

**Die Rolle des bakteriellen Insertionselements IS256  
bei der Modulation der Biofilmbildung in  
*Staphylococcus epidermidis***

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

vorgelegt von

Isabel Löbner

aus Hilden

Würzburg 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. J. Hacker

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde von April 1998 bis Januar 2002 am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg angefertigt.

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

Würzburg, 16.4.2002

## Vielen Dank!

Herrn Professor Dr. J. Hacker danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Überlassung des Themas sowie sein stetes Interesse am Fortgang und Erfolg dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. J. Kreft, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg, herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Wilma Ziebuhr. Sie fand stets Zeit, geduldig Fragen zu beantworten und neue Ideen zu diskutieren. Die Freiheit, die sie mir ließ und die fachliche Unterstützung, die sie mir gab, haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Nicht zu vergessen sind meine Laborkolleginnen! Die außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre war auf Rücksichtnahme, Verständnis und Kritik aber vor allem auf den Spaß zurückzuführen, den wir im Labor hatten. Ein dickes und sehr persönliches Dankeschön an Katja, Sabine und Dorothea! Darüber hinaus hat mir Katja immer zur Seite gestanden, wenn mir die Arbeit über den Kopf wuchs. Praktikanten, Diplomanden und Mediziner brachten frischen Wind ins Labor. Ein Dank an Hennes, Eisi, Simone und Martin.

Den restlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern gilt ebenfalls mein ausdrücklicher Dank. Sie waren stets hilfsbereit bei kleinen und großen Problemen im Labor, am Computer oder im Kaffeeraum.

Da wären noch Mella, Simone und Annette zu erwähnen. Mella hat mir in Würzburg immer Unterschlupf gewährt und mit mir viele aufschlußreiche Gespräche geführt. Simone und Annette haben mich stets mit Erfolg auf nichtwissenschaftliche Gedanken gebracht, vor allem in der Zeit des Zusammenschreibens: Dankeschön!

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders meinen Eltern und dem Rest der Familie, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und mir immer den nötigen Rückhalt gaben.

Sven hat meine Hochs und Tiefs mit Sicherheit am direktesten miterlebt. Für seine Geduld, sein Verständnis und seinen Zuspruch bin ich ihm von Herzen dankbar.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. a</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>1. b</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1.	Der Genus <i>Staphylococcus</i> .....	5
2.2.	Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken.....	5
2.3.	Antibiotikaresistenz bei Staphylokokken.....	6
2.4.	Adhärenz und Biofilmbildung bei <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	6
2.5.	Phasenvariation und Phänotypvariabilität.....	9
2.6.	Mobile genetische Elemente .....	10
2.6.1.	Transpositionsmechanismen .....	11
2.6.2.	Das Insertionselement IS256.....	14
<b>3.</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>16</b>
3.1.	Verbrauchsmaterialien .....	16
3.1.1.	Chemikalien .....	16
3.1.2.	Enzyme.....	16
3.1.3.	Antibiotika.....	16
3.2.	Bakterienkultur .....	17
3.2.1.	Bakterienstämme.....	17
3.2.2.	Medien zur Bakterienkultur .....	17
3.3.	Nukleotide und Oligonukleotide .....	19
3.3.1.	Nukleotide .....	19
3.3.2.	Oligonukleotide.....	19
3.4.	Plasmide und Vektoren.....	20
3.5.	Puffer und Lösungen.....	21
3.6.	Geräte .....	22
<b>4.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>24</b>
4.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und Staphylokokken.....	24
4.1.1.	Minipräparation- Plasmidisolierung im kleinen Maßstab aus <i>E. coli</i> .....	24

4.1.2. Midipräparation- Plasmidisolierung im mittleren Maßstab aus <i>E. coli</i> .....	24
4.1.3. Plasmidisolierung aus <i>Staphylococcus</i> spp.: Minipräparation (und Midipräparation).....	25
<b>4.2. Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden und DNA .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>25</b>
<b>4.4. Inverse PCR.....</b>	<b>27</b>
<b>4.5. Reinigung von PCR-Produkten .....</b>	<b>27</b>
<b>4.6. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel .....</b>	<b>27</b>
<b>4.7. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....</b>	<b>28</b>
<b>4.8. Restriktion von DNA.....</b>	<b>28</b>
<b>4.9. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....</b>	<b>29</b>
<b>4.10. Ligation von DNA-Fragmenten .....</b>	<b>29</b>
<b>4.11. Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> und Staphylokokken .....</b>	<b>30</b>
4.11.1. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	30
4.11.2. Herstellung kompetenter <i>Staphylococcus aureus</i> -Zellen.....	30
4.11.3. Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen (CaCl <sub>2</sub> -Methode) .....	30
4.11.4. Transformation von <i>Staphylococcus aureus</i> (Elektroporation) .....	31
<b>4.12. pGEM<sup>®</sup>-T-easy Vektor System .....</b>	<b>31</b>
<b>4.13. Isolierung von chromosomaler DNA aus Staphylokokken.....</b>	<b>31</b>
<b>4.14. Phenolextraktion .....</b>	<b>32</b>
<b>4.15. Ethanolfällung .....</b>	<b>32</b>
<b>4.16. Southern-Blot-Analyse.....</b>	<b>32</b>
4.16.1. Kapillarblot auf eine Nylonmembran.....	33
4.16.2. Vakuumblot auf eine Nylonmembran .....	33
4.16.3. Dot-Blot.....	34
4.16.4. Nichtradioaktive Markierung von Sonden mit dem ECL-System .....	34
4.16.5 Hybridisierung, Waschen und Entwicklung des Blots.....	34
<b>4.17. Sequenzierung.....</b>	<b>35</b>
4.17.1. Sequenzierung mit dem LiCor-Sequenzierer von MWG.....	35
4.17.2. Sequenzierung mit dem ABI-Sequenzierer von Perkin-Elmer .....	36
<b>4.18. PFGE-Pulsfeldgelelektrophorese (Wechselfeldgelelektrophorese) .....</b>	<b>37</b>
<b>4.19. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika (MHK) .....</b>	<b>39</b>
<b>4.20. Agardiffusionstest.....</b>	<b>39</b>
<b>4.21. Speziesbestimmung mit dem API-Staph-System.....</b>	<b>40</b>
<b>4.22. Adhärenzassay .....</b>	<b>40</b>
<b>4.23. Erstellung von Wachstumskurven.....</b>	<b>40</b>
<b>4.24. Bestimmung der Variationsrate von <i>Staphylococcus epidermidis</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.25. Erstellung einer Cosmid-Genbank .....</b>	<b>41</b>
4.25.1. Präparation der Vektor-DNA .....	42
4.25.2. Präparation der genomischen DNA.....	42

4.25.3. Ligation von DNA-Fragmenten in den Cosmid-Vektor SuperCos1 .....	43
4.25.4. „Packaging“: Verpacken der Cosmide in Phagenpartikel.....	43
4.25.5. Phagentransduktion in <i>E. coli</i> -Wirtszellen.....	44

## 5. ERGEBNISSE 45

<b>5.1. Variationen in der Produktion des Polysaccharid-Interzellulären Adhäsins bei Nachkommen eines klinischen <i>Staphylococcus epidermidis</i> Isolats.....</b>	<b>45</b>
5.1.1. Bestimmung der Variationsrate der PIA-Produktion.....	45
5.1.2. Phänotypische Analyse der <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Varianten .....	47
5.1.2.1. Betrachtung der Koloniemorphologie auf Kongorotagarplatten.....	47
5.1.2.2. Durchführung von Adhärenzassays mit roten <i>Staphylococcus 48 epidermidis</i> Kolonien .....	48
5.1.3. Genotypische Analyse der <i>Staphylococcus epidermidis</i> -Varianten.....	48
5.1.3.1. Ausschluß von Kontaminationen und Nachweis von <i>Rearrangements</i> durch Pulsfeldgelelektrophorese .....	49
5.1.3.2. <i>icaA</i> - und <i>icaC</i> -spezifische PCR und Southern-Hybridisierung.....	50
5.1.3.3. IS256-Hybridisierungsmuster von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 und dessen Varianten .....	52
<b>5.2. Charakterisierung der Deletionsmutanten <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307/9 und <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307/56 .....</b>	<b>55</b>
5.2.1. Phänotypische Tests .....	55
5.2.1.1. Wachstumsverhalten von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307/9 im Vergleich zum Wildtyp <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 .....	55
5.2.1.2. Durchführung eines API-Staph-Tests .....	57
5.2.1.3. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Gentamicin bei <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 und <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307/9 ...	57
5.2.1.4. Agardiffusionstest zur Ermittlung des Resistenzprofils von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307/9 und 307/56.....	58
5.2.2. Untersuchung des deletierten Bereichs von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307/9 ..	59
5.2.2.1. Erstellung einer Cosmid-Genbank von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 ...	60
5.2.2.2. Sequenzierung und Charakterisierung von Teilen des deletierten Bereichs.....	60
5.2.2.3. IS256-Insertion im Genom des Wildtypstammes <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 .....	63
5.2.2.4. Vergleich der Sequenz von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 mit dem Sequenzbereich von <i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A .....	64
5.2.2.5. <i>Shot-gun</i> Klonierung und Sequenzierung des Deletionsrandbereichs von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307/9 .....	65
5.2.3. Untersuchung des deletierten Bereichs von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307/56: Amplifikation mittels inverser PCR und Sequenzierung .....	69

5.2.3. Weitere Deletionsmutanten von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 .....	71
<b>5.3. Charakterisierung der IS256-Insertionsmutanten des Stammes <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 .....</b>	<b>74</b>
5.3.1. Anzahl und Hybridisierungsmuster des IS256-Elements bei Insertionsmutanten von <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 .....	74
5.3.2. Sequenzierung der IS256-Insertionsstellen im ica-Operon .....	75
<b>5.4. Untersuchungen zum Transpositionsmechanismus des Insertionselements IS256 .....</b>	<b>77</b>
5.4.1. Identifizierung von zirkulären IS256-Molekülen in <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307 und <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307/95 .....	77
5.4.2. Untersuchungen zur Bildung von zirkulären IS256-Molekülen in <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> und <i>Escherichia coli</i> .....	79
5.4.3. Klonierung und Sequenzierung der amplifizierten zirkulären IS256-Moleküle .....	80
5.4.4. Identifizierung von zirkulären IS256-Molekülen mittels Southern-Blot-Analyse ..	83
5.4.5. Einführung einer Mutation in das putative IS256-Transposasegen .....	84
 <b>6. DISKUSSION .....</b>	 <b>87</b>
 <b>6.1. Die Biofilmbildung bei <i>Staphylococcus epidermidis</i> ist variabel .....</b>	 <b>87</b>
6.1.1. Genotypische Variabilität bei <i>Staphylococcus epidermidis</i> 307: Nachweis von genomischen Umordnungen durch DNA-Fingerprints und IS256-spezifische Hybridisierungen .....	88
6.1.2. IS256-Insertionen im ica-Operon von <i>Staphylococcus epidermidis</i> führen zu einem PIA-negativen Phänotyp .....	89
6.1.3. Deletionen im Genom von <i>Staphylococcus epidermidis</i> betreffen auch das ica- Operon .....	90
 <b>6.2. Die Bildung von zirkulären IS256-Molekülen als mögliches Zwischenprodukt in der Transpositionsreaktion .....</b>	 <b>97</b>
6.2.1. Die von IS256 kodierte Transposase vermittelt die Bildung von zirkulären IS256-Molekülen .....	98
6.2.2. Modelle für die Bildung der zirkulären IS256-Moleküle .....	98
6.2.3. Der Einfluß der IS256-Transposition auf die Genomplastizität von <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	101
 <b>6.3. Die Bedeutung von mobilen genetischen Elementen für die Genomevolution .....</b>	 <b>102</b>

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

106

Abkürzungsverzeichnis.....	120
Anhang I: Sequenzdaten der <i>S. epidermidis</i> 307 Cosmid-Klone .....	122
Anhang II: Sequenzbereich aus <i>S. epidermidis</i> RP62A.....	139
Anhang III: Sequenz des Deletionsrandbereichs von <i>S. epidermidis</i> 307/56 .....	147

## 1. a Zusammenfassung

*Staphylococcus epidermidis* zählt zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen im Zusammenhang mit implantierten Fremdkörpern. Diese Bakterien zeigen eine außergewöhnliche phänotypische und genotypische Variabilität, von der auch die Expression wichtiger virulenz- und resistenzassoziierter Gene betroffen ist. Möglicherweise verfügen Staphylokokken damit über Anpassungsstrategien, die sie für das Überleben unter wechselnden Umweltbedingungen benötigen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von bakteriellen Insertionssequenzen (IS) bei der Genomplastizität von *Staphylococcus epidermidis* untersucht. Im Mittelpunkt des Interesses stand dabei das Insertionselement IS256 und sein Einfluß auf die Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis*.

Die Fähigkeit von *S. epidermidis*, an Oberflächen zu haften und Biofilme zu bilden ist von der Präsenz und Expression des *ica*-Operons abhängig, das Enzyme für die Synthese eines Exopolysaccharids (PIA) kodiert. Die PIA-Produktion ist äußerst variabel und hat damit Einfluß auf das Virulenz- und Kolonisierungsverhalten dieser Bakterien. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die veränderliche PIA-Produktion bei *S. epidermidis* im wesentlichen auf drei Mechanismen zurückzuführen ist, an denen das IS-Element IS256 ursächlich beteiligt ist.

Zunächst konnte durch den Vergleich der IS256-spezifischen Hybridisierungsmuster eines biofilmbildenden *S. epidermidis*-Wildtypstammes und dessen PIA-negativer Spontanvarianten gezeigt werden, daß die multiplen IS256-Kopien im Genom dieses Stammes außerordentlich aktiv sind. Die nähere Analyse der Varianten ergab bei einem Teil der PIA-negativen Abkömmlinge umfangreiche IS256-vermittelte genomische Umordnungen als Ursache für den Verlust der Biofilmbildung.

Eine weitere Gruppe von Biofilm-negativen Varianten wies IS256-Insertionen im *ica*-Gencluster auf. Die Verteilung der Insertionsstellen im *ica*-Operon ließ darauf schließen, daß es sich bei dem *icaC*-Gen um einen *Hot-spot* für die Integration von IS256 handelt. Solche *ica*::IS256-Insertionen konnten bereits in zahlreichen *S. epidermidis* Stämmen nachgewiesen werden. Da diese Insertionen reversibel sind, bilden sie eine wesentliche Ursache für die Phasenvariation der Biofilmbildung von *S. epidermidis*.

Bei einer dritten Gruppe von Varianten konnten Deletionen verschieden großer DNA-Abschnitte im *S. epidermidis*-Chromosom beobachtet werden, die zu einem Verlust der *ica*-Gene und damit der Fähigkeit, Biofilme auszubilden, führte. Um die Frage zu klären, welche Gene in der Umgebung des *ica*-Operons liegen und durch die Deletion von bis zu 250 kb-großen DNA-Fragmenten verloren gehen, wurde eine Cosmid-Genbank des *S. epidermidis* – Wildtypstammes erstellt. Die durch Nukleotidsequenzierung erhaltenen Informationen wurden mit der in der Genom-Datenbank zur Verfügung stehenden Sequenz des

Referenzstammes *S. epidermidis* RP62A verglichen und in einer Genkarte zusammengefaßt. Neben einzelnen Unterschieden zwischen den beiden *S. epidermidis*-Stämmen fiel vor allem auf, daß mehrere der von der Deletion betroffenen Leseraster für Proteine mit Ähnlichkeiten zu oberflächenassoziierten Proteinen kodieren, die an der Adhärenz der Bakterien beteiligt sein könnten. Daneben finden sich aber auch Leserahmen mit Ähnlichkeiten zu Transportsystemen und zahlreiche mobile genetische Elemente. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß das *ica*-Operon von *S. epidermidis* möglicherweise Teil einer Pathogenitätsinsel ist. Die Analyse der Deletionsrandbereiche einer Mutante ergab, daß der Verlust von mehr als 200 kb DNA durch homologe Rekombination zwischen zwei IS256-Elementen vermittelt wurde, die im Wildtypstamm in gleicher Orientierung zueinander vorlagen.

Da IS256 offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Genomplastizität von *S. epidermidis* spielt, konzentrierte sich der zweite Teil der Arbeit auf die Aufklärung des Transpositionsmechanismus dieses IS-Elements. Dabei konnte gezeigt werden, daß IS256 eine alternative Transpositionsreaktion nutzt, die durch die Bildung zirkulärer, extrachromosomaler DNA-Moleküle gekennzeichnet ist. Diese DNA-Zirkel bestehen aus einer vollständigen IS256-Kopie, bei der die beiden Enden des Elementes durch eine variable Anzahl von Nukleotiden fremder DNA als Brücke miteinander verbunden sind. Es konnte gezeigt werden, daß diese kurzen DNA-Abschnitte aus der Nachbarschaft der früheren IS256-Insertionsstelle stammen, wobei sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts liegende Nukleotidsequenzen nachgewiesen wurden. Neben diesen vollständigen IS256-Zirkeln wurden aber auch Moleküle gefunden, bei denen entweder das rechte oder das linke Ende von IS256 fehlten. Die Daten legen nahe, daß beide IS256-Enden an der Zirkelbildung teilnehmen können und im Unterschied zu anderen zirkelbildenden Insertionssequenzen, die Strangtransferreaktion während der Zirkularisierung mit geringer Spezifität verläuft. Ringförmige IS256-Moleküle konnten sowohl in *S. epidermidis* als auch in rekombinanten *S. aureus* und *E. coli*-Stämmen nachgewiesen werden, was auf eine untergeordnete Rolle speziesspezifischer Faktoren bei diesem Prozeß schließen läßt. Dagegen konnte durch die Einführung einer Mutation in das putative Transposasegen des Elementes gezeigt werden, daß dieses Genprodukt für die IS256-Zirkularisierung essentiell ist.

Es ist zu vermuten, daß die Bildung zirkulärer IS256-Moleküle die Voraussetzung für die präzise Exzision des Elementes während der Phasenvariation der Biofilmproduktion bildet. Außerdem ist die Generierung stabiler Mutationen durch das Zurücklassen von Teilen der duplizierten Zielsequenz oder durch die Vermittlung kleinerer Deletionen während der Zirkelbildung vorstellbar. Darüber hinaus bilden die multiplen Kopien des Elementes im Genom Kreuzungspunkte für homologe Rekombinationsereignisse. IS256 stellt damit sehr wahrscheinlich einen wesentlichen Faktor für die Flexibilität des Genoms von *S. epidermidis* dar. Die detaillierte Aufklärung der molekularen Mechanismen, die die Transposition von IS256 beeinflussen, könnten daher wertvolle Einblicke in die genetischen Anpassungsstrategien dieses bedeutenden nosokomialen Pathogens geben.

## 1. b Summary

*Staphylococcus epidermidis* is the predominant cause of implanted medical device related infections and of nosokomial sepsis. These bacteria show an unusual phenotypic and genotypic variability that comprises the expression of virulence- and resistance-associated genes. This adaptability is thought to be involved in the survival of staphylococci under changing environmental conditions. In this study the role of bacterial insertion sequences (IS) in the genome plasticity of *S. epidermidis* was investigated. Of particular interest was the insertion sequence element IS256 and its influence on *S. epidermidis*-biofilm formation.

The capability of *S. epidermidis* to attach to surfaces and to form biofilms is due to the presence and expression of the *ica* Operon. This gene locus was shown to mediate cell-cell adhesion and production of the polysaccharid intercellular adhesin (PIA). The PIA-production is variable and has an influence on the virulence and staphylococcal colonization. In the first part of this work it was shown that variable PIA-production depends on three different mechanisms which involve the insertion sequence IS256.

By comparison of different IS256-specific hybridization patterns of a biofilm forming wildtype *S. epidermidis* and its PIA-negative spontaneous variants, it could be shown that IS256 which is present in multiple copies in the genome of this strain is highly active. A more detailed analysis of this variants has shown that IS256 mediates genome rearrangements and causes the loss of biofilm formation in a number of PIA-negative variants.

Another group of biofilm-negative variants carries an IS256 inserted in the *ica*-Operon. The distribution of the *icaC*::IS256 insertion sites led us assume that *icaC* is a hot spot for the integration of IS256. *ica*::IS256 insertions have been detected in numerous *S. epidermidis* strains. Because this insertions are reversible they are a substantial cause for phase variation of biofilm formation in *S. epidermidis*.

A third group of variants shows the deletion of chromosomal DNA fragments of variable length which are accompanied with the loss of the *ica* genes and the ability to form biofilms. To answer the question which are the *ica*-neighbouring genes that get lost with the deletion of DNA-Fragments up to 250 kbp, we constructed an *S. epidermidis* wild type cosmid library. Nucleotide sequence information has been compared with the sequence of the reference strain *S. epidermidis* RP62A that is available in the genome database and was summarized in a gene map. Apart from some differences between this two *S. epidermidis* strains, it was remarkable that various open reading frames get lost, which show similarities to surface-associated proteins and which might be involved in adherence of bacteria. In addition, there are open reading frames showing similarities to transport proteins and numerous mobile DNA elements. These results indicate that the *ica* operon could be possibly a part of a pathogenicity island. Analysis of the deletion borders of a mutant has shown that homologous

recombination between two IS256 elements, oriented in the same direction, were responsible for the loss of more than 200 kbp DNA.

Because IS256 plays an essential role in the genome plasticity in *S. epidermidis* it was of special interest to elucidate the transposition mechanism of IS256 which was the second part of this work. The data obtained in this analyses have shown that IS256 transposes via an alternative transposition mechanism that is characterized by the formation of extrachromosomal circular DNA molecules. These DNA circles consist of complete IS256 copies in which the left and the right end of the IS element are connected via foreign DNA (circle junctions). It could be shown that these circle junctions were derived from upstream and downstream flanking DNA-sequences of the parental genetic locus. In addition to complete circles, incomplete circles were detected in which either the left or the right end of IS256 was truncated. These results suggest that either end of IS256 can attack the opposite terminus and, in contrast to other circle-forming IS elements, the strand-transfer reaction occurs with low specificity. Circular IS256 molecules could be shown both in recombinant *S. aureus* and *E. coli* strains, which indicates that in the circularization process host factors play a minor role. Mutagenesis of the gene for the putative transposase revealed that this gene product is essential for formation of IS256 circles.

There are grounds for the assumption that the formation of IS256-circles is the prerequisite for precise excision of the element during biofilm phase variation. Besides the generation of stable mutations through imprecise excision of the element is conceivable. In addition multiple copies of the element in the genome represent sites for homologous recombination. The combined data suggest that IS256 represents a driving force in the flexibility of the *S. epidermidis* genome. A detailed analysis of the molecular mechanisms which influence the transposition of IS256 could give an insight into the genetic adaptation of this important nosocomial pathogen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Der Genus *Staphylococcus*

Bei Bakterien der Gattung *Staphylococcus* handelt es sich um gram-positive, unbewegliche sporenlose Kokken. Sie sind Katalase-positiv und nicht bekapselt. Die Zellwand besteht aus Peptidoglykan und Teichonsäuren. Die Interpeptidbrücken werden aus Glycinbausteinen gebildet und sind der Angriffspunkt für Lysostaphin. Staphylokokken sind ein wichtiger Bestandteil der gesunden Haut- und Schleimhautflora bei Mensch und Tier. Der Genus umfaßt derzeit 33 bekannte Arten, deren wichtigster pathogener Vertreter die Koagulase-positive Spezies *Staphylococcus aureus* ist. Unter den Koagulase-negativen Spezies (KNS) ist *Staphylococcus epidermidis* der häufigste Besiedler der Körperoberfläche des Menschen. Diese Art hat in den letzten Jahren als opportunistischer Krankheitserreger große Aufmerksamkeit erlangt (Kloos und Bannermann, 1994).

### 2.2. Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken

Die Bedeutung von Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS), insbesondere *S. epidermidis*, als Krankheitserreger wurde lange Zeit unterschätzt. Schon 1967 zeigten Pulverer und Halswick, daß KNS die Ursache für verschiedene Infektionen sind. Trotzdem wurden sie weiterhin hauptsächlich als Kontaminanten von klinischen Isolaten angesehen. Heute ist bekannt, daß KNS wie *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* und *S. haemolyticus* eine wichtige Rolle als opportunistische Humanpathogene spielen. Sie sind unter den fünf am häufigsten isolierten Keimen aus nosokomialen Infektionen zu finden (Jarvis *et al.*, 1992). KNS sind u.a. für Blutvergiftungen bei Frühgeborenen verantwortlich (Sidebottom *et al.*, 1988; Patrick *et al.*, 1989). Mit der wachsenden Zahl immunsupprimierter Patienten und der zunehmenden Verwendung von Metallen und Kunststoffen in der modernen Medizin (z. B. Katheter- und Shuntsysteme, künstliche Gelenke und Herzklappen) hat sich *S. epidermidis* als einer der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen im Zusammenhang mit Fremdkörpern etabliert (Emori *et al.*, 1993; Kloos und Bannermann, 1994; Rupp und Archer, 1994). Bayston und Penny waren 1972 die ersten, die die Besiedelung von Implantaten mit Bakterien und extrazellulärem Material beschrieben haben. Man spricht hierbei von der Ausbildung eines Biofilms (Bayston und Penny, 1972). Die Fähigkeit von *S. epidermidis*, auf Implantaten mehrschichtige Biofilme zu bilden ist der wichtigste Pathomechanismus bei Polymer-assoziierten Infektionen (Peters *et al.*, 1988a; Peters *et al.*, 1988b). Zwei weitere wichtige Aspekte sind die ausgeprägte Neigung zur phänotypischen und genotypischen Variabilität und die Multiresistenz vieler Stämme, die neben der Fähigkeit zur Biofilmbildung dazu geführt haben, daß sich gerade *S. epidermidis* an diese ungewöhnlichen Habitate anpassen konnte.

### 2.3. Antibiotikaresistenz bei Staphylokokken

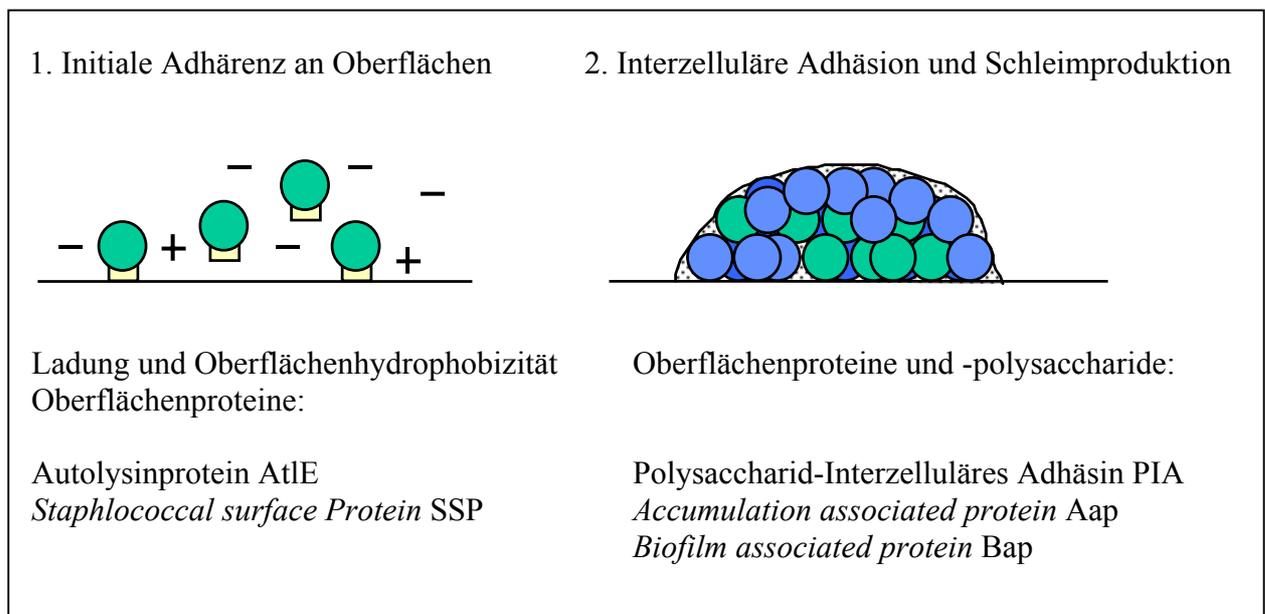
Staphylokokken sind durch das Auftreten multiresistenter Stämme schwer therapierbar. In Mitteleuropa sind mittlerweile 15,2% der nosokomialen *S. aureus* und 54% der KNS gegen Oxacillin resistent (Kresken *et al.*, 2000). Die Oxacillinresistenz geht mit einer Parallelresistenz gegen Antibiotika aus nicht verwandten Strukturklassen einher, wodurch viele Staphylokokkenstämme heute nur noch mit Reserveantibiotika wie Glykopeptiden oder Streptograminen behandelbar sind. Die Oxacillinresistenz wird durch das *mecA*-Gen vermittelt. *mecA* kodiert für ein zusätzliches Penicillinbindeprotein (PBP2a), an das  $\beta$ -Lactame nur vermindert binden können, und das damit zur Resistenz gegen alle Verbindungen dieser Stoffklasse führt. Das *mecA*-Gen ist auf einem 51kb-großen DNA-Element lokalisiert, das durch *direct* und *inverted repeats* begrenzt wird und die genetische Information für mehrere Transposons und Insertionssequenzen, Site-spezifische Rekombinasen und integrierte Plasmide enthält (Ito *et al.*, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die *mec*-DNA ein autonomes genetisches Element ist, das mobilisierbar ist und auf Oxacillin-sensitive Stämme übertragen werden kann (Cristomo *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2001a; Katayama *et al.*, 2000). In Analogie zum Begriff der Pathogenitätsinseln, auf denen Virulenz-assoziierte Gene lokalisiert sind, bezeichnet man daher die *mec*-DNA auch als Resistenzinsel (Ohlsen *et al.*, 1999). Vermutlich hat sowohl die klonale Ausbreitung als auch der Neuerwerb von Resistenzgenen durch horizontalen Gentransfer zum starken Anstieg multiresistenter Stämme in Krankenhäusern beigetragen.

### 2.4. Adhärenz und Biofilmbildung bei *Staphylococcus epidermidis*

Die Biofilmbildung von *S. epidermidis* ist ein komplexer Prozeß, der noch nicht vollständig verstanden ist. An der Biofilmbildung sind sowohl Proteine als auch Polysaccharide beteiligt, und sie vollzieht sich in zwei Schritten (Abb. 2.1.):

1. Zunächst haften die Zellen auf der Polymeroberfläche als einschichtiger Bakterienrasen. Die sogenannte initiale Adhärenz wird nach heutigem Kenntnisstand neben unspezifischen Faktoren wie Ladung und Oberflächenhydrophobizität der Bakterien auch durch spezifische oberflächenassoziierte Proteine vermittelt (Christensen *et al.*, 1990a). Hierzu gehören das *staphylococcal surface protein* SSP (Timmermann *et al.*, 1991) und das Autolysinprotein AtlE (Heilmann *et al.*, 1997). Bei SSP handelt es sich um ein ca. 280 kDa großes fimbrienähnliches Polymer, das proteolytisch empfindlich ist und auf der Oberfläche der Bakterien vorkommt (Veenstra *et al.*, 1996). AtlE ist ein 60 kDa großes Oberflächenprotein, das ein Anheften an Polystyren vermittelt, aber auch die Fähigkeit zur Vitronectinbindung aufweist (Heilmann *et al.*, 1997).
2. In einem zweiten Schritt kommt es zum kumulativen Wachstum und zur Ausbildung eines mehrschichtigen Biofilms, wobei sich die Bakterien eingebettet in einer

extrazellulären Matrix befinden. An diesem Schritt sind sowohl Proteine als auch Polysaccharide beteiligt. Von Hussain *et al.* wurde 1997 das *accumulation associated protein* Aap beschrieben. Das Fehlen eines 140 kDa-Proteins bei einer Mitomycin-Mutante verursachte einen Defekt in der Akkumulation von *S. epidermidis* auf Glas- und Plastikoberflächen. Kürzlich wurde ein weiteres Protein bei *S. aureus* beschrieben, das *biofilm associated protein* (Bap) (Cucurella *et al.*, 2001). Es handelt sich um ein Oberflächenprotein, das sowohl am Anheften der Bakterien an künstliche Oberflächen, als auch an der Akkumulation beteiligt ist. Ein Homolog von Bap in *S. epidermidis* ist wahrscheinlich, da eine entsprechende Nukleotidsequenz bei *S. epidermidis* RP62A vorhanden ist (s. Anhang). Von den an der Biofilmbildung beteiligten Polysacchariden ist das Polysaccharid-Interzelluläre-Adhäsion (PIA) am besten charakterisiert (Mack *et al.*, 1994). Bei diesem Adhäsion handelt es sich um ein lineares  $\beta$ -1,6 verknüpftes Glukosaminoglykan, das die Adhärenz der Zellen untereinander vermittelt. Zum größten Teil sind die Glukosaminylreste N-acetyliert. Neben nicht acetylierten Resten kommen auch Ester-gebundene Succinylreste vor, die einen anionischer Charakter haben (Mack *et al.*, 1996b). Von Pier *et al.* wurde 1988 das Polysaccharid Adhäsion PS/A beschrieben, das aus Galactose, Glucosamin, Galactosamin und Alduronsäure besteht. Aus heutiger Sicht scheinen sowohl PIA, PS/A und SAA (*slime associated antigen*), 1985 von Christensen *et al.* beschrieben, identisch zu sein und werden im Folgenden als PIA bezeichnet. PIA ist außerdem essentiell für die Hämagglutination von Erythrozyten (Rupp *et al.*, 1995; Gatermann *et al.*, 1993, Mack *et al.*, 1999b).



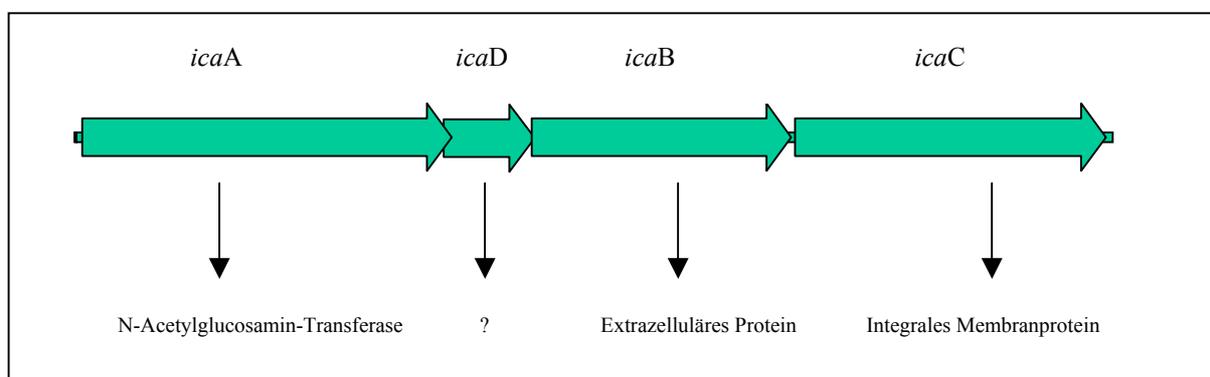
**Abb. 2.1.:** Die zwei Schritte der Biofilmbildung: Zusammenfassung der beteiligten Faktoren

An der Synthese von PIA *in vivo* und *in vitro* sind mehrere Proteine beteiligt, deren genetische Information im sogenannten *ica* (*intercellular adhesin*)-Operon lokalisiert ist

(Heilmann *et al.*, 1996a; Mack *et al.*, 1999a; Heilmann *et al.*, 1996b; Gerke *et al.*, 1998). Das *ica*-Operon wurde bisher fast ausschließlich in nosokomialen *S. epidermidis* Isolaten nachgewiesen. Bei saprophytären Isolaten von der Haut gesunder Personen, die keinen Krankenhauskontakt hatten, fand man das Gencluster dagegen nur selten: bei 85% der Blutkulturisolate im Gegensatz zu 6% bei Saprophyten (Ziebuhr *et al.*, 1997; Frebourg *et al.*, 2000). In zwei verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, daß das Vorhandensein des *ica*-Operons und die damit verbundene Synthese von PIA für die Pathogenese von *S. epidermidis* als Auslöser von fremdkörperassoziierten Infektionen essentiell ist (Mack *et al.*, 1994; Rupp *et al.*, 1999a und 1999b). Diese Daten lassen vermuten, daß es sich hier um einen Faktor handelt, dessen Erwerb zur Entwicklung von pathogenen *S. epidermidis* beigetragen haben könnte.

Das *ica*-Operon enthält vier Gene (*ica*A*DB*C), die für die Produktion des PIA benötigt werden (Abb. 2.2.). Das *icaA*-Genprodukt zeigt Ähnlichkeiten zu einer N-Acetylglucosamin-Transferase von *Rhizobium meliloti* und ist vermutlich als Glycosyltransferase an der Synthese von PIA beteiligt. IcaB enthält eine typische Signalsequenz und ist demzufolge im Kulturüberstand zu finden. Es weist keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen auf und seine genaue Funktion ist nicht bekannt. Die von *icaC* und *icaD* kodierten Proteine zeigen Eigenschaften von Membranproteinen. IcaC stellt einen putativen Kanal für die Translokation von PIA durch die Membran dar (Heilmann *et al.* 1996). Nur durch Koexpression von *icaA*, *icaD* und *icaC* ist die PIA-Synthese gewährleistet (Gerke *et al.*, 1998).

Das *ica*-Operon wurde auch bei *S. aureus* und anderen Staphylokokken-Spezies nachgewiesen. Im Gegensatz zu *S. epidermidis* besitzen alle untersuchten *S. aureus*-Isolate das *ica*-Operon, aber nur wenige exprimieren dieses auch und produzieren damit PIA *in vitro* (McKenney *et al.*, 1999; Cramton *et al.*, 1999). Bei *S. caprae* konnte mittels Hybridisierung mit geringer Stringenz eine Nukleotidsequenz identifiziert werden, die der *ica*-Sequenz von *S. epidermidis* entspricht (Allignet *et al.*, 1999).



**Abb. 2.2.:** Genomische Organisation des *ica*-Operons, das für die Synthesenzyme des Polysaccharid-Interzellulären Adhäsins von *S. epidermidis* kodiert.

## 2.5. Phasenvariation und Phänotypvariabilität

Klinische Isolate von *Staphylococcus aureus* und *S. epidermidis* sind dafür bekannt, ihre phänotypischen Eigenschaften sehr schnell ändern zu können. So können innerhalb einer einzigen Population Merkmale wie Wachstumsrate, Produktion von Exoproteinen, Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Adhäsion sehr heterogen ausgeprägt sein (Ziebuhr *et al.*, 1997; Baselga *et al.*, 1993; Christensen *et al.*, 1990b; Deighton *et al.*, 1992 und Mempel *et al.*, 1994). Man nimmt an, daß diese Phänotypvariabilität zum besseren Überleben unter wechselnden Umweltbedingungen beiträgt. Vor allem die Organisation von Bakterien in Biofilmen wird als entscheidender Mechanismus im Überleben unter ungünstigen externen Einflüssen angesehen (Costerton *et al.*, 1999). Kürzlich wurden einige Gene bei *S. aureus* identifiziert, die während des Wachstums in einem Biofilm wesentlich stärker exprimiert werden als in den entsprechenden planktonisch wachsenden Zellen. Hierzu gehören sowohl Glykolyse-Enzyme, als auch ein Protein, das Ähnlichkeit zu einem Streß-Protein aufweist, das essentiell bei der Bildung von Biofilmen bei Pseudomonaden ist (Becker *et al.*, 2001).

