	×	×	×
3207	SERP1908	■	■	■	■	■	■	3267	SERPA0004	×	×	×	×	×	×
3208	SERP1909	■	■	■	■	■	■	3268	SERPA0005	■	◇	■	■	■	■
3210	SERP1910	■	■	■	■	■	■	3269	SERPA0006	■	□	□	■	□	■
3211	SERP1911	■	■	■	■	■	■	3272	SERPA0008	■	■	■	■	■	■
3212	SERP1912	×	×	×	×	×	×	3273	SERPA0009	■	■	□	■	■	■
3214	SERP1913	×	×	×	×	×	×	3274	n. a.	■	△	□	△	□	□
3216	SERP1914	■	■	■	■	■	■	3275	SERPA0010	×	×	×	×	×	×
3219	SERP1916	■	■	■	■	■	■	3276	SERPA0011	×	×	×	×	×	×
3220	SERP1917	■	■	■	■	■	■	3277	SERPA0012	■	□	□	△	□	□
3221	SERP1918	■	■	■	■	■	■	3278	SERPA0014	×	×	×	×	×	×
3222	SERP1919	■	■	■	■	■	■	3279	SERPA0015	■	□	□	△	□	□
3223	SERP1920	■	■	■	■	■	■	3281	SERPA0016	■	□	□	△	■	□
3229	SERP1924	■	■	■	■	■	■	3282	SERPA0017	■	□	□	△	■	□
3231	SERP1925	■	■	■	■	■	■	3283	SERPA0018	■	□	□	△	■	□
3232	SERP1926	■	■	■	■	■	■	3284	SERPA0019	■	□	□	◇	■	■
3235	SERP1927	■	■	■	■	■	■	3285	SERPA0020	■	■	■	■	■	■
3239	SERP1930	■	■	■	■	■	■	3286	SERPA0021	■	■	■	■	■	■
3240	SERP1931	■	■	■	■	■	■	3287	SERPA0022	■	□	□	△	□	■
3242	SERP1933	■	■	■	■	■	■	3293	SERPA0023	■	□	□	△	□	■

C. formatblast.pl

```
use strict;
use Bio::SearchIO;

my $in = new Bio::SearchIO(-format => 'blast',
    -file => 'proteins-deletion.aa');
my $file = 'blastp.out';

open (FILE, ">$file");

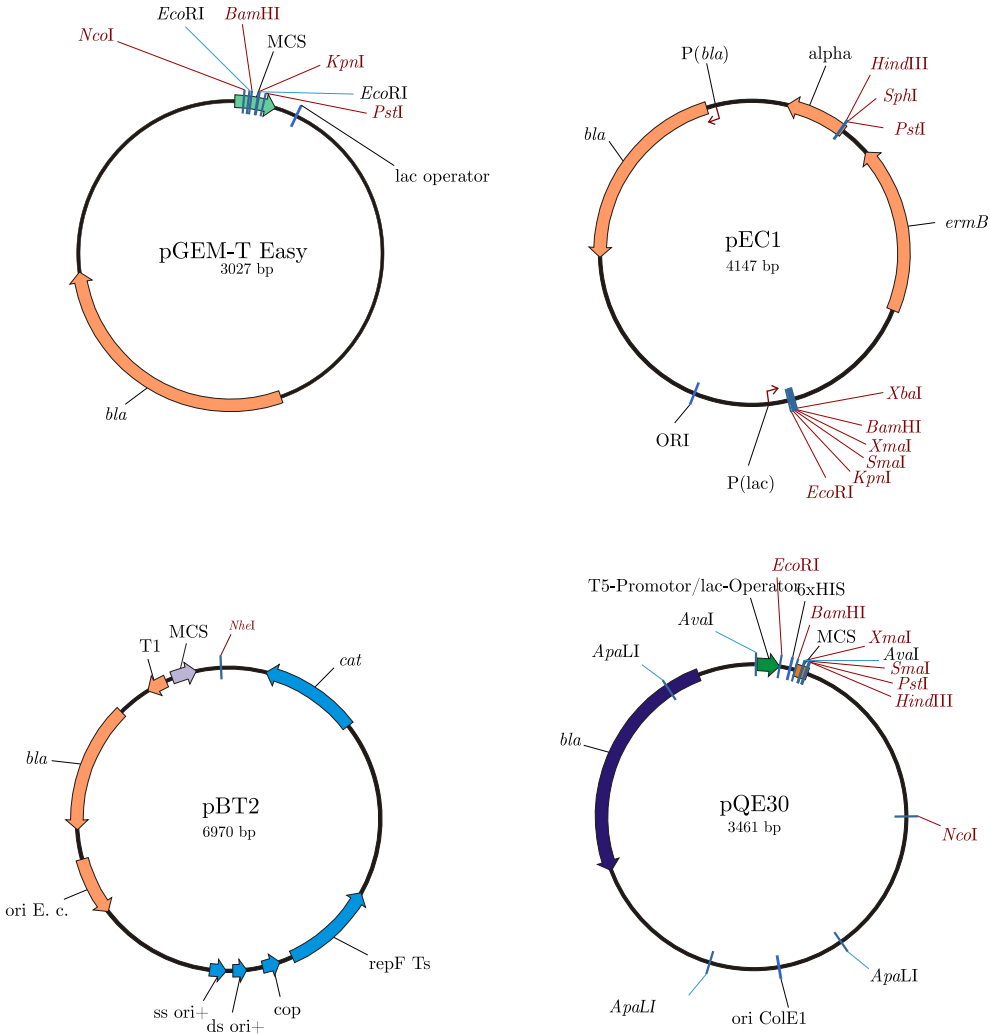
while(my $result = $in->next_result) {
    print FILE $result->query_name;
    print FILE "\t";
    my $hit = $result->next_hit;
    if ($hit != undef) {
        print FILE $hit->name;
        print FILE "\t";
        my $hsp = $hit->next_hsp;
        print FILE $hsp->frac_identical;
        print FILE "\t";
    }
    print FILE "\n";
}

close(FILE);
```

Das Programm `formatblast.pl` verwendet das `SearchIO`-Modul der Perl-Programmiersprache, um bestimmte Daten aus einer BLAST-Ausgabedatei zu extrahieren. Auf diese Weise kann mit diesem Algorithmus eine Liste der ähnlichen Proteine mit dem Grad der Ähnlichkeit erstellt werden:

<i>Query</i>	<i>Subject</i>	<i>Identity</i>
aus Deletion	aus ATCC12228	
tnp		
SERP2245	SE2213	1
SERP2246	SE2214	1
arcD	SE2215	0.925

D. Vektorkarten



E. Abkürzungen

aa	Aminosäuren (<i>amino acids</i>)
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b/bp	Base(n), -paar(e)
Cm	Chloramphenicol
CTP	Cytosintriphosphat
d/dd	(di)desoxy-
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
GTP	Guanosintriphosphat
ITPG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
M	mol/l
mM	mmol/l
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
NaAc	Natriumacetat
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
RBS	Ribosomen-Bindestelle

E. Abkürzungen

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur (25 °C)
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	transfer-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	Einheit (<i>unit</i> , bei Enzymaktivität)
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
vol.	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid

F. Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen

OHLSEN, K. ; ECKART, M. ; HÜTTINGER, C. ; ZIEBUHR, W.: Pathogenic Staphylococci: Lessons from Comparative Genomics. In: HACKER, J. (Hrsg.) ; DOBRINDT, U. (Hrsg.): *Pathogenomics: Genome Analysis of Pathogenic Microbes*. Weinheim : Wiley-VCH, 2006, S. 175–210

ZIEBUHR, W. ; HENNIG, S. ; ECKART, M. ; KRÄNZLER, H. ; BATZILLA, C. ; KOZITSKAYA, S.: Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *Int J Antimicrob Agents* 28 (2006), Aug, S.14–20

ECKART, M. ; ZIEBUHR, W.: Discovery of a small RNA transcript with a putative regulatory function in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun*. Manuskript eingereicht.