Auch die Expression des *ica*-Operons ist variabel. Nach Subkultivierung einer PIA-positiven Einzelkolonie erhält man eine Population, in der sowohl PIA-exprimierende Klone, als auch PIA-negative Klone nachzuweisen sind. Neben regulatorischen Effekten auf die Biofilmbildung wie der Verfügbarkeit von O<sub>2</sub>, Eisen, Glukose und NaCl (Cramton *et al.*, 2001; Deighton *et al.*, 1993) und dem Einfluß von subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen (Rachid *et al.*, 2000a) konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß auch unterschiedliche genetische Mechanismen an der Variation der PIA-Expression beteiligt sind (Ziebuhr *et al.*, 2000b). Diese Mechanismen umfassen das reversible An- und Ausschalten der PIA-Produktion und den irreversiblen Verlust der Biofilmbildung aufgrund chromosomaler DNA-Umordnungen (Ziebuhr *et al.*, 2000a). Es lassen sich demnach drei unterschiedliche Gruppen von Biofilm-negativen Varianten beschreiben. Die erste Gruppe beinhaltet Varianten, deren *ica*-Expression durch den Einfluß äußerer Faktoren sehr gering oder nicht vorhanden ist. Die Expression ist jedoch durch eine Änderung der Umweltbedingungen induzierbar. Die Vertreter der zweiten Gruppe werden als Phasenvarianten bezeichnet, da es ihnen möglich ist, von einem relativ stabilen nicht PIA-produzierenden Stadium in ein PIA-produzierendes Stadium zurückzukehren. Ein Mechanismus, der zur Phasenvariation der *ica*-Expression führt ist die Insertion und präzise Exzision des natürlich vorkommenden Insertionselements IS256 in die und aus den *ica*-Genen (Ziebuhr *et al.*, 1999). Das *ica*-Operon ist ein *Hot-spot* für die Integration des IS-Elements. IS256-Insertionsmutanten konnten sowohl *in vitro* als auch in *S. epidermidis*-Stämmen einer Polymer-assoziierten Infektion isoliert werden (Cho und Ziebuhr, im Druck). Da IS256 zusammen mit der 8-bp-Duplikation präzise wieder aus den entsprechenden Genen herausgeschnitten wird, könnte es als genetischer Schalter für die Phasenvariation der *ica*-Expression dienen. Trotzdem spielt dieser Mechanismus nur in 25 bis 30% der

Phasenvarianten eine Rolle. Das Phänomen der *ica*-Phasenvariation konnte ebenfalls in IS256-negativen Stämmen beobachtet werden. Scheinbar sind neben IS256 auch andere IS256-unabhängige Mechanismen an der Phasenvariation beteiligt. Weiterhin liegt die Vermutung nahe, daß IS256 nicht nur an der Phasenvariation beteiligt ist, sondern auch am irreversiblen Verlust von großen DNA-Bereichen in Biofilm-negativen Varianten. Diese Varianten zählen zu einer dritten Gruppe von *S. epidermidis*-Stämmen, die auch nach mehreren Passagen nicht wieder zum Biofilm-positiven Phänotyp revertieren können. Umfangreiche Genomumordnungen haben dazu geführt, daß das *ica*-Operon und daran angrenzende DNA-Bereiche verloren gehen.

## 2.6. Mobile genetische Elemente

Mobile genetische Elemente sind DNA-Segmente, die in der Lage sind, sich von einem Ort im Genom zum einem anderen zu bewegen (Transposition). Sie spielen eine fundamentale Rolle als Motor für die Genomplastizität in allen drei biologischen Reichen. Sie können Genom-Umordnungen auslösen und sind eine wichtige Ursache für Mutationen. In Prokaryonten sind sie häufig mit Genen für zusätzliche Eigenschaften assoziiert, wie z. B. Virulenzgene, Resistenzgene und Gene für die Verwertung von ungewöhnlichen Substraten. Darüber hinaus können sie Einfluß auf die Expression von nachfolgenden Genen haben (Berg und Howe, 1989; Haren *et al.*, 1999).

Ein Hauptmerkmal zur Unterscheidung der verschiedenen mobilen genetischen Elemente ist deren Transpositionsreaktion: Verläuft die Transpositionsreaktion ausschließlich über DNA-Intermediate so spricht man von Transposons oder IS-Elementen, die sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten vorkommen. Ist ein RNA-Intermediat an der Transpositionsreaktion beteiligt handelt es sich um Retroviren oder Retrotransposons, die nur bei Eukaryonten zu finden sind. Die mobilen DNA-Elemente können sehr komplex aufgebaut sein, wie z. B. der Bakteriophage Mu, der neben Enzymen für die Transposition viele Proteine für seinen viralen Lebenszyklus kodiert. Am einfachsten sind die Insertionselemente (IS-Elemente) organisiert. Sie bestehen aus zwei kurzen *inverted terminal repeats* die einen oder zwei offene Leserahmen (ORFs) flankieren. Diese ORFs tragen meist nur Gene für Proteine, die für die eigene Mobilität benötigt werden. Diese sog. Transposasen erkennen und prozessieren die Enden des Elements und leiten damit die Transpositionsreaktion ein (s.u.). Bis heute sind mehr als 500 bakterielle IS-Elemente beschrieben worden, die aufgrund ihrer genetischen Organisation in 17 verschiedenen Familien eingeteilt werden können (Mahillon und Chandler, 1998).

### 2.6.1. Transpositionsmechanismen

Die Transpositionsreaktion beginnt mit der endonukleolytischen Spaltung der Phosphodiesterbindungen an den Enden des IS-Elements worauf der Transfer der freien 3'-OH-Enden in das DNA-Zielmolekül erfolgt. Verdoppelt sich das Element während dieser Reaktion, spricht man von replikativer Transposition, bleibt die Kopienzahl nach der Transpositionsreaktion gleich, bezeichnet man den Mechanismus als *cut-and-paste* Transposition.

Im Verlauf der replikativen Transposition wird nur das 3'-Ende des IS-Elements in beiden DNA-Strängen geschnitten und das Donor-DNA-Rückgrat bleibt über einen Einzelstrang mit dem 5'-Ende des IS-Elements verbunden. Durch den Transfer des 3'-Endes in den Zielstrang entsteht eine potentielle Replikationsgabel. Das IS-Element wird verdoppelt und es kommt zur Ausbildung eines sog. Kointegrats. Dieses kann mit Hilfe einer Site-spezifischen Rekombinase wieder aufgelöst werden. Mobile genetische Elemente, die diesen Weg beschreiten sind z. B. der Bakteriophage Mu und Elemente der Tn3 und IS6-Familie.

Bei der *cut-and-paste* Transposition kommt es zur vollständigen Separation des IS-Elements aus dem Donor-DNA-Strang, bevor der Strangtransfer in das Ziel-Molekül stattfindet. Der erste Schritt, bei dem ein Strang geschnitten wird und ein freies 3'-OH-Ende entsteht verläuft in gleicher Art und Weise wie bei der replikativen Transposition, jedoch kann es entweder zum Einzelstrangbruch an einem 3'-Ende des IS-Elements kommen, oder aber zu einem zweiten Strangbruch auch an dem 3'-Ende des IS-Element im komplementären Strang (a). Es können im Folgenden unterschiedliche Strategien zur Prozessierung des zweiten Strangs verfolgt werden, wodurch das freie 5'-Ende entsteht (b).

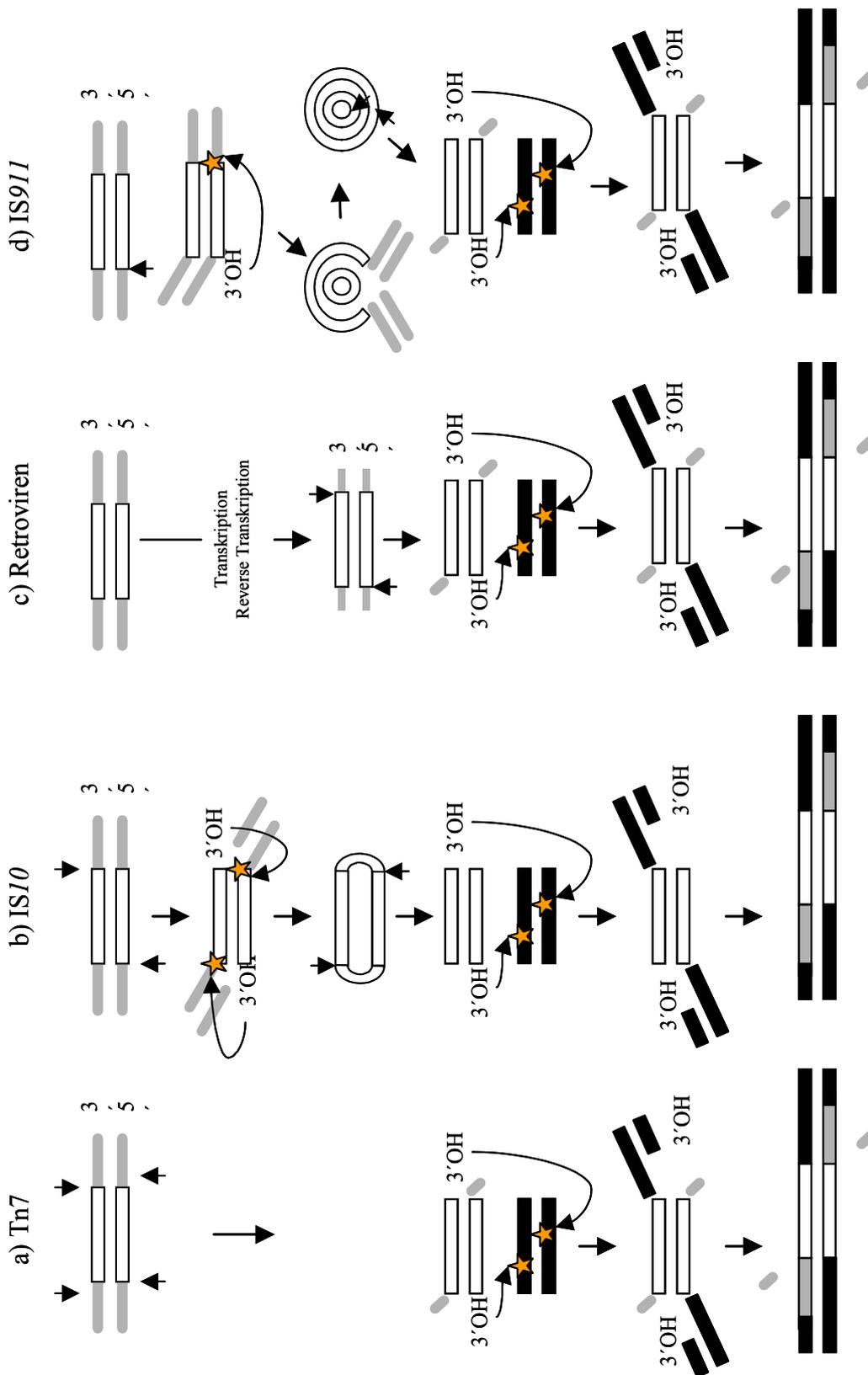
(a): Die meisten Transposasen besitzen eine Triade aus Aminosäuren, das DDE-Motiv (Glutamat, Glutamat, Aspartat) (Katzman *et al.*, 1991; Kulkosky *et al.*, 1992). Dieses Motiv ist wahrscheinlich für die von Transposasen katalysierte Reaktion wichtig, denn es ist stark konserviert und bei Transposasen vieler verschiedener Eubakterien weit verbreitet. Ein charakteristisches Merkmal dieser Enzyme ist, daß alle eine sehr ähnliche Reaktion katalysieren, nämlich den nukleophilen Angriff auf einen der beiden DNA-Stränge und das Freisetzen eines 3'-OH-Endes am Transposonende. Die konservierte Aminosäuretriade DDE scheint direkt in die Katalyse involviert zu sein (Bushman *et al.*, 1993; Vink *et al.*, 1993). Sie ist ein Teil des katalytischen Zentrums und steht dabei in Wechselwirkung mit zweiwertigen Metallionen ( $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ ) (Mizuuchi, 1997). Als Nukleophil dient in den meisten Fällen  $H_2O$ , wodurch die Phosphodiesterbindung hydrolysiert wird. Hierbei handelt es sich um eine Ein-Schritt-Reaktion, bei der es zu einer Inversion der Chiralität der Phosphorbindung kommt. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zur Site-spezifischen Rekombination, bei der in einem Enzym-Substrat-Komplex die ursprüngliche Konfiguration in einem zweiten Reaktionsschritt wieder hergestellt wird (Zwei-Schritt-Reaktion) (Mizuuchi und Adzuma

1991). Die sog. Einzelstranghydrolyse kann entweder an einem oder aber an beiden Enden des IS-Elements stattfinden, so daß ein oder zwei reaktive 3'-OH-Enden entstehen (Abb. 2.3). Ein oder beide 3'-OH Enden können die Ziel-DNA in einem Transesterifizierungsschritt angreifen, was einen Strangtransfer der Transposase-DNA in die Ziel-DNA zur Folge hat (Mizuuchi, 1992).

(b):

Nach einem ersten, bei allen Transposasen sehr ähnlichen Reaktionsschritt (a) folgt ein Schritt, bei dem der zweite komplementäre Transposonstrang prozessiert wird und der bei verschiedenen Transposasen stark variieren kann (Turlan und Chandler, 2000). Die einfachste Art, ein DNA-Element von der Donor-DNA zu separieren ist ein Doppelstrangsschnitt an beiden Enden des IS-Elements (Abb. 2.3. a). Dieses Prinzip findet man bei Tn7. Zwei Tn7-Proteine, TnsA und TnsB sind in die Hydrolyse und Strangtransferreaktionen involviert, wobei TnsA die Spaltung am 3'-Ende des Transposons und TnsB die Spaltung am 5-Ende katalysiert (May und Craig, 1996). Auch bei IS10 kommt es zur Doppelstrangspaltung, wobei ein Enzym-Monomer drei Reaktionsschritte katalysiert (Abb. 2.3. b). Zuerst erfolgt die Hydrolyse des 3'-Endes. Das freie 3'-OH-Ende reagiert aber im Folgenden nicht mit dem Zielstrang, sondern greift das entgegengesetzte Ende des IS-Elements im komplementären Strang an, wodurch es zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur und zur Freisetzung des IS-Elements aus der umgebenden DNA kommt. Im dritten Schritt wird die Phosphodiesterbindung wieder hydrolysiert und es entsteht ein freies 3'-OH-Ende, das den Angriff auf die Ziel-DNA durchführt (Bolland und Kleckner, 1996; Bolland und Kleckner, 1995; Kennedy *et al.*, 1998). Bei diesen beiden Möglichkeiten spricht man von konservativer Transposition. Daneben gibt es die sogenannten alternativen Wege der Transposition. Hierzu zählen die Mechanismen der Retroviren und die Transposition über zirkuläre Moleküle, wie es bei IS911 beschrieben wurde. Retroviren separieren sich von der flankierenden DNA durch deren Transkription. Die daraus resultierenden RNA wird über eine reverse Transkriptase in einen DNA-Doppelstrang umgeschrieben, der in das Wirtsgenom integriert werden kann. Hierbei handelt es sich um einen replikativen Mechanismus, da die ursprüngliche Kopie des Retrovirus in der Donor DNA erhalten bleibt (Abb. 2.3. c). Eine dritte Möglichkeit, wobei der zweite Strang gespalten wird und damit das mobile Element von der Donor DNA getrennt wird verläuft über eine zirkuläres Molekül (Abb. 2.3. d). Eine Reaktion dieser Art findet man bei Mitgliedern der IS3, IS30 und IS21-Familie (Mahillon und Chandler, 1998). Am Beispiel von IS911 aus der IS3-Familie soll dieses Prinzip kurz erläutert werden. Der erste Schritt, eine Transposase-katalysierte Hydrolyse, erzeugt eine freie 3'-OH-Gruppe an einem Ende des Transposons, im Unterschied zu Tn7 und IS10 ist diese Reaktion aber nicht symmetrisch und erfolgt nur an einem Transposonende. Anders als bei IS10, wo der komplementäre Strang angegriffen wird, greift das 3'-OH-Ende denselben Strang am entgegengesetzten Transposonende an und es entsteht ein zirkularisierter Einzelstrang, wobei Transposonanfang und -ende durch einen Einzelstrangverbindung zusammengehalten werden. Wie aus dieser Einzelstrangstruktur ein doppelsträngiges Molekül entsteht ist nicht geklärt, es könnten Rekombinations- oder Replikationsereignisse eine Rolle spielen. Im resultierenden zirkulären

Transposonmolekül sind Transposonanfang und -ende benachbart. Die zirkulären Moleküle können sich wieder auflösen und in einen DNA-Zielstrang integrieren.



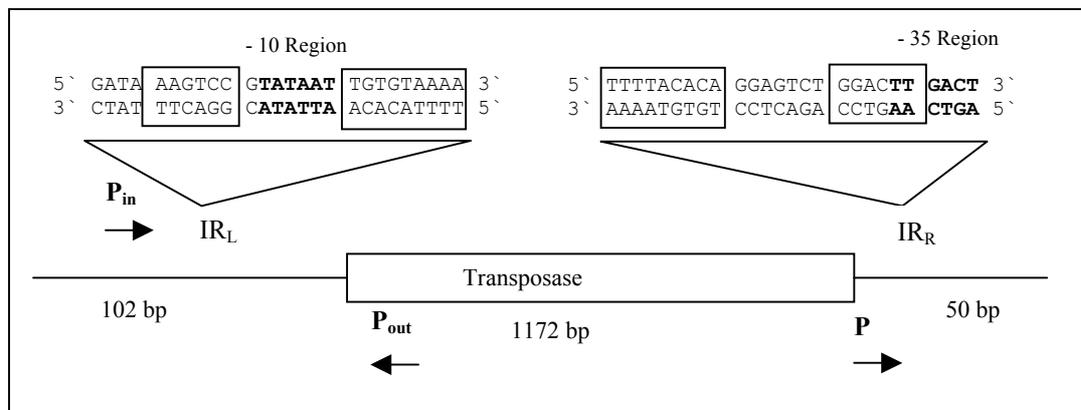
**Abb. 2.3.:** Verschiedene Mechanismen des Donorstrangbruchs und -transfers im Verlauf unterschiedlicher Transpositionsreaktionen. Die Sternchen stellen Phosphatgruppen dar, die von freien 3'-OH-Enden angegriffen werden. Siehe Text für Erläuterungen. Abbildung in Anlehnung an Haren *et al.*, 1999.

### 2.6.2. Das Insertionselement IS256

Das Insertionselement IS256 ist ein 1324 bp großes mobiles genetisches Element, das mit dem Aminoglykosidresistenz-Transposon Tn4001 assoziiert ist, aber auch in freien Kopien im Genom von multiresistenten Staphylokokken und Enterokokkenisolaten vorkommt (Byrne *et al.*, 1990; Byrne *et al.*, 1989; Dyke *et al.*, 1992; Morvan *et al.*, 1997; Rice und Thorisdottir, 1994). IS256-ähnliche Elemente sind auch in Mykobakterien, *Rhizobium meliloti*, Corynebakterien und einer Reihe weiterer Prokaryonten beschrieben worden (Mahillon und Chandler, 1998). Über die Funktionsweise von IS256 ist nur wenig bekannt. Es liegen bisher keine experimentellen Daten über den Transpositionsmechanismus und die Targetsiterkennung des Elements vor. Wie in Abbildung 2.4. zu sehen, besteht das IS-Element aus einem offenen Leserahmen, der eine putative Transposase kodiert und angrenzenden Sequenzen, die terminale *inverted repeats* (IR) enthalten. Es wurden putative Promotoren beschrieben, die möglicherweise an der Transkriptionsregulation von IS256 beteiligt sind und die P, P<sub>in</sub> und P<sub>out</sub> genannt wurden. P<sub>in</sub> ist der Promotor für das Transposase-Gen, P<sub>out</sub> ist ein aktiver Promoter, der durch kurze *antisense*-RNA-Transkripte die Translation des Transposasesgens reguliert und auf dem komplementären Strang lokalisiert ist. P ist ein möglicher Promotor für die Expression von stromabwärtsliegenden Genen. Zusätzlich zeigen 6 bp im IR<sub>R</sub> starke Ähnlichkeit zu der -35-Region von *Bacillus subtilis*. Im geeigneten Abstand zusammen mit einer -10-Region der Zielsequenz kann ein Hybridpromoter gebildet werden (Byrne *et al.*, 1989). Auch das kann dazu führen, daß das nachfolgende Gen verstärkt exprimiert wird, was einen Einfluß auf den Phänotyp der Insertionsmutanten hat (Maki und Murakami, 1997) und auch bei anderen IS-Elementen beschrieben wurde wie z.B. IS257, IS1, IS2 und IS911 (Simpson *et al.*, 2000; Prentki *et al.*, 1986; Jaurin und Normark, 1983; Ton-Hoang *et al.*, 1997). Darüber hinaus ist im IR<sub>L</sub> ein Bereich zu finden, der einer -10-Region gleicht. Wenn zwei IS-Elemente in gleicher Richtung in Form von *head-to-tail* Dimeren oder als zirkuläre DNA-Fragmente vorliegen, kommt es zur Bildung eines Promotors aus -10-Region des IR<sub>L</sub> und -35-Region des IR<sub>R</sub>, was zu erhöhter *tnp*-Expression führen kann (Mahillon und Chandler, 1998).

Einige interessante Beobachtungen legen nahe, daß IS256 auch eine wichtige Rolle bei der Evolution der Multiresistenz in *Enterococcus faecalis* spielt (Rice *et al.*, 1994; Rice *et al.*, 1995a; Rice *et al.*, 1995b; Rice *et al.*, 1998). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß IS256 vermehrt in Isolaten aus Infektionen im Vergleich zu Hautisolaten vorkommt (Cho und Ziebuhr, unveröffentlicht). Das deutet darauf hin, daß IS256 möglicherweise einen Virulenzmarker von *S. epidermidis* darstellt. Besondere Aufmerksamkeit gilt der außerordentlichen Aktivität von IS256. Früher noch als stabiles genetisches Element zur Typisierung von Staphylokokken beschrieben (Deplano *et al.*, 1997), konnte nun gezeigt werden, daß IS256 überaus aktiv ist und damit eine vielfältige Veränderung des Genoms verursacht, was sich in reversiblen Geninaktivierungen, DNA-Umordnungen und großen chromosomalen Deletionen mit einem Einfluß auf Virulenz- und Resistenzeigenschaften

ausdrückt (Ziebuhr *et al.*, 1999, Ziebuhr *et al.*, 2000a; Ziebuhr *et al.*, 2000b; Ziebuhr *et al.*, 2001).



**Abb. 2.4.:** Genetische Struktur des Insertionselements IS256. IR<sub>R</sub>, IR<sub>L</sub>: *inverted repeat* rechts/links; P<sub>in</sub>: Transposase-Promotor; P<sub>out</sub>: Promotor für *antisense*-RNA-Transkripte; P: Promotor für die Expression von stromabwärts-liegenden Genen; Kästchen zeigen die exakten *inverted repeats*; die putativen -10 und -35-Regionen sind fett gedruckt.

## Ziel der Arbeit

Durch seine Eigenschaft auf implantierten Fremdkörpern zu haften und Biofilme auszubilden, hat sich *Staphylococcus epidermidis* als einer der häufigsten Erreger nosokomialer Infektionen etabliert. Vorausgegangene Arbeiten haben gezeigt, daß Staphylokokken über eine außergewöhnliche phänotypische und genotypische Variabilität verfügen, die möglicherweise vorteilhaft für die Anpassung an veränderliche Umweltbedingungen ist.

Ziel der Arbeit war es, die genetischen Mechanismen, die zu dieser Variabilität von *S. epidermidis* beitragen, zu untersuchen. Einen Schwerpunkt bildete dabei die Rolle des IS-Elements IS256 bei der heterogenen Biofilmproduktion und dessen Einfluß auf die Genomplastizität von *S. epidermidis*.

## 3. Material

### 3.1. Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Verbrauchsmaterialien lieferten die Firmen Costar, Eppendorf, Greiner, Sarstedt und Schleicher & Schuell.

#### 3.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, Difco, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Oxoid, Pharmacia Biotech, Roth, Serva und Sigma geliefert.

#### 3.1.2. Enzyme

Die Enzyme und Inkubationspuffer stammten von Boehringer, Eurogentec, Gibco-BRL, New England Biolabs, MBI-Fermentas, Pharmacia, Promega und Stratagene. Themostabile Polymerasen für die PCR-Amplifikation wurden von Eurogentec (Dap-Goldstar-Polymerase) und Gibco-BRL (Taq-Polymerase) bezogen.

Es wurden folgende Kits verwendet:

- ECL™, Direct Nucleic Acid Labeling and Detection System, Amersham
- Gene Clean® Kit, Dianova
- PCR-Purification Kit, QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN Thermo-Sequenase fluorescence-labelled primer cycle sequencing kit, Amersham SuperCos 1 Cosmid Vector Kit, Stratagene
- Gigapack III XL Packaging Extract, Stratagene
- pGEM-T-Easy Vektor System, Promega
- ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin Elmer
- Sure Clone™ Ligation Kit, Pharmacia

#### 3.1.3. Antibiotika

<u>Antibiotikum</u>	<u>Stammlösung</u>
---------------------	--------------------

Ampicillin (Sigma)	100 mg/ml H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol (Serva)	20 mg/ml 70% EtOH
Gentamicin (Sigma)	10 mg/ml H <sub>2</sub> O

Die Aufbewahrung aller Antibiotika-Stammlösungen erfolgte bei -20°C.

## 3.2. Bakterienkultur

### 3.2.1. Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>S. epidermidis</i> RP62A	<i>ica</i> ADBC-positiv, IS256-positiv	ATCC 35984
<i>S. epidermidis</i> 307	<i>ica</i> ADBC-positiv, IS256-positiv, starker Biofilmbildner, Blutkulturuisolat	diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 307/95	Biofilm-negativ, <i>icaC</i> ::IS256-Insertionsmutante von <i>S. epidermidis</i> 307	diese Arbeit
<i>S. carnosus</i> TM300	<i>ica</i> ADBC-negativ, Biofilm-negativ	Götz <i>et al.</i> , 1990
<i>S. aureus</i> RN4220	Restriktionsnegatives Derivat von Stamm <i>S. aureus</i> 8325/4	Kreiswirth <i>et al.</i> ; 1983
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	Wirtsstamm für die Konstruktion von rekombinanten Plasmiden; <i>lacZ</i> -negativ	MBI-Fermentas
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Wirtsstamm für die Konstruktion von rekombinanten Plasmiden; <i>lacZ</i> -negativ	MBI-Fermentas
<i>Escherichia coli</i> GM2163	Adenin/Cytosin-Methylase-Mutante	MBI-Fermentas

ATCC: American Type Culture Collection

### 3.2.2. Medien zur Bakterienkultur

Agar und Trockensubstanzen für die Komplettmedien stammten von den Firmen Difco, OXOID bzw. Gibco BRL. Die verwendeten Medien wurden durch 20-minütiges Autoklavieren bei 120°C sterilisiert. Die Zugabe von Antibiotika und anderen Hitze-empfindlichen Substanzen erfolgte nach dem Abkühlen der Medien auf ca. 50°C. Bei Bedarf wurden 1,5 % Agar zur Herstellung von Festmedien zugesetzt.

BHI-Medium	BHI (Brain Heart Infusion; OXOID)	37 g
	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	
LB (Luria Bertani)-Medium	Caseinhydrolysat	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	

MH-Medium	Müller Hinton Broth (Oxoid)	21 g
	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	
TSB-Medium	Trypticase Soy Broth (Difco)	30 g
	H <sub>2</sub> O ad 1000 ml	
Kongorotagar	TSB	30 g
	Glucose	10 g
	Agar	15 g
	H <sub>2</sub> O	ad 900 ml
	Kongorot (getrennt in 100 ml H <sub>2</sub> O autoklavieren)	0,8 g

CDM-Medium (chemisch definiertes Medium bzw. Minimalmedium):

Es wurden fünf Chemikalien-Gruppen getrennt vorbereitet und nach dem Autoklavieren Gruppen 1 und 5) bzw. nach Sterilfiltration (Gruppen 2, 3 und 4) zusammengegeben. Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt. Die Mengenangaben beziehen sich auf 1 l Medium.

#### Gruppe 1

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	200 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub>	5 mg

#### Gruppe 2

Alanin	100 mg
Arginin	100 mg
Aspartat	100 mg
Cystein	50 mg
Glutamat	100 mg
Glycin	100 mg
Histidin	100 mg
Isoleucin	100 mg
Leucin	100 mg
Lysin	100 mg
Methionin	100 mg
Phenylalanin	100 mg
Prolin	100 mg
Hydroxyprolin	100 mg
Serin	100 mg
Threonin	200 mg
Tryptophan	100 mg

Tyrosin	100 mg
Valin	100 mg

#### Gruppe 3

P-Aminbenzoesäure	0,2 mg
Biotin	0,2 mg
Niacinamid	1 mg
$\beta$ -Nicotinamid Adenin Dinuklotid	2,5 mg
Pyridoxamin	1 mg
Riboflavin	2 mg

#### Gruppe 4

Adenin	20 mg
Guanin-Hydrochlorid	20 mg
Uracil	20 mg

#### Gruppe 5

Glukose	5000 mg
$\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	300 mg
$\text{NaHCO}_3$	500 mg

### **3.3. Nukleotide und Oligonukleotide**

#### **3.3.1. Nukleotide**

dATP (100 mM)	Gibco-BRL
dCTP (100 mM)	Gibco-BRL
dTTP (100 mM)	Gibco-BRL
dGTP (100 mM)	Gibco-BRL

#### **3.3.2. Oligonukleotide**

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG BIOTECH GmbH (Ebersberg) und Sigma-ARK (Darmstadt) hergestellt. Infrarotmarkierte Oligonukleotide wurden von der Firma MWG hergestellt.

Häufig verwendete Primer und deren Schmelztemperaturen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die Sequenzen bestimmter Primer sind im Text oder im Anhang II zu finden.

Primer	Sequenz 5 → 3'	Tm [°C]
icaA1	gac ctc gaa gtc aat aga ggt	57,9
icaA2	ccc agt ata acg ttg gat acc	57,9
icaB1	atg gct taa agc aca cga cgc	59,8
icaB2	tat cgg cat ctg gtg tga cag	59,8
icaC lower	ata tat aaa act ctc tta aca	46,2
icaC upper	ata aac ttg aat tag tgt att	46,2
IS.intern-f.1029	gct tgc gca tca ttg gat g	56,7
IS.intern-r.279	ctc ata ata gcc att tcg ttg	54
IS256forw	tga aaa gcg aag aga ttc aaa gc	52
IS256rev	atg tag gtc cat aag aac ggc	52
<b>Sequenzierprimer</b>		
M13universal	tgt aaa acg acg gcc agt	53,7
M13reverse	cag gaa aca gct atg acc	53,7

### 3.4. Plasmide und Vektoren

Vektor/Plasmid	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pUC18	Amp <sup>R</sup> , lacZ $\alpha$ , ori ColE1	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
SuperCos1	Amp <sup>R</sup> , ori ColE1, ori SV40, COS-sites	Stratagene
pGEM-T Easy	pGEM-T und pGEM-T Easy vector system, Amp <sup>R</sup> , lacZ, ori ColE1 AT-Klonierungsvektor	Promega
pRB472	Gram <sup>+</sup> /gram <sup>-</sup> -Shuttle-Vektor, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Reinhold Brückner, persönliche Mitteilung
pIL1	pGEM-T easy Klonierungsvektor mit der <i>icaC</i> ::IS256-Insertion aus <i>S. epidermidis</i> 307/95	diese Arbeit
pIL2	Shuttle Vektor pRB472 mit der <i>icaC</i> ::IS256-Insertion aus <i>S. epidermidis</i> 307/95	diese Arbeit
pIL1 $\Delta$ tnp	pGEM-T easy Klonierungsvektor mit der <i>icaC</i> ::IS256-Insertion aus <i>S. epidermidis</i> 307/95 mit einem mutierten <i>tnp256</i> -Gen	diese Arbeit
pIL2 $\Delta$ tnp	Shuttle Vektor pRB472 mit der <i>icaC</i> ::IS256-Insertion aus <i>S. epidermidis</i> 307/95 mit einem mutierten <i>tnp256</i> -Gen	diese Arbeit
pGAP9a	pUC18 mit Tn4001 auf einem ca. 6,5 kb-großen <i>EcoRV/NruI</i> -Fragment aus <i>S. epidermidis</i> 307	diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pGAP9b	pUC18 mit Tn4001 auf einem 2,5 kb- großen <i>HindIII</i> -Fragment aus <i>S.</i> <i>epidermidis</i> 307	diese Arbeit

### 3.5. Puffer und Lösungen

1 M Tris/HCl	Tris pH mit HCl auf 7,5 einstellen H <sub>2</sub> O	60,57 g  ad 500 ml
0,5 M EDTA	EDTA H <sub>2</sub> O pH mit 10 N NaOH auf 8,0 einstellen H <sub>2</sub> O	93,1 g 350 ml  ad 500 ml
3 M NaAc	5 M NaAc Essigsäure (konz.) pH durch Zugabe von Essigsäure auf 4,8 einstellen	60 ml ca. 40 ml
10 x PBS	NaCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	80 g 2 g 2 g 11,4 g ad 1000 ml
50 x TAE-Puffer	Tris Essigsäure (konz.) 0,5 M EDTA H <sub>2</sub> O	242 g 57,1 ml 100 ml ad 1000 ml
10 x TBE-Puffer	Tris Borsäure 0,5 M EDTA H <sub>2</sub> O	108 g 55 g 50 ml ad 1000 ml

10 x TPE	Tris	108 g
	0,5 M EDTA	40 ml
	pH mit Phosphorsäure auf 8,0 einstellen	
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
TE-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
20 x SSC	NaCl	3M
	Natriumcitrat	0,3 M
10 % SDS	Sodiumdodecylsulfat (SDS)	10 g
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml
10 x PBS	NaCl	40 g
	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	6,25 g
	KCl	1 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
10 x SDS-Laufpuffer	Tris	30 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### 3.6 Geräte

Autoklaven	Webeco
Brutschränke	Heraeus B 5050E, Memmert TV40b
Computer	Pentium III
Elektrophoresekammern	Institutswerkstatt, BioRad
Elektroporationsgerät	Easyject prima, Equibio
ELISA-Reader	BioRad
Filme	Hyperfilm ECL
Gene Linker	UV Stratalinker 1800, Stratagene
Heizblöcke	Eppendorf - Thermostat 5320, Liebisch
Hybridisierungsofen	Hybaid Mini 10
Magnetrührer	Heidolph MR3000
Mikroliterpipetten	Gilson, Eppendorf
Mikroskope	Leitz, Zeiss
Nylonmembran	Pall Biotyne B, 0,45 µm
PCR-Thermocycler	Biometra, ProGene

---

pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	Pharmacia Ultrospec
Pulsfeldgelelektrophoresekammer	BioRad, CHEF-DR <sup>®</sup> III
Scanner	Hewlett Packard JetScan
Schüttelinkubator	Bühler W55 Swip, Innova TM4300
Spannungsgerät	BioRad PowerPac; Pharmacia Power Supply EPS600
Sterilarbeitsbank	NuAire II Type A/B3
Tischinkubator	Eppendorf
Vakuumblotter	Pharmacia
Videoprinter	Mitsubishi, BioRad
Vortexer	Boskamp GmbH
Waagen	Chyo Electronic Balance MP3000 Chyo Balance Corp.
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	Beckmann J2-21 mit JA10 und JA20 Festwinkelrotoren; Eppendorf Centrifuge 5415C

## 4. Methoden

### 4.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und Staphylokokken

#### 4.1.1. Minipräparation - Plasmidisolierung im kleinen Maßstab aus *E. coli*

Puffer I:	Tris/HCl, pH7,5	50 mM
	EDTA pH 8,0	10 mM
	Rnase	0,1 mg/ml
Puffer II:	NaOH	0,2 N
	SDS	1 %
Puffer III:	Natriumacetat pH 4,8	3 M

Die Bakterien werden über Nacht unter dem Selektionsdruck des jeweiligen Antibiotikums in 4 ml LB-Medium angezogen. Davon werden 1,5 ml abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 150 µl Puffer I aufgenommen. Anschließend wird die gleiche Menge Puffer II dazugeben, kurz geschwenkt, bis der Ansatz klar und viskös erscheint und 5 min bei RT inkubiert. Danach werden 150 µl Puffer III dazugeben, kurz gemischt und das Reaktionsgefäß 10 min auf Eis gestellt, um die chromosomale DNA und die Proteine zu fällen. Anschließend wird 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird sofort mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, um die Plasmide zu fällen. Die DNA wird bei einem weiteren Zentrifugationsschritt in 15 min bei 14000 rpm pelletiert und anschließend erst mit 500 µl 100% Ethanol und danach mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nachdem das Pellet bei RT getrocknet wurde, wird die DNA in 50 µl 50 mM Tris (pH 8,5) aufgenommen. Für eine Restriktion zur Überprüfung von klonierten Fragmenten in gängige Vektoren oder als Template in einer PCR-Reaktion kann die Plasmid-DNA in diesem Reinheitsgrad verwendet werden. Soll im Anschluß eine Sequenzierreaktion durchgeführt werden, so muß die DNA in einem weiteren Schritt aufgereinigt werden. Dies geschieht mit dem „PCR-Purification-Kit“ von QIAGEN (s. 4.5.)

#### 4.1.2. Midipräparation – Plasmidisolierung im mittleren Maßstab aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab wird mit dem „Midi Plasmid Purification Kit“ von QIAGEN durchgeführt. Dabei werden die Zellen so lysiert wie bei einer Minipräparation, die Plasmid-DNA wird jedoch anschließend durch Adsorption an eine spezielle Säule, die nach dem Prinzip eines Anionenaustauschers funktioniert, gereinigt. Nach

verschiedenen Waschschritten wird die DNA mit einem Puffer mit erhöhter Salzkonzentration eluiert und bei RT mit Isopropanol gefällt. Die verwendeten Kartuschen erlauben eine Ausbeute von bis zu 100 µg Plasmid-DNA aus 10-100 ml Bakterienkultur. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und die genaue Durchführung können dem vom Hersteller mitgelieferten Standardprotokoll entnommen werden.

#### **4.1.3. Plasmidisolierung aus *Staphylococcus* spp.: Minipräparation (und Midipräparation)**

Staphylokokken werden über Nacht unter dem Selektionsdruck des jeweiligen Antibiotikums in 4 ml (100 ml) LB mit 1% Glycin bei 37°C angezogen. Von der Kultur werden mindestens 2 ml (100 ml) abzentrifugiert und das Pellet in 150 µl (500 µl) Puffer I aufgenommen, dem 10 µl (50 µl) Lysostaphin (2 mg/ml) zugesetzt werden. Der Ansatz wird bei 37°C inkubiert bis er viskös wird. Dann wird (im Falle der Midipräparation Puffer I bis zu einem Volumen von 4 ml aufgefüllt,) Puffer II und Puffer III dazugegeben, und verfahren wie unter 4.1.1. (bzw. 4.2.2.) angegeben.

## **4.2. Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden und DNA**

Für die Konzentrationsbestimmung wird die Extinktion einer DNA- oder Oligonukleotidlösung bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Menge an doppelsträngiger DNA (ds DNA) bzw. an Oligonukleotiden (ss DNA) kann folgendermaßen berechnet werden:

1 Einheit bei OD<sub>260</sub> entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml

1 Einheit bei OD<sub>260</sub> entspricht einer Oligonukleotid-Konzentration von 33 µg/ml

Der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 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.

## **4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine Methode zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA, bei der die hitzestabile DNA-Polymerase eines thermophilen Bakteriums eingesetzt wird. Es kommt hierbei zu einem mehrfach wiederholten und automatisierten Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Auffüllreaktion ausgehend von zwei zueinander weisenden Oligonucleotiden, wodurch die zwischen den Primern liegende Sequenz exponentiell vermehrt wird. Als Ausgangsmaterial (Template-

DNA) dient entweder gereinigte chromosomale DNA, Plasmid-DNA oder chromosomale DNA in einem Zellysat.