ECKART, M. ; LOESSNER, I. ; ZIEBUHR, W.: Multiple copies of the insertion sequence element IS256 cause genome instability in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Manuskript in Vorbereitung.

Tagungsbeiträge

ECKART, M. ; LÖSSNER, I. ; HACKER, J. ; ZIEBUHR, W.: IS256-mediated chromosomal deletions in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* affecting adherence and biofilm formation. Poster auf der DGHM-Jahrestagung, Dresden (2003)

ECKART, M. ; ZIEBUHR, W.: Genome Comparison of Pathogenic and Saprophytic *Staphylococcus epidermidis* Strains by Microarray Analysis. Poster auf der DGHM-Fachgruppentagung, Bad Urach (2004)

ECKART, M. ; ZIEBUHR, W.: Discovery of a small RNA transcript upstream of the *ica* operon in *Staphylococcus epidermidis* with a putative regulatory function. Poster auf der Gordon Research Conference on staphylococcal diseases, Newport, RI, USA (2005)

ECKART, M. ; ZIEBUHR, W.: Discovery of a small RNA transcript upstream of the *ica* operon in *Staphylococcus epidermidis* with a putative regulatory function. Vortrag auf der VAAM-Jahrestagung, Jena (2006)

F. Publikationen und Tagungsbeiträge

ECKART, M. ; LÖSSNER, I. ; ZIEBUHR, W.: Characterization of a large deletion region in *S. epidermidis*. Vortrag auf der DGHM-Fachgruppen-Tagung, Bad Urach (2006)

G. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Martin Eckart
Geburtsdatum	19.03.1977
Geburtsort	Neuendettelsau, Landkreis Ansbach

Schulbildung

1983–1987	Grundschule Heilsbronn
1987–1996	Platen-Gymnasium in Ansbach

Zivildienst

1996–1997	Diakonieverein Heilsbronn
-----------	---------------------------

Studium

1997–2001	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Oktober 2001	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie (HF), Biochemie (NF) und Informatik (NF)
2001–2002	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie in Würzburg und am Institut für Bioinformatik der GSF Neuherberg. Thema: „Erweiterung einer Reaktionsdatenbank auf prokaryotische Stoffwechselprozesse im Modellsystem <i>Listeria monocytogenes</i> “
Oktober 2002	Abschluss: Diplom-Biologe (Univ.)

Promotion

seit Oktober 2002	Promotion am Institut für Molekulare Infektionsbiologie bei Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Jörg Hacker und PD Dr. Wilma Ziebuhr
-------------------	--

Literaturverzeichnis

Altschul et al. 1990

ALTSCHUL, S.F. ; GISH, W. ; MILLER, W. ; MYERS, E.W. ; LIPMAN, D.J.: Basic local alignment search tool. In: *J Mol Biol* 215 (1990), Oct, Nr. 3, S. 403–410

Apfalter 2003

APFALTER, P.: MRSA/MRSE – VISA/GISA/VRSA – PRP – VRE: Aktuelle gram-positive Problemkeime und ihre Resistenzmechanismen, Prävalenz und klinische Konsequenz. In: *Wien Med Wochenschr* 153 (2003), Nr. 7-8, S. 144–147

Argaman u. Altuvia 2000

ARGAMAN, L. ; ALTUVIA, S.: *fhlA* repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. In: *J Mol Biol* 300 (2000), Jul, Nr. 5, S. 1101–1112

Badía et al. 1998

BADÍA, J. ; IBÁÑEZ, E. ; SABATÉ, M. ; BALDOMÀ, L. ; AGUILAR, J.: A rare 920-kilobase chromosomal inversion mediated by IS1 transposition causes constitutive expression of the *yiaK-S* operon for carbohydrate utilization in *Escherichia coli*. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Apr, Nr. 14, S. 8376–8381

Barber 1961

BARBER, M.: Methicillin-resistant staphylococci. In: *J Clin Pathol* 14 (1961), Jul, S. 385–393

Batzilla et al. 2006

BATZILLA, C.F. ; RACHID, S. ; ENGELMANN, S. ; HECKER, M. ; HACKER, J. ; ZIEBUHR, W.: Impact of the accessory gene regulatory system (Agr) on extracellular proteins, *codY* expression and amino acid metabolism in *Staphylococcus epidermidis*. In: *Proteomics* 6 (2006), Jun, Nr. 12, S. 3602–3613

Bensing u. Sullam 2002

BENSING, B.A. ; SULLAM, P.M.: An accessory *sec* locus of *Streptococcus gordonii* is required for export of the surface protein GspB and for normal levels of binding to human platelets. In: *Mol Microbiol* 44 (2002), May, Nr. 4, S. 1081–1094

Betley u. Mekalanos 1985

BETLEY, M.J. ; MEKALANOS, J.J.: Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. In: *Science* 229 (1985), Jul, Nr. 4709, S. 185–187

Betley u. Mekalanos 1988

BETLEY, M.J. ; MEKALANOS, J.J.: Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. In: *J Bacteriol* 170 (1988), Jan, Nr. 1, S. 34–41

Blum et al. 1994

BLUM, G. ; OTT, M. ; LISCHEWSKI, A. ; RITTER, A. ; IMRICH, H. ; TSCHÄPE, H. ; HACKER, J.: Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. In: *Infect Immun* 62 (1994), Feb, Nr. 2, S. 606–614

Borezee et al. 2000

BOREZEE, E. ; PELLEGRINI, E. ; BERCHE, P.: OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. In: *Infect Immun* 68 (2000), Dec, Nr. 12, S. 7069–7077

Bradford 1976

BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), May, S. 248–254

Brescia et al. 2003

BRESCIA, C.C. ; MIKULECKY, P.J. ; FEIG, A.L. ; SLEDJESKI, D.D.: Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. In: *RNA* 9 (2003), Jan, Nr. 1, S. 33–43

Broman et al. 1978

BROMAN, K. ; LAUWERS, N. ; STALON, V. ; WIAME, J.M.: Oxygen and nitrate in utilization by *Bacillus licheniformis* of the arginase and arginine deiminase routes of arginine catabolism and other factors affecting their syntheses. In: *J Bacteriol* 135 (1978), Sep, Nr. 3, S. 920–927

Brückner 1997

BRÜCKNER, R.: Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. In: *FEMS Microbiol Lett* 151 (1997), Jun, Nr. 1, S. 1–8

Brüssow et al. 2004

BRÜSSOW, H. ; CANCHAYA, C. ; HARDT, W.D.: Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (2004), Sep, Nr. 3, S. 560–602

Byrne et al. 1989

BYRNE, M.E. ; ROUCH, D.A. ; SKURRAY, R.A.: Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. In: *Gene* 81 (1989), Sep, Nr. 2, S. 361–367

Carias et al. 1998

CARIAS, L.L. ; RUDIN, S.D. ; DONSKEY, C.J. ; RICE, L.B.: Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. In: *J Bacteriol* 180 (1998), Sep, Nr. 17, S. 4426–4434

Carlomagno et al. 1988

CARLOMAGNO, M.S. ; CHIARIOTTI, L. ; ALIFANO, P. ; NAPPO, A.G. ; BRUNI, C.B.: Structure and function of the *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* K-12 histidine operons. In: *J Mol Biol* 203 (1988), Oct, Nr. 3, S. 585–606

Carver et al. 2005

CARVER, T.J. ; RUTHERFORD, K.M. ; BERRIMAN, M. ; RAJANDREAM, M.A. ; BARRELL, B.G. ; PARKHILL, J.: ACT: the Artemis Comparison Tool. In: *Bioinformatics* 21 (2005), Aug, Nr. 16, S. 3422–3423

Chan et al. 2003

CHAN, K. ; BAKER, S. ; KIM, C.C. ; DETWEILER, C.S. ; DOUGAN, G. ; FALKOW, S.: Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar typhimurium DNA microarray. In: *J Bacteriol* 185 (2003), Jan, Nr. 2, S. 553–563

Charbonnel et al. 2003

CHARBONNEL, P. ; LAMARQUE, M. ; PIARD, J.C. ; GILBERT, C. ; JUILLARD, V. ; ATLAN, D.: Diversity of oligopeptide transport specificity in *Lactococcus lactis* species. A tool to unravel the role of OppA in uptake specificity. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Apr, Nr. 17, S. 14832–14840

Chen et al. 2002

CHEN, S. ; LESNIK, E.A. ; HALL, T.A. ; SAMPATH, R. ; GRIFFEY, R.H. ; ECKER, D.J. ; BLYN, L.B.: A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the *Escherichia coli* genome. In: *Biosystems* 65 (2002), Nr. 2-3, S. 157–177

Chongtrakool et al. 2006

CHONGTRAKOOL, P. ; ITO, T. ; MA, X.X. ; KONDO, Y. ; TRAKULSOMBOON, S. ; TIENSASITORN, C. ; JAMKLANG, M. ; CHAVALIT, T. ; SONG, J.H. ; HIRAMATSU, K.: Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Typing of Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus Strains Isolated in 11 Asian Countries: a Proposal for a New Nomenclature for SCC*mec* Elements. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006), Nr. 3, S. 1001–1012

Conlon et al. 2002a

CONLON, K.M. ; HUMPHREYS, H. ; O'GARA, J.P.: Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. In: *FEMS Microbiol Lett* 216 (2002), Nov, Nr. 2, S. 171–177

Conlon et al. 2002b

CONLON, K.M. ; HUMPHREYS, H. ; O'GARA, J.P.: *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Aug, Nr. 16, S. 4400–4408

Conlon et al. 2004

CONLON, K.M. ; HUMPHREYS, H. ; O'GARA, J.P.: Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Bacteriol* 186 (2004), Sep, Nr. 18, S. 6208–6219

Couto et al. 2003

COUTO, I. ; WU, S.W. ; TOMASZ, A. ; DE LENCASTRE, H.: Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the *mecA* homologue native to the species. In: *J Bacteriol* 185 (2003), Jan, Nr. 2, S. 645–653

Cucarella et al. 2001

CUCARELLA, C. ; SOLANO, C. ; VALLE, J. ; AMORENA, B. ; LASA, I. ; PENADÉS, J.R.: Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. In: *J Bacteriol* 183 (2001), May, Nr. 9, S. 2888–2896

Darby et al. 2002

DARBY, C. ; HSU, J.W. ; GHORI, N. ; FALKOW, S.: *Caenorhabditis elegans*: Plague bacteria biofilm blocks food intake. In: *Nature* 417 (2002), Mai, Nr. 6886, S. 243–244.
– ISSN 0028–0836

Daveran-Mingot et al. 1998

DAVERAN-MINGOT, M.L. ; CAMPO, N. ; RITZENTHALER, P. ; LE BOURGEOIS, P.: A natural large chromosomal inversion in *Lactococcus lactis* is mediated by homologous recombination between two insertion sequences. In: *J Bacteriol* 180 (1998), Sep, Nr. 18, S. 4834–4842

Davey u. O'Toole 2000

DAVEY, M.E. ; O'TOOLE, G.A.: Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (2000), Dec, Nr. 4, S. 847–867

Domingo u. Fontanet 2001

DOMINGO, P. ; FONTANET, A.: Management of complications associated with totally implantable ports in patients with AIDS. In: *AIDS Patient Care STDS* 15 (2001), Jan, Nr. 1, S. 7–13

Dorrell et al. 2005

DORRELL, N. ; HINCHLIFFE, S.J. ; WREN, B.W.: Comparative phylogenomics of pathogenic bacteria by microarray analysis. In: *Curr Opin Microbiol* 8 (2005), Oct, Nr. 5, S. 620–626

Dubin 2003

DUBIN, G.: Defense against own arms: staphylococcal cysteine proteases and their inhibitors. In: *Acta Biochim Pol* 50 (2003), Nr. 3, S. 715–724

Dunne 2002

DUNNE, W.M.: Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? In: *Clin Microbiol Rev* 15 (2002), Apr, Nr. 2, S. 155–166

Ermolaeva et al. 2000

ERMOLAEVA, M.D. ; KHALAK, H.G. ; WHITE, O. ; SMITH, H.O. ; SALZBERG, S.L.: Prediction of transcription terminators in bacterial genomes. In: *J Mol Biol* 301 (2000), Aug, Nr. 1, S. 27–33

Fetherston et al. 1992

FETHERSTON, J.D. ; SCHUETZE, P. ; PERRY, R.D.: Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. In: *Mol Microbiol* 6 (1992), Nr. 18, S. 2693–2704

Frank u. Pace 1998

FRANK, D.N. ; PACE, N.R.: Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. In: *Annu Rev Biochem* 67 (1998), S. 153–180

Franze de Fernandez et al. 1968

FRANZE DE FERNANDEZ, M.T. ; EOYANG, L. ; AUGUST, J.T.: Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q β -RNA. In: *Nature* 219 (1968), Aug, Nr. 154, S. 588–590

Garault et al. 2002

GARAULT, P. ; LE BARS, D. ; BESSET, C. ; MONNET, V.: Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Jan, Nr. 1, S. 32–39

Geissmann u. Touati 2004

GEISSMANN, T.A. ; TOUATI, D.: Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. In: *EMBO J* 23 (2004), Jan, Nr. 2, S. 396–405

Gerke et al. 1998

GERKE, C. ; KRAFT, A. ; SÜSSMUTH, R. ; SCHWEITZER, O. ; GÖTZ, F.: Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Jul, Nr. 29, S. 18586–18593

Gertz et al. 2000

GERTZ, S. ; ENGELMANN, S. ; SCHMID, R. ; ZIEBANDT, A.K. ; TISCHER, K. ; SCHARF, C. ; HACKER, J. ; HECKER, M.: Characterization of the σ^B regulon in *Staphylococcus aureus*. In: *J Bacteriol* 182 (2000), Dec, Nr. 24, S. 6983–6991

Gill et al. 2005

GILL, S.R. ; FOUTS, D.E. ; ARCHER, G.L. ; MONGODIN, E.F. ; DEBOY, R.T. ; RAVEL, J. ; PAULSEN, I.T. ; KOLONAY, J.F. ; BRINKAC, L. ; BEANAN, M. ; DODSON, R.J. ; DAUGHERTY, S.C. ; MADUPU, R. ; ANGIUOLI, S.V. ; DURKIN, A.S. ; HAFT, D.H. ; VAMATHEVAN, J. ; KHOURI, H. ; UTTERBACK, T. ; LEE, C. ; DIMITROV, G. ; JIANG, L. ; QIN, H. ; WEIDMAN, J. ; TRAN, K. ; KANG, K. ; HANCE, I.R. ; NELSON, K.E. ; FRASER, C.M.: 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. In: *J Bacteriol* 187 (2005), Apr, Nr. 7, S. 2426–2438