Die Methode, eine PCR mit Hilfe von Bakterienlysaten durchzuführen, bietet durch die Möglichkeit, mehrere Kolonien gleichzeitig zu untersuchen, eine effiziente und schnelle Art des „Vorscreenings“. Man resuspendiert zu diesem Zweck Zellmaterial einer oder mehrerer Kolonien in 50 µl H<sub>2</sub>O, kocht den Ansatz (5 min, 100°C) auf und stellt ihn sofort auf Eis. Bei Staphylokokken ist die Zugabe von 1 µl (2 mg/ml) Lysostaphin vor dem Aufkochen notwendig. Entstandene Zellfragmente werden kurz abzentrifugiert und der Überstand, der die DNA enthält, in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Diese kann sofort für die PCR eingesetzt werden.

Ein PCR-Standardansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

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

In Abhängigkeit von der eingesetzten Polymerase und dem dazugehörigen PCR-Puffer müssen eventuell noch 1-2 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM) zugesetzt werden. Dieser Zusatz ist auch bei einigen schlecht bindenden Primern zur allgemeinen Optimierung der Reaktion erforderlich, da MgCl<sub>2</sub> die Bindungsspezifität der Primer herabsetzt.

Der Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert, gut vermischt und kurz abzentrifugiert. Die PCR wird im Thermocycler unter folgenden Richtbedingungen durchgeführt:

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

Die Temperatur für die Primer-Hybridisierung hängt von der T<sub>M</sub> des Oligonukleotids ab. Dabei kann man grob 2°C pro AT-Paar und 3°C pro GC-Paar berechnen. Die Zeit für die Auffüllreaktion hängt von der zu amplifizierenden Fragmentlänge ab.

Es werden in der Regel 30 Reaktionszyklen durchlaufen. Danach wird der Erfolg der PCR durch Auftragen eines Aliquots von 10 µl auf ein Agarosegel überprüft.

#### 4.4. Inverse PCR

Die Inverse PCR dient dazu, einen Bereich, der an eine bekannte DNA-Sequenz grenzt, zu amplifizieren, zu klonieren und anschließend zu sequenzieren. Dazu wird die chromosomale DNA mit einem Restriktionsenzym hydrolysiert und anschließend zu ringförmigen DNA-Fragmenten ligiert. Diese zirkulären Fragmente werden als Template in einer PCR eingesetzt, wobei man Primer verwendet, die während der Reaktion in die entgegengesetzte Richtung verlängert werden. Da die DNA-Fragmente für eine Selbstligation nicht zu groß sein dürfen, andererseits aber auch nicht zu klein, um zu gewährleisten, daß auch unbekannte DNA mittels PCR amplifiziert wird, muß die Fragmentgröße vorher durch eine Southern Hybridisierung ermittelt werden. Diese sollte zwischen 2 und 4 kb liegen. Die Ligation wird in einem sehr großen Reaktionsvolumen durchgeführt, um die Selbstligation der DNA-Moleküle zu fördern. Es werden 10 µg chromosomale DNA über Nacht mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten. Der Spaltansatz wird aufgereinigt, entweder über ein QIAGEN-Säulchen oder phenolisiert. Es wird 1 µg DNA für die Ligation herangezogen, die in einem Volumen von 80 µl über Nacht bei 14°C durchgeführt wird. Der Ligationsansatz wird erneut aufgereinigt und in 50 µl 50 mM Tris, pH 8,5 aufgenommen. Von diesen 50 µl werden 5 µl als Template bei der nachfolgenden PCR eingesetzt (s. 4.3.). Als Negativkontrolle wird nicht-ligierte chromosomale DNA als Template bei der PCR eingesetzt. Das erhaltene PCR-Produkt wird anschließend in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T easy kloniert und sequenziert (s. 4.12. und 4.17.).

#### 4.5. Reinigung von PCR-Produkten

Zur Abtrennung der Primer, Nukleotide, Enzyme und Salze von den PCR-Produkten wird der „QIAquick PCR Purification Kit“ (QIAGEN, Hilden) verwendet. Da Oligonukleotide bis zu einer Länge von 40 bp abgetrennt werden, eignet sich diese Methode auch zum Entfernen von Bruchstücken, die nach einer Restriktion von PCR-Produkten entstehen. Alle benötigten Puffer sowie Ionenaustausch-Säulen sind im Kit enthalten.

Die genaue Versuchsdurchführung kann dem vom Händler mitgelieferten Protokoll entnommen werden.

#### 4.6. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

DNA-Probenpuffer	Bromphenolblau	0,25 %
	Xylencyanol	0,25 %
	Glycerin	50 %
	SDS	1 %
	TBE/TAE/TPE	1 x
	EDTA	0,1 M

Bei der Agarose-Gelelektrophorese nutzt man die negative Ladung von DNA-Molekülen, um diese in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufzutrennen. Lineare DNA-Fragmente von etwa 0,4-20 kb werden in Agarosegelen aufgetrennt, deren Agarosekonzentration je nach Fragmentgröße zwischen 0,3 % und mehr als 2 % liegen kann. Mit einem 1 %igen Agarosegel erhält man zum Beispiel eine optimale Auftrennung für Moleküle von 1-10 kb. Als Laufpuffer wird dabei 1 x TAE oder 1 x TPE eingesetzt, TAE wird vor allem herangezogen, wenn DNA aus dem Gel präpariert werden soll. 0,5 x TBE wird für die PFG-Elektrophorese benötigt.

Zur Herstellung eines Gels muß die Agarose im Laufpuffer aufgeköcht werden, bis sie sich vollständig gelöst hat. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C gießt man die Lösung luftblasenfrei in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm. Nach dem Erstarren wird das Gel mit 1 x Laufpuffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben werden mit 1/10 Vol. Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von etwa 90 Volt, wobei die Blaufront des Probenpuffers (Bromphenolblau) auf einer Höhe zwischen 500 und 600 bp läuft. Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung wird eine Färbung mit Ethidiumbromid durchgeführt und die DNA kann unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Videoprinters fotografiert werden.

#### **4.7. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die DNA kann mit verschiedenen Kits aus der Agarose eluiert werden, z.B. mit dem „Gene Clean Kit“ der Firma BIO 101. Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, daß die Agarosescheiben gelöst werden und die DNA-Fragmente anschließend in Gegenwart eines chaotropen Salzpuffers an eine spezielle Glasmatrix binden oder es kann ein Säulchen verwendet werden, an das die DNA bindet (z.B. aus dem „PCR-Purification Kit“ der Firma QIAGEN). Nach verschiedenen Waschvorgängen kann die DNA dann direkt mit H<sub>2</sub>O oder mit einem Niedrigsalzpuffer (z.B. TE-Puffer) eluiert werden. Die genaue Durchführung ist den jeweiligen Standardprotokollen zu entnehmen.

#### **4.8. Restriktion von DNA**

Die für die Restriktion eingesetzte Enzymmenge richtet sich nach der zu spaltenden DNA-Menge, wobei laut Definition ein Unit (U) des Enzyms in der Lage ist, bei optimalen Puffer- und Temperaturbedingungen 1 µg DNA in einer Stunde vollständig zu spalten. Um die Enzymaktivität durch das im Enzym-Aufbewahrungspuffer enthaltene Glycerin nicht zu beeinflussen, sollte die Enzymmenge 1/10 des Reaktionsvolumens nicht überschreiten. Die optimale Konzentration des Restriktionspuffers 10 x One-Phor-All Buffer PLUS (Pharmacia) richtet sich nach den verwendeten Enzymen und kann aus einer vom Hersteller mitgelieferten Tabelle entnommen werden. Falls die Enzyme unterschiedliche Optima besitzen, kann die

Restriktion in zwei Einzelschritten erfolgen, wobei mit dem Enzym begonnen wird, das die niedrigere Salzkonzentration benötigt. Der Restriktionsansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 0,5-2µg DNA, 10x Puffer, Enzyme und H<sub>2</sub>O, das bis zur benötigten Pufferkonzentration aufgefüllt wird. Üblicherweise haben die Spaltansätze ein Endvolumen von 20 µl und enthalten 0,5-1,0 µg DNA. Die Inkubation des Ansatzes erfolgt bei 37°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1/10 Vol. DNA-Probenpuffer, der gegebenenfalls mit RNase versetzt wird, gestoppt, und die entstandenen Fragmente werden im Agarosegel aufgetrennt. Die Länge der Inkubationszeit und die Menge an eingesetztem Enzym (in Units) richtet sich nach der Molarität der auf der zu spaltenden DNA vorhandenen Schnittstellen:

#### 4.9. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Vektoren, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert wurden, müssen dephosphoryliert werden, um eine Religation zu verhindern. Dabei werden die 5'-terminalen Phosphatgruppen an der Schnittstelle entfernt.

Zu einem 20 µl Restriktionsansatz werden 1µl (1 U/µl) Alkalische Phosphatase (AP) (Boehringer, Mannheim) und 2 µl 10 x AP-Puffer gegeben. Der Ansatz wird 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend über den „PCR-Purification Kit“ aufgereinigt.

#### 4.10. Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Kondensation einer 5'-Phosphatgruppe mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe von doppelsträngigen (ds) DNA-Molekülen unter ATP-Verbrauch. Vor einer Ligation müssen 5'-Ende und 3'-Ende der zu ligierenden DNA-Fragmente mit der gleichen Restriktionsendonuklease geschnitten werden. Für „sticky end“ Klonierungen sollten die zu ligierenden DNA-Fragmente in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:5 vorliegen (z.B. 30 fmol Vektor und 150 fmol Insert). Daneben werden 5 x Ligasepuffer (z.B. von Gibco BRL, Endkonzentration 1 x Ligasepuffer), 1 µl T4-DNA-Ligase (Gibco BRL, 1 U/µl) und H<sub>2</sub>O bis zum gewünschten Endvolumen zugesetzt. Dabei ist zu beachten, daß dieses Volumen möglichst gering sein sollte, um die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von Vektor und Insert zu erhöhen. Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 14°C inkubiert. Anschließend setzt man ca. 10 µl für eine Transformation ein und bewahrt den Rest bei -20°C auf.

## 4.11. Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* und Staphylokokken

### 4.11.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

200 ml LB-Medium werden mit 500 µl einer *E. coli*-ÜNK angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von maximal 0,6 geschüttelt. Die Kultur wird für 10 min auf Eis gestellt und anschließend in vorgekühlten Greinerröhrchen abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Das Zellpellet wird in 100 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und ca. 20 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 10 ml eiskalter sterilfiltrierter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>/15 % Glycerin (v/v) aufgenommen und nochmals 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen können jetzt in 250 µl Aliquots in vorgekühlte Eppendorfgefäße gefüllt und bei -70°C eingefroren werden.

### 4.11.2. Herstellung kompetenter *Staphylococcus aureus*-Zellen

100 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer *S. aureus*-ÜNK angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD von 0,6 bis 0,7 geschüttelt. Die Kultur wird 5 min bei 6000 rpm und 20°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird zunächst zwei-bis dreimal mit 50 ml sterilem H<sub>2</sub>O und anschließend zweimal mit 20 ml 10 % Glycerin (v/v) gewaschen. Die Zellen werden in 10-15 ml 10 % Glycerin resuspendiert, 15 min bei RT inkubiert, 7 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und schließlich in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen. Die kompetenten Zellen können jetzt in 70 µl Aliquots bei -70°C eingefroren werden.

### 4.11.3. Transformation von *E. coli*-Zellen (CaCl<sub>2</sub>-Methode)

200 µl kompetente *E. coli*-Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit ca. 50-100 ng Plasmid-DNA oder mit 10 µl Ligationsansatz versetzt und für 30-45 min auf Eis gestellt. Dann wird ein Temperaturschock durchgeführt, wobei die Zellen für 2 min auf 42°C erhitzt, 8 min bei 37°C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt werden. Im Anschluß daran wird 1 ml steriles LB-Medium zugegeben, und die Bakterien werden zur Expression der plasmidkodierten Resistenzgene 45-60 min bei 37°C inkubiert. Danach plattiert man 100 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten aus. Der Rest wird kurz abzentrifugiert und nach dem Entfernen des Überstands bis auf ein Endvolumen von etwa 100 µl in konzentrierter Form ebenfalls ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert, gewachsene Kolonien können dann vereinzelt und mit Hilfe einer Minipräparation auf eine erfolgreiche Transformation hin überprüft werden.

#### 4.11.4. Transformation von *Staphylococcus aureus* (Elektroporation)

70 µl kompetente *S. aureus*-Zellen werden bei RT aufgetaut, mit ca. 250-500 ng Plasmid-DNA (in H<sub>2</sub>O) versetzt und für 15-30 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wird in Elektroporationsküvetten mit 1 mm Spaltdurchmesser gefüllt und mit einer Spannung von 1,8 kV elektroporiert. Sofort wird 1 ml BHI-Medium in die Küvette gegeben, der gesamte Ansatz in ein Reagenzröhrchen überführt und ca. 2 h bei 37°C geschüttelt. Danach wird 100 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert. Der Rest wird kurz abzentrifugiert und nach dem Entfernen des Überstands bis auf ein Endvolumen von etwa 100 µl in konzentrierter Form ebenfalls ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert, gewachsene Kolonien können dann vereinzelt und mit Hilfe einer Minipräparation auf eine erfolgreiche Transformation hin überprüft werden

#### 4.12. pGEM<sup>®</sup>-T-easy Vektor System

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

2 x T4 DNA Ligationspuffer	5 µl
pGEM-T Easy Vektor (50 ng)	1 µl
PCR-Produkt	1-3 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O ad 10 µl	

Der Ansatz wird gemischt und bei 4°C oder 14°C ÜN inkubiert.

#### 4.13. Isolierung von chromosomaler DNA aus Staphylokokken

Die Bakterien werden über Nacht bei 37°C in 4 ml LB-Medium mit 1% Glycin geschüttelt. 2 ml der Kultur werden bei 8000 rpm 5 min zentrifugiert und das Bakterienpellet einmal mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend werden die Bakterien in 100 µl 10 mM Tris/HCl, 25% Saccharose, pH 7,5 gründlich resuspendiert. Man gibt 15 µl EDTA 0,5 M, pH 8 dazu, mischt den Ansatz, und nach Zugabe von 10 µl Lysostaphin (2 mg/ml) inkubiert man die Bakterien bei 37°C bis der Ansatz viskös wird (ca. 10 – 20 min). Es wird 375 µl TE-Puffer, 225 µl 10% SDS und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugeben und bei 55°C 30 min inkubiert.

Danach gibt man 150 µl 5 M Natriumperchlorat dazu, schwenk den Ansatz kurz, gibt 0,5 Volumenanteil (ca. 450 µl) Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dazu und schüttelt den Ansatz kräftig mindestens 1,5 h in einem Tischrüttler (modifizierter Vortexer). Anschließend wird der Ansatz 10 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt und auf zwei neue Eppendorfcaps verteilt. Die DNA wird mit dem doppelten Volumen 100% Ethanol gefällt, 10 min abzentrifugiert (14000 rpm, RT), der Alkohol entfernt und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der DNA wird diese in 50 µl Tris/HCl, pH 8,5 aufgenommen und vor Gebrauch mindestens 12 h bei 4°C gelagert.

#### 4.14. Phenolextraktion

Um verunreinigte DNA von Proteinen und Salzen zu befreien kann eine Phenolextraktion mit anschließender Ethanol-fällung vorgenommen werden. Zu einer DNA-Lösung wird das gleiche Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohollösung (25:24:1) gegeben, gut gemischt und 1 min zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase, in der sich die DNA befindet, wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und 5 min auf einem Tischrüttler geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wird die obere wäßrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene DNA kann nun mit Ethanol gefällt werden (s. 4.13.).

#### 4.15. Ethanol-fällung

Die in Lösung befindliche DNA wird mit Natriumacetat auf eine Endkonzentration von 0,3 M eingestellt. Es wird das 2,5fache Volumen 100% Ethanol zugegeben, gut gemischt und der Ansatz 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wird 30 min bei 4°C zentrifugiert, das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und bei RT getrocknet. Zuletzt wird die DNA in einem angemessenen Volumen Puffer oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 4.16. Southern-Blot-Analyse

Denaturierungslösung	NaCl 1,5 M
	NaOH 0,5 M
Neutralisierungslösung (pH 7,5)	Tris 1 M
	NaCl 2 M

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

Die zu analysierende DNA wird zunächst vollständig mit einem Restriktionsenzym gespalten und die entstandenen Fragmente anschließend auf einem 1% TPE-Agarosegel aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wird das Gel auf vollständige Spaltung der DNA hin überprüft und mit einem an der Seite angelegten Lineal fotografiert. Dies ermöglicht später eine Zuordnung der Hybridisierungsbanden in einen Fragmentgrößenbereich. Nach der Gelelektrophorese wird das Gel erst 15 min in einer 0,25 M HCl-Lösung geschwenkt, danach 15 min in Denaturierungslösung und schließlich 15 min Neutralisierungslösung. Nach dieser Vorbehandlung kann die DNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran übertragen werden.

#### **4.16.1. Kapillarblot auf eine Nylonmembran**

Der Kapillarblot wird verwendet, wenn die zu übertragenden DNA-Fragmente nicht größer als ca. 20-50 kb sind. Bei größeren Fragmenten, z.B. bei solchen, die durch Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt wurden, wird die Vakuumblot-Methode angewendet (s. 4.16.2.), die durch das Anlegen eines kräftigeren Vakuums auch deren Übertragung sicherstellt. In eine Plastikwanne wird der Transferpuffer (ca. 500 ml 20 x SSC) gegeben, über die Wanne legt man eine Glasplatte. Über die Glasplatte wird ein langer Streifen Whatmanpapier gelegt, so daß dieser mit den Enden in den Puffer taucht, und sich mit Puffer vollsaugt. Das Gel legt man möglichst luftblasenfrei auf das Papier, danach ebenfalls luftblasenfrei eine in Gelgröße zurechtgeschnittene mit H<sub>2</sub>O angefeuchtete Membran. Es folgen drei Stücke Whatmanpapier (in Gelgröße) und ein ca. 10-15 cm hoher Stapel Papiertücher. Zum Abschluß legt man eine zweite Glasplatte oben auf den Stapel, was einer gleichmäßigen Gewichtsverteilung dient und beschwert den Aufbau mit einem Gewicht von ca. 1 kg. Die DNA wird durch die entstehenden Kapillarkräfte aus dem Gel auf die Nylonmembran transferiert. Die DNA muß anschließend durch UV-Licht auf der Membran fixiert werden.

#### **4.16.2. Vakuumblot auf eine Nylonmembran**

Wie oben erwähnt wird der Vakuumblot vor allem für den Transfer von längeren DNA-Fragmenten verwendet. Hierfür wird eine spezielle Vakuumapparatur verwendet, die es ermöglicht, die DNA aus dem Gel mit einem Druck von 50 mbar auf die Membran zu übertragen. Es wird eine Nylonmembran in Gelgröße zurechtgeschnitten, die mit H<sub>2</sub>O angefeuchtet und auf die Oberfläche der Apparatur gelegt wird. Darauf wird eine Plastikmaske plaziert, die die Umgebung des Gels abdichtet und nur einen Ausschnitt für das Gel freiläßt. Das Gel wird auf die Membran gelegt, in den Ausschnitt der Maske, und mit Transferpuffer überschichtet. Durch den Vakuumsog wird die DNA aus dem Gel auf die Membran übertragen. Es muß darauf geachtet werden, daß sich immer genug Transferpuffer auf dem Gel befindet, um eine gleichmäßige Übertragung zu gewährleisten.

### 4.16.3. Dot-Blot

Mit Hilfe der Dot-Blot Methode wird eine DNA-Lösung direkt auf eine Nylonmembran aufgebracht. Hierbei wird eine verdünnte Lösung mit denaturierter DNA, z. B. aus einer Plasmidpräparation, durch ein angelegtes Vakuum mit 10 x SSC als Transferpuffer auf die Membran übertragen. Diese Methode eignet sich dazu, eine größere Zahl von Klonen auf das Vorhandensein eines bestimmten Genabschnitts zu überprüfen. Die DNA muß auf der Membran durch UV-Licht fixiert werden und kann sofort für Hybridisierungsversuche herangezogen werden.

### 4.16.4. Nichtradioaktive Markierung von Sonden mit dem ECL-System

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

Die Standarddurchführung für die Markierung einer Sonde läßt sich folgendermaßen beschreiben: 200 – 400 ng der Sonden-DNA (z.B. PCR-Produkt) wird in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Eine Denaturierung der DNA erfolgt 5 min bei 100°C, danach muß die DNA sofort auf Eis abgekühlt werden. Es folgt die Zugabe von 10 µl des Labelling-Reagenz, nach kurzem Mischen wird 10 µl Glutaraldehyd zugegeben, gut gemischt und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Sonde kann anschließend bis zur Verwendung maximal 15 min auf Eis aufbewahrt werden.

### 4.16.5. Hybridisierung, Waschen und Entwicklung des Blots

Waschpuffer I	SSC	0,1 – 1 x
	SDS	0,4 %
Waschpuffer II	SSC	2 x
	Hybridisierungspuffer	Hyb-Puffer (Gold) 500 ml
	NaCl	0,5 M
	Blocking Reagenz	5 %

Nach einer Vorhybridisierung der Membran kann die Hybridisierung unter Zugabe der markierten Sonde über Nacht erfolgen. Die Vorhybridisierung dient dazu, alle unspezifischen

Bindungsstellen der Nylonmembran abzudecken, so daß die Sonde während der Hybridisierung nur spezifisch an die DNA binden kann. Für die Vorhybridisierung wird die Membran kurz in 5 x SSC geschwenkt, mit ca. 20 ml Hybridisierungspuffer zusammen in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und 2 h bei 42°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die markierte Sonde wird zugeben und es folgt eine Inkubation ÜN bei 42°C. Die Hybridisierungslösung wird anschließend verworfen und die Membran 2 x 10 min bei 55°C mit Waschpuffer I gewaschen. Der Gehalt an SSC in Waschpuffer I bestimmt die Stringenz, mit der die restliche Sonde während dieses Waschschrtes entfernt wird. Es können je nach Signalintensität der Sonde unterschiedliche Waschpuffer für unterschiedliche Sonden verwendet werden. Der zweite Waschschrte mit Waschpuffer II wird 2 x 5 min bei RT durchgeführt. Nachdem der Waschpuffer entfernt wurde kann der Blot nun mit der Detektionslösung bedeckt werden. Die Detektionslösung wird im Verhältnis 1:1 aus zwei Einzellösungen hergestellt, die im Kit enthalten sind und 1 min auf die Membran gegeben. Anschließend wird die Lösung verworfen, die Membran kurz auf Whatmanpapier getrocknet, in eine Frischhaltefolie eingepackt und in der Dunkelkammer mit einem ECL-Hyperfilm bedeckt. Detektionsreagenz 1 zerfällt in Wasserstoffperoxid, dem Substrat der Peroxidase. Das in Detektionslösung enthaltenen Luminol wird daraufhin oxidiert, wobei es zu einer Lichtreaktion und zum Aussenden von blauem Licht kommt, das auf dem der Membran aufgelegten Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Je nach Signalstärke verbleibt der Film 1-30 min auf der Membran. Genauere Angaben sind dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

## **4.17. Sequenzierung**

### **4.17.1. Sequenzierung mit dem LiCor-Sequenzierer von MWG**

DNA-Sequenzen ermittelt man durch die enzymatische Verlängerung eines DNA-Primers in vier Sequenzierungsansätzen, von denen jeder die Nukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP enthält. Daneben gibt es in jedem Ansatz noch ein Didesoxyanalogon (ddNTP) von einem dieser Nukleotidtriphosphate, dessen Einbau zu einem kontrollierten, statistisch verteilten und basenspezifischen Abbruch der Reaktion führt. So entstehen Fragmente verschiedener Länge, die nebeneinander in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden können. Mit der dazugehörenden Software von MWG kann die Basensequenz direkt aus der Reihenfolge der Banden in den vier Spuren abgelesen werden.

Die Sequenzierung wird mit dem „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“ der Firma Amersham Pharmacia durchgeführt. Genaue Angaben bezüglich der Zusammensetzung der Reagenzien sind dem Protokoll der Hersteller zu entnehmen.

**Sequenzierungsansatz**

Premix:           3-10 µl Template (Plasmidpräparation, PCR-Produkt, etc.)  
                   1 µl DMSO  
                   1 µl 50 mM TMAC  
                   1 µl Primer (1 pmol/µl)  
                   H<sub>2</sub>O ad 13 µl

Es werden je 3 µl des Premix auf vier 500 µl-Reaktionsgefäße verteilt, dazu kommen je 1 µl pro A-, C-, G- und T-Reagenz (ddNTP, dNTP, Polymerase und Puffer), schließlich wird jeder Ansatz mit einem Tropfen Paraffinöl überschichtet. Die PCR findet unter folgenden Bedingungen statt:

Denaturierung	30 sec	95°C
Primer-Annealing	30 sec	T <sub>m</sub> + 3°C
Primer-Extension	45 sec	70°C

Es werden in der Regel 30 Reaktionszyklen durchlaufen. Anschließend wird der Ansatz auf 4°C gehalten. Nach der Zugabe von 3 µl Stop-Puffer steht der Ansatz für die Gelelektrophorese zur Verfügung, die am hauseigenen automatischen Sequenzierer von MWG durchgeführt wird.

**4.17.2. Sequenzierung mit dem ABI-Sequenzierer von Perkin Elmer**

Man bedient sich hierbei der Methode einer zyklischen Sequenzierung, wobei durch Anwendung des „ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits“ Fluoreszenz-Farbstoff-markierte Didesoxynukleotide während einer PCR-Amplifikation durch die spezifisch modifizierte Taq-Polymerase eingebaut werden und zum Kettenabbruch führen.

**Sequenzierungsansatz**

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

Terminator Ready Reaction Mix	4 µl
Template (Plasmid-DNA oder PCR)	1-4 µl
Primer (50 pmol/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

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

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

Es werden in der Regel 25 Reaktionszyklen durchlaufen. Anschließend wird der Ansatz auf 4°C gehalten.

### Reinigung der amplifizierten DNA

Um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte Nukleotide und Enzyme zu entfernen, muß die DNA gereinigt werden. Am wirkungsvollsten lassen sich die nicht-eingebauten Nukleotide, welche die spätere Auswertung verfälschen würden, durch eine Ethanol-fällung abtrennen. Dazu werden 90 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl 3 M NaAc (pH 4,6) zu dem Sequenzierungsansatz gegeben und gemischt. Die DNA wird durch die Zugabe von 250 µl 100 % Ethanol gefällt und anschließend in 15 min bei 14000 rpm und RT abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl TSR aufgenommen. Zuletzt wird die DNA durch Inkubation für 2 min bei 90°C denaturiert und steht damit für die Auftrennung im hauseigenen ABI-Sequenzierer zur Verfügung.

### 4.18. PFGE - Pulsfeldgelelektrophorese (Wechselfeldgelelektrophorese)

SE-Puffer	NaCl	75 mM
	EDTA, pH 7,5	25 mM
EC-Puffer	Tris/HCl	6 mM
	NaCl	1M
	EDTA, pH 7,5	100 mM
	Bridj 58	0,5 %
	Desoxycholat	0,2 %
	N-Laurylsarcosyl	0,5%
10 x Puffer für LGT-Agarose	Tris/HCl	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	EDTA	0,1 mM

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

### Präparation chromosomaler DNA aus Staphylokokken für die PFGE

Die in der PFGE aufzutrennende chromosomale DNA kann nicht auf herkömmlichem Weg isoliert werden, da sie vor jeglichen Scherkräften geschützt und nur an definierten Restriktionsstellen in Fragmente zerlegt werden soll. Zu diesem Zweck werden ganze Zellen

in Agarose eingebettet und in fixierter Form den vor der Elektrophorese notwendigen enzymatischen Reaktionen unterzogen.

Die Bakterien werden über Nacht in 10 ml LB-Medium mit 1% Glycin bei 37°C geschüttelt. Davon werden 2 ml abzentrifugiert, das Bakterienpellet 2 x in je 1 ml SE-Puffer gewaschen und schließlich in 0,5 ml SE-Puffer aufgenommen. 100 µl der Bakteriesuspension werden mit 900 µl H<sub>2</sub>O gemischt und die OD bei 600 nm bestimmt. Diese sollte zwischen 0,7 und 1 liegen. Die Reaktionsgefäße mit der Bakteriensuspension werden bei 37°C in einem Inkubator vorgewärmt, während 2%ige LGT-Agarose zum schmelzen gebracht wird. Nun werden 500 µl der Bakteriensuspension, 500 µl der etwas abgekühlten Agarose und 20 µl Lysostaphin (2 mg/ml) gemischt und sofort in eine Gießvorrichtung für Agaroseblöckchen gegossen. Die Blöckchen werden nach dem Erkalten in ca. 2 x 3 mm große Stückchen zerschnitten, in 3 ml EC-Puffer gegeben und bei 37°C 30 min bis 1 h im Schüttler inkubiert. Der EC-Puffer wird danach durch 3 ml neuen EC-Puffer ersetzt, dem Proteinase K zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml zugesetzt wird. Es folgt eine Inkubation der Blöckchen über Nacht im Schüttelwasserbad bei 55°C. Der Puffer wird durch 10 ml TE-Puffer ersetzt, der noch weitere 3 mal ausgetauscht werden muß, um die Proteinase K vollständig aus den Blöckchen zu entfernen. Bis zur Restriktion können die Blöckchen bei 4°C aufbewahrt werden (mindestens 1 Woche, längstens 1 Jahr).

### **Restriktion**

Zur Spaltung von Staphylokokken-DNA für die PFGE haben sich die Enzyme *SmaI* und *SstII* bewährt, da sie sehr selten im AT-reichen Staphylokokkengenom schneiden. Die Blöckchen werden in 500 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers 1 h bei 50°C vorinkubiert. Der Puffer wird entfernt, durch 100 µl frischen Puffer ersetzt und 20 U des entsprechenden Enzyms zugegeben. Der Ansatz wird bei 25°C für *SmaI* und bei 37°C für *SstII* 4 h lang inkubiert.

### **Beladung des Gels und Elektrophorese**

Die Blöckchen werden aus dem Puffer auf den horizontal liegenden Kamm der Gießvorrichtung gelegt, zusätzlich muß ein Blöckchen mit einem DNA-Größenstandard für PFGE aufgebracht werden. Mit einem Papiertuch wird überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Dann wird ein 1%iges Agarosegel in 0,5 x TBE in der Gießvorrichtung für Pulsfeldgele gegossen. Nachdem die Agarose etwas abgekühlt ist, wird der Kamm mit den auf ihm liegenden Agaroseblöckchen in die warme Agarose getaucht. Das muß vorsichtig aber zügig geschehen, damit die Blöckchen nicht fortgeschwemmt werden sondern auf dem Kamm haften bleiben. Nach Erkalten des Gels wird der Kamm herausgezogen und das Gel in die PFGE-Apparatur gelegt. Es wird das „CHEF-DR<sup>®</sup> III Pulsed Field Elektrophoresis System“ von BIO-RAD verwendet. Genauer zum Aufbau und den dazugehörigen Geräten kann dem mitgelieferten Handbuch entnommen werden. Die Bedingungen für die Elektrophorese richten sich nach dem Größenbereich, in dem die beste Auftrennung erfolgen soll. Werden kurze Pulszeiten (Umpolung des Feldes) verwendet, so werden kleinere Fragmente gut aufgetrennt, bei langen Pulszeiten ist der Bereich mit den großen DNA-Fragmenten besser

aufgetrennt. Als Längenstandard wird der „Lambda Ladder PFG Marker“ und der „Low Range PFG Marker“ (New England Biolabs) verwendet. Außerdem wurde chromosomale DNA des kartierten Stammes *S. aureus* 8325/4 mit *Sma*I gespalten und aufgetragen. Die entsprechenden Größen der Banden sind den Abbildungen zu entnehmen.

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

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

#### 4.19. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Antibiotika (MHK)

Die Bakterien werden in 20 ml Müller-Hinton-Medium mit 5% NaCl angeimpft und 4 h im Schüttler bei 37°C angezogen. Die Kultur wird mit frischem MH-Medium auf den McFarland-Standard 0,5 eingestellt und anschließend 1:200 weiterverdünnt. Gleichzeitig wird eine Antibiotikaverdünnungsreihe hergestellt. Dazu stellt man sich eine Stammlösung des entsprechenden Antibiotikums von 2 mg/ml her. Diese wird auf 512 µg/ml weiterverdünnt, indem man 1 ml der Stammlösung mit 2,91 ml MH-Medium versetzt. Es werden 12 Röhren aufgestellt und numeriert. In jedes wird jeweils 0,5 ml steriles MH-Medium pipettiert. In das zweite Röhren werden 0,5 ml der Antibiotikallösung gegeben. Durch Überpipettieren von 0,5 ml des Gemisches in das jeweils nächste Röhren wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, wobei 0,5 ml der Lösung aus dem letzten Reagenzglas verworfen werden. Das erste Röhren bleibt für eine Wachstumskontrolle antibiotikafrei. Anschließend werden alle 12 Ansätze mit 0,5 ml des vorbereiteten Inokulums beimpft und 18 h bei 37°C geschüttelt. Als minimale Hemmkonzentration wird die Antibiotikakonzentration angegeben, bei der als letzte kein Wachstum von Bakterien im Röhren mehr sichtbar ist.

Röhren Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AB-Konzentration [µg/ml]	-	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

#### 4.20. Agardiffusionstest

Die Bakterien werden in MH-Medium mit 5% NaCl angeimpft und 4 h bei 37°C im Schüttler angezogen. Die Kultur wird mit frischem MH-Medium auf den McFarland-Standard 0,5 eingestellt und anschließend 1:200 weiterverdünnt. Von dieser Verdünnung werden 100 µl

auf eine MH-Agarplatte ausplattiert. Anschließend werden Antibiotikatestplättchen auf die Platte aufgelegt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt die Beurteilung des Tests durch Ausmessen der Hemmhofdurchmesser.

#### **4.21. Speziesbestimmung mit dem API-Staph-System**

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

#### **4.22. Adhärenzassay**

Die Biofilmbildung bei Staphylokokken läßt sich in einem Adhärenzassay in Polystyren-Mikrotiterplatten nachweisen. Dazu wird eine ÜNK im Verhältnis 1:100 verdünnt. Je 100 µl dieser Suspension werden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Gewebekulturplatte pipettiert, wobei jeder Stamm 8fach angesetzt wird. Als Positivkontrolle dient *S. epidermidis* RP62A, *S. carnosus* TM300 wird als Negativkontrolle eingesetzt. Die Platten werden im Brutschrank bei 37°C 18 Stunden inkubiert. Danach werden die Kulturgefäße vorsichtig entleert. Anschließend wird die Platte dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, die dann noch anhaftenden Bakterien auf einem Heizblock bei 60°C hitzefixiert und mit Kristallviolett für 5 min gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wird unter fließendem Wasser abgewaschen. Nach dem Trocknen kann die Dichte des Biofilms mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden. Meßwerte unter 0,12 werden als negativ bewertet, Stämme mit Werten zwischen 0,12 und 0,24 gelten als schwach adhärent und Ergebnisse über 0,24 als stark adhärent. Der Grenzwert von 0,12 entspricht dabei dem dreifachen Durchschnittswert der Negativkontrolle.

#### **4.23. Erstellung von Wachstumskurven**

Für die Erstellung der Wachstumskurven wird eine Einzelkolonie der Bakterien über Nacht in Vollmedium inkubiert. Anschließend wird eine Tageskultur angesetzt, indem eine 1:100 Verdünnung der ÜNK in 50 ml Medium hergestellt und diese bei entsprechenden Temperaturen und einer Frequenz von 200 rpm inkubiert wird. In definierten Zeitintervallen wird unter sterilen Bedingungen eine Probe entnommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt.

#### 4.24. Bestimmung der Variationsrate von *S. epidermidis*

Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Ereignisses (P) pro Zelle und Generation berechnet sich aus der Formel

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

wobei n für die Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen steht und x = (Anzahl der PIA-negativen Kolonien)/(Gesamtzahl der ausplattierten Kolonien) ist.

Die Anzahl der Zellteilungen n berechnet sich wie folgt:

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

N = Gesamtzahl der Bakterien in der Kultur;  $N_0$  = Anzahl der Bakterien im Inokulum.

Es wird eine Einzelkolonie des PIA-positiven Stammes *S. epidermidis* 307 gepickt und in 50 ml PBS-Puffer resuspendiert. Von dieser Suspension wird jeweils 1  $\mu$ l, 10  $\mu$ l und 25  $\mu$ l in 50 ml TSB-Medium angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600nm</sub> 0,2 angezogen. Parallel dazu werden die gleichen Volumina der Keimsuspension auf TSB Agarplatten ausplattiert, um die Ausgangszellzahl  $N_0$  im Inokulum zu bestimmen.

Am nächsten Tag wird nur mit dem Versuchsansatz weitergearbeitet, der ein möglichst kleines Inokulum enthielt und zu diesem Zeitpunkt gerade in den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase eintritt. Dazu werden die Kolonien auf den Agarplatten ausgezählt und die optische Dichte der Kultur bestimmt. Befindet sich die Kultur in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase, wird zu diesem Zeitpunkt eine Probe entnommen, von der eine Verdünnung hergestellt wird, so daß sich in einem Volumen von 100  $\mu$ l ca. 20000 Zellen befinden. Anschließend wird je 100  $\mu$ l der Zellsuspension auf 100-150 großen Platten mit Kongorotagar ausplattiert. So können bis zu 2 Millionen Einzelklone auf deren Koloniefarbe hin überprüft werden. Nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wird die Gesamtzahl der Kolonien und die Anzahl der roten Kolonien ermittelt. Aus diesen Zahlen kann x ermittelt werden. Alle roten Kolonien werden gepickt und auf Kongorotplatten vereinzelt. Mit diesen Klonen können weitere Experimente durchgeführt werden.

#### 4.25. Erstellung einer Cosmid-Genbank

Eine verbreitete Methode für die Klonierung großer DNA-Fragmente stellt die Cosmid-Klonierung dar. Mit dieser Methode ist es möglich, Fragmente bis zu einer Größe von 45 kb in *E. coli*-Zellen zu replizieren. Der hier verwendete 7,9 kb große Cosmid Vektor SuperCos1 (Stratagene) zeichnet sich durch zwei aus dem  $\lambda$ -Phagen stammenden COS Sequenzen aus, die in einem *E. coli* Plasmid inseriert sind. Weiterhin enthält der Vektor SuperCos1 einen Replikationsursprung (ori) für die Replikation in *E. coli*, zwei Antibiotika-Resistenzgene (Ampicillin und Neomycin), eine *Xba*I-Klonierungsstelle zwischen den beiden COS-Sequenzen sowie *Not*I, *Bam*HI und *Eco*RI Restriktionsstellen.

#### 4.25.1. Präparation der Vektor-DNA

Der Vektor SuperCos1 wurde zunächst aus den Wirtszellen *E. coli* XL1-blue in größerem Maßstab isoliert (Midi-Präparation). 30 µg der erhaltenen Vektor-DNA wurden mit 120 U des Restriktionsenzym *Xba*I linearisiert und mit Hilfe des PCR-Purification Kit von QIAGEN aufgereinigt. Die vollständige Linearisierung des Vektors wurde in einem 0,8%igem Agarosegel überprüft. Anschließend wurde der linearisierte Vektor mit 1 U alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, die Reaktion mit 15 mM EDTA abgestoppt bevor eine erneute Aufreinigung und Spaltung mit 20 U *Bam*HI durchgeführt wurde. Die Größe der erhaltenen Fragmente wurde erneut in einem 0,8%igem Agarosegel überprüft. Es konnten zwei Banden mit den erwarteten Größen 6,5 und 1,1 kb identifiziert werden.

#### 4.25.2. Präparation der genomischen DNA

Da für die Klonierung in das Cosmid-System große DNA-Fragmente benötigt werden, muß die genomische DNA sehr vorsichtig isoliert werden, ohne große Scherkräfte auf sie einwirken zu lassen. Dies geschieht mit der unter 4.11. beschriebenen Methode. Um Fragmente in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors zu ligieren, wird die chromosomale DNA zunächst mit dem Enzym *Sau*3AI partial gespalten. Es wird eine Reihe von Testspaltungen durchgeführt, um die idealen Bedingungen für eine resultierende Fragmentgröße von 30-45 kb zu erhalten:

Ansatz:        30 µg chromosomale DNA  
                  10 µl One Phor All Puffer Plus (Pharmacia)  
                  ad 100 µl H<sub>2</sub>O

Dieser Ansatz wird für 5 min bei 37°C vorinkubiert, anschließend werden 0,5 U *Sau*3AI zugegeben. Nach 0 min, 0,5 min, 1, 2, 5 und 10 min werden 15µl Aliquots entnommen, sofort mit STOP-Puffer versetzt und auf Eis gestellt. Auf einem 0,4%igen Agarosegel lassen sich die Fragmentgrößen ermitteln wobei sich zeigte, daß eine Reaktionszeit von 2 min ausreicht, um die meisten Fragmente in einem Bereich von ca. 29-48 kb erhalten.

Für die endgültige Partialsplaltung werden die Bedingungen der Testspaltung möglichst genau imitiert. Das heißt, es werden jeweils *Sau*3AI-Splaltungen in einem Volumen von 100 µl mit jeweils 30 µg DNA angesetzt. Da für die Ligation jedoch mindestens 100 µg DNA benötigt werden, wird die Spaltung 5-fach angesetzt. Davon wird aus einem Ansatz wiederum in den o.g. Zeitintervallen je ein Aliquot entnommen, um den Reaktionsverlauf zu überprüfen. Die vier restlichen Ansätze werden nach 2 min vereinigt und die Reaktion durch die Zugabe von 6 µl 0,5 M EDTA abgestoppt. Nachdem erneut über ein 0,4%iges Agarosegel sichergestellt wurde, daß der Ansatz Fragmente der gewollten Größe enthält, wird dieser einer Phenolextraktion unterworfen und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die gereinigte, partial geschnittene DNA wird anschließend dephosphoryliert.

Ansatz: 50 µl partial geschnittene DNA  
 10 µl AP-Puffer  
 25 µl Alkalische Phosphatase (AP) (1U/µl)  
 15 µl H<sub>2</sub>O

Nach Inkubation (1 h bei 37°C) wird der Ansatz phenolisiert und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wird gemessen und ein Aliquot der DNA auf einem 0,3%igen Agarosegel überprüft.

#### 4.25.3. Ligation von DNA-Fragmenten in den Cosmid-Vektor SuperCos1

Die Ligation wird bei 4°C über Nacht im 60 µl-Ansatz durchgeführt:

partial geschnittene AP-behandelte chr. DNA (7,5 µg)	15 µl
SuperCos1 DNA ( <i>Xba</i> I-AP, <i>Bam</i> HI) (3 µg)	7,3 µl
Ligase Puffer (Promega)	6 µl
Ligase (6 U) (Promega)	2 µl
H <sub>2</sub> O	31,7 µl

Es wird eine Negativkontrolle mitgeführt, die im Unterschied zum Ligationsansatz keine genomische DNA enthält:

SuperCos1 DNA ( <i>Xba</i> I-AP, <i>Bam</i> HI) (3 µg)	7,3 µl
Ligase Puffer (Promega)	6 µl
Ligase (6 U) (Promega)	2 µl
H <sub>2</sub> O	46,7 µl

Bevor die Ligase zu den Ansätzen gegeben wird und nach Beendigung der Reaktion werden je 10µl aus den Ansätzen für ein Kontrollgel entnommen.

#### 4.25.4. Packaging: Verpacken der Cosmide in Phagenpartikel

SM-Puffer	NaCl	5,8 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2 g
	Tris/HCl, pH 7,5	50 ml
	Gelatine (2% w/v)	5 ml
	H <sub>2</sub> O	ad 1000ml

Während der *Packaging* Reaktion binden die λ-Proteine Nu1 und A an die COS-Enden der ligierten DNA und bewerkstelligen die Insertion der DNA-Abschnitte, die zwischen zwei COS-Stellen liegen in leere Phagenköpfe. Anschließend heften sich die Phagenschwänze an die gefüllten Köpfe, und es entstehen λ-Phagen, die statt λ-DNA rekombinante DNA tragen und die in der Lage sind, *E. coli*-Zellen zu infizieren und somit die in den Phagenköpfen verpackte DNA in die Zielzellen zu injizieren.

Für die *Packaging* Reaktion wird das „Gigapack III XL Packaging Extract“ von Stratagene verwendet. Dieser Kit beinhaltet den *Packaging*-Mix mit den  $\lambda$ -Phagenpartikeln und als Positivkontrolle die Wirtszellen *E. coli* VCS257 und  $\lambda$ -DNA. Anhand der Positivkontrolle soll die Effizienz des Packaging Extrakt überprüft werden.

Es werden Reaktionsansatz (1) und Positivkontrolle (2) parallel durchgeführt, indem für (1) und (2) je ca. 40  $\mu$ l Packaging Extrakt vorgelegt werden. Hinzu kommen für (1) 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes und für (2) 1  $\mu$ l der mitgelieferten  $\lambda$ -Kontroll-DNA. Die Ansätze werden vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und 2 h bei 22°C im Heizblock inkubiert. Anschließend werden je 500  $\mu$ l SM-Puffer und 20  $\mu$ l Chloroform zugegeben, vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert, um das Chloroform zu sedimentieren und den Überstand zu entnehmen, der die fertigen Phagen enthalten sollte. Der Überstand kann bei 4°C bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

#### 4.25.5. Phagentransduktion in *E. coli* Wirtszellen

Da die DNA, die in den Phagenköpfen verpackt wurde keine  $\lambda$ -Proteine kodiert können keine viralen Partikel in der infizierten Zelle entstehen und sich somit auch keine Plaques entwickeln. Stattdessen zirkularisiert die DNA und bildet in den Zielzellen große Cosmid-Vektoren, die ein Stück fremder DNA, in diesem Falle Staphylokokken-DNA, tragen. Die Vektoren replizieren und die Kolonien können einfach auf Ampicillin-Platten selektioniert werden. Reaktionsansatz (1) wird mit den *E. coli* Wirtszellen XL1-blue inkubiert, die Positivkontrolle (2) mit dem mitgelieferten Stamm *E. coli* VCS257. Zunächst werden die Wirtszellen für die Infektion vorbereitet, indem eine Einzelkolonie des jeweiligen Stammes in 4 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% Maltose 5 h lang inkubiert wird. Davon wird 1 ml entnommen, die Zellen pelletiert und in SM-Puffer auf eine OD von 0,5 eingestellt. Für die Positivkontrolle werden 10  $\mu$ l von 10<sup>-2</sup> und 10<sup>-4</sup>-Verdünnungen der *Packaging*-Reaktion mit 200  $\mu$ l der Wirtszellen gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Suspension mit 3 ml LB-Top-Agar (48°C) gemischt und auf vorgewärmte LB-Platten gegeben. Für die Infektion der *E. coli* XL1-blue Zellen werden unterschiedliche Verdünnungen der Packaging Reaktion herangezogen. In einem Endvolumen von 50  $\mu$ l sind jeweils 25  $\mu$ l und 10  $\mu$ l der *Packaging*-Reaktion enthalten. Hinzu kommen je 50  $\mu$ l der in SM-Puffer aufgenommenen Wirtszellen. Die Ansätze wird gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Es wird je 1 ml LB-Medium zugegeben, 1 h bei 37°C inkubiert und die Ansätze ab und zu vorsichtig geschwenkt. Die Zellen werden danach abzentrifugiert, in je 100  $\mu$ l frischem LB-Medium aufgenommen und je 50  $\mu$ l auf LB-Platten mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Variationen in der Produktion des Polysaccharid-Interzellulären Adhäsins (PIA) bei Nachkommen eines klinischen *Staphylococcus epidermidis* Isolats

Bei Kultivierung einer *ica*-positiven, adhärennten *Staphylococcus epidermidis* Wildtyp-Kolonie treten spontan nicht-adhärennte und somit PIA-negative *S. epidermidis* Varianten auf. Nach Subkultivierung einer PIA-positiven Einzelkolonie erhält man eine Population, in der sowohl PIA-produzierende als auch PIA-negative Klone nachzuweisen sind. PIA-positive und PIA-negative Klone lassen sich auf Kongorotagar anhand ihrer Koloniefarbe leicht differenzieren (s. 5.1.2.1.). Die Variation in der Biofilmbildung ist neben äußeren Faktoren auch auf unterschiedliche molekulare Mechanismen zurückzuführen. Hierzu gehören genomische Rearrangements, Insertion eines IS-Elements und die Deletion von DNA-Abschnitten unterschiedlicher Größe (s. 5.1.3.1.-5.1.3.3.).

#### 5.1.1. Bestimmung der Variationsrate der PIA-Produktion

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Insertion des IS-Elements IS256 in das *ica*-Operon einen PIA-negativen Phänotyp hervorruft. Im folgenden Experiment wurde die Variationsrate der PIA-Produktion allgemein (Variationsrate) sowie bezüglich auftretender Insertionen von IS256 und Deletionen (Insertions- und Deletionsrate) bestimmt.

Eine Einzelkolonie des Biofilm-positiven *S. epidermidis* Stammes 307 wurde verdünnt, in einer Flüssigkultur bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen und anschließend auf Kongorotagarplatten ausplattiert (s. 4.22.). Die resultierenden roten Kolonien wurden gepickt und im Adhärenzassay auf ihre Fähigkeit, Biofilm zu bilden untersucht. Nachfolgend wurde eine Pulsfeldgelelektrophorese durchgeführt um eventuelle Kontaminationen auszuschließen. Die verbleibenden Klone wurden auf das Vorhandensein des *ica*-Operons durch *icaA*- und *icaC*-spezifische PCR-Reaktionen und Southern Blot Hybridisierung mit *icaA* und *icaC*-spezifischen Sonden getestet. In zwei unabhängigen Versuchen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Versuch 1:

Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen ( <i>n</i> ):	25,6
Gesamtzahl der ausplattierten Kolonien:	1,7478 x 10 <sup>6</sup>
Anzahl der Bakterien im Inokulum ( <i>N</i> <sub>0</sub> ):	912
Gesamtzahl der Bakterien in der Kultur ( <i>N</i> ):	4,5 x 10 <sup>10</sup>

Gesamtzahl der roten Kolonien:	223
Gesamtzahl der PIA-negativen Kolonien:	49
Anzahl der <i>icaC/icaA</i> ::IS256 Insertionen:	7
Anzahl der <i>icaC/icaA</i> -Deletionen:	4

Versuch 2:

Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen ( $n$ ):	27,24
Gesamtzahl der ausplattierten Kolonien:	$1,847 \cdot 10^6$
Anzahl der Bakterien im Inokulum ( $N_0$ ):	871
Gesamtzahl der Bakterien in der Kultur ( $N$ ):	$1,385 \times 10^{11}$
Gesamtzahl der roten Kolonien:	871
Gesamtzahl der PIA-negativen Kolonien:	847
Anzahl der <i>icaC/icaA</i> ::IS256 Insertionen:	3
Anzahl der <i>icaC/icaA</i> -Deletionen:	1

Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Ereignisses ( $P$ ) pro Zelle und Generation berechnet sich aus der Formel

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

wobei  $n$  für die Anzahl der stattgefundenen Zellteilungen steht und  $x = (\text{Anzahl der PIA-negativen Kolonien}) / (\text{Gesamtzahl der ausplattierten Kolonien})$  ist.

Die Anzahl der Zellteilungen  $n$  berechnet sich wie folgt:

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

$N$  = Gesamtzahl der Bakterien in der Kultur;  $N_0$  = Anzahl der Bakterien im Inokulum.

#### Variationsrate:

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer PIA-negativen Kolonie ist demzufolge für

Versuch 1:  $P = 1,1 \times 10^{-6}$

Versuch 2:  $P = 1,6 \times 10^{-5}$ .

#### Insertionsrate:

Die Wahrscheinlichkeit einer Insertion beträgt für

Versuch 1:  $P = 1,57 \times 10^{-7}$

Versuch 2:  $P = 6 \times 10^{-8}$ .

#### Deletionsrate:

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Deletionsereignisses beträgt für

Versuch 1:  $P = 6,72 \times 10^{-8}$

Versuch 2:  $P = 2 \times 10^{-8}$ .

Variations- und Insertionsrate wurden in früheren Experimenten für den Stamm *S. epidermidis* RP62A bestimmt. Die Variationsrate für diesen Stamm betrug 4 bis  $6 \times 10^{-5}$ , die Insertionsrate betrug 1,4 bis  $1,9 \times 10^{-6}$ . Die variable PIA-Produktion und die damit

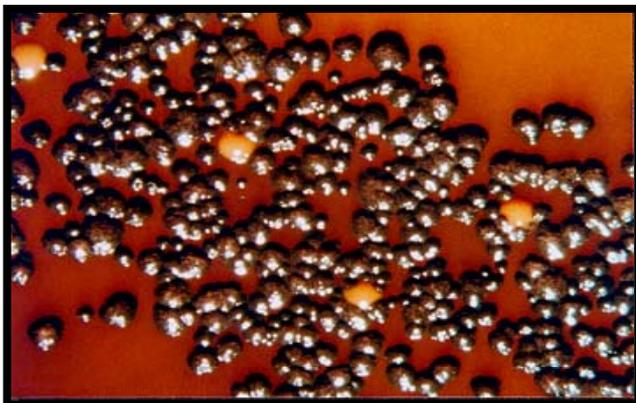
verbundene Häufigkeit einer IS256-Insertion in das *ica*-Operon scheint von Stamm zu Stamm unterschiedlich zu sein. Möglicherweise haben auch äußere Faktoren wie die Kultivierung der Bakterien und die Ernte der Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen bzw. nach einer unterschiedlichen Anzahl an Zellteilungen Einfluß auf die Variationsraten. Die erhaltenen Deletions- und Insertionsmutanten wurden anschließend genauer charakterisiert (s. 5.1.2. und 5.1.3. bzw 5.3.).

### 5.1.2. Phänotypische Analyse der *Staphylococcus epidermidis*-Varianten

Die Betrachtung der Koloniemorphologie und die Durchführung des Adhärenzassays umfaßt alle *S. epidermidis* Varianten. Mit den als Insertions- bzw Deletionsmutanten von *S. epidermidis* 307 identifizierten Klonen wurden weitere Tests durchgeführt, die in Abschnitt 5.2.1. beschrieben werden.

#### 5.1.2.1. Betrachtung der Koloniemorphologie auf Kongorotagarplatten

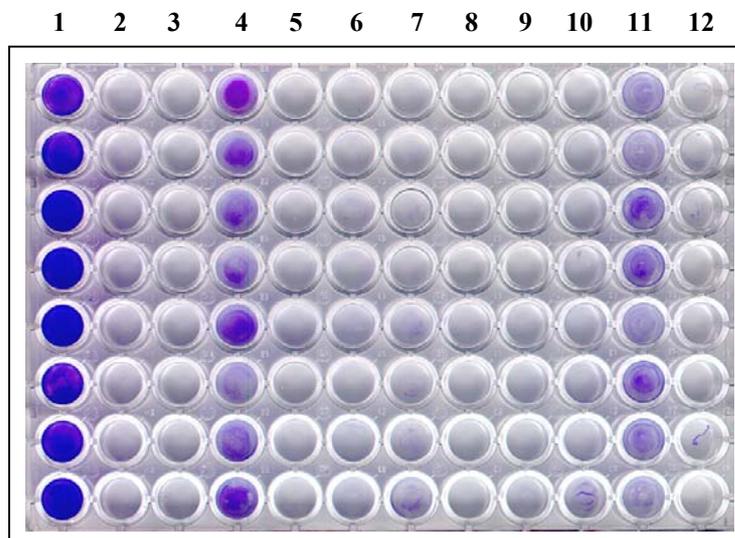
Das Erscheinungsbild der von *S. epidermidis* auf Kongorotagarplatten gebildeten Kolonien war recht verschieden (Abb. 5.1.). So wurden einerseits Kolonien mit eindeutig roter oder schwarzer Färbung identifiziert. Es kamen aber auch solche vor, die entweder eine braune oder rotbraune Farbe oder schwarze und rote Fragmente aufwiesen. Weiterhin ließen sich Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit der Kolonien beobachten. Die in Abschnitt 5.1.1. beschriebenen PIA-negativen Kolonien unterschieden sich vor allem dadurch von den PIA-positiven Kolonien, als daß sie eine glattere Oberfläche aufwiesen. Es mußte also nicht unbedingt eine eindeutig rote Koloniefarbe vorliegen, um einen Klon mit Hilfe des Adhärenzassays als nicht-adhärent einzustufen. Auf der anderen Seite war eine rauhe, schwarze Kolonie immer adhärent.



**Abb. 5.1.:** Nach Kultivierung auf Kongorotagarplatten können Biofilm-positive *S. epidermidis* Kolonien (schwarz) von Biofilm-negativen Kolonien (rot) unterschieden werden.

### 5.1.2.2. Durchführung von Adhärenzassays mit roten *Staphylococcus epidermidis* Kolonien

Mit 223 roten Kolonien aus Versuch 1 und 871 roten Kolonien aus Versuch 2 wurden Adhärenzassays durchgeführt. Da sich einige der rot erscheinenden Kolonien im Adhärenzassay (Abb. 5.2.) als Biofilm-positiv erwiesen, reduzierte sich die Anzahl der nicht adhärenenten und damit vermutlich PIA-negativen Klone auf 49 für Versuch 1 und 847 für Versuch 2. Diese nun als PIA-positiv identifizierten Klone sind möglicherweise regulatorischen Einflüssen unterworfen. Mit allen 49 Klonen aus Versuch 1 und einer Auswahl von 85 Klonen aus Versuch 2 wurden einige genotypische Untersuchungen durchgeführt (s. 5.1.3.).



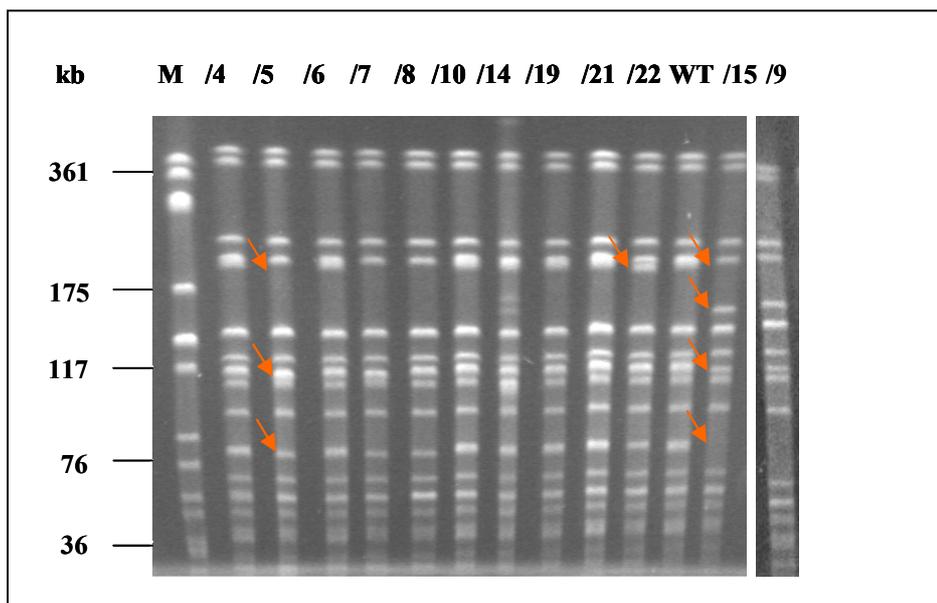
**Abb. 5.2.:** Adhärenzassay in einer Polystyren-Mikrotiterplatte nach Anfärbung der Bakterien mit Kristallviolett. Reihe 1: *S. epidermidis* 307; Reihe 2: Negativkontrolle: *S. carnosus* TM300; Reihe 3-12: Biofilm-negative *S. epidermidis* 307-Varianten.

### 5.1.3. Genotypische Analyse der *Staphylococcus epidermidis* Varianten

Zunächst wurde mit den PIA-negativen Varianten eine Pulsfeldgelelektrophorese durchgeführt, um Kontaminationen auszuschließen und Genomumordnungen, sogenannte *Rearrangements* nachzuweisen (s. 5.1.3.1.). Da die PIA-Produktion von der Präsenz und Expression des *ica*-Operons abhängt, sind *icaA* und *icaC*-spezifische PCR-Reaktionen durchgeführt worden, weiterhin wurde eine Southernblot-Hybridisierung mit *icaA*- und *icaC* spezifischen Sonden zur Bestätigung der erhaltenen Resultate durchgeführt. Es wurde die Anzahl und die Verteilung des IS256-Elements durch Hybridisierungs-experimente mit IS256-spezifischen Sonden untersucht (s. 5.1.3.3.). Mit den identifizierten *S. epidermidis*-Deletions- und Insertionsmutanten (s. 5.1.3.2.) wurden weitere Tests durchgeführt, die in den Abschnitten 5.2.1. und 5.2.2. beschrieben werden.

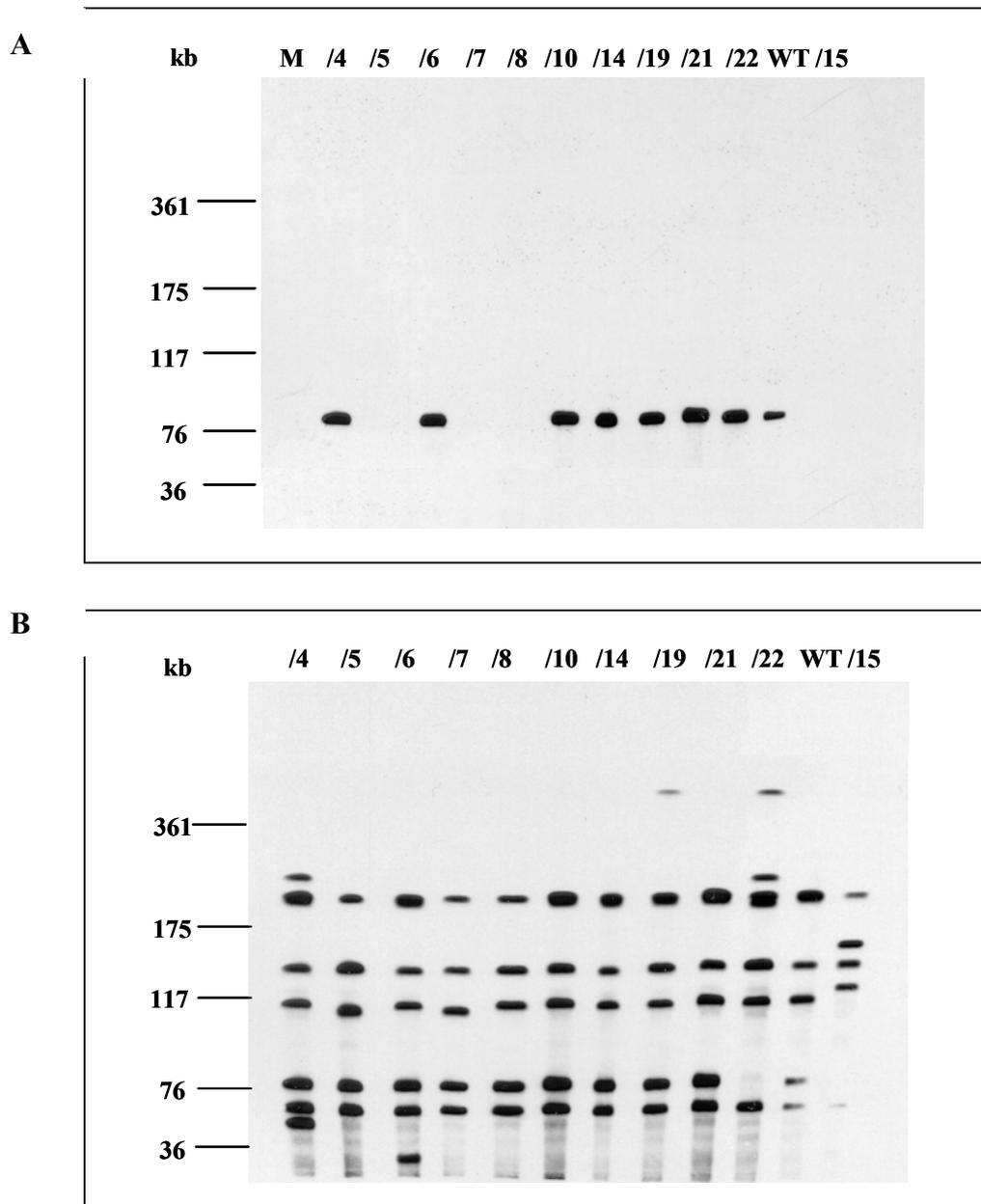
### 5.1.3.1. Ausschluß von Kontaminationen und Nachweis von *Rearrangements* durch Pulsfeldgelelektrophorese

Mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wurde der DNA-Fingerabdruck des Wildtyp-Stammes *S. epidermidis* 307 mit den Profilen seiner PIA-negativen Varianten verglichen (Abb. 5.3.). Hierbei konnten zwar Unterschiede im Bandenmuster festgestellt werden, diese stellen jedoch nicht in Frage, daß es sich bei allen aufgeführten Varianten um den gleichen Stamm handelt. Die identifizierten Unterschiede im Bandenmuster weisen auf Umordnungen im Genom hin, hierbei konnte auch die Deletion eines großen DNA-Abschnittes beobachtet werden. Auffällig ist Variante 307/9, bei der mehrere Änderungen im Bandenmuster im Vergleich zum Wildtyp 307 zu erkennen sind. Drei Banden von ca. 117 kb, 80 kb und 200 kb gehen im Gegensatz zum Wildtyp verloren, wobei eine 150 kb-Bande erscheint, die beim Wildtyp nicht zu verzeichnen ist (Abb 5.3.). Daraus ergibt sich rein rechnerisch für den deletierten DNA-Bereich eine Größe von ca. 250 kb, das sind fast 10% der *S. epidermidis*-Gesamtgenomgröße von 2,8 Mb. Bei genauerer Betrachtung fallen noch weitere Unterschiede auf, die in der folgenden Abbildung mit Pfeilen markiert sind.



**Abb. 5.3.:** Pulsfeldgelelektrophorese mit *SmaI*-geschnittener chromosomaler DNA verschiedener Biofilm-negativer *S. epidermidis* Varianten. Unterschiede im Bandenmuster der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sind mit Pfeilen markiert. Spur 1: Marker (M); Spur 2-11 und 13-14: PIA-negative Varianten des Stammes *S. epidermidis* 307; Spur 12: *S. epidermidis* 307 Wildtyp (WT).

Die DNA wurde anschließend mittels Vakuumblot auf eine Nylonmembran übertragen und mit *icaA*-, *icaC*- und IS256-spezifischen Sonden hybridisiert. Die Hybridisierung der DNA einiger Varianten mit *icaA* und IS256 ist in Abbildung 5.4. dargestellt.



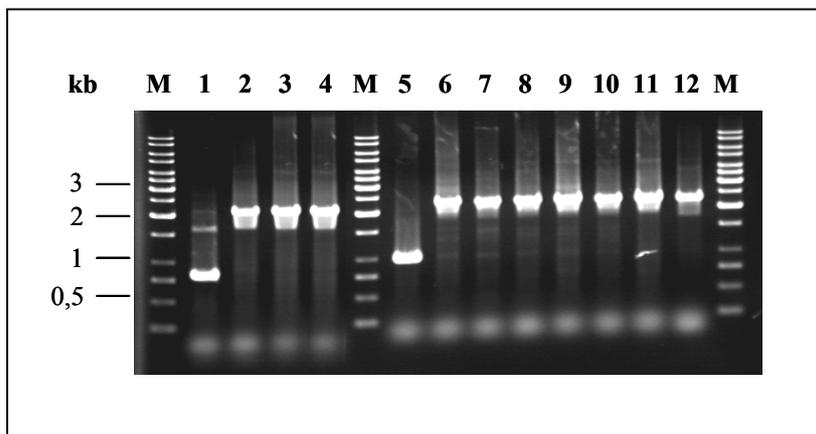
**Abb. 5.4.:** *icaA*- (A) und IS256-spezifische Southern-Hybridisierung (B) mit im Pulsfeldgel aufgetrennter, *Sma*I-hydrolysiertes chromosomaler DNA verschiedener Biofilm-negativer *S. epidermidis* Varianten. Spur 1-10 und 12: PIA-negative Varianten des Stammes *S. epidermidis* 307; Spur 12: *S. epidermidis* 307 Wildtyp (WT).

### 5.1.3.2. *icaA*- und *icaC*-spezifische PCR und Southern-Hybridisierung

Die Grundlage für die Synthese von PIA und somit für die Eigenschaft von *S. epidermidis* an Oberflächen zu haften ist das Vorhandensein und die Expression des *ica*-Operons. Der Verlust der Fähigkeit zur Adhärenz legt die Vermutung nahe, daß bei nicht-adhärenen *S. epidermidis*-Varianten das *ica*-Operon von einer Mutation betroffen ist oder sogar fehlen könnte. Um diese Hypothese zu prüfen wurde zunächst von allen erhaltenen Varianten *Eco*RI-gespaltene chromosomale DNA in einer Southern-Hybridisierung mit *icaA* und *icaC*-

spezifischen Sonden untersucht. Von allen in Abschnitt 5.1.1. genannten biofilm-negativen Varianten zeigten 10 einen Bandenshift, bei 5 Varianten fehlte eine *ica*-spezifische Hybridisierungsbande. Diese Beobachtung konnte mit Hilfe einer PCR-Amplifikation der *ica*-Gene bestätigt werden, hier konnte bei 10 Varianten ein um ca. 1,3 kb größeres PCR-Produkt (Abb. 5.5.), bei 5 Varianten kein PCR-Produkt erhalten werden.

Diese Daten legen die Vermutung nahe, daß sowohl eine Insertion zusätzlicher DNA als auch die Deletion eines DNA-Abschnittes auftreten kann. Bei der Insertion handelt es sich um das Insertionselement IS256, das dafür bekannt ist, in *S. epidermidis* RP62A durch Insertion in das *ica*-Operon und Exzision eine Phasenvariation hervorzurufen. Die Annahme, daß es sich hier um das gleiche IS-Element handelt wurde durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt. (s. Abschnitt 5.3.2.).



**Abb. 5.5.:** *icaA*- (Spur 1-4) und *icaC*-spezifische PCR (Spur 5-12) mit chromosomaler DNA von Varianten des Stammes *S. epidermidis* 307 mit IS256-Insertion im *icaA*- bzw. *icaC*-Gen.

Alle anderen stabilen biofilm-negativen Varianten zeigen bezüglich des *ica* einen normalen genetischen Hintergrund. Ihr Verlust der Adhärenz ist möglicherweise auf Punktmutationen direkt im *ica*-Operon oder in Genen, die einen regulatorischen Einfluß auf die Biofilmbildung haben, zurückzuführen. Diese Varianten wurden im Folgenden nur hinsichtlich ihres IS256-Hybridisierungsmusters untersucht.

Tabelle 5.1. gibt einen Überblick über identifizierte Insertions- und Deletionsmutanten. Hierbei ist zu beachten, daß 7 Varianten in die Tabelle und in weitere Untersuchungen aufgenommen wurden (Varianten Nr. 5-20), die nicht aus den beschriebenen Versuchen, sondern aus einem früheren Experiment (Versuch 0) hervorgegangen sind:

Variante 307 Nr.	<i>icaA</i> -Gen	<i>icaC</i> -Gen
5	-	-
8	-	-
9	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
20	-	-
28	IS256	+
29	-	-
30	IS256	+
44	+	IS256
46	+	IS256
47	-	-
48	+	IS256
55	-	+
56	+	-
59	+	+
60	+	IS256
63	+	IS256
95	+	IS256
96	IS256	+
101	+	IS256
108	-	-
Alle anderen Varianten Σ 137	+	+

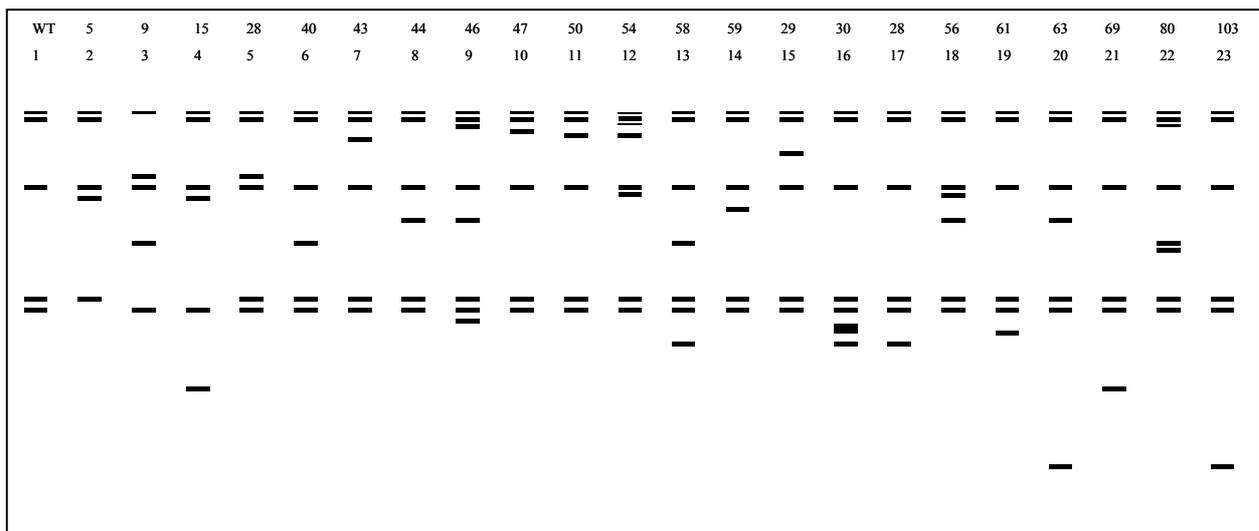
**Tab. 5.1.:**  
Zusammenfassung der Untersuchung der PIA-negativen *S. epidermidis* 307-Varianten mittels Southern-Hybridisierung und PCR: Insertion von IS256 in das *icaA* oder *icaC*-Gen oder Deletion der entsprechenden Gene als Ursache für einen Biofilm-negativen Phänotyp.

### 5.1.3.3. IS256-Hybridisierungsmuster von *Staphylococcus epidermidis* 307 und dessen Varianten

Für die Hybridisierung mit einer IS256-spezifischen Sonde wurde die chromosomale DNA von *S. epidermidis* 307 und 134 Varianten zunächst mit *EcoRI* gespalten. Dieses Enzym hat in der IS256-Sequenz keine Restriktionsstelle, so daß im optimalen Fall jedes Hybridisierungssignal ein IS-Element anzeigt, falls nicht zwei oder mehr IS-Elemente auf einem DNA-Fragment liegen (z.B. Tn4001). Die benötigte Sonde wurde mit den Primern IS256forw und IS256rev hergestellt. Nach Hybridisierung über Nacht und anschließenden Waschschritten (Waschpuffer I 0,1 x SSC; 0,4% SDS) konnten 23 unterschiedliche Hybridisierungsmuster mit einer IS256-Kopienzahl von 5 bis 8 identifiziert werden (s. Abb. 5.6.). Weiterhin konnten unterschiedliche Häufigkeiten für das Auftreten eines bestimmten Hybridisierungsmusters festgestellt werden. Bei insgesamt 65 Varianten aus Versuch 1 und Versuch 2 war das IS-Muster zu dem des *S. epidermidis* 307 Wildtyps (Muster Nr.1) identisch. Bei Muster Nr. 6 ist auffällig, daß dieses vorwiegend im zweiten Versuch auftrat, wo im Gegensatz zu 2 Varianten in Versuch 1 36 Varianten in Versuch 2 dieses Muster aufweisen. Das deutet darauf hin, daß die Transposition des IS256-Elements an eine andere Stelle im Genom ein zufälliges Ereignis ist, das, je nachdem in welchem Wachstumsstadium der Kultur es stattfindet, unterschiedliche Auswirkungen auf die Bakterienpopulation hat. Außerdem kamen 15 Muster nur bei den Varianten vor, die aus dem ersten Versuch hervorgegangen sind (Nr. 5, Nr. 9-16, Nr. 17-23). Drei der Muster (Nr 2-4) traten nur bei

Deletionsmutanten auf, die aus dem unter 5.1.3.2. erwähnten Versuch 0 hervorgegangen sind, darunter auch Deletionsmutante 307/9. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß zwei IS-Elemente auf demselben DNA-Fragment liegen und damit mehr IS-Elemente vorhanden sind, als hier nachgewiesen werden können.

Diese vielfältigen Hybridisierungsmuster zeigen, daß IS256 keineswegs als stabiles genetisches Element angesehen und zu Typisierungszwecken von *S. epidermidis* und *S. aureus* herangezogen werden kann, wie 1997 von Deplano *et al.* beschrieben. Vielmehr zeigen diese Ergebnisse, daß es sich um ein IS-Element mit großer Aktivität handelt, dessen Kopienzahl und Position im Genom bei den Nachkommen einer einzigen Kolonie nach nur einer Passage stark variieren kann. Die Transposition von IS256 verursacht Geninaktivierungen durch Insertionen z.B. im *icaC*-Gen, aber wahrscheinlich auch die Deletion von großen DNA-Abschnitten, wie in 5.2.2. beschrieben. Da es sich bei der Transposition vermutlich um ein nicht gerichtetes Ereignis handelt, kann IS256 maßgeblich an der Variabilität des Genoms von *Staphylococcus epidermidis* und anderen IS256-positiven Stämmen beteiligt sein.



Anzahl der IS256-Hybridisierungsbanden																						
5	5	5	6	6	6	6	6	8	6	6	8	7	6	6	8	6	7	6	7	6	8	6
Häufigkeiten der IS256-Hybridisierungsmuster: Versuch 0+1/ Versuch 2																						
26	1	4	1	1	2	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	-	-	-	-	36	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-

**Abb. 5.6.:** Schematische Zusammenfassung unterschiedlicher IS256-Hybridisierungsmuster, die aus den Nachkommen von *S. epidermidis* 307 nach 25 bzw. 27 Teilungen (s. 5.1.1.) hervorgegangen sind. Es sind die Anzahl der IS256-Hybridisierungsbanden und die Häufigkeiten der einzelnen IS256-Hybridisierungsmuster bezüglich aller untersuchten Varianten angegeben.

**Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 5.1.**

- Die PIA-Produktion und die damit verbundene Biofilmbildung von Nachkommen einer *S. epidermidis* 307 Einzelkolonie ist variabel.
- Ursache für einen PIA-negativen *S. epidermidis*-Phänotyp ist neben möglichen regulatorischen Phänomenen und Punktmutationen die Insertion von IS256 in das *ica*-Operon oder eine Deletion des *ica*-Operons.
- IS256 ist in *S. epidermidis* 307 aktiv. Das IS256-Hybridisierungsmuster der verschiedenen PIA-negativen Varianten ist sehr heterogen.

## 5.2. Charakterisierung der Deletionsmutanten *Staphylococcus epidermidis* 307/9 und 307/56

Zwei der in Abschnitt 5.1.3.1. beschriebenen Deletionsmutanten, *S. epidermidis* 307/9 und *S. epidermidis* 307/56, wurden hinsichtlich der Größe und Sequenz des deletierten Bereichs untersucht. Weiterhin wurden einige phänotypische Tests durchgeführt, die dazu dienen, die Fitness der Mutanten nach Verlust eines größeren DNA-Abschnittes zu beurteilen.