Gillet u. Felden 2001

GILLET, R. ; FELDEN, B.: Emerging views on tmRNA-mediated protein tagging and ribosome rescue. In: *Mol Microbiol* 42 (2001), Nov, Nr. 4, S. 879–885

Goodell u. Higgins 1987

GOODELL, E.W. ; HIGGINS, C.F.: Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 169 (1987), Aug, Nr. 8, S. 3861–3865

Gottesman 2005

GOTTESMAN, S.: Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. In: *Trends Genet* 21 (2005), Jul, Nr. 7, S. 399–404

Götz et al. 2004

GÖTZ, F. ; BANNERMAN, T. ; SCHLEIFER, K.H.: The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: DWORKIN, M. (Hrsg.) et al.: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. New York : Springer-Verlag, 5. Mi $\frac{1}{2}$ rz 2004 (3. Auflage, Ausgabe 3.16). – <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>

Griffin 1971

GRIFFIN, B.: Separation of ^{32}P -labelled ribonucleic acid components. The use of polyethylenimine-cellulose (TLC) as a second dimension in separating oligoribonucleotides of '4.5 S' and 5 S from *E. coli*. In: *FEBS Lett* 15 (1971), Jun, Nr. 3, S. 165–168

Groisman u. Ochman 1996

GROISMAN, E.A. ; OCHMAN, H.: Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. In: *Cell* 87 (1996), Nov, Nr. 5, S. 791–794

Hacker et al. 1997

HACKER, J. ; BLUM-OEHLER, G. ; MÜHLDOERFER, I. ; TSCHÄPE, H.: Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. In: *Mol Microbiol* 23 (1997), Mar, Nr. 6, S. 1089–1097

Hacker u. Carniel 2001

HACKER, J. ; CARNIEL, E.: Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. In: *EMBO Rep* 2 (2001), May, Nr. 5, S. 376–381

Hanssen u. Ericson Sollid 2006

HANSSSEN, A.M. ; ERICSON SOLLID, J.U.: SCC mec in staphylococci: genes on the move. In: *FEMS Immunol Med Microbiol* 46 (2006), Feb, Nr. 1, S. 8–20

Hanssen et al. 2004

HANSSSEN, A.M. ; KJELDSSEN, G. ; SOLLID, J.U.E.: Local variants of Staphylococcal cassette chromosome mec in sporadic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococci: evidence of horizontal gene transfer? In: *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2004), Jan, Nr. 1, S. 285–296

Hare u. McDonough 1999

HARE, J.M. ; MCDONOUGH, K.A.: High-Frequency RecA-Dependent and -Independent Mechanisms of Congo Red Binding Mutations in *Yersinia pestis*. In: *J. Bacteriol.* 181 (1999), Nr. 16, S. 4896–4904

Hartford et al. 2001

HARTFORD, O. ; O'BRIEN, L. ; SCHOFIELD, K. ; WELLS, J. ; FOSTER, T.J.: The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. In: *Microbiology* 147 (2001), Sep, Nr. Pt 9, S. 2545–2552

Heilmann et al. 1997

HEILMANN, C. ; HUSSAIN, M. ; PETERS, G. ; GÖTZ, F.: Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. In: *Mol Microbiol* 24 (1997), Jun, Nr. 5, S. 1013–1024

Heilmann et al. 1996

HEILMANN, C. ; SCHWEITZER, O. ; GERKE, C. ; VANITTANAKOM, N. ; MACK, D. ; GÖTZ, F.: Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. In: *Mol Microbiol* 20 (1996), Jun, Nr. 5, S. 1083–1091

Heilmann et al. 2003

HEILMANN, C. ; THUMM, G. ; CHHATWAL, G.S. ; HARTLEIB, J. ; UEKÖTTER, A. ; PETERS, G.: Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. In: *Microbiology* 149 (2003), Oct, Nr. Pt 10, S. 2769–2778

Hershberg et al. 2003

HERSHBERG, R. ; ALTUVIA, S. ; MARGALIT, H.: A survey of small RNA-encoding genes in *Escherichia coli*. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Apr, Nr. 7, S. 1813–1820

Hindley 1967

HINDLEY, J.: Fractionation of ³²P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. In: *J Mol Biol* 30 (1967), Nov, Nr. 1, S. 125–136

Hiramatsu et al. 2002

HIRAMATSU, K. ; KATAYAMA, Y. ; YUZAWA, H. ; ITO, T.: Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Int J Med Microbiol* 292 (2002), Jul, Nr. 2, S. 67–74

Hoyle u. Costerton 1991

HOYLE, B.D. ; COSTERTON, J.W.: Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. In: *Prog Drug Res* 37 (1991), S. 91–105

Huang et al. 2005

HUANG, J. ; SU, Z. ; XU, Y.: The evolution of microbial phosphonate degradative pathways. In: *J Mol Evol* 61 (2005), Nov, Nr. 5, S. 682–690

Huang et al. 1999

HUANG, M. ; OPPERMAN-SANIO, F.B. ; STEINBÜCHEL, A.: Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. In: *J Bacteriol* 181 (1999), Jun, Nr. 12, S. 3837–3841

Hughes 2000

HUGHES, D.: Evaluating genome dynamics: the constraints on rearrangements within bacterial genomes. In: *Genome Biol* 1 (2000), Nr. 6, S. REVIEWS0006

Huntzinger et al. 2005

HUNTZINGER, E. ; BOISSET, S. ; SAVEANU, C. ; BENITO, Y. ; GEISSMANN, T. ; NAMANE, A. ; LINA, G. ; ETIENNE, J. ; EHRESMANN, B. ; EHRESMANN, C. ; JACQUIER, A. ; VANDENESCH, F. ; ROMBY, P.: *Staphylococcus aureus* RNAPIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. In: *EMBO J* 24 (2005), Feb, Nr. 4, S. 824–835

Hussain et al. 1997

HUSSAIN, M. ; HERRMANN, M. ; EIFF, C. von ; PERDREAU-REMINGTON, F. ; PETERS, G.: A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. In: *Infect Immun* 65 (1997), Feb, Nr. 2, S. 519–524

Ito et al. 2001

ITO, T. ; KATAYAMA, Y. ; ASADA, K. ; MORI, N. ; TSUTSUMIMOTO, K. ; TIENSASITORN, C. ; HIRAMATSU, K.: Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 45 (2001), May, Nr. 5, S. 1323–1336

Ito et al. 1999

ITO, T. ; KATAYAMA, Y. ; HIRAMATSU, K.: Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. In: *Antimicrob Agents Chemother* 43 (1999), Jun, Nr. 6, S. 1449–1458

Ito et al. 2004

ITO, T. ; MA, X.X. ; TAKEUCHI, F. ; OKUMA, K. ; YUZAWA, H. ; HIRAMATSU, K.: Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2004), Jul, Nr. 7, S. 2637–2651

Ito et al. 2003

ITO, T. ; OKUMA, K. ; MA, X.X. ; YUZAWA, H. ; HIRAMATSU, K.: Insights on antibiotic

resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. In: *Drug Resist Updat* 6 (2003), Feb, Nr. 1, S. 41–52

Janzon et al. 1989

JANZON, L. ; LÖFDAHL, S. ; ARVIDSON, S.: Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. In: *Mol Gen Genet* 219 (1989), Nov, Nr. 3, S. 480–485