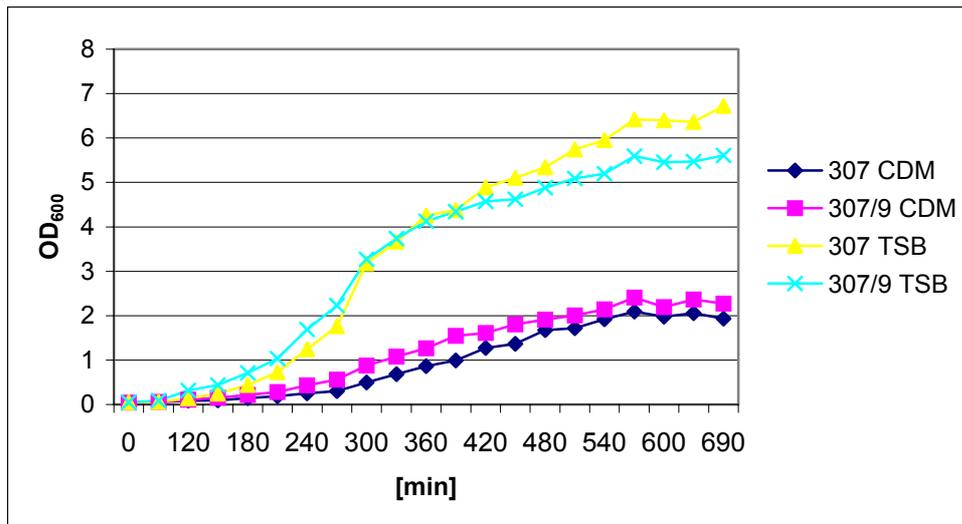
### 5.2.1. Phänotypische Tests

Zu den phänotypischen Tests zählt die Beurteilung des Wachstums in unterschiedlichen Medien unter Zusatz von verschiedenen Chemikalien und bei unterschiedlichen Temperaturen, die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Gentamicin und die Durchführung eines API-Staph-Tests. Diese Versuche wurden nur mit der Mutante 307/9 und dem dazugehörigen Wildtypstamm *S. epidermidis* 307 durchgeführt. Ein Plattendiffusionstest mit unterschiedlichen Antibiotika wurde zusätzlich mit der Mutante 307/56 durchgeführt.

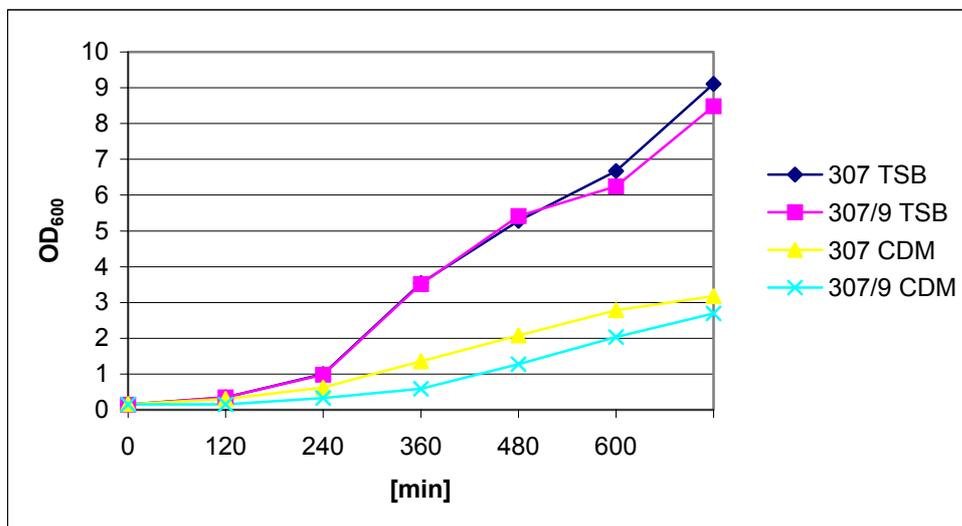
#### 5.2.1.1. Wachstumsverhalten von *S. epidermidis* 307/9 im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* 307

Umweltfaktoren wie Nährstoffe oder Temperatur beeinflussen das Bakterienwachstum in einer Kultur. Für den Vergleich des Wachstumsverhaltens von *S. epidermidis* 307/9 und *S. epidermidis* WT wurden die Zellen in einem Vollmedium (TSB) und einem Minimalmedium (CDM) kultiviert. Das Wachstum wurde bei Temperaturen von 37°C und 30°C beobachtet. Weiterhin wurde dem Minimalmedium 0,01% SDS, 0,5% Ethanol und 0,06% Harnstoff zugesetzt, was einen Einfluß auf die *ica*-Expression als Antwort auf Streß haben kann (Rachid et al. 2000).

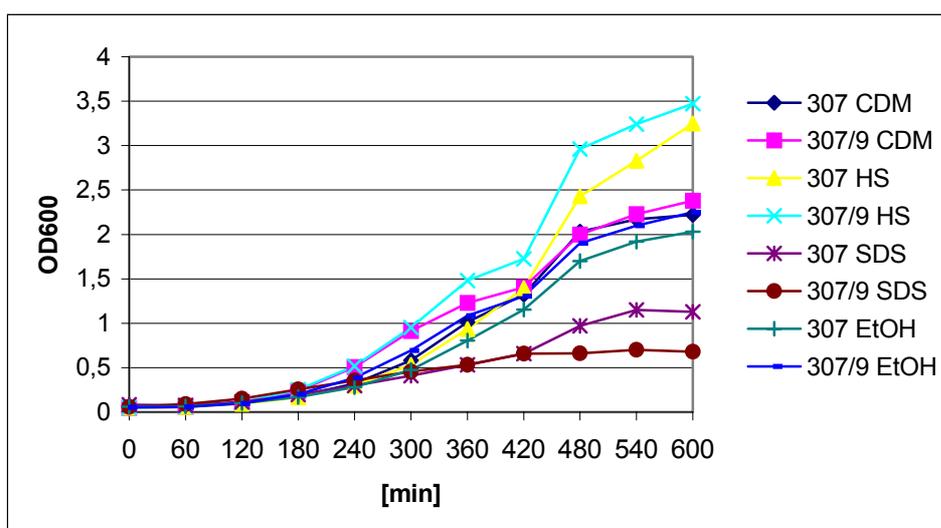
Für die Erstellung der Wachstumskurven wird eine Einzelkolonie der Bakterien über Nacht in Vollmedium inkubiert. Anschließend wird eine Tageskultur angesetzt, indem eine 1:100 Verdünnung der ÜNK in 50 ml Medium hergestellt und diese bei entsprechenden Temperaturen und einer Frequenz von 200 rpm inkubiert wird. In definierten Zeitintervallen wird unter sterilen Bedingungen eine Probe entnommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt.



A



B



C

**Abb. 5.7.:** (A) Wachstum von *S. epidermidis* 307 und 307/9 in Minimalmedium (CDM) und Vollmedium (TSB) bei 37°C  
 (B) Wachstum von *S. epidermidis* 307 und 307/9 in Minimalmedium (CDM) und Vollmedium (TSB) bei 30°C  
 (C) Wachstum von *S. epidermidis* 307 und 307/9 in Minimalmedium (CDM) und unter Zusatz von 0,01% SDS (SDS), 0,06% Harnstoff (HS) und 0,5% Ethanol (EtOH)

Der Verlust eines DNA-Bereichs von ca. 250 kb scheint keinen Einfluß auf das Wachstumverhalten der Deletionsmutante *S. epidermidis* 307/9 zu haben. Wildtyp und Mutante wachsen unter denselben Bedingungen gleich schnell und bis zu gleicher Bakteriendichte in Voll- und Minimalmedium (A). Bei einer Kultivierungstemperatur von 30°C unterscheidet sich das Wachstum im Vergleich zu 37°C nur darin, daß sowohl Wildtyp als auch Mutante bis zu einer höheren Dichte bei 30°C wachsen können. Der Zusatz von SDS, Ethanol und Harnstoff beeinflusst Wildtyp und Mutante in gleicher Weise. Das Wachstum verläuft wesentlich langsamer, wenn SDS zugegeben wird, die Zugabe von Harnstoff hingegen scheint das Wachstum der Bakterien zu fördern.

### 5.2.1.2. Durchführung eines API-Staph-Tests

Mit *S. epidermidis* 307/WT und *S. epidermidis* 307/9 wurde ein API-Staph-Test durchgeführt, der aus 20 biochemischen Reaktionen besteht. Dabei ergab sich für den Wildtyp ein Zahlencode von 6606113 für die Mutante 6602112 was aus den unterschiedlichen Reaktionen der alkalischen Phosphatase und der Arginin-Dihydrolase resultiert. Diese Reaktionen sind im Falle des Wildtyps als positiv, für die Mutante als negativ zu bewerten. Vermutlich sind die für diese Stoffwechselreaktionen notwendigen Enzyme entweder direkt oder indirekt von der Deletion betroffen. In beiden Fällen konnte *Staphylococcus epidermidis* eindeutig identifiziert werden.

### 5.2.1.3. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Gentamicin bei *S. epidermidis* 307 und 307/9

Das *aacA-aphD*-Gen, das für ein Aminoglykosid-modifizierendes Enzym kodiert und Resistenz gegen Gentamicin vermittelt, ist in dem Transposon Tn4001 organisiert und wird von zwei IS256-Elementen flankiert (Rouch *et al.*, 1997). Wie unter 5.1.3.3. beschrieben ist IS256 sehr aktiv und an der Genomvariabilität von *S. epidermidis* beteiligt. Möglicherweise ist auch das Transposon Tn4001 von derartigen genomischen Umordnungen und Deletionen betroffen. Aus diesem Grund sollte die minimale Hemmkonzentration des Antibiotikums Gentamicin bei *S. epidermidis* 307 und dessen Deletionsmutante 307/9 bestimmt werden. Hierbei ergab sich, daß sowohl Wildtyp als auch Mutante gemäß der Grenzwerte nach DIN resistent gegen Gentamicin sind. Das läßt vermuten, daß das Transposon Tn4001 sowohl im Wildtyp-Stamm *S. epidermidis* 307 als auch in der Deletionsmutante *S. epidermidis* 307/9 vorhanden und voll funktionsfähig ist.

#### 5.2.1.4. Agardiffusionstest zur Ermittlung des Resistenzprofils von *S. epidermidis* 307/9 und *S. epidermidis* 307/56

Nach Durchführung eines Plattendiffusionstests mit unterschiedlichen Antibiotika wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Antibiotikum (Beladung pro Plättchen [µg])	Hemmhofdurchmesser 307 WT	Hemmhofdurchmesser 307/9	Hemmhofdurchmesser 307/56
Penicillin (10)	17	20	16
Erythromycin (15)	30	30	28
Gentamicin (10)	-	-	-
Tetracyclin (30)	-	-	-
Vancomycin (30)	20	18	17
Trimetoprim (5)	30	30	27
Clindamycin (2)	27	28	26
Oxacillin (1)	25	27	25
Chloramphenicol (30)	27	30	28

**Tab. 5.2.:** Ergebnis des Plattendiffusionstests mit unterschiedlichen Antibiotikatestplättchen. Als Maß für die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber den getesteten Antibiotika ist der Hemmhofdurchmesser in mm angegeben.

Es zeigt sich, daß sich *S. epidermidis* 307 und dessen Deletionsmutanten nicht in ihrem Resistenzmuster unterscheiden. Sowohl Wildtyp als auch Mutanten sind nur gegen Penicillin, Gentamicin und Tetrazyklin resistent, gegen alle anderen getesteten Antibiotika in der verwendeten Konzentration sind sie empfindlich. Vermutlich sind auf dem deletierten DNA-Fragment keine Gene vorhanden, die Resistenzen gegen die getesteten Antibiotika verleihen.

### 5.2.2. Untersuchung des deletierten DNA-Bereichs von *Staphylococcus epidermidis* 307/9

Betrachtet man Wachstums- und Resistenzverhalten, so besitzen *S. epidermidis* 307 und 307/9 nahezu die gleichen Eigenschaften (s. 5.2.1.). Unterschiede sind in der PIA-Produktion festzustellen, was auf ein Fehlen der *ica*-Gene in *S. epidermidis* 307/9 zurückzuführen ist. Aber nicht nur das *ica*-Operon fehlt bei *S. epidermidis* 307, sondern ein weitaus größerer Bereich von ca. 250 kb (5.1.3.1.). Mit dem Verlust des 250 kb großen DNA-Abschnittes geht auch ein verändertes IS256-Hybridisierungsmuster einher (s. 5.1.3.3.).

Deletionen werden u.a. durch die Rekombination von homologen Sequenzen hervorgerufen. Diese homologen Sequenzen sind meist repetitive Elemente aber auch IS-Elemente, die in mehreren aufeinanderfolgenden Kopien in gleicher Orientierung im Genom vorkommen. Es ist denkbar, daß IS256 am irreversiblen Verlust eines Genomabschnitts beteiligt ist: IS256 kommt mit 5–8 Kopien im Genom von *S. epidermidis* 307 und dessen Varianten vor und ist offensichtlich sehr aktiv (s. 5.1.3.3.). Um den Deletionsmechanismus aufzuklären ist es von großer Bedeutung, die Ränder des deletierten Bereichs zu untersuchen. Dort könnte es wertvolle Hinweise auf den Mechanismus in Form von repetitiven Elementen oder IS-Elementen geben.

Außerdem soll geklärt werden, welche Gene von der Deletion betroffen sind, denn deren Verlust hat keinen sichtbaren Effekt auf die Fitness der Mutanten.

Um an Sequenzinformationen dieses Bereichs zu gelangen wurde eine Cosmid-Genbank des Stammes *S. epidermidis* 307 (Wildtyp) hergestellt. Durch Dot-Blot-Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden wurden *ica*-positive Klone aufgesucht und zunächst ausgehend vom Cosmidvektor ansequenziert. Mit den Sequenzinformationen aus diesen Bereichen wurden durch PCR-Amplifikation DNA-Sonden hergestellt, mit denen die jeweiligen Anschlußklone in der Genbank detektiert wurden. Gleichzeitig wurden die Deletionsmutanten mit diesen Sonden hybridisiert, um festzustellen, ob der entsprechende DNA-Abschnitt noch Teil des deletierten Bereichs ist. Durch Sequenzierung und Southern-Hybridisierung wurde ein DNA-Abschnitt gefunden, der in relativer Nähe zum vermuteten Grenzbereich aber noch außerhalb der Deletion liegt. Im Fall von Deletionsmutante 307/56 wurden durch inverse PCR die exakten Grenzen der Deletion bestimmt (s. 5.2.3.1.). Bei Deletionsmutante 307/9 gestaltete sich das Vorgehen etwas schwieriger, da die Präsenz von zwei IS256 Elementen im Grenzbereich keine spezifische PCR zuließ (s. 5.2.2.3.). Schließlich wurden die erhaltenen Sequenzinformationen mit der teilweise in der Datenbank zur Verfügung stehenden Sequenz von *S. epidermidis* RP62A verglichen und eine Genkarte erstellt.

### 5.2.2.1. Erstellung einer Cosmid-Genbank von *Staphylococcus epidermidis* 307

Für die Genomanalyse eines vollständigen Chromosoms müssen die überlappenden DNA-Fragmente erfaßt werden, die ein Genom abdecken. Es wurde eine Genbank des Stammes *S. epidermidis* 307 hergestellt, bei dem zufallsmäßig DNA-Fragmente, welche durch partielle Hydrolyse der chromosomalen DNA erhalten wurden, in einen Cosmid-Vektor kloniert und in einer sog. *shot gun* Bibliothek angelegt wurden. Um das ca. 2,5 Mb große Genom von *S. epidermidis* zehnfach abzudecken benötigt man ca. 700 Klone mit je einer Insertgröße von 30-45 kb.

Die Erstellung der Genbank erfolgte mit dem Cosmid-Vektor SuperCos1 (Stratagene). Hierbei handelt es sich um einen 7,9 kb großen Cosmid-Vektor, der über eine Ampicillin-Resistenzkassette verfügt und ca. 30-45 kb große DNA-Fragmente aufnehmen kann (s. auch 4.23.). Nach partieller Hydrolyse der DNA, Ligation in den Vektor, „Packaging“ in Phagenpartikel und Infektion von *E. coli* XL1-blue Zellen wurden mehr als 1500 Klone erhalten. Zunächst wurde die Cosmid-DNA in kleinem Maßstab isoliert und diese mit der Dot Blot-Methode auf Nylonmembranen aufgebracht. Als Positivkontrolle diente chromosomale DNA von *S. epidermidis* 307, als Negativkontrolle wurde chromosomale DNA des *E. coli* Stammes K12 DH5 $\alpha$  herangezogen. Mit diesen Membranen, auf denen DNA von maximal je 96 verschiedenen Klonen fixiert war, wurden Southern-Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Zunächst sollte ein Klon identifiziert werden, der die Gene des *ica*-Operons trägt, um von diesem bekannten Sequenzbereich in den benachbarten unbekanntem Bereich stromaufwärts und stromabwärts zu gelangen. Es wurde mittels PCR eine *icaA*- und eine *icaC*- spezifische Sonde hergestellt, die für die Hybridisierung herangezogen wurde. Dabei wurden ein Klon identifiziert, der die *icaA* und *icaC*-Sequenz aufweist (Klon Nr. 40). Durch oben beschriebene Vorgehensweise wurden 5 Klone identifiziert, die einen Bereich von insgesamt ca. 160 kb des deletierten Bereichs und darüber hinaus (hauptsächlich stromaufwärts von *ica* abdecken, und die bis auf eine Lücke von 7 kb mit mindestens 10 kb überlappen (s. Abb. 5.8.).

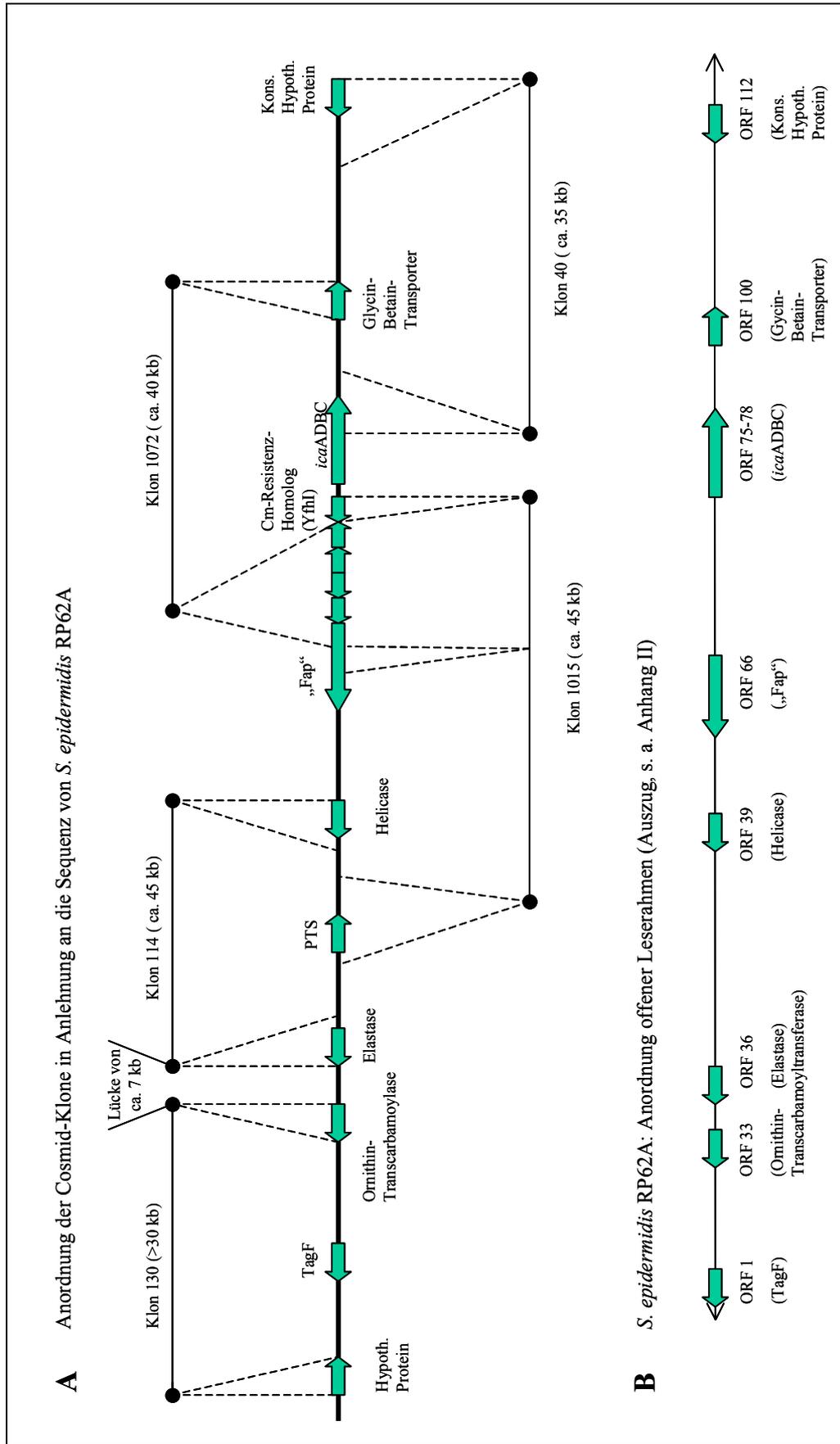
### 5.2.2.2. Sequenzierung und Charakterisierung von Teilen des deletierten Bereichs

Wie unter 5.2.2.1. erwähnt wurden fünf Klone identifiziert, die einen Teil des deletierten Bereichs abdecken. Diese Klone wurden hinsichtlich des Vorkommens von IS-Elementen untersucht, außerdem wurden alle fünf Klone ausgehend vom Cosmid-Vektor ansequenziert.

Aus den Southern-Hybridisierungsexperimenten, die mit chromosomaler DNA der Deletionsmutanten durchgeführt wurde hat sich ergeben, daß mit dem Verlust von *ica* auch eine Umordnung des Genoms stattfindet, die im Pulsfeldgel bestätigt werden konnte. Diese *Rearrangements* gehen mit einem variablen IS256-Hybridisierungsmuster einher, weiterhin

gehen durch den Deletionsprozeß vermutlich zwei IS257-Elemente und eine Kopie eines IS200-ähnlichen Elements verloren. Alle fünf Cosmid-Klone wurden auf das Vorhandensein von IS256, IS257 und des IS200 ähnlichen Elements mittels PCR untersucht. Es ergab sich, daß nur Klon 130 sowohl IS256 (s. 5.2.2.3) als auch das IS200 ähnliche Element trägt. Das IS200-ähnliche Element kommt bei *S. epidermidis* RP62A scheinbar an der gleichen Stelle im Genom vor (s. 5.2.2.4.).

Die Sequenzierung ausgehend vom Cosmid-Vektor wurde mit den Sequenzierprimern Scosforw und Scosrev durchgeführt, die in geringem Abstand zur *Bam*HI-Klonierungsstelle des Vektors binden, so daß mit einem Schritt unter optimalen Bedingungen bis zu 850 bp des inserierten Fragments sequenziert werden konnten. Bei den in diesem Abschnitt beschriebenen Sequenzen handelt es sich ausschließlich um Rohdaten, die mit Fehlern behaftet sein können. Es wurde darauf verzichtet, den Gegenstrang zu sequenzieren oder die Sequenzierung mehrmals durchzuführen. Eine detaillierte Auswertung der Sequenzierdaten ist im Anhang I zu finden. Die einzelnen sequenzierten DNA-Bereiche mit offenen Leserahmen, Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen, Nukleotidsequenz und die dazu verwendeten Primer sind aufgeführt.

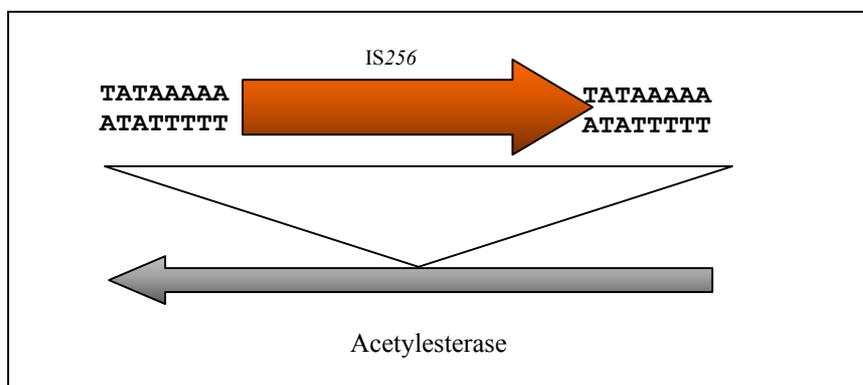


**Abb. 5.8.** Übersicht über die Anordnung von fünf identifizierten Genbank-Klonen, die einen ca. 160 kb-großen Bereich stromaufwärts und stromabwärts des *ica*-Operons abdecken (A). Zum Vergleich ist der entsprechende DNA-Abschnitt des Stammes *S. epidermidis* RP62A schematisch dargestellt (B).

### 5.2.2.3. IS256-Insertion im Genom des Wildtypstammes *Staphylococcus epidermidis* 307

Wie in Abschnitt 5.1.3.2. erwähnt, ist IS256 in der Lage, in das *ica*-Gencluster zu inserieren und dadurch einen nicht-adhärenen Phänotyp hervorzurufen. Im Genom des Biofilm-positiven Wildtyps *S. epidermidis* 307 sind mindestens fünf IS256-Kopien vorhanden (s. 5.1.3.3.), die keinen Einfluß auf die Adhärenz haben. Eine Untersuchung der IS256-Insertionsstellen und ein Vergleich mit den bekannten Insertionsstellen im *icaA*- und *icaC*-Gen könnte Hinweise auf die Target-Site-Präferenz des IS-Elements liefern.

Es wurde die Cosmid-DNA der Genbank-Klone, die im Dot-Blot fixiert worden war mit einer IS256-spezifischen Sonde hybridisiert. Es wurden 16 von 262 Klonen im Blot als IS256-positiv identifiziert. Bei einer IS256-spezifischen PCR-Reaktion konnten nur 12 von diesen Klonen als IS256-positiv angesehen werden, möglicherweise sind die IS-Elemente bei den anderen vier Genbank-Klonen nicht vollständig auf dem Insert vorhanden. Von vier entsprechenden Klonen (Nr. 130, 134, 181 und 333) wurde Cosmid-DNA isoliert (Midipräparation), die mit den IS256-Primern ISintern forw. und ISintern rev. aus der IS-Sequenz in den umgebenden DNA-Bereich sequenziert wurde. Interessanterweise ergab sich in allen drei Fällen dieselbe Insertionsstelle in einem Gen, das Ähnlichkeiten zu einer Acetylerase aufweist. Die Insertionsstellen mit Target-site Duplikationen waren absolut identisch (s. Abb. 5.9.). Ein Vergleich der Insertionsstelle und der umgebenden Sequenz mit den Insertionsstellen im *icaA*- und *icaC*-Gen ergaben keine Ähnlichkeiten.



**Abb. 5.9.:** IS256-Insertionsstelle mit 8 bp-Duplikation bei *S. epidermidis* 307 in einem Gen, das Ähnlichkeit zu einer Acetylerase aufweist.

Es konnten jeweils 600 bp der Sequenz stromaufwärts und stromabwärts der Insertionsstelle ermittelt werden. Ein Vergleich mit der entsprechenden Sequenz von *S. epidermidis* RP62A (s. Anhang und Abschnitt 5.2.2.4.) ergab, daß an dieser Stelle im Genom von Stamm RP62A kein IS256-Element auftritt.

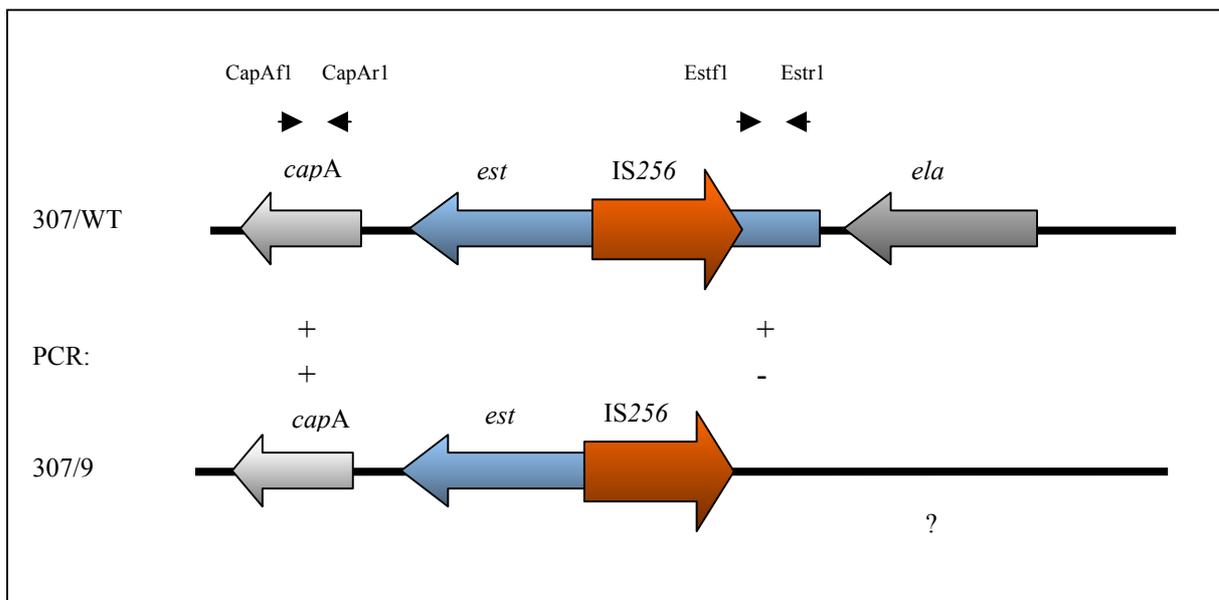
#### 5.2.2.4. Vergleich der Sequenz von *Staphylococcus epidermidis* 307 mit dem entsprechendem Sequenzbereich von *Staphylococcus epidermidis* RP62A

Eine Komplettssequenzierung der fünf unter 5.2.2.1. genannten Cosmid-Klone war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Um sich aber dennoch einen Überblick über die mögliche Sequenz des deletierten DNA-Bereichs zu verschaffen, wurde ein ca. 260 kb großer DNA-Bereich des Stammes *S. epidermidis* RP62A annotiert. Die Sequenzdaten des noch nicht abgeschlossenen Sequenzierprojektes dieses Stammes am *Institute for genomic research* stehen in Form ungeordneter Contigs ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)) zur Verfügung. Ausgehend vom *ica*-Gencluster wurde in beide Richtungen nach überlappenden DNA-Bereichen gesucht (TIGR-Blast), um die einzelnen Contigs zu ordnen (Contig Express). Die zusammengesetzte DNA-Sequenz wurde anschließend nach möglichen offenen Leserastern durchsucht (ORF-Finder) und diese nach Homologien zu bekannten Proteinen untersucht (pBlast-Search). In bestimmten Abständen wurden aus der bekannten *S. epidermidis* RP62A-DNA-Sequenz Primer konstruiert, die dazu dienten, zunächst zu prüfen, ob die entsprechenden DNA-Bereiche auch bei *S. epidermidis* 307 vorhanden sind und weiterhin, ob diese Bereiche von der Deletion betroffen sind. Eine ausführliche Abbildung im Anhang II zeigt alle akzeptierten offenen Leseraster. In der angefügten Tabelle sind die Proteine mit signifikanten Ähnlichkeiten aufgeführt. Unterschiede zwischen den beiden *S. epidermidis*-Stämmen RP62A und 307 konnten bezüglich des IS-Elements 257 und einiger Gene festgestellt werden, die dem *Staphylococcal cassette chromosome* (SCC) zuzuordnen sind. Das IS-Element 257, das in Staphylokokken mit unterschiedlichen Resistenzdeterminanten assoziiert ist, darunter verschiedene Schwermetallresistenzen, Tetracyclin, Trimethoprim und Aminoglykoside, kommt bei *S. epidermidis* RP62A stromaufwärts der Sequenz mit Ähnlichkeiten zu Genen für eine Cadmiumresistenz vor (ORF 9-12). Sowohl das IS257-Element, als auch die möglichen Gene für eine Cadmiumresistenz sind bei *S. epidermidis* 307 nicht vorhanden. Ein weiterer Unterschied der beiden Genome ist im Bereich der Gene, die möglicherweise ein Arsenresistenzoperon darstellen, zu finden (ORF 200-205). Zusammen mit den stromabwärts liegenden Genen, die Proteine kodieren, die Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen aus *aureus* besitzen (ORF 206-208) hat dieser DNA-Bereich Ähnlichkeit zum *Staphylococcal cassette chromosome* (SSC) das kürzlich bei Methicillin-resistenten *S. aureus* beschrieben wurde (Katayama *et al.*; 2000). Dieser 52kb-große DNA-Bereich beinhaltet neben dem *mecA*-Gen, das Resistenz gegen Methicillin vermittelt, zwei Gene, die für Rekombinasen der Integrase/Rekombinase-Familie kodieren. Bei SCC handelt es sich um ein genomisches Element, das möglicherweise zwischen Staphylokokken-Spezies übertragbar ist. Bei *S. epidermidis* 307 scheint dieses Element zumindest teilweise zu fehlen. Dieser Stamm ist erstens Methicillin-sensitiv und zweitens konnte in einer *mecA*-spezifischen PCR kein Produkt erhalten werden, was durch weitere Untersuchungen bestätigt werden müsste. Ansonsten konnten im untersuchten DNA-Bereich keine auffälligen Unterschiede zwischen *S. epidermidis* RP62A und *S. epidermidis* 307 festgestellt werden.

Aufgrund der erhaltenen Sequenzinformationen konnten alle *S. epidermidis* 307-Deletionsmutanten auf den deletierten Bereich hin untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 5.2.4. zusammengefaßt.

### 5.2.2.5. Shot-gun Klonierung und Sequenzierung des Deletionsrandbereiches von *Staphylococcus epidermidis* 307/9

Da der Randbereich eines deletierten DNA-Abschnittes Hinweise auf den Deletionsmechanismus liefern kann, wurde der Deletionsrandbereich von *S. epidermidis* 307/9 in einen Vektor kloniert und sequenziert. Nachdem aus 5.2.2.3. bekannt war, daß ein IS256-Element in *S. epidermidis* 307 in einer Sequenz mit Ähnlichkeit zu einer Tributyrinesterase vorkommt, wurde der angrenzende Bereich stromaufwärts und stromabwärts der Tributyrinesterase bei Deletionsmutante *S. epidermidis* 307/9 näher untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Sequenz mit Ähnlichkeit zum Elastase-Gen (*ela*), das stromaufwärts des Gens mit Ähnlichkeit zur Tributyrinesterase liegt, bei *S. epidermidis* 307/9 deletiert ist (Abb. 5.10.). Stromabwärts des putativen Gens für die Tributyrinesterase ist ein Gen zu finden, das gewisse Ähnlichkeiten zu einem Kapselsynthesegen aus *Streptococcus pyogenes* besitzt (*capA*: ORF 32). Es wurden Primer konstruiert, die einerseits stromaufwärts im *capA* (CapAfl/CapAr1) und andererseits stromabwärts der IS256-Insertionsstelle im Gen mit Ähnlichkeit zur Tributyrinesterase (*est*) (Estf1/Estr1) binden. Eine PCR-Reaktion zeigte, daß das Insertionselement IS256 die Grenze des deletierten Bereichs bildet.



**Abb. 5.10.:** Schematische Darstellung der Sequenz im Bereich der putativen Acetylerase bei *S. epidermidis* 307 und *S. epidermidis* 307/9 und die Ergebnisse aus CapA- und Est-PCR.

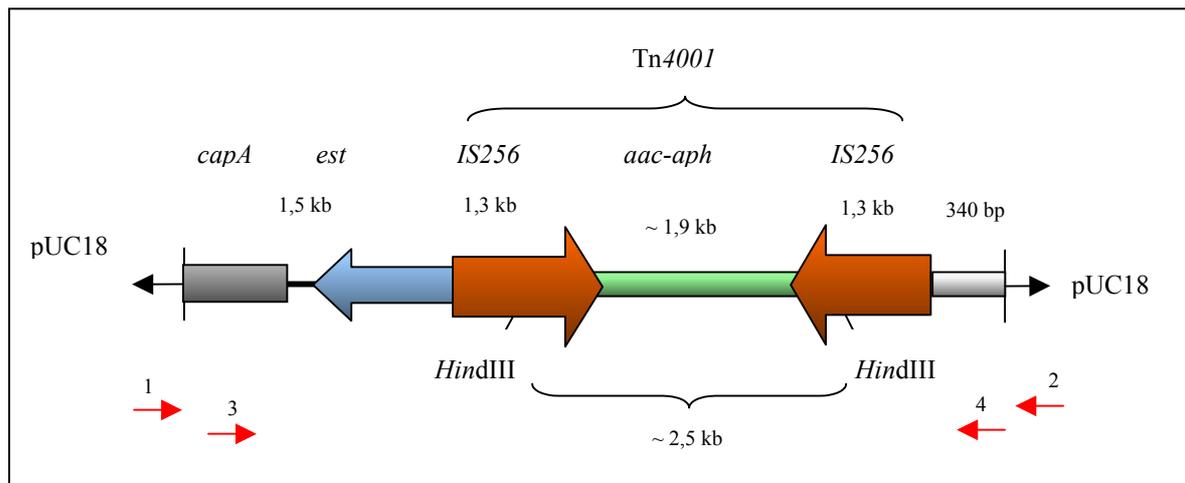
Um den Deletionsrandbereich von *S. epidermidis* 307/9 zu untersuchen mußte dieser kloniert und sequenziert werden. Nach Hydrolyse der chromosomalen DNA von *S. epidermidis* 307/9

und dessen Wildtyp mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *NruI* und anschließender Southern-Hybridisierung mit einer *capA*-spezifischen Sonde konnte ein ca. 6 kb bzw. 4,5 kb großes Fragment identifiziert werden. Dieses Fragment sollte direkt und ohne vorherige Amplifikation in einen entsprechend linearisierten Vektor ligiert werden (*Shot-gun*-Klonierung).

Es wurden 15 µg der chromosomalen DNA von 307/9 mit je 30U der Enzyme *EcoRV* und *NruI* gespalten. Nach Auftrennung der DNA in einem Agarosegel wurde die DNA im Bereich von 6 kb ausgeschnitten, aus der Agarose eluiert und in 50 µl 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,5 aufgenommen. Da die bei der Restriktion der DNA erhaltenen Fragmente über glatt geschnittene Enden verfügen wurde für die Ligation ein *SmaI*-linearisierter und dephosphorylierter pUC18-Vektor aus dem Sure Clone<sup>®</sup> Ligation Kit (Pharmacia) verwendet. Die Ligation wurde über Nacht bei 4°C nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden je 10 µl der Ansätze für eine Transformation in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen verwendet. Nach Inkubation der Transformanten bei 37°C über Nacht wurden 100 Klone gepickt. Von 51 Klonen wurden Zellysate hergestellt und mit diesen Lysaten als Template eine *capA*-spezifische PCR durchgeführt. Von 51 Klonen stellte sich einer als *capA*-positiv heraus, der pGAP9a benannt wurde. Um zu prüfen, ob sich auch IS256 auf dem inserierten Fragment befindet, wurde eine IS256-spezifische PCR durchgeführt, die sich ebenfalls als positiv erwies. Weiterhin wurde eine Präparation der Vektor-DNA (Minipräp) und eine Spaltung des Vektors mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *HindIII* und *EcoRI/HindIII* durchgeführt, um Informationen über die Größe des inserierten Fragments zu erlangen. Es ergab sich ein Restriktionsmuster was auf eine Insertgröße von ca. 6,5 – 7 kb schließen ließ. Die Vektor-DNA wurde anschließend aufgereinigt und das Insert ausgehend vom Vektor mit den Sequenzierprimern M13universal und M13reverse ansequenziert und mit den Sequenzierprimern CapAforw1 (5'-CAC CTA CAG CAA CCA CAC G-3') und 13forw1 (5'-CTA ATC CAT GTC ATA ATA TG-3') weitersequenziert. Dabei ergab sich, daß das IS-Element IS256 doppelt auf dem klonierten Fragment vorhanden ist (Abb. 5.11.). Der Sequenzbereich zwischen den beiden aufeinander zuweisenden IS-Elementen konnte nicht sequenziert werden, da jeder IS256 spezifische Sequenzierprimer in beiden IS-Sequenzen bindet, was während des PCR-Verlängerungsschrittes im unbekanntem Bereich zu Doppellesungen führt. Aus diesem Grund wurde ein ca. 2,5 kb großes *HindIII*-Fragment aus pGAP9a subkloniert, das sowohl jeweils die letzten 300 bp der IS-Elemente als auch den Bereich zwischen den IS-Elementen einschließt (Abb. 5.11.).