Johnson et al. 2002

JOHNSON, J.E. ; LACKNER, L.L. ; DE BOER, P.A.J.: Targeting of (D)MinC/MinD and (D)MinC/DicB complexes to septal rings in *Escherichia coli* suggests a multistep mechanism for MinC-mediated destruction of nascent FtsZ rings. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Jun, Nr. 11, S. 2951–2962

Juillard et al. 1995

JUILLARD, V. ; LE BARS, D. ; KUNJI, E.R. ; KONINGS, W.N. ; GRIPON, J.C. ; RICHARD, J.: Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. In: *Appl Environ Microbiol* 61 (1995), Aug, Nr. 8, S. 3024–3030

Kaneko et al. 1998

KANEKO, J. ; KIMURA, T. ; NARITA, S. ; TOMITA, T. ; KAMIO, Y.: Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage ϕ PVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. In: *Gene* 215 (1998), Jul, Nr. 1, S. 57–67

Katayama et al. 2003

KATAYAMA, Y. ; TAKEUCHI, F. ; ITO, T. ; MA, X.X. ; UI-MIZUTANI, Y. ; KOBAYASHI, I. ; HIRAMATSU, K.: Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *J Bacteriol* 185 (2003), May, Nr. 9, S. 2711–2722

Kim et al. 1996

KIM, S. ; KIM, H. ; PARK, I. ; LEE, Y.: Mutational analysis of RNA structures and sequences postulated to affect 3' processing of M1 RNA, the RNA component of *Escherichia coli* RNase P. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Aug, Nr. 32, S. 19330–19337

Kloos u. Bannerman 1994

KLOOS, W.E. ; BANNERMAN, T.L.: Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. In: *Clin Microbiol Rev* 7 (1994), Jan, Nr. 1, S. 117–140

Kocianova et al. 2005

KOCIANOVA, S. ; VUONG, C. ; YAO, Y. ; VOYICH, J.M. ; FISCHER, E.R. ; DELEO, F.R.

; OTTO, M.: Key role of poly- γ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Clin Invest* 115 (2005), Mar, Nr. 3, S. 688–694

Kotrba et al. 2001

KOTRBA, P. ; INUI, M. ; YUKAWA, H.: Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. In: *J Biosci Bioeng* 92 (2001), Nr. 6, S. 502–517

Kozitskaya et al. 2004

KOZITSKAYA, S. ; CHO, S.H. ; DIETRICH, K. ; MARRE, R. ; NABER, K. ; ZIEBUHR, W.: The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. In: *Infect Immun* 72 (2004), Feb, Nr. 2, S. 1210–1215

Kozitskaya et al. 2005

KOZITSKAYA, S. ; OLSON, M.E. ; FEY, P.D. ; WITTE, W. ; OHLSEN, K. ; ZIEBUHR, W.: Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying or lacking biofilm-mediating genes by multilocus sequence typing. In: *J Clin Microbiol* 43 (2005), Sep, Nr. 9, S. 4751–4757

Kresken et al. 2001

KRESKEN, M. ; HAFNER, D. ; SCHMITZ, F.J. ; WICHELHAUS, T.A.: Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Arbeitsgemeinschaft *Empfindlichkeitsprüfungen & Resistenz* / Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie. 2001. – Forschungsbericht

Kresse et al. 2003

KRESSE, A.U. ; DINESH, S.D. ; LARBIG, K. ; RÖMLING, U.: Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. In: *Mol Microbiol* 47 (2003), Jan, Nr. 1, S. 145–158

Kwong et al. 2004

KWONG, S.M. ; SKURRAY, R.A. ; FIRTH, N.: *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK41: analysis of the replication region, initiator protein binding and antisense RNA regulation. In: *Mol Microbiol* 51 (2004), Jan, Nr. 2, S. 497–509

Lazarevic et al. 1998

LAZAREVIC, V. ; SOLDI, B. ; DÜSTERHÖFT, A. ; HILBERT, H. ; MAUËL, C. ; KARAMATA, D.: Introns and intein coding sequence in the ribonucleotide reductase genes of *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SP β . In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Feb, Nr. 4, S. 1692–1697

Lazazzera et al. 1999

LAZAZZERA, B.A. ; KURTSEY, I.G. ; MCQUADE, R.S. ; GROSSMAN, A.D.: An auto-regulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. In: *J Bacteriol* 181 (1999), Sep, Nr. 17, S. 5193–5200

Lease et al. 1998

LEASE, R.A. ; CUSICK, M.E. ; BELFORT, M.: Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Oct, Nr. 21, S. 12456–12461

Lee et al. 1985

LEE, C.A. ; FOURNIER, M.J. ; BECKWITH, J.: *Escherichia coli* 6S RNA is not essential for growth or protein secretion. In: *J Bacteriol* 161 (1985), Mar, Nr. 3, S. 1156–1161

Leonard et al. 1996

LEONARD, B.A. ; PODBIELSKI, A. ; HEDBERG, P.J. ; DUNNY, G.M.: *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Jan, Nr. 1, S. 260–264

Leonard et al. 2004

LEONARD, E.E. ; TOMPKINS, L.S. ; FALKOW, S. ; NACHAMKIN, I.: Comparison of *Campylobacter jejuni* isolates implicated in Guillain-Barré syndrome and strains that cause enteritis by a DNA microarray. In: *Infect Immun* 72 (2004), Feb, Nr. 2, S. 1199–1203

Liang et al. 2006

LIANG, F.S. ; GREENBERG, W.A. ; HAMMOND, J.A. ; HOFFMANN, J. ; HEAD, S.R. ; WONG, C.H.: Evaluation of RNA-binding specificity of aminoglycosides with DNA microarrays. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), Aug, Nr. 33, S. 12311–12316

Lindsay et al. 1998

LINDSAY, J.A. ; RUZIN, A. ; ROSS, H.F. ; KUREPINA, N. ; NOVICK, R.P.: The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. In: *Mol Microbiol* 29 (1998), Jul, Nr. 2, S. 527–543

Little u. Ivins 1999

LITTLE, S.F. ; IVINS, B.E.: Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection. In: *Microbes Infect* 1 (1999), Feb, Nr. 2, S. 131–139

Livny et al. 2005

LIVNY, J. ; FOGEL, M.A. ; DAVIS, B.M. ; WALDOR, M.K.: sRNAPredict: an integrative

computational approach to identify sRNAs in bacterial genomes. In: *Nucleic Acids Res* 33 (2005), Nr. 13, S. 4096–4105

Lößner 2002

LÖSSNER, I.: *Die Rolle des bakteriellen Insertionselements IS256 bei der Modulation der Biofilmbildung in Staphylococcus epidermidis*, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Dissertation, 2002

Luirink u. Dobberstein 1994

LUIRINK, J. ; DOBBERSTEIN, B.: Mammalian and *Escherichia coli* signal recognition particles. In: *Mol Microbiol* 11 (1994), Jan, Nr. 1, S. 9–13

Luong et al. 2002

LUONG, T.T. ; OUYANG, S. ; BUSH, K. ; LEE, C.Y.: Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Jul, Nr. 13, S. 3623–3629

Lyon et al. 1984

LYON, B.R. ; MAY, J.W. ; SKURRAY, R.A.: Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*. In: *Mol Gen Genet* 193 (1984), Nr. 3, S. 554–556

Ma et al. 2002

MA, X.X. ; ITO, T. ; TIENSASITORN, C. ; JAMKLANG, M. ; CHONGTRAKOOL, P. ; BOYLE-VAVRA, S. ; DAUM, R.S. ; HIRAMATSU, K.: Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. In: *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2002), Apr, Nr. 4, S. 1147–1152

Mack et al. 2004

MACK, D. ; BECKER, P. ; CHATTERJEE, I. ; DOBINSKY, S. ; KNOBLOCH, J.K.M. ; PETERS, G. ; ROHDE, H. ; HERRMANN, M.: Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. In: *Int J Med Microbiol* 294 (2004), Sep, Nr. 2-3, S. 203–212

Mack et al. 1996a

MACK, D. ; FISCHER, W. ; KROKOTSCH, A. ; LEOPOLD, K. ; HARTMANN, R. ; EGGE, H. ; LAUFS, R.: The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. In: *J Bacteriol* 178 (1996), Jan, Nr. 1, S. 175–183

Mack et al. 1996b

MACK, D. ; HAEDER, M. ; SIEMSEN, N. ; LAUFS, R.: Association of biofilm produc-

tion of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. In: *J Infect Dis* 174 (1996), Oct, Nr. 4, S. 881–884

Maghnouj et al. 1998

MAGHNOUJ, A. ; DE SOUSA CABRAL, T.F. ; STALON, V. ; VANDER WAUVEN, C.: The *arcABDC* gene cluster, encoding the arginine deiminase pathway of *Bacillus licheniformis*, and its activation by the arginine repressor *argR*. In: *J Bacteriol* 180 (1998), Dec, Nr. 24, S. 6468–6475

Mah u. O'Toole 2001

MAH, T.F. ; O'TOOLE, G.A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. In: *Trends Microbiol* 9 (2001), Jan, Nr. 1, S. 34–39

Mahillon u. Chandler 1998

MAHILLON, J. ; CHANDLER, M.: Insertion sequences. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 62 (1998), Sep, Nr. 3, S. 725–774

Majdalani et al. 1998

MAJDALANI, N. ; CUNNING, C. ; SLEDJESKI, D. ; ELLIOTT, T. ; GOTTESMAN, S.: DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Oct, Nr. 21, S. 12462–12467

Majdalani et al. 2005

MAJDALANI, N. ; VANDERPOOL, C.K. ; GOTTESMAN, S.: Bacterial small RNA regulators. In: *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40 (2005), Nr. 2, S. 93–113

Maki et al. 2004

MAKI, H. ; MCCALLUM, N. ; BISCHOFF, M. ; WADA, A. ; BERGER-BÄCHI, B.: *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2004), Jun, Nr. 6, S. 1953–1959

Maki u. Murakami 1997

MAKI, H. ; MURAKAMI, K.: Formation of potent hybrid promoters of the mutant *llm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *J Bacteriol* 179 (1997), Nov, Nr. 22, S. 6944–6948

Marsh et al. 2006

MARSH, I.B. ; BANNANTINE, J.P. ; PAUSTIAN, M.L. ; TIZARD, M.L. ; KAPUR, V. ; WHITTINGTON, R.J.: Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. In: *J Bacteriol* 188 (2006), Mar, Nr. 6, S. 2290–2293

Mathews et al. 1999

MATHEWS, D.H. ; SABINA, J. ; ZUKER, M. ; TURNER, D.H.: Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. In: *J Mol Biol* 288 (1999), May, Nr. 5, S. 911–940

Metcalf u. Wanner 1991

METCALF, W.W. ; WANNER, B.L.: Involvement of the *Escherichia coli phn* (*psiD*) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, P_i esters, and P_i. In: *J Bacteriol* 173 (1991), Jan, Nr. 2, S. 587–600

Mizuno et al. 1984

MIZUNO, T. ; CHOU, M.Y. ; INOUE, M.: A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (1984), Apr, Nr. 7, S. 1966–1970

Møller et al. 2002

MØLLER, T. ; FRANCH, T. ; HØJRUP, P. ; KEENE, D.R. ; BÄCHINGER, H.P. ; BRENNAN, R.G. ; VALENTIN-HANSEN, P.: Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. In: *Mol Cell* 9 (2002), Jan, Nr. 1, S. 23–30

Mongkolrattanothai et al. 2004

MONGKOLRATTANOETHAI, K. ; BOYLE, S. ; MURPHY, T.V. ; DAUM, R.S.: Novel non-*mecA*-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2004), May, Nr. 5, S. 1823–1836

Morikawa et al. 2005

MORIKAWA, K. ; HIDAKA, T. ; MURAKAMI, H. ; HAYASHI, H. ; OHTA, T.: Staphylococcal Drp35 is the functional counterpart of the eukaryotic PONs. In: *FEMS Microbiol Lett* 249 (2005), Aug, Nr. 1, S. 185–190

Murakami et al. 1999

MURAKAMI, H. ; MATSUMARU, H. ; KANAMORI, M. ; HAYASHI, H. ; OHTA, T.: Cell wall-affecting antibiotics induce expression of a novel gene, *drp35*, in *Staphylococcus aureus*. In: *Biochem Biophys Res Commun* 264 (1999), Oct, Nr. 2, S. 348–351

Murphy et al. 1985

MURPHY, E. ; HUWYLER, L. ; DE FREIRE BASTOS, M. do C.: Transposon Tn554: complete nucleotide sequence and isolation of transposition-defective and antibiotic-sensitive mutants. In: *EMBO J* 4 (1985), Dec, Nr. 12, S. 3357–3365

Normark u. Normark 2002

NORMARK, B.H. ; NORMARK, S.: Evolution and spread of antibiotic resistance. In: *J Intern Med* 252 (2002), Aug, Nr. 2, S. 91–106

Novick 1991

NOVICK, R.P.: Genetic systems in staphylococci. In: *Methods Enzymol* 204 (1991), S. 587–636

Novick 2003

NOVICK, R.P.: Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. In: *Mol Microbiol* 48 (2003), Jun, Nr. 6, S. 1429–1449

Novick et al. 1993

NOVICK, R.P. ; ROSS, H.F. ; PROJAN, S.J. ; KORNBLUM, J. ; KREISWIRTH, B. ; MOGHAEZEH, S.: Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. In: *EMBO J* 12 (1993), Oct, Nr. 10, S. 3967–3975

Ogston 1883

OGSTON, A.: *Micrococcus* poisoning. In: *J. Anat. Physiol.* 17 (1883), S. 24–58

Ohlsen et al. 2006

OHLSEN, K. ; ECKART, M. ; HÜTTINGER, C. ; ZIEBUHR, W.: Pathogenic Staphylococci: Lessons from Comparative Genomics. In: HACKER, J. (Hrsg.) ; DOBRINDT, U. (Hrsg.): *Pathogenomics: Genome Analysis of Pathogenic Microbes*. Weinheim : Wiley-VCH, 2006, S. 175–210

Oliveira u. de Lencastre 2002

OLIVEIRA, D.C. ; DE LENCASTRE, H.: Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2002), Jul, Nr. 7, S. 2155–2161

Pannone u. Wolin 2000

PANNONE, B.K. ; WOLIN, S.L.: Sm-like proteins wRING the neck of mRNA. In: *Curr Biol* 10 (2000), Jun, Nr. 13, S. R478–R481

Pichon u. Felden 2003

PICHON, C. ; FELDEN, B.: Intergenic sequence inspector: searching and identifying bacterial RNAs. In: *Bioinformatics* 19 (2003), Sep, Nr. 13, S. 1707–1709

Pichon u. Felden 2005

PICHON, C. ; FELDEN, B.: Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Oct, Nr. 40, S. 14249–14254