Es wurden 8 µl der Minipräp-DNA von pGAP9a mit *HindIII* gespalten, die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und das 2,5 kb große *HindIII*-Fragment aus dem Gel eluiert. Parallel dazu wurde 1 µg pUC18-Vektor mit *HindIII* linearisiert, die Vektor-DNA dephosphoryliert und aufgereinigt und die Ligationsreaktion angesetzt: *HindIII*-Fragment, 6 µl; pUC18 x *HindIII*, dephosphoryliert, 1 µl; Ligase (Gibco), 1 µl und 5 x Puffer, 2 µl. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14°C. Anschließend wurde der ganze Ansatz für eine Transformation in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen verwendet. Nach Inkubation der Transformanten bei

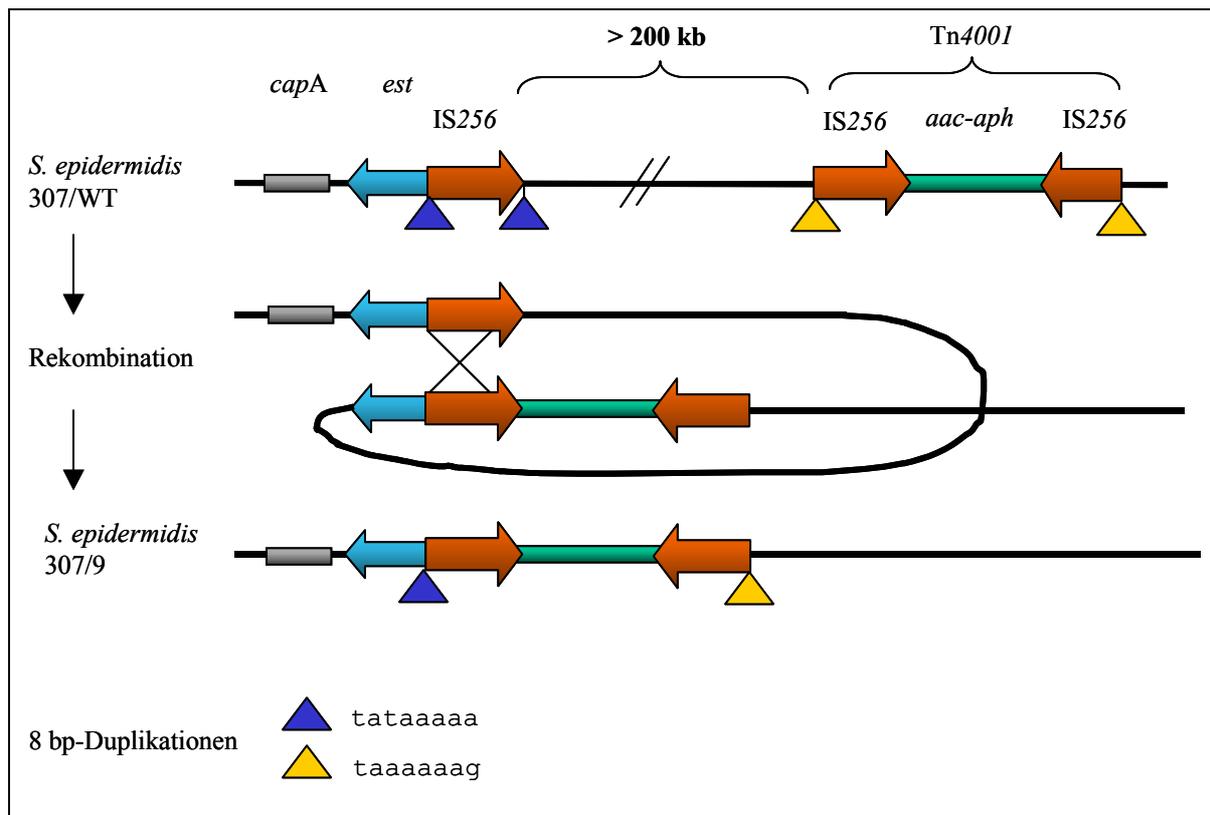
37°C über Nacht wurden 18 Klone gepickt, Plasmid-DNA präpariert, diese mit *Hind*III gespalten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Es konnte ein Klon identifiziert werden, der neben der 2,6 kb großen Vektorbande auch die 2,5 kb große Bande des inserierten Fragments zeigte. Dieser Klon wurde pGAP9b genannt. Die Vektor-DNA wurde aufgereinigt und das Insert ausgehend vom Vektor mit den Sequenzierprimern M13universal und M13reverse sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde nach Homologien zu bekannten Genen untersucht und es zeigte sich, daß es sich um das Gentamicin-Resistenz-vermittelnde Gen *aac-aph* handelt, das Teil des zusammengesetzten Transposons *Tn4001* ist.



**Abb. 5.11.:** Schematische Darstellung des klonierten *Nru*I/*Eco*RV-Fragments aus *S. epidermidis* 307/9 mit *capA*-Sequenz und dem Transposon *Tn4001*: pGAP9a. Die Pfeile mit den Ziffern 1-4 zeigen die Positionen der verwendeten Sequenzierprimer M13reverse, M13universal, CapAforw1 und 13forw1, die für die Sequenzierung von pGAP9a verwendet wurden. Das 2,5 kb-große *Hind*III-Fragment wurde subkloniert und der resultierende Vektor pGAP9b genannt.

Da es sich bei *Tn4001* um ein zusammengesetztes Transposon handelt, das aus zwei *IS256*-Elementen in den Randbereichen besteht und sich an der Grenze des deletierten Bereichs befindet, ist es wahrscheinlich, daß *IS256* am Deletionsmechanismus beteiligt ist. Möglich ist neben der Deletion durch ein Transpositionsereignis auch eine Deletion durch homologe Rekombination, die auftreten kann, wenn zwei *IS*-Elemente im Genom die gleiche Richtung aufweisen. Diese Vermutung wurde durch einen Vergleich der Umgebung von *Tn4001* im Wildtyp *S. epidermidis* 307 und der Deletionsmutante *S. epidermidis* 307/9 bestätigt. Hierbei waren die 8-bp-Duplikationen der die Resistenzkassette flankierenden *IS256*-Elemente von entscheidender Bedeutung. Weisen die Duplikationen sowohl am Anfang und am Ende des Transposons dieselbe Sequenz auf, so kann man davon ausgehen, daß das Transposon durch ein Transpositionsereignis an die aktuelle Position im Genom gelangt ist. Sind die Duplikationen am Anfang und am Ende des Transposons unterschiedlich, dann hat eine Umordnung des DNA-Bereichs durch homologe Rekombination zwischen zwei in gleicher Richtung angeordneter *IS256*-Elemente stattgefunden (Abb. 5.12.).

Nach Sequenzierung der jeweiligen 8-bp-Duplikationen von Tn4001 bei *S. epidermidis* 307 und *S. epidermidis* 307/9 zeigte sich, daß sich diese bei Wildtyp und Deletionsmutanten unterscheiden. Im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem am Anfang und am Ende des Transposons dieselben 8-bp-Duplikationen identifiziert werden konnten, wurde festgestellt, daß diese bei der Mutante unterschiedlich sind. Die Deletionsmutante *S. epidermidis* 307/9 ist demzufolge vermutlich durch homologe Rekombination zwischen zwei in gleicher Richtung orientierten IS256-Elementen hervorgegangen, bei dem ein mehr als 200 kb großer DNA-Bereich deletiert wurde, auf dem u.a. die *ica*-Gene lokalisiert sind, die für das Polysaccharid-interzelluläre Adhäsion PIA kodieren (Abb. 5.12.).



**Abb. 5.12.:** Homologe Rekombination zwischen zwei repetitiven DNA-Elementen, hier IS256, als mögliche Ursache für die Deletion eines ca. 250 kb-großen DNA-Bereichs und die damit verbundene Entstehung der PIA-negativen Deletionsmutante *S. epidermidis* 307/9. Die durch die Transposition von IS256 oder Tn4001 entstehenden 8 bp-Duplikationen sind als Dreiecke dargestellt. Gleiche Farben weisen auf identische 8bp-Duplikationen hin.

Eine Aussage über die Größe der Deletion kann nicht gemacht werden, da das 340 bp Fragment stromabwärts des Transposons (Abb. 5.11.) keine Ähnlichkeiten zu anderen Sequenzen zeigt. Sogar in der *S. epidermidis* RP62A-Datenbank wurden keine signifikant homologen Bereiche gefunden. Auf Nukleinsäureebene wurden bestenfalls Fragmente aus *S. epidermidis* RP62A mit einer Identität von 56% identifiziert.

### 5.2.3. Untersuchung des deletierten Bereichs von *Staphylococcus epidermidis* 307/56: Amplifikation mittels inverser PCR und Sequenzierung

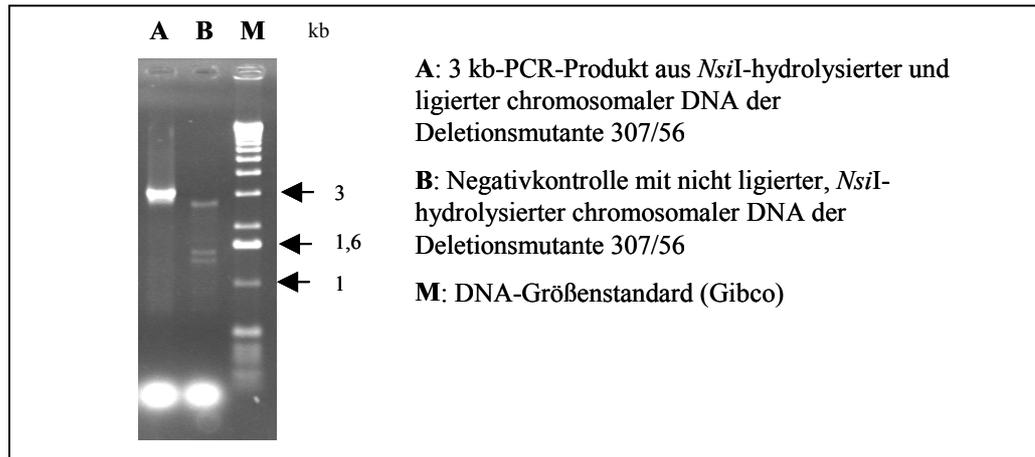
Die Biofilm-negative Deletionsmutante *S. epidermidis* 307/56 wurde genauer untersucht, da die Grenze des deletierten Bereichs im *ica*-Operon und damit in bekanntem Sequenzbereich liegt. Durch PCR und Southern-Hybridisierung wurde zunächst festgestellt, daß die *icaA*-Sequenz noch vorhanden ist, *icaC* und stromabwärts liegende Gene jedoch deletiert sind. Um den Deletionsgrenzbereich zu sequenzieren, wurde dieser mittels inverser PCR amplifiziert und kloniert.

Um ein DNA-Fragment zu identifizieren, auf der die Deletionsgrenze liegt, wurde die chromosomale DNA von *S. epidermidis* 307 und 307/56 zunächst mit unterschiedlichen Enzymen geschnitten und anschließend im Southern Blot mit einer *icaA*-spezifischen Sonde hybridisiert. Hierbei zeigte sich das Hybridisierungssignal nach Spaltung mit *NsiI* (NEB) beim Wildtyp auf Höhe einer 2 kb-Bande und bei der Deletionsmutante auf einer Höhe von 3,5 kb.

Für die inverse PCR wurden 10 µg chromosomale DNA der Mutante über Nacht mit 20U *NsiI* gespalten. Der Ansatz wurde phenolisiert und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wurde die Selbstligation über Nacht bei 14°C mit 1 µg der gespaltenen DNA in einem 80 µl Ansatz durchgeführt. Die DNA wurde über ein QIAGEN-Säulchen gereinigt und mit 50 µl 50mM Tris pH 8,5 eluiert. Für die PCR wurden 5 µl des Eluats als Template verwendet. Die verwendeten Primer (*icaArev1/icaArev2*) binden in der *icaA*-Sequenz an den Positionen 1079 und 1872 (Genbank Accession Nr. U43366) und sind entgegengesetzt orientiert. Bei einem zirkulären Template müßte es damit zu einer Amplifikation aus dem *icaA*-Gen in den angrenzenden Bereich kommen.

Es wurden 30 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 45 sec 95°C; 1 min 42°C; 4 min 70°C. Nach Auftrennung der DNA auf einem Agarosegel konnte eine Bande in der erwarteten Größe von 3 kb identifiziert werden (s. Abb. 5.13.).

Die DNA wurde aus dem Gel eluiert und in den Vektor pGEM-T-easy ligiert. Nach Transformation in kompetente *E. coli* DH5α-Zellen wurde aus 11 Klonen die Plasmid-DNA isoliert und 2 der Klone für eine Sequenzierung herangezogen. Diese wurde mit den Sequenzierprimern M13universal und M13reverse durchgeführt. Im Anschluß wurde das klonierte PCR-Produkt durch „Primer-Walking“ komplett sequenziert.

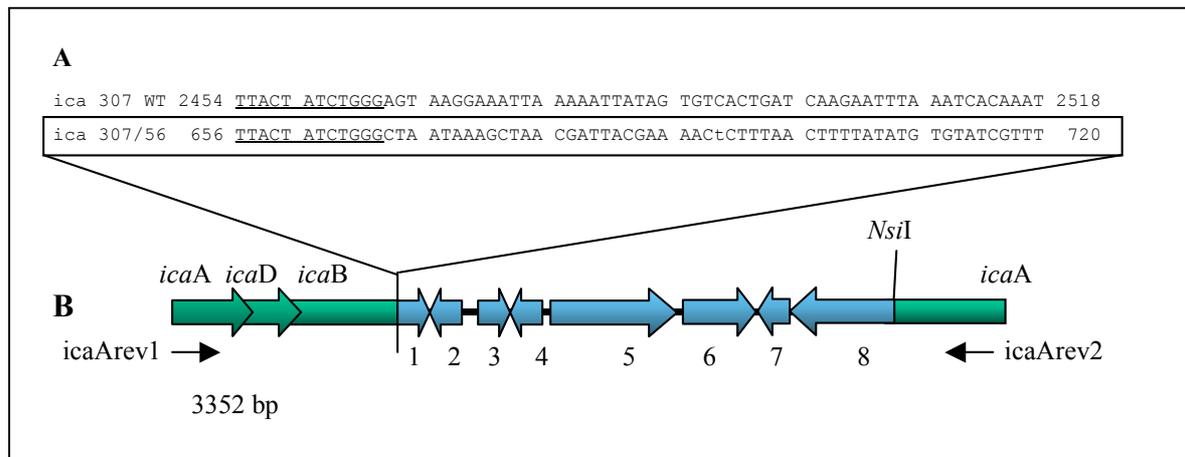


**Abb. 5.13.:** Inverse PCR mit *icaA*-spezifischen Primern zur Amplifikation des Deletionsrandbereichs von *S. epidermidis* 307/56

Es zeigte sich, daß die *ica*-Sequenz bei Position 2465 abbricht, danach folgt ein Sequenzbereich, zu dem keine Ähnlichkeit auf Nukleotidebene in der Datenbank gefunden werden konnte. Auf Proteinebene konnten mehrere kleinere offene Leserahmen (Nr. 1–7 in Abb. 5.14. und Tabelle 5.3.) identifiziert werden. Der Grenzbereich zwischen dem Abbruch der *icaB*-Sequenz und der anschließenden Sequenz (Abb. 5.14.) weist keine Besonderheiten auf, d.h. es wurden weder sich wiederholende DNA-Abschnitte noch Teile eines bekannten IS-Elements gefunden. Es handelt sich hier um eine Deletion, deren Mechanismus aufgrund der erhaltenen Sequenzinformationen nicht offensichtlich wird, so wie das bei Deletionsmutante 307/9 und dem IS256-Element der Fall war. Weiterhin konnte keine Aussage über die Größe der Deletion gemacht werden, da der angrenzende DNA-Bereich keine Ähnlichkeit zu bekannten Genen aufweist und auch im eng verwandten *S. epidermidis* RP62A keine homologen Bereiche identifiziert werden konnten. Das unter 5.2.3. erwähnte 340 bp-Fragment aus 307/9 hat ebenfalls keine Ähnlichkeit zur Sequenz aus 307/56. Die komplette Sequenz des in Abbildung 5.15. dargestellten Bereichs und die verwendeten Sequenzierprimer sind im Anhang III zu finden.

ORF	Ähnlichkeiten	Ident/Ähnl. [%]	Accession No.	Länge [bp]
1	Keine signifikante Ähnlichkeit			120
2	Keine signifikante Ähnlichkeit			102
3	Keine signifikante Ähnlichkeit			123
4	Keine signifikante Ähnlichkeit			111
5	Coronin-bindendes Protein ( <i>Dictyostelium</i> )	29/52	AAC05577	474
6	Putatives periplasmatisches Protein ( <i>Campylobacter jejuni</i> )	25/47	CAB73041	243
7	Keine signifikante Ähnlichkeit			120
8	Hypothetisches Protein ( <i>S. aureus</i> )	34/49	BAB47656	489

**Tab. 5.3.:** Analyse des Deletionsgrenzbereichs von *S. epidermidis* 307/56: Zusammenfassung der identifizierten offenen Leserahmen (ORF) und Ähnlichkeiten der putativen Proteine zu bekannten Proteinen.

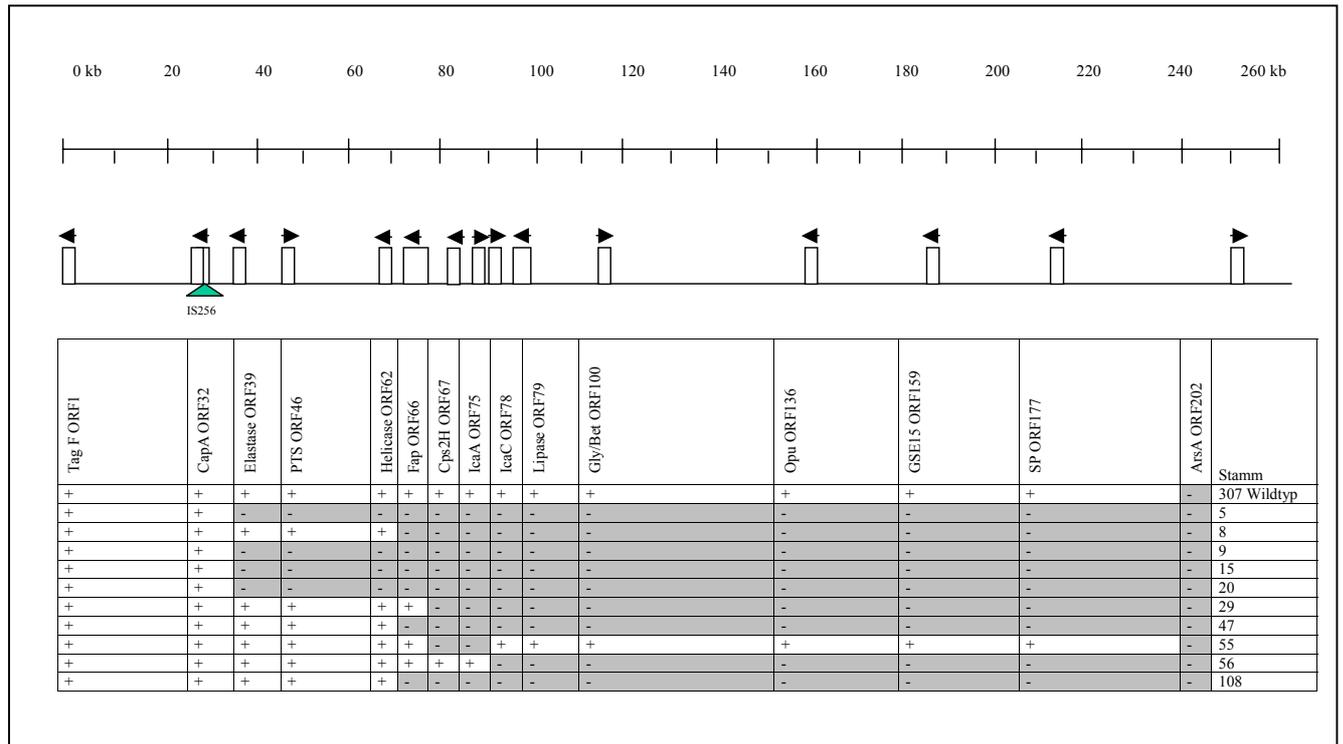


**Abb. 5.14.:** Analyse des Produkts der inversen PCR, ausgehend von *icaA*, zur Amplifizierung des Deletionsgrenzbereichs der Mutante *S. epidermidis* 307/56. Dargestellt sind 65 bp der Nukleotidequenz des Grenzbereichs aus *S. epidermidis* 307/56 im Vergleich zur *icaA*-Sequenz des Wildtyps (A). Unter (B) sind die identifizierten offenen Leserahmen schematisch gezeigt, sowohl solche mit Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen (grün), als auch putative Leserahmen mit zumeist nur geringer oder keiner Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen (blau) (s. Tabelle 5.3.). Außerdem sind die für die inverse PCR verwendeten Primer und die für die anfängliche Hydrolyse wichtige *NsiI*-Schnittstelle eingezeichnet.

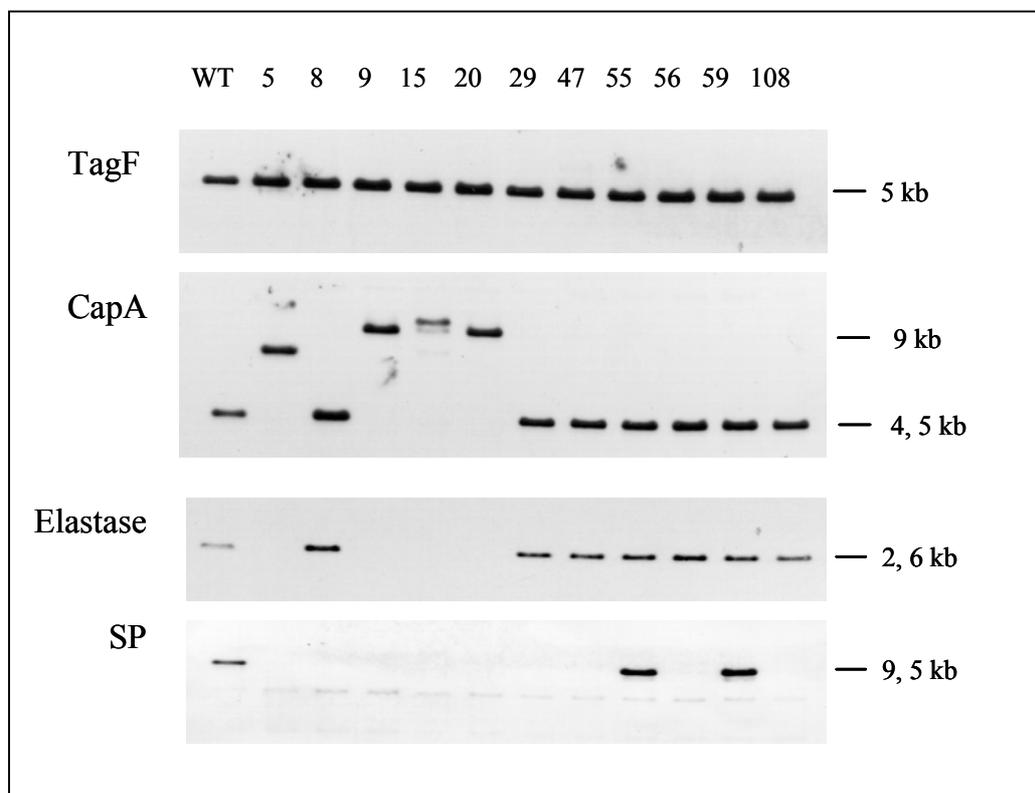
#### 5.2.4. Weitere Deletionsmutanten von *Staphylococcus epidermidis*

Wie in 5.2.2.4. erwähnt wurden außer *S. epidermidis* 307/9 und 307/56 acht weitere Mutanten von *S. epidermidis* 307 unter Zuhilfenahme der Sequenzinformation von *S. epidermidis* RP62A bezüglich ihrer deletierten DNA-Abschnitte untersucht. Dies wurde zum einen durch PCR-Amplifikation ausgewählter Gene und zum anderen durch Hybridisierung der chromosomalen DNA mit den entsprechenden Sonden durchgeführt (Abb. 5.16.). Dabei ergab sich, daß es vermutlich 5 unterschiedliche Deletionsgrenzen gibt. Über die Größe der Deletionen kann keine genaue Aussage gemacht werden, da nur die jeweils stromaufwärts von *ica* liegende Deletionsgrenze, nicht aber die stromabwärtsliegende Grenze bekannt ist. Eine Ausnahme bildet Stamm 307/55, dessen deletierter Bereich nur die Gene von *cps2H* bis *icaA*, d.h. ca. 12 kb umfaßt. Alle untersuchten Mutanten mit Größe und Position der deletierten Bereiche sind in Abb 5.15. zusammenfassend dargestellt.

Welche Mechanismen zum Verlust dieser unterschiedlich großen DNA-Bereiche geführt haben bleibt offen. Es ergibt sich die interessante Frage, ob und inwieweit sich die möglichen Mechanismen unterscheiden, und welche Ursachen dazu führen, daß solch große DNA-Fragmente bei *S. epidermidis* deletieren.



**Abb. 5.15.:** Schematische Darstellung zur Größe der deletierten Bereiche bei 10 verschiedenen Deletionsmutanten des Stammes *S. epidermidis* 307. Gezeigt sind Gene, die für das Screening der Mutanten verwendet wurden (offene Rechtecke), die Pfeile zeigen die Richtung der offenen Leserahmen an. Hinter dem Kürzel der jeweiligen Genbezeichnung ist die entsprechende ORF-Nummerierung für *S. epidermidis* RP62A angegeben (s. auch Anhang II)



**Abb. 5.16.:** Southern Hybridisierung *EcoRI*-hydrolysiertes chromosomaler DNA des Stammes *S. epidermidis* 307 und dessen Deletionsmutanten mit verschiedenen Sonden. Die Abkürzungen der Sonden entsprechen denen in Abb. 5.15.

### Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 5.2.

- Wachstums- und Resistenzverhalten von *S. epidermidis* 307 Wildtyp und Deletionsmutante 307/9 sind identisch.
- *S. epidermidis* 307 trägt eine IS256-Kopie in einem Gen, das bei dem nahe verwandten *S. epidermidis* RP62A IS256-frei ist.
- Die Deletion eines ca. 250kb-großen Bereichs von *S. epidermidis* 307 wird durch homologe Rekombination zwischen zwei IS256-Elementen verursacht. Dabei gehen Gene verloren, die Ähnlichkeiten zu Oberflächenproteinen, Resistenzdeterminanten und mobilen genetischen Elementen aufweisen.
- Die Deletionsgrenzen der PIA-negativen Variante *S. epidermidis* 307/56 liefern im Gegensatz zur Deletionsmutante 307/9 keine Hinweise auf den Deletionsmechanismus.
- Acht weitere *S. epidermidis* 307 *ica*-Deletionsmutanten weisen in Größe und Bereich des deletierten DNA-Abschnitts Unterschiede auf.

### 5.3. Charakterisierung der IS256-Insertionsmutanten des Stammes *Staphylococcus epidermidis* 307

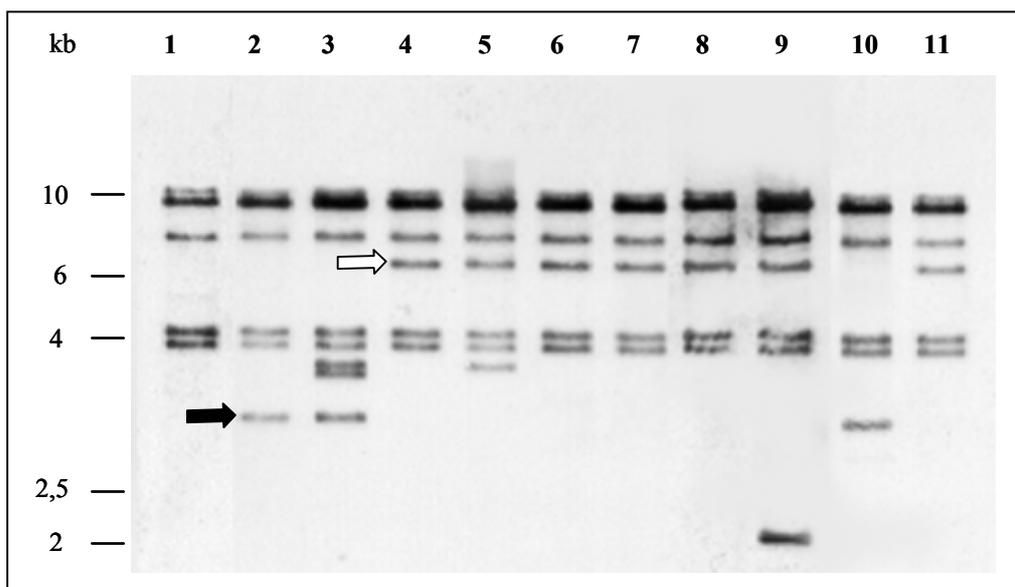
Wie in Abschnitt 5.1.3.2. beschrieben, konnten die Biofilm-negativen Varianten des Stammes *S. epidermidis* 307 in drei große Bereiche eingeteilt werden. Zum einen handelt es sich um Mutanten, bei denen ein großer DNA-Abschnitt deletiert ist, zum anderen handelt es sich um Mutanten, die über eine IS256-Insertion im *ica*-Operon verfügen (s. Tab. 5.1.). Die dritte Gruppe zeigt im Bereich des *ica*-Operons keine Unterschiede zur Wildtypsequenz.

Es wurden 10 Insertionsmutanten identifiziert und deren IS256-Insertionsstellen im *ica*-Operon sequenziert. Die Mutanten wurden im Southern Blot auf die Anzahl und die Verteilung der Insertionselemente hin untersucht (s. auch 5.1.1.3.).

#### 5.3.1. Anzahl und Hybridisierungsmuster des IS256-Elements bei Insertionsmutanten von *Staphylococcus epidermidis* 307

Die im Folgenden untersuchten *S. epidermidis* 307-Insertionsmutanten haben durch eine IS256-Insertion im *icaA*- oder *icaC*-Gen ihre Fähigkeit verloren, Biofilm zu bilden. Zunächst soll das IS256-Hybridisierungsmuster und damit die Anzahl der IS-Elemente genauer betrachtet werden.

Die Southern-Blot-Hybridisierung (Abb. 5.17.) wurde wie unter 2.1.1.3. beschrieben durchgeführt.



**Abb. 5.17.:** IS256-spezifische Southern-Hybridisierung mit *EcoRI* hydrolysiertes chromosomaler DNA. Spur 1: *S. epidermidis* 307; Spur 2, 3, und 10: *icaA*-Insertionsmutanten von *S. epidermidis* 307; Spur 4-9 und 11: *icaC*-Insertionsmutanten von *S. epidermidis* 307. Der schwarze Pfeil markiert eine *icaA*::IS256-spezifische Hybridisierungsbande, der weiße Pfeil zeigt eine *icaC*::IS256-spezifische Hybridisierungsbande.

Bei allen Insertionsmutanten war zu beobachten, daß die Anzahl der IS-Elemente im Vergleich zum Wildtyp zunahm. Konnte man beim Wildtyp nur 5 Hybridisierungsbanden sehen, so waren es bei den Insertionsmutanten 6, 7 oder sogar 8 IS256-spezifische Banden. Die Transposition scheint hier replikativ abgelaufen zu sein. Bei den Mutanten in Spur 2, 3 und 10 handelt es sich um *icaA*::IS256-Insertionen. Nur bei diesen Mutanten ist die mit einem roten Pfeil markierte Bande zu festzustellen. Dies muß die Bande sein, auf der sich auch *icaA*-befindet. Das gleiche kann man bei den *icaC*::IS256-Insertionsmutanten feststellen. Hier ist die mit einem grünen Pfeil markierte Bande auffällig und vermutlich ist dort das *icaC*-Gen zu finden. Diese Annahmen wurden durch Hybridisierung mit *icaA*- und *icaC*-spezifischen Sonden bestätigt.

### 5.3.2. Sequenzierung der IS256-Insertionsstellen im *ica*-Operon

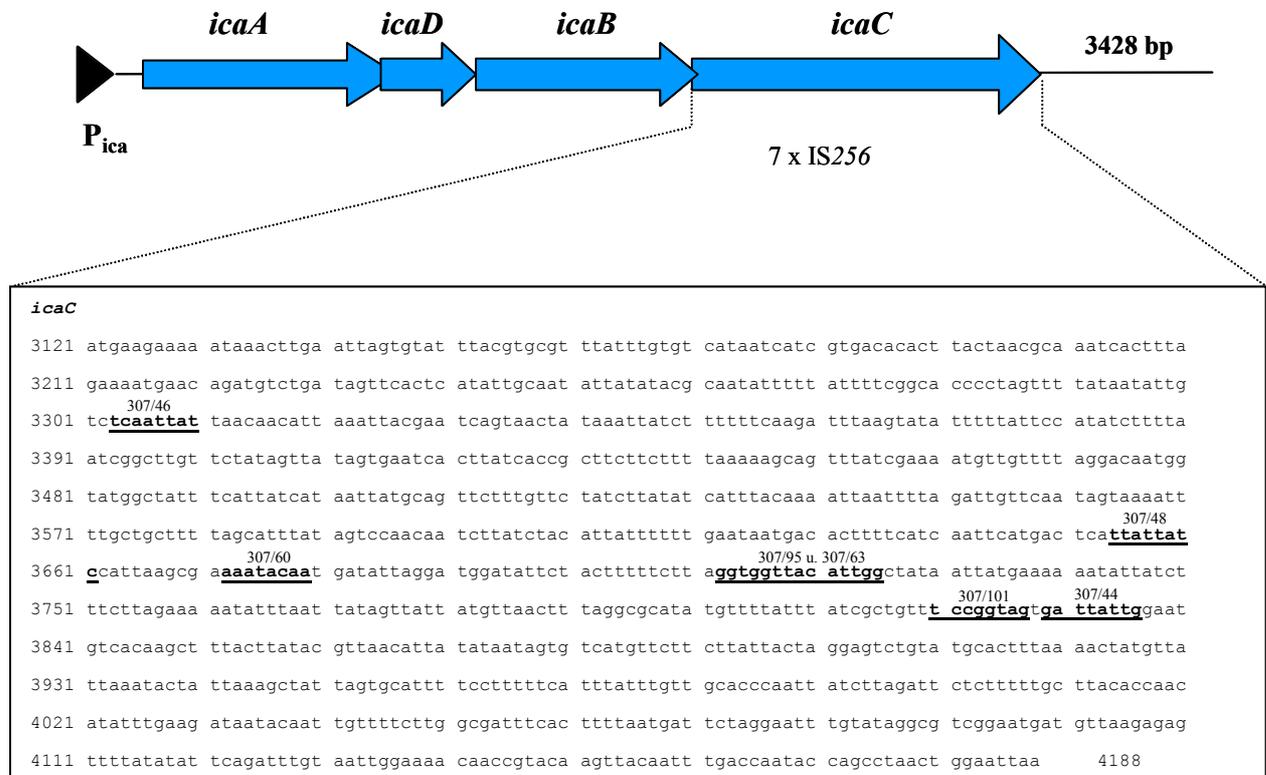
Es wurden die Insertionsstellen des IS-Elements 256 im *icaA*- und *icaC*-Gen sequenziert. Dafür wurden in einer PCR-Reaktion *icaA*- und *icaC*-Gen der Insertionsmutanten mit spezifischen Primern amplifiziert (*icaA*1/2 und *icaC*upper/lower). Die PCR-Produkte wurden über ein QIAGEN-Säulchen aufgereinigt und die Sequenzierung am LiCor-Sequenzierer durchgeführt wie unter 4.17.1. beschrieben. Es wurden die markierten Sequenzierprimer ISintern.forw2 (5'- GGA CCT ACA TGA TGA ATG G-3') und ISintern.rev2. (5'- CTT GGG TCA TGT AAA AGT-3') verwendet, die in der IS256-Sequenz an den Positionen 93 und 1217 binden. Die Insertionsstellen im *icaC*-Gen sind in Abb. 5.18. dargestellt, die Target-Site Duplikationen für Insertionen in *icaA* und *icaC* sind in Tab. 5.4. zusammengefaßt.

	Stamm	8 bp-Duplikation der Insertionsstelle 5'→3'	Position in <i>ica</i>	Richtung
<i>icaA</i>	307/28	atccttta	1768	←
	307/30	aacaaatc	1647	←
	307/96	ctacatcg	1672	←
<i>icaC</i>	307/44	gattattg	3829	←
	307/46	tcaattat	3303	←
	307/48	ttattatc	3654	←
	307/60	aaatacaa	3672	←
	307/63	tacattgg	3718	→
	307/95	ggtgggta	3712	→
	307/101	tccggtag	3820	→

**Tab. 5.4.:** IS256-Insertionsstellen im *icaA*- und *icaC*-Gen von verschiedenen *S. epidermidis* 307-Varianten (Spalte 2). Aufgeführt sind die 8 bp-Target-Site Duplikationen ( Spalte 3), die Position der Insertionsstelle im *ica*-Operon (Accession Nr. U43366) ( Spalte 4) und die Orientierung des IS-Elements bezüglich des *icaA*- und *icaC*-Gens (Spalte 5).

Aufgrund der unterschiedlichen 8-bp-Duplikationen kann man nicht auf eine sequenzspezifische Insertionsstrategie von IS256 schließen. Das gehäufte Vorkommen von IS256-Insertionen im *icaC*- Gen im Vergleich zu den anderen *ica*-Genen bestätigt aber, daß es

sich hierbei, wie auch bei *S. epidermidis* RP62A (Ziebuhr *et al.*, 1999), um einen *Hot-spot* für die Integration von IS256 handelt.



**Abb. 5.18.:** IS256-Insertionsstellen in der *icaC*-Sequenz des Stammes *S. epidermidis* 307. Die 8 bp-Duplikationen des IS-Elements sind unterstrichen und fett gedruckt.

### Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 5.3.