Raad et al. 1998

RAAD, I. ; ALRAHWAN, A. ; ROLSTON, K.: *Staphylococcus epidermidis*: emerging resistance and need for alternative agents. In: *Clin Infect Dis* 26 (1998), May, Nr. 5, S. 1182–1187

Rachid et al. 2000a

RACHID, S. ; OHLSEN, K. ; WALLNER, U. ; HACKER, J. ; HECKER, M. ; ZIEBUHR, W.: Alternative transcription factor σ^B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. In: *J Bacteriol* 182 (2000), Dec, Nr. 23, S. 6824–6826

Rachid et al. 2000b

RACHID, S. ; OHLSEN, K. ; WITTE, W. ; HACKER, J. ; ZIEBUHR, W.: Effect of sub-inhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 44 (2000), Dec, Nr. 12, S. 3357–3363

Ramaley u. Bernlohr 1965

RAMALEY, R.F. ; BERNLOHR, R.W.: Apparent induction of ornithine transcarbamylase and arginase by arginine in *Bacillus licheniformis*. In: *J Mol Biol* 11 (1965), Apr, S. 842–844

Reese 2001

REESE, M.G.: Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. In: *Comput Chem* 26 (2001), Dec, Nr. 1, S. 51–56

Resch et al. 2006

RESCH, A. ; LEICHT, S. ; SARIC, M. ; PÁSZTOR, L. ; JAKOB, A. ; GÖTZ, F. ; NORDHEIM, A.: Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. In: *Proteomics* 6 (2006), Mar, Nr. 6, S. 1867–1877

Rivas et al. 2001

RIVAS, E. ; KLEIN, R.J. ; JONES, T.A. ; EDDY, S.R.: Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. In: *Curr Biol* 11 (2001), Sep, Nr. 17, S. 1369–1373

Rohde et al. 2004

ROHDE, H. ; KALITZKY, M. ; KRÖGER, N. ; SCHERPE, S. ; HORSTKOTTE, M.A. ; KNOBLOCH, J.K.M. ; ZANDER, A.R. ; MACK, D.: Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus*

epidermidis strains from a bone marrow transplant unit. In: *J Clin Microbiol* 42 (2004), Dec, Nr. 12, S. 5614–5619

Rosenstein u. Götz 2000

ROSENSTEIN, R. ; GÖTZ, F.: Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. In: *Biochimie* 82 (2000), Nov, Nr. 11, S. 1005–1014

Ruzin et al. 2001

RUZIN, A. ; LINDSAY, J. ; NOVICK, R.P.: Molecular genetics of SaPI1—a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. In: *Mol Microbiol* 41 (2001), Jul, Nr. 2, S. 365–377

Sadovskaya et al. 2005

SADOVSKAYA, I. ; VINOGRADOV, E. ; FLAHAUT, S. ; KOGAN, G. ; JABBOURI, S.: Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. In: *Infect Immun* 73 (2005), May, Nr. 5, S. 3007–3017

Schumacher et al. 2002

SCHUMACHER, M.A. ; PEARSON, R.F. ; MØLLER, T. ; VALENTIN-HANSEN, P. ; BRENNAN, R.G.: Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. In: *EMBO J* 21 (2002), Jul, Nr. 13, S. 3546–3556

Schwalbe et al. 1987

SCHWALBE, R.S. ; STAPLETON, J.T. ; GILLIGAN, P.H.: Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. In: *N Engl J Med* 316 (1987), Apr, Nr. 15, S. 927–931

Siguier et al. 2006

SIGUIER, P. ; PEROCHON, J. ; LESTRADE, L. ; MAHILLON, J. ; CHANDLER, M.: ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), Jan, Nr. Database issue, S. D32–D36

Skaugen u. Nes 2000

SKAUGEN, M. ; NES, I.F.: Transposition in *Lactobacillus sakei*: inactivation of a second lactocin S operon by the insertion of IS1520, a new member of the IS3 family of insertion sequences. In: *Microbiology* 146 (Pt 5) (2000), May, S. 1163–1169

Sledjeski u. Gottesman 1995

SLEDJESKI, D. ; GOTTESMAN, S.: A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced *rcsA* gene of *Escherichia coli*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Mar, Nr. 6, S. 2003–2007

Stabler et al. 2005

STABLER, R.A. ; MARSDEN, G.L. ; WITNEY, A.A. ; Y.L. ; BENTLEY, S.D. ; TANG, C.M. ; HINDS, J.: Identification of pathogen-specific genes through microarray analysis of pathogenic and commensal *Neisseria* species. In: *Microbiology* 151 (2005), Sep, Nr. Pt 9, S. 2907–2922

Storz et al. 2005

STORZ, G. ; ALTUVIA, S. ; WASSARMAN, K.M.: An abundance of RNA regulators. In: *Annu Rev Biochem* 74 (2005), S. 199–217

Storz et al. 2004

STORZ, G. ; OPDYKE, J.A. ; ZHANG, A.: Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. In: *Curr Opin Microbiol* 7 (2004), Apr, Nr. 2, S. 140–144

Tacconelli et al. 1997

TACCONELLI, E. ; TUMBARELLO, M. ; PITTIRUTI, M. ; LEONE, F. ; LUCIA, M.B. ; CAUDA, R. ; ORTONA, L.: Central venous catheter-related sepsis in a cohort of 366 hospitalised patients. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16 (1997), Mar, Nr. 3, S. 203–209

Takahashi et al. 2002

TAKAHASHI, Y. ; KONISHI, K. ; CISAR, J.O. ; YOSHIKAWA, M.: Identification and characterization of *hsa*, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1. In: *Infect Immun* 70 (2002), Mar, Nr. 3, S. 1209–1218

Takeuchi et al. 2005

TAKEUCHI, F. ; WATANABE, S. ; BABA, T. ; YUZAWA, H. ; ITO, T. ; MORIMOTO, Y. ; KURODA, M. ; CUI, L. ; TAKAHASHI, M. ; ANKAI, A. ; BABA, S. ; FUKUI, S. ; LEE, J.C. ; HIRAMATSU, K.: Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. In: *J Bacteriol* 187 (2005), Nov, Nr. 21, S. 7292–7308

Tegmark et al. 1998

TEGMARK, K. ; MORFELDT, E. ; ARVIDSON, S.: Regulation of agr-dependent virulence genes in *Staphylococcus aureus* by RNAIII from coagulase-negative staphylococci. In: *J Bacteriol* 180 (1998), Jun, Nr. 12, S. 3181–3186

Tétart u. Bouché 1992

TÉTART, F. ; BOUCHÉ, J.P.: Regulation of the expression of the cell-cycle gene *ftsZ* by DicF antisense RNA. Division does not require a fixed number of FtsZ molecules. In: *Mol Microbiol* 6 (1992), Mar, Nr. 5, S. 615–620

Tormo et al. 2005

TORMO, M.A. ; KNECHT, E. ; GÖTZ, F. ; LASA, I. ; PENADÉS, J.R.: Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? In: *Microbiology* 151 (2005), Jul, Nr. Pt 7, S. 2465–2475

Tsui et al. 1994

TSUI, H.C. ; LEUNG, H.C. ; WINKLER, M.E.: Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. In: *Mol Microbiol* 13 (1994), Jul, Nr. 1, S. 35–49

Valentin-Hansen et al. 2004

VALENTIN-HANSEN, P. ; ERIKSEN, M. ; UDESEN, C.: The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. In: *Mol Microbiol* 51 (2004), Mar, Nr. 6, S. 1525–1533

Vandenesch et al. 1991

VANDENESCH, F. ; KORNBLOM, J. ; NOVICK, R.P.: A temporal signal, independent of *agr*, is required for *hla* but not *spa* transcription in *Staphylococcus aureus*. In: *J Bacteriol* 173 (1991), Oct, Nr. 20, S. 6313–6320

Veenstra et al. 1996

VEENSTRA, G.J. ; CREMERS, F.F. ; VAN DIJK, H. ; FLEER, A.: Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. In: *J Bacteriol* 178 (1996), Jan, Nr. 2, S. 537–541

Vuong et al. 2005

VUONG, C. ; KIDDER, J.B. ; JACOBSON, E.R. ; OTTO, M. ; PROCTOR, R.A. ; SOMERVILLE, G.A.: *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. In: *J Bacteriol* 187 (2005), May, Nr. 9, S. 2967–2973

Vuong et al. 2004a

VUONG, C. ; KOCIANOVA, S. ; VOYICH, J.M. ; YAO, Y. ; FISCHER, E.R. ; DELEO, F.R. ; OTTO, M.: A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Dec, Nr. 52, S. 54881–54886

Vuong u. Otto 2002

VUONG, C. ; OTTO, M.: *Staphylococcus epidermidis* infections. In: *Microbes Infect* 4 (2002), Apr, Nr. 4, S. 481–489

Vuong et al. 2004b

VUONG, C. ; VOYICH, J.M. ; FISCHER, E.R. ; BRAUGHTON, K.R. ; WHITNEY, A.R. ;

DELEO, F.R. ; OTTO, M.: Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. In: *Cell Microbiol* 6 (2004), Mar, Nr. 3, S. 269–275

Wang et al. 2004

WANG, Xin ; PRESTON, III ; ROMEO, Tony: The *pgaABCD* Locus of *Escherichia coli* Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation. In: *J Bacteriol* 186 (2004), Nr. 9, S. 2724–2734

Wassarman 2002

WASSARMAN, K.M.: Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. In: *Cell* 109 (2002), Apr, Nr. 2, S. 141–144

Wassarman et al. 2001

WASSARMAN, K.M. ; REPOILA, F. ; ROSENOW, C. ; STORZ, G. ; GOTTESMAN, S.: Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. In: *Genes Dev* 15 (2001), Jul, Nr. 13, S. 1637–1651

Wassarman u. Storz 2000

WASSARMAN, K.M. ; STORZ, G.: 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. In: *Cell* 101 (2000), Jun, Nr. 6, S. 613–623

Wassarman et al. 1999

WASSARMAN, K.M. ; ZHANG, A. ; STORZ, G.: Small RNAs in *Escherichia coli*. In: *Trends Microbiol* 7 (1999), Jan, Nr. 1, S. 37–45

Wielders et al. 2001

WIELDERS, C.L. ; VRIENS, M.R. ; BRISSE, S. ; DE GRAAF-MILTENBURG, L.A. ; TROELSTRA, A. ; FLEER, A. ; SCHMITZ, F.J. ; VERHOEF, J. ; FLUIT, A.C.: In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. In: *Lancet* 357 (2001), May, Nr. 9269, S. 1674–1675

Williams u. Bartel 1998

WILLIAMS, K.P. ; BARTEL, D.P.: The tmRNA Website. In: *Nucleic Acids Res* 26 (1998), Jan, Nr. 1, S. 163–165

Williams et al. 2002

WILLIAMS, R.J. ; HENDERSON, B. ; SHARP, L.J. ; NAIR, S.P.: Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. In: *Infect Immun* 70 (2002), Dec, Nr. 12, S. 6805–6810

Winkler et al. 1978

WINKLER, M.E. ; ROTH, D.J. ; HARTMAN, P.E.: Promoter- and attenuator-related

metabolic regulation of the *Salmonella typhimurium* histidine operon. In: *J Bacteriol* 133 (1978), Feb, Nr. 2, S. 830–843

Wu et al. 1996

WU, S. ; PISCITELLI, C. ; DE LENCASTRE, H. ; TOMASZ, A.: Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. In: *Microb Drug Resist* 2 (1996), Nr. 4, S. 435–441

Yao et al. 2005a

YAO, Y. ; STURDEVANT, D.E. ; OTTO, M.: Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. In: *J Infect Dis* 191 (2005), Jan, Nr. 2, S. 289–298

Yao et al. 2005b

YAO, Y. ; STURDEVANT, D.E. ; VILLARUZ, A. ; XU, L. ; GAO, Q. ; OTTO, M.: Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. In: *Infect Immun* 73 (2005), Mar, Nr. 3, S. 1856–1860

Zhang et al. 1998

ZHANG, A. ; ALTUVIA, S. ; TIWARI, A. ; ARGAMAN, L. ; HENGGE-ARONIS, R. ; STORZ, G.: The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. In: *EMBO J* 17 (1998), Oct, Nr. 20, S. 6061–6068

Zhang et al. 2002

ZHANG, A. ; WASSARMAN, K.M. ; ORTEGA, J. ; STEVEN, A.C. ; STORZ, G.: The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. In: *Mol Cell* 9 (2002), Jan, Nr. 1, S. 11–22

Zhang et al. 2003a

ZHANG, A. ; WASSARMAN, K.M. ; ROSENOW, C. ; TJADEN, B.C. ; STORZ, G. ; GOTTESMAN, S.: Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. In: *Mol Microbiol* 50 (2003), Nov, Nr. 4, S. 1111–1124

Zhang et al. 2005

ZHANG, K. ; MCCLURE, J.A. ; ELSAYED, S. ; LOUIE, T. ; CONLY, J.M.: Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: *J Clin Microbiol* 43 (2005), Oct, Nr. 10, S. 5026–5033

Zhang et al. 2003b

ZHANG, Y.Q. ; REN, S.X. ; LI, H.L. ; WANG, Y.X. ; FU, G. ; YANG, J. ; QIN, Z.Q. ;

MIAO, Y.G. ; WANG, W.Y. ; CHEN, R.S. ; SHEN, Y. ; CHEN, Z. ; YUAN, Z.H. ; ZHAO, G.P. ; QU, D. ; DANCHIN, A. ; WEN, Y.M.: Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). In: *Mol Microbiol* 49 (2003), Sep, Nr. 6, S. 1577–1593

Zheng u. Gierasch 1997

ZHENG, N. ; GIERASCH, L.M.: Domain interactions in *E. coli* SRP: stabilization of M domain by RNA is required for effective signal sequence modulation of NG domain. In: *Mol Cell* 1 (1997), Dec, Nr. 1, S. 79–87

Ziebuhr et al. 2000

ZIEBUHR, W. ; DIETRICH, K. ; TRAUTMANN, M. ; WILHELM, M.: Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis. In: *Int J Med Microbiol* 290 (2000), Mar, Nr. 1, S. 115–120

Ziebuhr et al. 1997

ZIEBUHR, W. ; HEILMANN, C. ; GÖTZ, F. ; MEYER, P. ; WILMS, K. ; STRAUBE, E. ; HACKER, J.: Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. In: *Infect Immun* 65 (1997), Mar, Nr. 3, S. 890–896

Ziebuhr et al. 1999

ZIEBUHR, W. ; KRIMMER, V. ; RACHID, S. ; LÖSSNER, I. ; GÖTZ, F. ; HACKER, J.: A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. In: *Mol Microbiol* 32 (1999), Apr, Nr. 2, S. 345–356

Zor u. Selinger 1996

ZOR, T. ; SELINGER, Z.: Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. In: *Anal Biochem* 236 (1996), May, Nr. 2, S. 302–308

Zuker 2003

ZUKER, M.: Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Jul, Nr. 13, S. 3406–3415