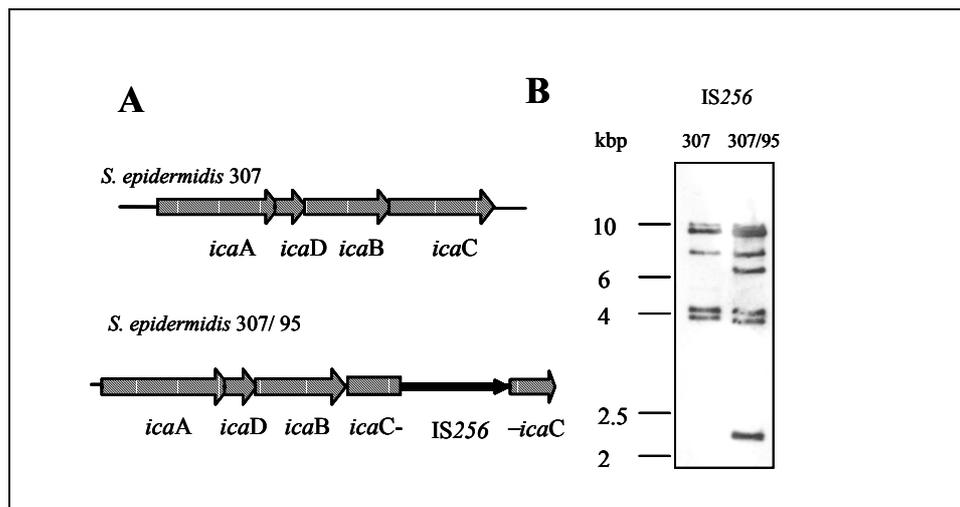
- Die Anzahl der IS256-Elemente bei den *S. epidermidis* *ica*::IS256-Insertionsmutanten ist größer als die Anzahl der IS256 Elemente im Genom des Wildtyps.
- Die Sequenzen der 8-bp-Duplikationen der Insertionsstellen lassen nicht auf eine sequenzspezifische Insertionsstrategie von IS256 schließen.
- Das *icaC*-Gen stellt einen *Hot-spot* für die Integration des IS-Elements IS256 dar.

## 5.4. Untersuchungen zum Transpositionsmechanismus des Insertionselements IS256

Wie bei *Staphylococcus epidermidis* RP62A und *Staphylococcus epidermidis* 307 gezeigt, ist IS256 aktiv an genomischen Umordnungen und damit auch an phänotypischer Variabilität von *S. epidermidis* beteiligt (Ziebuhr *et al.*, 1999; diese Arbeit). Dazu gehören die reversible Inaktivierung von Genen, DNA-Umordnungen und chromosomale Deletionen, die sich auf die Expression von virulenz- und resistenzassoziierten Genen auswirken können. Auch das *ica*ADBC-Operon ist von der Aktivität des IS256 betroffen. Eine Insertion des IS-Elements in den *Hot-Spot icaC* ruft einen nicht adhären Phänotyp hervor (s. Tab. 5.1., Abschnitt 5.1.3.2.). In Abschnitt 5.1.3.3. wurde bereits beschrieben, daß die Varianten, die aus dem Stamm *S. epidermidis* 307 hervorgegangen sind, eine variable Zahl an IS256-Kopien im Chromosom aufweisen. Zusammen mit der Tatsache, daß es auch zur Phasenvariation kommen kann, bei der sich das IS-Element inklusive der 8 bp-Duplikation wieder aus dem Gen ausschneiden kann, stellt sich die Frage, ob der Transpositionsmechanismus des IS256-Elements replikativ oder konservativ abläuft. Im folgenden Abschnitt wird die Identifizierung eines zirkulären IS256-Moleküls beschrieben, dessen Existenz auf einen alternativen Transpositionmechanismus hindeutet. Bei diesem Transpositionsweg kann es zur Bildung von doppelsträngigen ringförmigen IS-Molekülen kommen, bei denen Anfang und Ende des IS-Elements durch Fragmente des benachbarten DNA-Bereichs verbunden sind (*circle junction*). Es konnte gezeigt werden, daß die Zirkularisierungsreaktion der IS256-Moleküle sehr variabel ist, was sich in der unterschiedlichen Länge und Sequenz der *circle junctions* ausdrückt. Die Bildung der ringförmigen IS-Moleküle ist allein auf die Funktion des Proteins zurückzuführen, das von IS256 kodiert wird und die mutmaßliche Transposase des Elements darstellt. Dies wurde durch die Einführung einer Mutation in den offenen Leserahmen von IS256 gezeigt. Stammspezifische Wirtsfaktoren scheinen keine Rolle zu spielen, da die Formation der zirkulären IS256-Moleküle auch in IS256-freien Stämmen wie *S. aureus* RN4220 und *E. coli* DH5 $\alpha$  stattfindet.

### 5.4.1. Identifizierung von zirkulären IS256-Molekülen in *Staphylococcus epidermidis* 307 und *Staphylococcus epidermidis* 307/95

Für die folgenden Experimente wurde der Biofilm-positive Stamm *Staphylococcus epidermidis* 307 und dessen biofilm-negative Variante 307/95 verwendet. Der biofilm-negative Phänotyp der Variante 307/95 gründet sich auf eine IS256-Insertion im *icaC* Gen an Position 3719 (Genbank Accession Nr. U43366), die mit einer 8 bp-Duplikation einhergeht. Ein Vergleich der IS256-spezifischen Southern-Blots vom *S. epidermidis* 307 WT und der Insertionsmutante 95 zeigte ein unterschiedliches Hybridisierungsmuster und eine unterschiedliche Anzahl an IS256-spezifischen Hybridisierungssignalen (Abb. 5.19. und Abschnitt 5.1.1.3.).

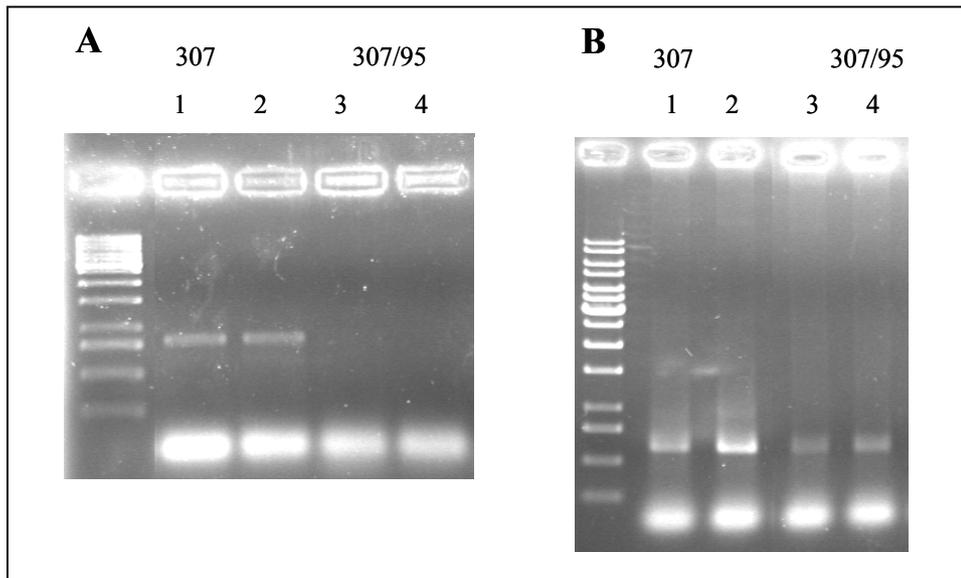


**Abb. 5.19.:** (A) Struktur des *ica*-Operons des PIA-positiven Stammes *S. epidermidis* 307 und dessen PIA-negativer IS256-Insertionsmutante 307/95. Der schwarze Pfeil zeigt Richtung und Position des IS-Elements im *icaC*-Gen. (B) IS256-spezifische Southern-Hybridisierung mit *EcoRI*-hydrolysiertes chromosomaler DNA der Stämme *S. epidermidis* 307 (Spur 1) und *S. epidermidis* 307/95 (Spur 2).

Zunächst stellte sich die Frage, ob IS256 in den Stämmen *S. epidermidis* 307 und der Insertionsmutante *S. epidermidis* 307/95 als extrachromosomales zirkuläres Molekül vorkommt. Zu diesem Zweck wurde aus beiden Stämmen extrachromosomale DNA isoliert. Diese DNA wurde in einer PCR-Reaktion als Template verwendet, bei der IS256-spezifische Primer verwendet wurden, die voneinander wegweisen und damit nur DNA-Fragmente amplifiziert werden können, die in zirkulärer Form vorliegen.

Die Präparation der extrachromosomalen DNA aus Staphylokokken wurde wie unter 4.1.3. angegeben durchgeführt, über ein QIAGEN-Säulchen aufgereinigt und in 50  $\mu$ l 50 mM Tris-Puffer pH 8,5 aufgenommen. Um mögliche Kontaminationen mit chromosomaler DNA und damit eine Amplifikation von IS256-Tandem-Dimeren auszuschließen wurden 25  $\mu$ l der extrachromosomalen DNA zunächst mit 30U *EcoRI* 2 h bei 37°C hydrolysiert und anschließend erneut aufgereinigt. Es folgte eine Behandlung des Ansatzes mit 200 U Exonuklease III (Amersham Pharmacia, Freiburg) und 20 U Exonuklease VII (Amersham Pharmacia, Freiburg) für 18 h bei 37°C. Danach wurden erneut 200 U Exonuklease III zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Aufreinigung der DNA wurden 1  $\mu$ l und 10  $\mu$ l des 50  $\mu$ l-Ansatzes als Template für eine inverse PCR-Reaktion eingesetzt. Es wurden einerseits die Primer IS.intern forw.1029 (5'-GCT TCG GCA TCA TTG GAT G-3') und IS.intern rev 279 (5'-CTC ATA ATA GCC ATT TCG TTG-3') für eine Amplifikation der zirkulären IS256-Moleküle und die Primer *icaA*1 und *icaA*2, die einen 814 bp-Fragment des *icaA*-Gens amplifizieren als Negativkontrolle verwendet. Die IS256-PCR wurde unter folgenden Bedingungen mit Taq-Polymerase (Gibco) durchgeführt, es wurden 45 Zyklen durchlaufen: 30 sec, 95°C; 30 sec, 54°C; 40 sec, 70°C. Wie in Abb. 5.19. zu sehen, konnte

nur mit den IS256-spezifischen Primern ein Produkt in der erwarteten Größe von 600 bp amplifiziert werden. Mit *icaA*-spezifischen Primern konnte kein Produkt erhalten werden, was zeigt, daß in dem als Template verwendeten Exonuklease-behandelten Ansatz keine chromosomale DNA vorhanden war. Das Ergebnis zeigt außerdem, daß ein zirkuläres DNA-Fragment im Stamm 307 und auch 307/95 vorliegt, das mit IS256-spezifischen inversen Primern amplifiziert wurde. Um den Übergang zwischen Anfang und Ende des IS-Elementes zu charakterisieren wurden die erhaltenen PCR-Produkte kloniert und sequenziert (s. 5.4.3.)



**Abb. 5.20.:** *icaA*-PCR (A) und IS256-inverse PCR (B) mit extrachromosomaler DNA der Stämme *S. epidermidis* 307(1) und *S. epidermidis* 307/95 (2) und nach Behandlung mit Exonuklease.

#### 5.4.2. Untersuchung zur Bildung von zirkulären IS256-Molekülen in *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*

Um die Hypothese zu prüfen, daß es sich tatsächlich um zirkuläre IS256-Moleküle handelt, und um auszuschließen, daß eine Amplifikation auf das Vorhandensein von mehreren IS256-Kopien im Chromosom oder auf natürliche Plasmiden zurückzuführen ist, wurden weitere Untersuchungen in IS256-freiem genetischen Hintergrund vorgenommen. Es wurden zwei Vektoren konstruiert, die das IS256-Element und umgebende *icaC*-DNA tragen. Diese wurden zum einen in den IS256-negativen Stamm *Staphylococcus aureus* RN4220 und in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Anschließend wurde eine IS256-inverse PCR mit der extrachromosomalen DNA der Stämme durchgeführt, um vorhandene IS256-Zirkel zu amplifizieren.

Es wurde zunächst die *icaC*::IS256-Insertion aus dem Stamm *S. epidermidis* 307/95 mit den Primern *icaC*upper und *icaC*lower mit Taq-Polymerase (Gibco) amplifiziert (30 sec, 95°C; 1 min 42°C; 1,5 min 70°C; 30 Zyklen), das 2,3 kb große Fragment mit dem IS256-Element und flankierenden *icaC*-spezifischen DNA-Abschnitten in den AT-Klonierungsvektor pGEM-T-

easy ligiert und in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Der resultierende Vektor wurde pIL1 genannt. Für die Konstruktion von pIL2 wurde das *icaC*::IS256-Fragment mit den Enzymen *Pst*I und *Sph*I aus pIL1 herausgeschnitten und in den mit *Pst*I und *Sph*I hydrolysierten Shuttle-Vektor pRB472 ligiert, der pIL2 genannt wurde. pIL2 wurde anschließend in den restriktionsnegativen Stamm *S. aureus* RN4220 mittels Elektroporation transformiert. Aus beiden Stämmen wurde extrachromosomale DNA isoliert und diese in der inversen IS256-PCR als Template eingesetzt. Die PCR wurde unter den in 5.4.1. beschriebenen Bedingungen durchgeführt, wobei die kurze Verlängerungszeit von 40 sec die Amplifikation des gesamten Vektors reduzieren sollte.

Es wurde mit pIL1 und pIL2 als Template jeweils ein 600 bp großes Produkt erhalten. Dies zeigt, daß die IS256-Zirkularisierung nicht nur in *S. epidermidis* sondern auch in *S. aureus* und *E. coli* und unabhängig von Spezies-spezifischen Wirtsfaktoren stattfindet. Die PCR-Produkte wurden für weitere Analysen kloniert und sequenziert (s. 5.4.3.).

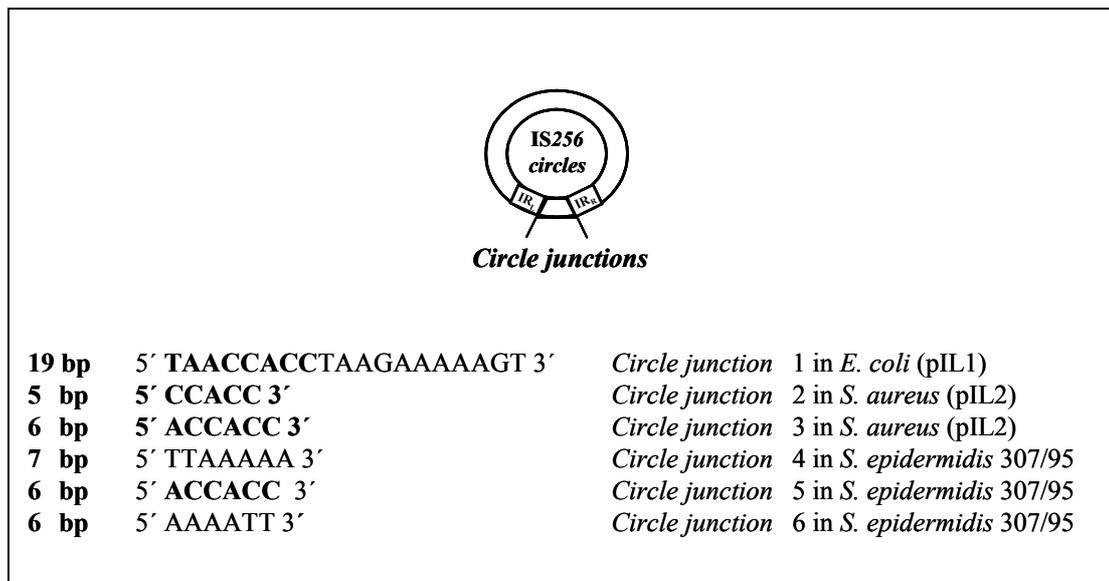
### 5.4.3. Klonierung und Sequenzierung der amplifizierten IS256-zirkulären Moleküle

Die 600 bp großen PCR-Produkte aus 5.4.1. und 5.4.2. wurden jeweils aus dem Gel eluiert, aufgereinigt, in den Vektor pGEM-T-easy ligiert und in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Die Transformanten wurden auf LB Platten mit X-Gal, Ampicillin und IPTG ausplattiert, was eine Blau-Weiß-Selektion der Klone ermöglicht. In der Regel haben Klone, die einen Vektor mit Fragment in der multiplen Klonierungsstelle tragen eine weiße Koloniefarbe und können so leicht von den Religanten mit blauer Koloniefarbe unterschieden werden. In diesem Fall waren fast alle Transformanten von blauer Farbe. Es wurden daher weiße und blaue Kone gepickt und analysiert. Nach Restriktion der Plasmid-DNA mit *Eco*RI zeigte sich, daß sowohl weiße als auch blaue Klone fremde DNA unterschiedlicher Größe tragen. Die Plasmid DNA einiger Klone wurde für eine nachfolgende Sequenzierung herangezogen.

Hierbei war vor allem der Bereich zwischen dem Anfang und dem Ende des zirkulären IS-Elements von Interesse, die *circle junction*. Da *S. epidermidis* 307 und *S. epidermidis* 307/95 mehrere IS256-Kopien an unterschiedlichen Stellen im Genom tragen, können bei diesen Stämmen unterschiedliche *circle junctions* entstehen. Produkte der inversen PCR, die aus der Amplifikation von pIL1 und pIL2 hervorgegangen sind sollten in der Sequenz zwischen Anfang und Ende des IS-Elements *icaC*-spezifische DNA tragen. Das würde zeigen, daß die amplifizierten Zirkel tatsächlich aus den entsprechenden Vektoren resultieren.

Die Sequenzierung der Vektoren wurde mit den markierten Sequenzierprimern M13universal und M13reverse durchgeführt. Es zeigte sich, daß die 600 bp-Fragmente, die bei der inversen PCR erhalten wurden unterschiedlich waren. Es wurden sowohl vollständige IS256-Elemente

mit unterschiedlich langen DNA-Fragmenten zwischen Anfang und Ende des IS-Elements gefunden (Abb. 5.21.). Es kam aber auch vor, daß entweder der Anfang oder das Ende des IS-Elements verkürzt waren, d.h. es wurden Teile des linken oder rechten Arms inklusive der *Inverted repeats* (IR) rechts (IR<sub>R</sub>) oder links (IR<sub>L</sub>) im Prozeß der Zirkelbildung deletiert (Abb. 5.22.). Es wurde bei PCR-Produkten, die aus der Präparation von pIL1 hervorgegangen sind, DNA-Abschnitte aus der *icaC*-Sequenz identifiziert, was eindeutig zeigt, daß das zirkuläre Template aus dem Vektor mit der *icaC*::IS256-Insertion hervorgegangen ist (s. Abb. 5.21.).

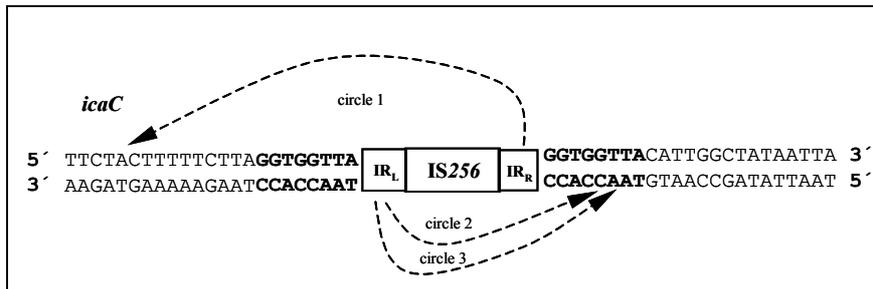


**Abb. 5.21.:** Schematische Darstellung der IS256-zirkulären Moleküle und der Sequenzen der *circle-junctions*, die bei *S. epidermidis* 307/95, *S. aureus* (pIL2) und *E. coli* (pIL1) erfaßt wurden. IR<sub>L</sub>: *Inverted repeat links*, IR<sub>R</sub>: *Inverted repeat rechts*. Die aus *icaC* stammenden *Targetsites*-Duplikationen sind fett gedruckt.

Eine *Circle junction*, die aus *E. coli* (pIL1) hervorgegangen ist, besteht aus dem rechten und linken IR, die durch eine 19 bp lange Sequenz verbunden sind (Abb. 5.21. *Circle junction* 1). Diese 19 bp stimmen perfekt mit der Nukleotidsequenz des *icaC*-Gens stromaufwärts der IS256-Insertionsstelle in pIL1 überein. Man kann daraus schließen, daß das zirkuläre IS256-Molekül aus dem Plasmid pIL1 hervorgegangen ist.

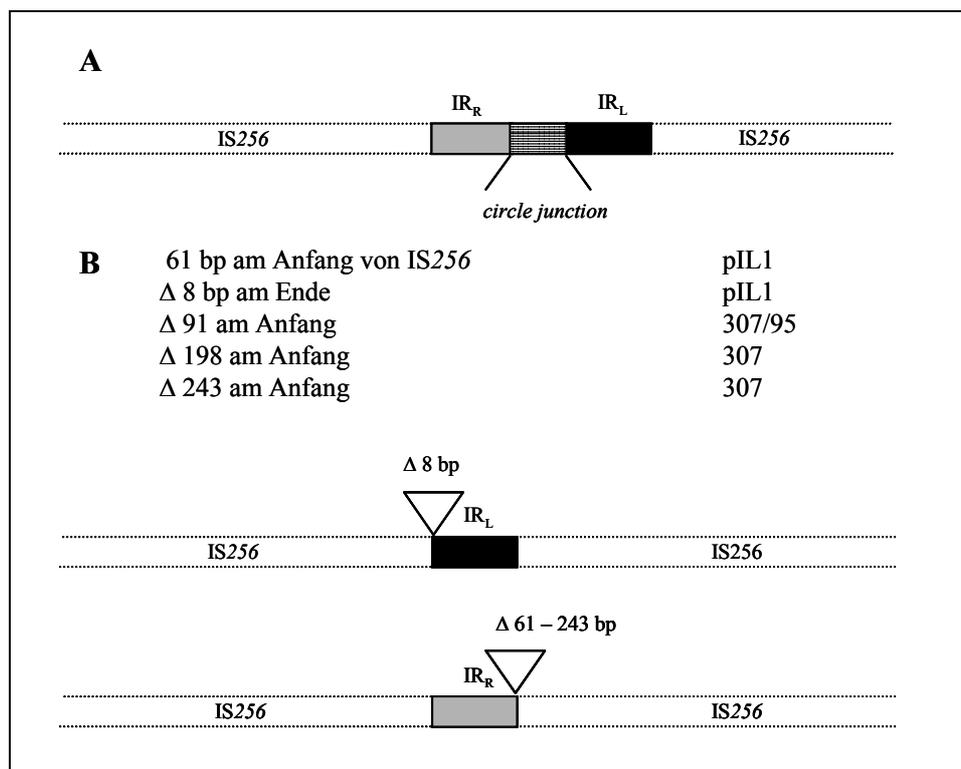
Die *Circle junctions* 2 und 3 resultieren aus dem Vektor pIL2 aus *S. aureus* RN4220. Hier verbindet eine fünf bzw. sechs Nukleotide lange Sequenz Anfang und Ende des IS-Elements. Diese Basen sind identisch mit denen, die stromabwärts der Insertionsstelle von IS256 im *icaC*-Gen bei pIL2 liegen. Ein Strangtransfer während der Transpositionsreaktion kann demzufolge von beiden Enden des IS-Elements ausgehen (Abb. 5.22.). Die PCR Produkte aus *S. epidermidis* 307 und 307/95 sind im Bereich der *Circle junction* sehr variabel. Es kommen erwartungsgemäß verschiedene Sequenzen vor, was darauf zurückzuführen ist, daß IS256 an mehreren Stellen im Genom von *S. epidermidis* 307 vorkommt und damit die DNA der Insertionsstellen in der *Circle junction* wiederzufinden ist. Ein zirkuläres Molekül der *icaC*::IS256-Insertionsmutante zeichnet sich dadurch aus, daß es eine 6 bp-*Circle junction* trägt, die identisch mit der Basenabfolge der 8 bp-Duplikation der Insertionsstelle des IS256-

Elements im *icaC*-Gen bei *S. epidermidis* 307/95 ist. Das zeigt, daß auch die IS256-Kopie im *icaC*-Gen mobil ist, sich aus dem Gen ausschneiden kann und ein zirkuläres Molekül bildet.



**Abb. 5.22.:** Schematische Darstellung der IS256-Insertion im *icaC*-Gen. Die 8-bp-Duplikation ist fett gedruckt. Die Pfeile verdeutlichen mögliche durch die Transposase verursachte Strangtransferreaktionen

Sehr interessant sind auch die Sequenzen der sog. inkompletten IS256-zirkulären Moleküle. In Abbildung 5.23. sind diejenigen zirkulären IS-Moleküle dargestellt, die während des Transpositionsmechanismus entweder Teile des Anfangs oder des Endes der IS-Elements verloren haben. Zu solchen Molekülen kann es kommen, wenn der Strangtransfer nicht spezifisch an den Enden IS-Elements stattfindet, sondern im IS-Element selbst, was auf eine geringe Spezifität der Strangtransferreaktion schließen läßt. Diese Moleküle dürften nicht in der Lage sein, an anderen Stellen im Genom zu inserieren und werden sehr wahrscheinlich verloren gehen.

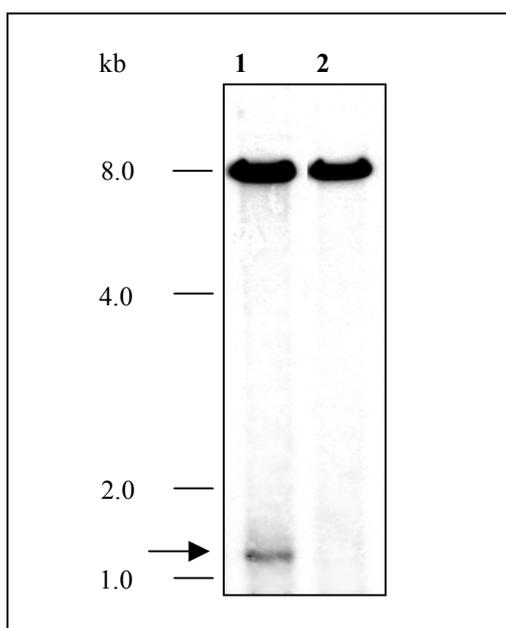


**Abb. 5.23.:** Schematische Darstellung der unvollständigen *Circle junctions* (B) im Vergleich zur vollständigen *Circle junction* (A). Unter (B) ist zusätzlich die Position und Anzahl der deletierten Basen aufgeführt. Daneben ist entsprechend die Herkunft der unvollständigen *Circle junctions* angegeben: entweder stammen diese aus einer Kopie des IS-Elements IS256 der Stämme *S. epidermidis* 307, *S. epidermidis* 307/95 oder aus dem Vektor pIL1 (*E. coli*) mit dem klonierten aktiven IS-Element IS256.

Zurück bleibt im Genom ein unvollständig ausgeschnittenes IS-Element was zur irreversibeln Inaktivierung des betroffenen Gens führen kann. Ähnliches ist auch vorstellbar, wenn sich das IS-Element unpräzise ausschneidet und nicht nur die 8-bp-Duplikation wieder entfernt wird, sondern auch ein Teil des Gens, wie es für *Circle junction 1* beschrieben wurde. Hier bleibt ein *icaC*-Gen mit einer Deletion von 19 bp zurück.

#### 5.4.4. Identifizierung von zirkulären IS256-Molekülen mittels Southern Blot Analyse

Um die Existenz der zirkulären IS256-Moleküle mittels einer anderen Methode als durch eine PCR-Reaktion zu zeigen, wurde eine Southern-Blot-Hybridisierung mit einer IS256-spezifischen Sonde durchgeführt. Zirkuläre IS-Moleküle sind in der Regel instabile Transpositionsintermediate und kommen nur in sehr geringen Mengen in der Zelle vor. Um diese sichtbar zu machen wurde die extrachromosomale DNA des Stammes *S. aureus* (pIL2) und *S. aureus* (pIL2 $\Delta$ tnp), der ein mutiertes Transposase-Gen trägt, verwendet. Die extrachromosomale DNA wurde isoliert wie die Template DNA für die PCR beim Nachweis der zirkulären Moleküle. 2  $\mu$ g der DNA wurden jeweils ungespalten und mit *Cla*I gespalten auf ein 0,7 %iges Agarosegel aufgetragen. *Cla*I spaltet das IS-Element an Positionen 985 und 1005 der IS256-Sequenz, so daß ein 20 bp-Fragment herausgeschnitten wird und die Restsequenz linearisiert vorliegt. Anschließend wurde eine Southern Hybridisierung mit einer ECL-markierten IS256-spezifischen Sonde durchgeführt. Es konnte eine IS256-spezifische Bande mit einer Größe von ca. 1,3 kb bei Stamm *S. aureus* pIL2 (Abb. 5.24., Spur 1) identifiziert werden. Dieses Signal konnte bei *S. aureus* pIL2 $\Delta$ tnp, der ein mutiertes Transposase-Gen trägt, nicht beobachtet werden. Das 1,3 kb große Fragment scheint die linearisierte Form des IS256-Moleküls zu sein, was exakt der Länge des IS-Elements entspricht.

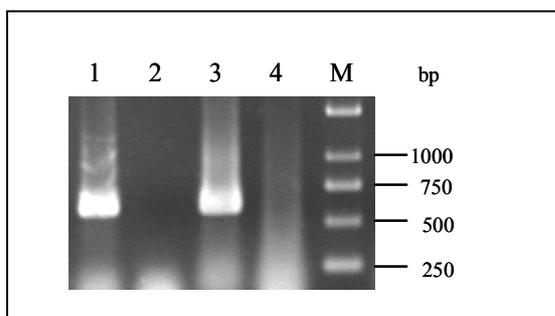


**Abb. 5.24.:** Nachweis der zirkulären IS256-Moleküle durch Southern-Hybridisierung von extrachromosomaler *Cla*I-hydrolysiertes DNA mit einer IS256-spezifischen Sonde bei *S. aureus* pIL2 (Spur 1) und *S. aureus* pIL2 $\Delta$ tnp (Spur 2). Der Pfeil zeigt die linearisierte Form des zirkulären IS256-Moleküls bei 1,3 kb.

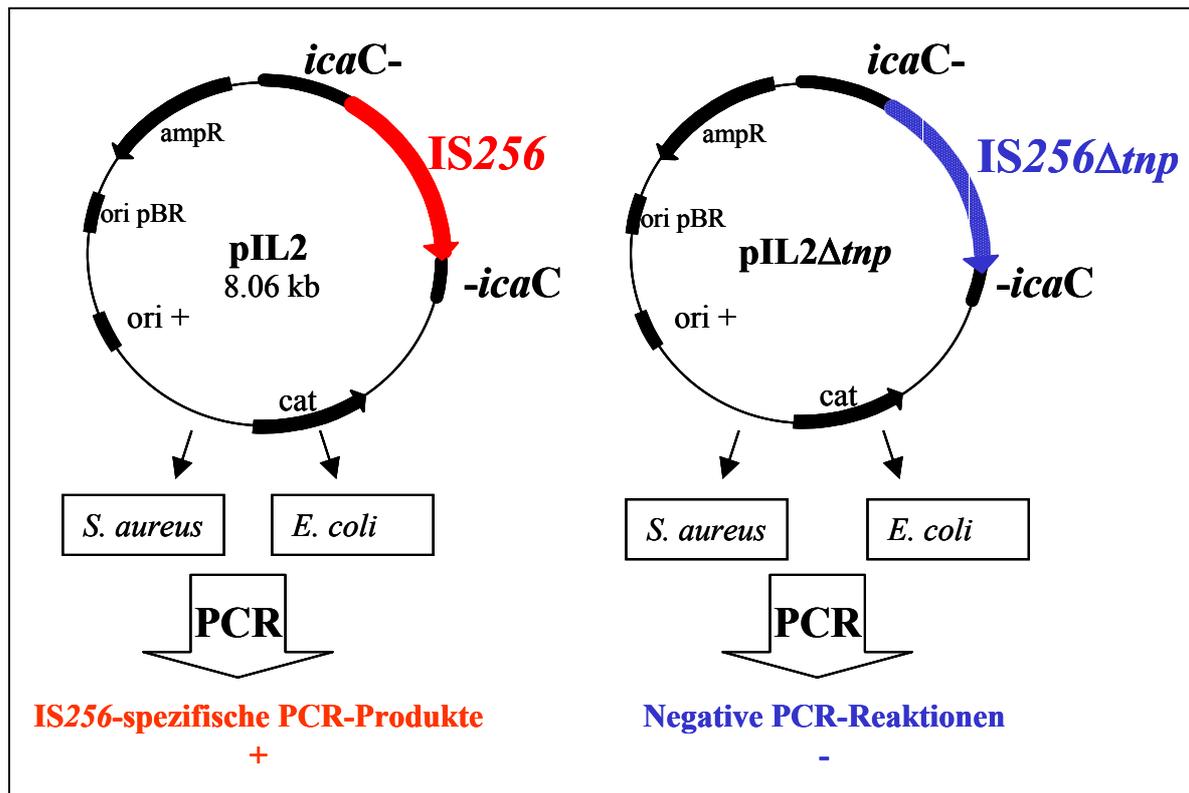
### 5.4.5. Einführung einer Mutation in das putative IS256-Transposase Gen

Es sollte untersucht werden, ob die Bildung der zirkulären IS-Moleküle tatsächlich auf die Funktion der putativen Transposase zurückzuführen ist. IS256 enthält einen offenen Leserahmen, der ein Protein aus 390 Aminosäuren kodiert (Byrne et al., 1989). Die Aminosäuresequenz zeigt große Ähnlichkeit zu bakteriellen Transposasen und enthält ein typisches „DDE“-Motiv (Reste D167, D233 und E341), das das katalytische Zentrum des Enzyms darstellen soll (Haren et al., 1999). Für die Mutation des putativen Transposase-Gens *tnp256* wurde aus den Vektoren pIL1 und pIL2 ein 20 bp langes Fragment herausgeschnitten, so daß es zur Expression eines verkürzten Transposase-Proteins kommt, dem der Glutamat-Rest des DDE-Motivs fehlt.

Es wurde zunächst der Vektor pIL1 in den Adenin/Cytosin-Methylase defekten Stamm *E. coli* GM2163 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) transformiert. Nach Reisolierung des Vektors wurde dieser mit *Cla*I gespalten. Dieses Enzym schneidet die IS256-Sequenz an Position 985 und 1005, wodurch ein 20 bp langes Fragment herausgeschnitten wird und ein STOP-Codon an Position 927 entsteht, wodurch es zu einem frühzeitigen Kettenabbruch bei der Proteinbiosynthese kommt. Der Restriktionsansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und der Vektor aus dem Gel eluiert, gereinigt und religiert, was zum Vektor pIL1 $\Delta$ *tnp* führte. Für die Konstruktion von pIL2 $\Delta$ *tnp* wurde das *Sph*I/*Pst*I-Fragment aus pIL1 $\Delta$ *tnp* in den Shuttle-Vektor pRB472 ligiert (s Abb. 5.26.). Die Insertion und die korrekte Sequenz der klonierten Fragmente mit 20bp-Deletion wurde durch Sequenzierung überprüft. Nach erneuter Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde der Vektor pIL2 $\Delta$ *tnp* in *S. aureus* RN4220 mittels Elektroporation transformiert. IS256-Proteinen, die von pIL1 $\Delta$ *tnp* oder pIL2 $\Delta$ *tnp* kodiert werden, fehlen die letzten 82 Aminosäurereste und damit der Glutamatrest des DDE-Motivs. Nach Transformation in *E. coli* und *S. aureus* wurde extrachromosomale DNA isoliert und diese als Template in einer IS256-inversen PCR-Reaktion zum Nachweis von zirkulären IS-Molekülen eingesetzt. Wie in Abb. 5.25. zu sehen, war es nicht möglich, PCR-Fragmente der erwarteten Größe von 600 bp zu detektieren. Daraus kann man schließen, daß das von IS256 kodierte Protein eine Transposase ist, die die Bildung von IS256-zirkulären Molekülen katalysiert.



**Abb. 5.25.:** Ergebnis der IS256-inversen PCR-Reaktion zum Nachweis von zirkulären IS-Molekülen aus *E. coli* pIL2 (Spur1), *E. coli* pIL2 $\Delta$ *tnp* (Spur2), *S. aureus* pIL2 (Spur3), *S. aureus* pIL2 $\Delta$ *tnp* (Spur4), M: DNA-Größenstandard.



**Abb. 5.26.:** Darstellung der Shuttle-Vektoren pIL2 und pIL2Δtnp und Zusammenfassung der Ergebnisse der inversen PCR, die nach Transformation der Shuttle-Vektoren in die Stämme *S. epidermidis* und *E. coli* mit extrachromosomaler DNA durchgeführt wurde.

#### Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 5.4.

- In *S. epidermidis* konnte ein IS256-zirkuläres Molekül mittels zirkelspezifischer PCR nachgewiesen werden. Daraus läßt sich schließen, daß die Transposition von IS256 über einen alternativen Weg verläuft.
- Die *Circle junctions*, Basenabfolgen zwischen Anfang und Ende des IS-Elements umfassen eine variable Anzahl von 5-18 bp. Es wurde gezeigt, daß es sich hierbei um IS256-angrenzende DNA-Bereiche handelt.
- Neben kompletten IS256-zirkulären Molekülen kommen auch inkomplette IS256-Moleküle vor, bei denen entweder Teile des Anfangs oder des Endes des IS-Elements fehlen.
- Durch die Einführung einer Mutation in das putative Transposase-Gen konnte gezeigt werden, daß die Bildung der IS256-zirkulären Moleküle eine Transposase-katalysierte Reaktion ist.

## 6. Diskussion

Viele Pathogene, die persistierende oder wiederkehrende Infektionen auslösen, z. B. *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, Streptokokken und Staphylokokken können an künstlichen oder natürlichen Oberflächen adhären. Sie produzieren extrazelluläre Polysaccharide und liegen darin eingebettet als Biofilme vor (Costerton *et al.*, 1999). Diese Biofilme stellen ein wachsendes medizinisches Problem dar, da sie den Bakterien eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika verleihen und Infektionen bei Patienten mit künstlichen Implantaten auslösen. Bakterien die in Biofilmen organisiert sind, ähneln multizellulären Organismen und unterscheiden sich in ihren Eigenschaften wie Stoffwechselfunktionen, Genexpression und Resistenzmuster häufig von ihren planktonischen Verwandten (Shapiro, 1998). Im Verlauf einer Infektion mit Biofilm-bildenden Bakterien können immer wieder Zellen aus dem Zellverbund entlassen werden und neue Oberflächen kolonisieren (Costerton *et al.*, 1999). Es kann davon ausgegangen werden, daß es neben einem mechanischen Herauslösen der Bakterien auch ein genetisches Programm gibt, das den Zellen erlaubt, die Produktion der extrazellulären Matrix zu verändern.

Die Biofilmbildung bei *Staphylococcus epidermidis* unterliegt einem Zwei-Schritt-Mechanismus. Es kommt zunächst zur initialen Adhärenz und Ausbildung eines einschichtigen Bakterienrasens. Daran sind unspezifische Faktoren wie Ladung, Hydrophobizität und spezifische oberflächenassoziierte Proteine der Bakterien beteiligt. Im zweiten Schritt wird ein mehrschichtiger Biofilm ausgebildet. Das Polysaccharid-Interzelluläre Adhäsion (PIA) spielt hierbei eine Schlüsselrolle. Die für die Synthese des PIA benötigten Enzyme werden von den *icaADBC*-Genen kodiert und sind in einem Operon organisiert.

Die Produktion von PIA und die damit verbundene Biofilmbildung von *S. epidermidis* ist sehr variabel. Die veränderliche Expression von Virulenzgenen ist bei Pathogenen ein verbreiteter Mechanismus, um sich an wechselnde Umweltbedingungen optimal anzupassen. Bei *S. epidermidis* wurden bisher unterschiedliche Mechanismen beobachtet, die zu einer veränderlichen Biofilmbildung führen. Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß die Expression des *ica*-Operons sowohl durch externe Streßfaktoren als auch durch subinhibitorische Konzentrationen einiger Antibiotika induziert wird. Die *ica*-Transkription in *S. aureus* ist außerdem abhängig von der Expression des globalen Transkriptionsfaktors SigmaB (Rachid *et al.*, 2000b). Neben den regulatorischen Einflüssen, denen das *ica*-Operon unterliegt, sind unterschiedliche genetische Mechanismen für den Biofilm-negativen Phänotyp der Varianten verantwortlich. Dazu gehört das An- und Abschalten der PIA-Produktion durch die reversible Integration des Insertionselements IS256 in das *ica*-Operon von *S. epidermidis* RP62A (Phasenvariation) (Ziebuhr *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten drei Mechanismen identifiziert werden, die zur einer Änderung

der PIA-Produktion bei dem pathogenen nosokomialen *Staphylococcus epidermidis* 307 Stamm führten. Es wurde die Insertion des IS-Elements IS256 in das *ica*-Operon beobachtet. Daneben sind der IS256 vermittelte Verlust des *ica*-Operons durch homologe Rekombination und umfassende genomische Umordnungen nachgewiesen worden, bei denen ebenfalls IS256 eine Rolle spielt.

Neben den genetischen Mechanismen, die zur Variabilität der Biofilmbildung bei Staphylokokken beitragen, wurde die Insertionsstrategie des IS Elements IS256 und dessen Transpositionsmechanismus untersucht, da dieses mobile genetische Element offenbar maßgeblich an der Genomplastizität von *Staphylococcus epidermidis* beteiligt ist.

### 6.1. Die Biofilmbildung bei *S. epidermidis* ist variabel

Biofilm-positive (PIA-positive) *S. epidermidis*-Kolonien können von Biofilm-negativen (PIA-negativen) *S. epidermidis*-Kolonien aufgrund ihrer Koloniemorphologie auf Kongorotagar unterschieden werden. Während PIA-positive Kolonien schwarz sind und eine rauhe Oberfläche aufweisen, sind PIA-negative Kolonien rot und glatt. Im Adhärenzassay, der in Polystyren-Mikrotiterplatten durchgeführt wurde, konnte die Biofilmbildung qualitativ untersucht werden. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer im Adhärenzassay nicht adhären Kolonie lag für den Stamm *S. epidermidis* 307 zwischen  $1,6 \times 10^{-5}$  und  $1,1 \times 10^{-6}$ . *S. epidermidis* RP62A wies eine Variationsrate von  $4 \times 10^{-5}$  bis  $6 \times 10^{-5}$  auf, womit sich beide Stämme nicht signifikant in ihrer Neigung zur Variation unterscheiden.

Bei vielen Bakterien, vor allem solchen, die die Atemwegsorgane kolonisieren, wie z. B. Streptokokken, Neisserien und *Haemophilus influenza*, wurde gezeigt, daß eine Veränderung von Kapseln, Lipooligosacchariden und Oberflächenproteinen eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Mikroorganismen während einer Infektion spielt. Die Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit kann einen Einfluß auf die Adhärenzeigenschaften der Bakterien haben. Ihre Fähigkeit, in die Zellen des Wirts einzudringen und auch die Möglichkeit, dem Immunsystem des Wirts zu entkommen ändert sich dabei (van Putten und Robertson, 1995; Roche und Moxon, 1995; Cleary *et al.*, 1998). Warum Biofilm-bildende *S. epidermidis*-Stämme ihre Fähigkeit, PIA zu produzieren abschalten, ist noch nicht geklärt. Es gibt jedoch eine Reihe von Hinweisen darauf, daß Biofilm-negative Varianten von ehemals Biofilm-positiven Ausgangsstämmen an akuten und chronischen Infektionen beteiligt sind (Baddour und Christensen, 1987; Christensen *et al.*, 1987; Baddour *et al.*, 1990; Deighton *et al.*, 1992b; Baselga *et al.*, 1993). Es ist denkbar, daß das Abschalten der PIA-Produktion den einzelnen Zellen erlaubt, aus dem Biofilm zu entkommen und neue Oberflächen zu besiedeln. Ein Zurückkehren in den Biofilm-bildenden Zustand könnte den Bakterien in einer späteren Phase der Infektion eine erneute Besiedelung von Oberflächen an anderer Stelle ermöglichen.

Diese Strategie verfolgt z. B. *Pseudomonas aeruginosa*. Bei diesen Bakterien, die eine persistierende Infektion der Lunge bei Patienten mit cystischer Fibrose durch eine Besiedelung und Bildung eines Biofilms auf dem Epithel hervorrufen, wurde ein Enzym gefunden, das das Exopolysaccharid Alginat abbaut und damit dafür sorgt, daß die Bakterien aus dem Biofilm entlassen werden (Lam *et al.*, 1980; Boyd und Chakraborty, 1994).

Wie anfänglich erwähnt, können Bakterien, die an medizinischen Implantaten oder an wirtseigenem Gewebe adhären, chronische Infektionen auslösen (Costerton *et al.*, 1999, Costerton und Stewart, 2000). Häufig sind in Biofilmen organisierte Bakterien bis zu 1000-fach resistenter gegen Antibiotika als ihre planktonischen Verwandten und entgehen außerdem dem Abwehrsystem des Wirts (Stewart und Costerton, 2001). Die Resistenz gegen Antibiotika ist hierbei nicht auf allgemein bekannte Mechanismen wie Efflux-Pumpen, modifizierende Enzyme oder *Target*-Mutationen (Walsh, 2000) zurückzuführen. Es scheinen vielmehr andere Mechanismen für die Resistenz der Bakterien verantwortlich zu sein (Stewart und Costerton, 2001). Erstens ist es möglich, daß Antibiotika entweder nur sehr langsam oder gar nicht die Matrix des Biofilms durchdringen können. Zweitens kann sich die Mikroumgebung der Bakterien im Biofilm z. B. durch das Anhäufen von Stoffwechselprodukten ändern und damit die Wirkung einiger Antibiotika negativ beeinflussen. Möglich ist auch, daß die Bakterien durch Nahrungsmangel im Zentrum des Biofilms in ein Ruhestadium wechseln und damit für viele Antibiotika kein Angriffspunkt mehr sind. Eine dritte sehr spekulative Hypothese ist, daß die Bakterien in ein anderes phänotypisches Stadium wechseln, in dem sie jegliche Empfindlichkeit gegen äußere Einflüsse verlieren, ähnlich dem Stadium einer Endospore (Stewart und Costerton, 2001). Es ist bemerkenswert, daß Bakterien als opportunistische Pathogene persistieren können, weil sie in der Lage sind, sich in Biofilmen zu organisieren, in denen sie vor äußeren Einflüssen geschützt sind.

### **6.1.1. Genotypische Variabilität bei *S. epidermidis* 307: Nachweis von genomischen Umordnungen durch DNA-Fingerprints und IS256-spezifische Hybridisierungen**

Nach Kultivierung des PIA-positiven Stammes *S. epidermidis* 307 konnten PIA-negative Varianten isoliert werden. Es ist möglich, daß es sich bei den PIA-negativen Kolonien um saprophytäre Kontaminanten handelt. Um diesen Fall auszuschließen, aber vor allem, um den genetischen Hintergrund des PIA-negativen Phänotyps der Varianten zu untersuchen, wurde der PIA-positive Wildtypstamm und seine PIA-negativen Varianten einem DNA-Fingerprint mittels Pulsfeldgelelektrophorese unterzogen. Außerdem wurde eine Southern-Hybridisierung mit *ica*- und IS256-spezifischen Sonden durchgeführt.

Es zeigte sich im Pulsfeldgel, daß der PIA-negative Phänotyp bei einigen Varianten mit größeren Umordnungen des Chromosoms einhergeht (Abb. 5.3.). Zusätzlich kommt es bei 13 von 147 Varianten zum Verlust des *ica*-Operons. Kontaminanten konnten mit Hilfe der pulsfeldgelelektrophoretischen Auftrennung der chromosomalen DNA eindeutig erkannt und eliminiert werden. Die Hybridisierung des Pulsfeldgels mit einer IS256-spezifischen Sonde zeigte, daß sich Varianten, die im Pulsfeldgel gleiche DNA-Restriktionsmuster aufwiesen unterschiedliche IS256-Hybridisierungsmuster haben können (Abb. 5.3. und 5.4. z. B. *S. epidermidis* 307/4 und 307/6 bzw. 307/21 und 307/22). Die Pulsfeldgelelektrophorese eignet sich dazu, verschiedene Stämme voneinander zu unterscheiden und genomische Umordnungen zu erkennen. Die Hybridisierung mit IS256 deckt dabei noch weitere Unterschiede auf, die mit den gängigen Methoden zur Stammtypisierung nicht nachzuweisen sind. Eine noch feinere Typisierung der Varianten konnte mit der Southern-Hybridisierung von chromosomaler *Eco*RI-hydrolysiertes DNA mit einer IS256-spezifischen Sonde erreicht werden (Abb. 5.6.). Bemerkenswert ist, daß aus einem PIA-positiven Klon Varianten hervorgehen, die über 22 verschiedene Hybridisierungsmuster verfügen. IS256 ist offensichtlich sehr aktiv und an Umordnungen des Genoms von *S. epidermidis* beteiligt. Dieses Ergebnis stellt die früher beschriebene Möglichkeit in Frage, Staphylokokken anhand ihrer IS256-Hybridisierungsmuster zu typisieren (Deplano *et al.*, 1997).

### **6.1.2. IS256-Insertionen im *ica*-Operon von *S. epidermidis* führen zu einem PIA-negativen Phänotyp**

Insertionssequenzen (IS-Elemente) sind dafür bekannt, daß sie eine wichtige Rolle bei der Flexibilität des bakteriellen Genoms und der Mikroevolution spielen (Arber, 1993; Mahillon und Chandler, 1998). Sie sind in unterschiedlicher Weise an der Variation der Genexpression bei verschiedenen Organismen beteiligt. Durch Transposition in funktionelle Gene können sie diese inaktivieren oder durch Exzision entsprechend aktivieren. Daneben verursachen sie komplexe DNA-Umordnungen, Inversionen, Deletionen und Genamplifikationen. Außerdem sind sie als repetitive Elemente im Genom eine mögliche Ursache für die Rekombination zwischen homologen Sequenzen (Arber, 1993).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß das Insertionselement IS256 in mehreren nicht-adhärenenten *S. epidermidis* 307-Varianten für den PIA-negativen Phänotyp verantwortlich ist, indem es in das *ica*-Operon inseriert. Dieser Mechanismus ist schon in einem früheren *in vitro* Experiment bei *S. epidermidis* RP62A (Ziebuhr *et al.*, 1999) und *in vivo* bei *S. epidermidis* 569 (Cho *et al.*, im Druck) beobachtet worden. In den Experimenten mit *S. epidermidis* 307 und *S. epidermidis* RP62A findet die Insertion von IS256 in das *icaC*-Gen häufiger statt als Insertionen in das *icaA*-, *icaD*- oder *icaB*-Gen. 15 von 17 Insertionsstellen sind in einem 320 bp-großen Bereichs innerhalb des 1067 bp-großen *icaC*-Gens identifiziert worden. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, daß das *icaC*-Gen ein *Hot-spot* für die Integration von IS256 in das

Genom von *S. epidermidis* ist. Die IS256-Insertionsstellen sind bei den untersuchten *S. epidermidis* 307-Varianten nicht identisch (Abb. 5.18. und Tab. 5.4.). Das deutet darauf hin, daß die Insertion von IS256 kein sequenzspezifisches aber dennoch ein gerichtetes Ereignis ist. Diese gewisse Variabilität, die sich bei der Insertion von IS256 in das *icaC*-Gen zeigt, kann Auswirkungen auf die Flexibilität von Staphylokokken an sich ändernde Umweltbedingungen haben, was an anderer Stelle diskutiert wird (s. 6.2.3.).

Auch bei anderen pathogenen Bakterien wurde beobachtet, daß die Insertion eines IS-Elements Auswirkungen auf die Expression bestimmter Gene und die damit verbundene Virulenz hat. So wurde bei *Neisseria meningitidis* eine Veränderung der Expression des *siaA* Gens und des *porA*-Gens durch die Integration des IS-Elements IS1301 nachgewiesen. Die reversible Insertion von IS1301 in das *siaA*-Gen wirkt sich auf die Kapselsynthese und damit die Invasivität von *N. meningitidis* aus. Nichtbekapselte Varianten sind in der Lage, an Epithelzellen zu adhären und in diese einzudringen. Die anschließende Expression der *sia*-Gene verursacht die Bildung einer Kapsel aus Sialinsäure, die es den Bakterien ermöglicht, der Immunabwehr des Wirts zu entkommen (Hammerschmidt *et al.*, 1996). Die Insertion von IS1301 in das *porA*-Gen von *Neisseria meningitidis* hat Einfluß auf die Expression des äußeren Membranproteins PorA. Durch diese Antigenvariation gelingt es den Bakterien, das Immunsystem des Wirts zu unterlaufen (Newcombe *et al.*, 1998).

### **6.1.3. Deletionen im Genom von *S. epidermidis* betreffen auch das *ica*-Operon**

Verschiedene Mechanismen tragen zur Genomvariabilität von Bakterien bei. Neben Genduplikationen können auch neue Gene durch horizontalen Gentransfer erworben werden (Jordan *et al.*, 2001; Ochman *et al.*, 2000). Es stellt sich die Frage, warum das bakterielle Genom trotz Akquisition von genetischem Material relativ kompakt ist und nicht fortlaufend größer wird. Es gibt verschiedene Mechanismen, bei denen überflüssige DNA deletiert wird. Häufig kommt es vor der Deletion von DNA-Abschnitten zur Inaktivierung der Gene durch Punktmutationen oder Frameshift-Mutationen. Dabei entstehen sog. Pseudogene, die nachfolgend eliminiert werden, da sie keine Funktion mehr erfüllen und nicht benötigt werden. Möglich ist auch die direkte Deletion noch intakter Gene. Deletionen sind nachgewiesenermaßen häufiger als Insertionen und haben einen größeren direkten Effekt auf die Genomgröße als Insertionen (Mira *et al.*, 2001).

Die Deletion unterschiedlich großer DNA-Bereiche konnte in der vorliegenden Arbeit bei einem klinischen Biofilm-positiven *Staphylococcus epidermidis*-Isolat nachgewiesen werden. Der Stamm *S. epidermidis* 307 fiel dadurch auf, daß er nicht nur aufgrund einer Insertion von IS256 in das *ica*-Operon seine Fähigkeit verlor, Biofilm auf Polystyren-Mikrotiterplatten

auszubilden, sondern auch dadurch, daß das *ica*-Operon bei 13 von 146 Varianten deletiert wurde. Es stellte sich heraus, daß diese Varianten nur in ihrer Fähigkeit, Biofilm zu bilden eingeschränkt waren. Anhand von Wachstumskurven in Minimal- und Vollmedium und unter verschiedenen Temperaturen konnte festgestellt werden, daß die Deletion eines größeren DNA-Bereichs keine negativen Auswirkungen auf die Fitness der Mutanten hat. Man kann sogar vermuten, daß die Deletionsmutanten einen gewissen Wachstumsvorteil haben, da sie in Minimalmedium bei 37°C schneller in die stationäre Wachstumsphase eintreten als der *S. epidermidis* 307-Wildtyp (Abb. 5.7.). Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine kürzere Replikationszeit des bis zu 250 kb kleineren Genoms der Deletionsmutanten zurückzuführen. Durch den Verlust der DNA-Bereiche gehen offensichtlich keine essentiellen Gene verloren. Deletionen größerer chromosomaler DNA-Abschnitte, von denen das *ica*-Operon betroffen ist, wurden in unserer Arbeitsgruppe auch bei zwei anderen *S. epidermidis* Stämmen beobachtet (Krimmer und Ziebuhr, unveröffentlicht).

Ein Vergleich der Resistenzmuster von *S. epidermidis* 307, *S. epidermidis* 307/9 und 307/56 ergab, daß sich die Resistenzeigenschaften im Zuge der Deletion nicht ändern (Tab. 5.2.). Sowohl Wildtyp als auch Mutanten sind in gleichem Maße gegen die getesteten Antibiotika resistent oder sensibel. Auf dem deletierten DNA-Bereich sind demnach keine Gene für die Resistenz gegen die getesteten Antibiotika vorhanden.

Es stellt sich die Frage, welche Gene im Verlauf der Genomumordnung, wie sie bei den Deletionsmutanten von *S. epidermidis* 307 beobachtet wurde, verloren gehen. Eine Möglichkeit, die Sequenz des deletierten Bereichs zu ermitteln wäre die Sequenzierung des entsprechenden Bereichs im Wildtyp-Stamm. Die vollständige Sequenzierung von Cosmid-Klonen der Genbank von *S. epidermidis* 307, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurde, war aufgrund der Größe des zu untersuchenden Bereichs von ca. 250 kb nicht möglich. Daher wurde auf eine andere Methode zurückgegriffen. Ausgehend vom *ica*-Operon wurde die Sequenz stromaufwärts und stromabwärts vom *ica*-Operon des Biofilm-positiven Stammes *S. epidermidis* RP62A mit der entsprechenden Sequenz von *S. epidermidis* 307 und dessen Deletionsmutanten verglichen. Die Sequenz des Stammes *S. epidermidis* RP62A steht in der TIGR-Datenbank des *Institute for Genomic Research* zur Verfügung. Dieses Sequenzierprojekt ist noch nicht abgeschlossen und die Sequenzen liegen in Form von ca. 20 kb großen ungeordneten Contigs vor. Mit Hilfe des Computerprogramms ContigExpress wurden diese anhand überlappender Sequenzbereiche geordnet und die identifizierten offenen Leserahmen (ORF-Finder, NCBI) nach Homologien zu bekannten Proteinen untersucht (pBlast-search). Nun konnten die stromaufwärts von *ica* gelegenen Deletionsgrenzen der *ica*-negativen Mutanten genauer untersucht werden (Abb. 5.15.). Es stellte sich heraus, daß die zehn überprüften Mutanten fünf unterschiedliche Deletionsgrenzen aufweisen. Man kann daraus schließen, daß es sich hier nicht um einen einheitlichen Deletionsmechanismus handelt. Die Größe der deletierten Bereiche läßt sich bei Mutante 307/9 und Mutante 307/55 bestimmen. Bei *S. epidermidis* 307/9 wurde die Größe des deletierten Bereichs aufgrund des

Restriktionsmusters im Pulsfeldgel auf ca. 250 kb geschätzt. Der deletierte DNA-Abschnitt bei *S. epidermidis* 307/55 ist ungefähr 12 kb groß, das konnte durch den Vergleich mit der Sequenz von *S. epidermidis* RP62A ermittelt werden. Über den Umfang der anderen deletierten Bereiche läßt sich momentan noch nichts sagen, da die Deletionsgrenze stromabwärts von *ica* nicht beschrieben werden konnte. Das lag vor allem darin begründet, daß auch nahverwandte Stämme wie *S. epidermidis* 307 und *S. epidermidis* RP62A über eine unterschiedliche Struktur ihrer Genome verfügen. So konnten bei *S. epidermidis* RP62A offene Leserahmen detektiert werden, die Ähnlichkeiten zu Proteinen der SCC (*Staphylococcal Chromosome Cassette*) von *S. aureus* aufweisen (ORF 200-208 im Anhang II). Ähnliche Bereiche konnten bei *S. epidermidis* 307 nicht gefunden werden, was ein Hinweis darauf ist, daß *S. epidermidis* 307 *mecA*-negativ und damit Methicillin-sensibel ist. Es wurden weitere Unterschiede bei einem Vergleich der möglichen offenen Leserahmen von *S. epidermidis* 307 und RP62A festgestellt: So fehlen bei *S. epidermidis* 307 Sequenzbereiche, die für Proteine kodieren, die gewisse Ähnlichkeiten zu Cadmiumresistenzproteinen aufweisen und die bei *S. epidermidis* RP62A vorhanden sind (ORF 9-12 im Anhang II).

Ansonsten konnten alle Gene, die für das *Screening* des deletierten Bereichs ausgewählt wurden und die bei *S. epidermidis* RP62A vorkommen auch bei *S. epidermidis* 307 mittels PCR und Southern Hybridisierung identifiziert werden. Offen bleibt aber, ob die Anordnung der Gene bei den beiden *S. epidermidis*-Stämme identisch ist. Möglicherweise gibt es auch Gene, die bei *S. epidermidis* 307 aber nicht bei *S. epidermidis* RP62A vorkommen. Dies kann nur durch die Sequenzierung des betreffenden Bereichs von *S. epidermidis* 307 ermittelt werden. Die Sequenzierung der entsprechenden Genbank-Klone ist in Vorbereitung und wird einen Einblick in die stammspezifischen Unterschiede von *Staphylococcus epidermidis* geben.

Von besonderem Interesse war der Mechanismus, der zur Deletion unterschiedlich großer DNA-Bereiche bei *S. epidermidis* führte. Die Grenzen einer deletierbaren DNA-Sequenz können Aufschluß über den zugrundeliegenden Mechanismus geben. Mobile genetische Elemente wie Insertionssequenzen oder Transposons sowie repetitive Elemente weisen auf homologe Rekombination als Deletionsmechanismus hin. Homologe Rekombination, die zwischen zwei sich wiederholenden DNA-Sequenzen stattfindet, ist einer der wichtigsten Mechanismen bei der Umordnung bakterieller Genome (Petes und Hill, 1988; Roth, 1996). Sie kann zwischen allen sich wiederholenden Sequenzen stattfinden, wobei IS-Elemente gut dokumentierte Beispiele sind (Haack und Roth, 1995; Noel und Ames, 1978; Timmons *et al.*, 1986). Deletionen, die auf ein Rekombinationsereignis zurückzuführen sind, wurden bei verschiedenen Pathogenen nachgewiesen. Bei *Mycobacterium tuberculosis* vermitteln zwei 1,3 kb-große Kopien des Insertionselements IS6110 die Deletion des dazwischenliegenden Bereichs (Fang *et al.*, 1999). Bei *Neisseria meningitidis* hat die Deletion unterschiedlich großer DNA-Sequenzen durch Rekombination zwischen repetitiven Elementen Einfluß auf

die Expression des *porA*-Gens und damit auf die Variation des äußeren Membranproteins PorA (van der Ende, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde die homologe Rekombination zwischen zwei in gleicher Richtung im Chromosom vorkommenden IS256-Elementen bei *S. epidermidis* 307 beobachtet, was zur Deletion eines großen Bereichs chromosomaler DNA führte, bei dem neben dem *ica*-Operon eine Reihe anderer möglicherweise virulenzassoziierte Gene verloren gegangen ist. Ausschlaggebend für diese Annahme sind die 8bp-Duplikationen des Transposons bzw. IS256-Elements, die bei Wildtyp und Mutante verglichen wurden (Abb. 5.12.). Tn4001 weist im Wildtypgenom identische 8 bp-Duplikationen am Anfang und am Ende des Transposons auf. Das bedeutet, daß das Transposon durch Transposition an diese Stelle im Chromosom gelangt ist. In der Deletionsmutante *S. epidermidis* 307/9 sind die 8 bp-Duplikationen die das Transposon umgeben unterschiedlich. Das linke IS256-Element des Transposons weist hierbei die gleiche 8 bp-Duplikation wie die eines stromaufwärts liegenden einzelnen IS256-Elements des Wildtyps auf. Rekombination hat demzufolge zwischen dem linken IS256 des Transposons und dem einzelnen in gleicher Richtung positionierten stromaufwärts liegenden IS256 stattgefunden. Dabei wurde der dazwischenliegende DNA-Abschnitt und damit neben anderen Genen auch das *ica*-Operon deletiert. Dies ist der erste Nachweis, daß IS256 nicht nur durch alternative Transposition an der Genomplastizität von Staphylokokken beteiligt ist sondern auch durch homologe Rekombination, die zwischen mehreren Kopien eines IS-Elements stattfinden kann. Das könnte nicht nur für das IS-Element IS256 gelten, sondern auch für andere IS-Elemente, die häufig im Staphylokokkengenom vorkommen wie IS257 oder IS200. Bei *Salmonella typhimurium* konnte die Rekombination zwischen zwei IS200-Elementen bereits nachgewiesen werden (Haack und Roth, 1995). Es ist offensichtlich, daß das IS-Element IS256 Genomumordnungen mittels Transposition und Rekombination verursacht und damit zur Variabilität und Evolution von *Staphylococcus epidermidis* beitragen kann.

Der Erwerb von Pathogenitätsinseln (PAIs) spielt in der Evolution von Gram-negativen Pathogenen eine wichtige Rolle (Hacker und Kaper, 2000; Ochman, 2000). Im Gegensatz dazu sind bisher nur wenige PAIs bei Gram-positiven pathogenen Bakterien beschrieben worden. Diese unterscheiden sich zudem in ihren Eigenschaften von PAIs Gram-negativer Bakterien.

Pathogenitätsinseln sind DNA-Elemente, die in pathogenen Stämmen bestimmter Spezies vorkommen, in verwandten apathogenen Spezies dagegen fehlen. Es handelt sich um große genomische DNA-Fragmente die meist auf dem Chromosom lokalisiert sind und vermehrt Virulenzgene tragen. Der G+C-Gehalt einer PAI unterscheidet sich häufig von dem des Restgenoms. PAIs stellen instabile distinkte genetische Elemente dar, die oft von *Direct*

*repeats* flankiert werden. Desweiteren sind sie mit tRNAs und (oft kryptischen) Mobilitätsgenen assoziiert (IS-Elemente, Integrasen, Transposasen) (Hacker *et al.*, 1997). Genprodukte, die auf Pathogenitätsinseln kodiert sind, repräsentieren das gesamte Spektrum bakterieller Virulenzfaktoren, von Adhäsinen über Toxine bis hin zu Wirtsabwehrmechanismen (s. Hacker und Kaper 2000).

Unter den Gram-positiven Pathogenen konnten bis jetzt bei *S. aureus*, *S. pneumoniae* und bei Listerien Pathogenitätsinseln identifiziert werden (Lindsay *et al.*, 1998; Fitzgerald *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2001; Chakraborty *et al.*, 2000). Das Gen für das Superantigen Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin (TSST) konnte bei *S. aureus* auf einem 15,2 kb-großen genetischen Element detektiert werden, das nicht bei TSST-negativen Stämmen vorkommt und das durch Helferphagen auf andere *S. aureus*-Stämme übertragen werden kann. Dieses Element, das als SaPI1 bezeichnet wurde, wird von 17 bp langen *Direct-repeats* flankiert und enthält neben dem *tst*-Gen auch offene Leserahmen, die Ähnlichkeiten zu weiteren Pathogenitätsfaktoren zeigen. Ferner wurde ein ORF entdeckt, dessen Produkt Ähnlichkeiten zu einem Mitglied der Integrase-Familie der Rekombinasen hat. Es werden damit drei Kriterien, die PAIs auszeichnen erfüllt: Virulenzfaktoren, die bei TSST-negativen Stämmen nicht vorkommen und die von *Direct repeats* flankiert werden. Der GC-Gehalt unterscheidet sich nicht von der umgebenden Region (Lindsay *et al.*, 1998). Eine weitere mögliche Pathogenitätsinsel wurde bei bovinen Mastitis-*S. aureus*-Isolaten nachgewiesen (SaPIbov), auf der z.B. das TSST und ein Enterotoxin-ähnliches Proteine kodiert sind. Der Genbereich wird von 74 bp-*Direct-repeats* flankiert, enthält außerdem ein Integrase-Gen und hat im Kernbereich Ähnlichkeiten zur SaPI1 von *S. aureus* (Fitzgerald *et al.*, 2001). Im Rahmen der Komplettssequenzierung von *S. aureus* konnten fünf neue Pathogenitätsinseln identifiziert werden. Diese tragen entweder die Gene für das toxische Schock Syndrom Toxin (*tst*) oder ein Exotoxingencluster (Kuroda *et al.*, 2001). Zuletzt wurde die Pathogenitätsinsel SaPI3 bei *S. aureus* beschrieben (Yarwood *et al.*, 2002). Alle *S. aureus*-Pathogenitätsinseln haben große Ähnlichkeit zueinander, manche Bereich sind identisch. Es wird vermutet, daß alle SaPIs aus einem Vorläufer entstanden sind. Dieser wurde auf unterschiedliche Stämme übertragen und hat sich durch Rekombinationen, Deletionen, Insertionen und Mutationen verändert (Yarwood *et al.*, 2002; Novick *et al.*, 2001). Auch bei *S. pneumoniae* wurde kürzlich eine mögliche Pathogenitätsinsel beschrieben (Putative Pathogenitätsinsel PPI-1). Hierbei handelt es sich um den sog. *pit1* bzw. *pit2*-Genbereich, der für ein Eisenaufnahmesystem von *S. pneumoniae* kodiert. Pit-Mutanten sind in ihrer Virulenz stark attenuiert (Brown *et al.*, 2001). Wie viele PAIs Gram-negativer Pathogene und anders als die SaPI1 ist PPI-1 stabil in das Chromosom integriert.

Bei *S. epidermidis* 307/9 ist ein ca. 250 kb-großer DNA-Bereich deletiert. In diesem Bereich konnten durch Sequenzanalysen zahlreiche offene Leserahmen identifiziert werden. Deren mögliche Genprodukte weisen zum Teil keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen auf. Daneben wurden Sequenzen gefunden, die gewisse Ähnlichkeiten zu Stoffwechselgenen haben (z. B. ORF 44, 47, 103-106, 156, 170-172 im Anhang II). Auffällig

ist das Vorhandensein von vielen offenen Leserahmen mit Ähnlichkeiten zu Transportproteinen, sekretierten Proteinen, Zellwand und Oberflächenproteinen, mobilen genetischen Elementen und Resistenzdeterminanten (s. Tabelle und Abbildung im Anhang II). Vergleicht man die Eigenschaften dieser Proteine mit PAI-kodierten Proteinen, so könnte man vermuten, daß es sich hier möglicherweise um eine PAI handelt. Auf alle Fälle liegt ein interessanter DNA-Bereich vor, der vermehrt virulenzassoziierte Gene beinhaltet, deren Herkunft und Funktionen in weiteren Experimenten geklärt werden muß. Im Folgenden sollen einige dieser Proteine mit Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen und deren Funktion vorgestellt werden:

**Oligopeptidtransporter** (ORF 146-150): Das *opp*-Operon von *S. aureus* beinhaltet fünf Gene und kodiert für ein Oligopeptidtransportsystem, das den Import von Proteinen in die Zelle vermittelt. *Opp*-Mutanten zeigen eine attenuierte Virulenz in verschiedenen Infektionsmodellen. Oligopeptidtransporter spielen eine Rolle bei der Wachstumsregulation, der Adhärenz an Wirtszellen und der Resistenz/Empfindlichkeit gegenüber Defensinen und toxischen Peptiden (Coulter *et al.*, 1998).

**Drp35** (ORF 96): Die Expression des Gens *drp35* wird bei *S. aureus* durch Zellwandantibiotika induziert. Vermutlich ist das *drp35*-Genprodukt an der Zellwandsynthese von Staphylokokken beteiligt und vermittelt ein Überleben der Zellen wenn sie z. B.  $\beta$ -Lactamen ausgesetzt sind (Murakami *et al.*, 1999).

**Glycin-Betain/Carnithin/Cholin ABC Transporter** (ORF 133-136): Diese ABC-Transporter vermitteln bei *B. subtilis* die Aufnahme von Cholin in die Zelle für die Synthese des Osmoprotectant Glycin-Betain (*opu*: osmo protectant uptake) als Antwort auf osmotischen Streß (Kappes *et al.*, 1999).

**Immunodominantes Staphylokokken Antigen IsaB** (ORF 101): Hierbei handelt es sich um eine in unserer Arbeitsgruppe identifizierte immundominante Staphylokokken-spezifische Antigenstruktur, die während einer Infektion mit MRSA exprimiert wird. Die Funktion und die Rolle, die dieses Protein während des Infektionsverlaufs spielt, ist nicht bekannt (Lorenz *et al.*, 2000).

**Serin-Protease** (ORF 177): Die extrazelluläre V8-Protease (SspA) von *S. aureus* trägt zum Wachstum und Überleben von *S. aureus* in verschiedenen Infektionsmodellen bei und spielt unter Umständen eine Rolle bei der Kontrolle der Adhäsion. Die Serin-Protease hat möglicherweise einen Einfluß auf Oberflächenproteine, da gezeigt wurde, daß sie das Fibronectinbindeprotein abbaut. Das *ssp*-Operon besteht aus drei Genen, wobei SspA für die proteolytische Reifung von SspB benötigt wird (Rice *et al.*, 2001).

**Ornithin-Carbamoyltransferase** (ORF 129): Bei der Isolierung von Fibronectinbindeproteinen aus *S. epidermidis* mittels LiCl-Extraktion konnte ein 42-kDa-Protein als Ornithin-Carbamoyltransferase identifiziert werden (Hussain *et al.*, 1999). Dieses Enzym ist an der Synthese von Arginin beteiligt, indem es Ornithin in Citrullin umwandelt. Schon an anderer Stelle wurde berichtet, daß Enzyme mit Stoffwechselfunktionen an der Oberfläche von Mikroorganismen vorkommen, wie z. B. die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-

Dehydrogenase bei *S. aureus* und *S. epidermidis* (Modun und Williams, 1999). Bei diesen Enzymen handelt es sich um eine neue Familie von multifunktionalen zellwandassoziierten Proteinen.

**Hämagglutinin-Protein und Fimbrienassoziiertes Protein (ORF66):** Das Fimbrien-assoziierte Protein ist an der Adhärenz von *Streptococcus parasanguis* beteiligt. Auffällig ist eine Proteinregion mit außerordentlich vielen sich wiederholenden Bereichen. Derartige *Repeat*-Strukturen sind auch bei anderen Oberflächenproteinen zu beobachten, die Virulenzdeterminanten darstellen (Wu und Fives-Taylor, 1999). Der *Clumping*-Faktor A aus *S. aureus* z. B. enthält Serin-Aspartat Dipeptid-Wiederholungen (*SD-repeats*), die ca. 30% des gesamten Proteins ausmachen. Diese Proteinbereiche sind als membranspannende Domänen und als Ligandenbindedomänen wichtig (Hartford *et al.*, 1997). Auch bei *S. epidermidis* konnten drei oberflächenassoziierte Proteine mit *SD-repeats* identifiziert werden (SdrF, SdrG und SdrH), die möglicherweise einer Rolle in der Virulenz der Bakterien spielen (McCrea *et al.*, 2000).

**Biofilm-assoziiertes Protein (ORF 168):** Das Biofilm-assoziierte Protein Bap ist ein Zellwandassoziiertes Protein von *S. aureus*, das im Infektionsmodell in die Pathogenese von *S. aureus* involviert ist und persistierende Infektionen auslöst. Bap-negative Mutanten haben auf Kongorotagar das gleiche Erscheinungsbild wie PIA-negative Mutanten. Das Bap-Protein weist 13 *repeats* auf, wobei mögliche Insertionen oder Deletionen zu Antigenvariabilität führen und dazu beitragen, daß die Bakterien der Immunabwehr des Wirts entkommen können (Cucurella *et al.*, 2001).

**Tributyryn-Esterase (ORF 33 und ORF 132):** Die Tributyrin-Esterase von *L. lactis* ist nicht essentiell, vermittelt die Hydrolyse von Acyl-Estern, Phospholipiden und langkettigen Lipiden und nimmt eine Funktion beim Phospholipidstoffwechsel und der Formaldehyd-Detoxifikation ein (Fernandez *et al.*, 2000). In diesem Gen ist bei *S. epidermidis* 307 ein IS256-Element inseriert.

**Kapselsyntheseprotein (ORF67):** Die Typ 2-Kapsel spielt nachweislich eine Rolle in der Pathogenese von *S. suis* Serotyp 2-Infektionen, indem sie den Bakterien Schutz vor Phagozytose durch Wirtsmakrophagen bietet (Smith *et al.*, 1999).

Ein großer Teil dieser Proteine nimmt eine Funktion in der Virulenz der betreffenden Bakterien ein. Daneben kommen auf dem annotierten DNA-Abschnitt aus *S. epidermidis* RP62A, der die Umgebung des *ica*-Operons darstellt auch vollständige oder nur Teile von mobilen genetischen Elementen vor. Hierzu gehören die IS-Elemente IS200, IS150 und IS257 (ORF 29, 187 und 9). Fünf mögliche Transposasen (ORF 3, 16, 53, 102, 185) und putative Proteine mit gewissen Ähnlichkeiten zu Invertasen/Recombinasen (ORF27) und Phagenproteinen (ORF 2 und 48) sind ebenfalls zu finden. Bei *S. epidermidis* 307 ist zusätzlich ein IS256-Element im Gen, das Ähnlichkeit zu einer Tributyrin-Esterase aufweist vorhanden (s. 5.2.2.3.).

Welche Eigenschaften, die eine Pathogenitätsinsel auszeichnen können für die Sequenz, die das *ica*-Operon umgibt geltend gemacht werden?

- Das *ica*-Operon kommt bei adhärenenten und damit virulenten *S. epidermidis* Isolaten vor und fehlt bei den meisten saprophytären *S. epidermidis* Isolaten (Ziebuhr *et al.* 1997).
- Bei der Deletion unterschiedlich großer DNA-Bereiche von *S. epidermidis* sind neben dem *ica*-Operon auch andere virulenzassoziierte Gene, Resistenzgene und mobile genetische Elemente betroffen (Instabilität, möglicherweise Mobilität und das Vorkommen von Virulenzgenen)
- Mehrere IS256 -Kopien im Genom von *S. epidermidis* 307 können *Direct-repeats* verkörpern, zwischen denen es nachweislich zur Deletion von DNA durch homologe Rekombination kommt.

Der evolutionäre Ursprung der *ica*-Gene und die Mechanismen ihrer Verbreitung innerhalb verschiedener Staphylokokkenspezies ist noch ungeklärt. Sequenzvergleiche ergaben für *icaA* sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene, neben den zu erwartenden Ähnlichkeiten mit anderen Zuckertransferasen, auch eine Homologie zu einem Gen des Pigmentierungslokus aus *Yersinia pestis* (Lillard *et al.*, 1997). Dieser Pigmentierungslokus liegt auf einem 102 kb-großen instabilen genetischen Element, das auch die *High-Pathogenicity-Island* (HPI) von *Yersinia pestis* enthält (Buchrieser *et al.*, 1998). Das 102 kb-Fragment wird von Insertionssequenzen flankiert, die die spontane Deletion dieses Genomabschnittes vermitteln (Fetherston *et al.*, 1992). Neuere Untersuchungen zeigen, daß eine Übertragung von HPI-spezifischen Genen von Yersinien auf *E. coli* und andere Enterobakterien durch horizontalen Gentransfer stattgefunden hat. Ein solcher Mechanismus ist auch für den 250 kb-großen deletierbaren Bereich von *S. epidermidis* denkbar, auf dem das *ica*-Operon liegt und der von IS256 flankiert wird. Das Vorkommen von *ica*-negativen und *ica*-positiven *S. epidermidis*-Stämmen deutet auf eine mögliche Übertragbarkeit der *ica*-Gene hin.

## 6.2. Die Bildung von zirkulären IS256-Molekülen als mögliches Zwischenprodukt in der Transpositionsreaktion

Insertionssequenzen haben unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um sich von einem Ort im Genom zu einem anderen zu bewegen (s. Haren *et al.*, 1999 für eine aktuelle Zusammenfassung). Transposition kann über einen *Cut-and-paste*-Mechanismus erfolgen, wobei das IS-Element aus dem Donorstrang herausgelöst und in den Zielstrang inseriert wird. Eine andere Möglichkeit ist die Transposition über ein Kointegrat, bei dem es zur Verdopplung der IS-Kopien kommt. Einige bakterielle Insertionselemente transponieren über einen alternativen Transpositionsweg, der durch die Bildung von zirkulären Transpositionszwischenprodukten gekennzeichnet ist. Ein gut untersuchtes Beispiel für diesen Mechanismus ist das IS-Element IS911, ein Mitglied der IS3-Familie (Ton-Hoang *et al.*,

1998). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die von IS256 kodierte Transposase die Bildung eines zirkulären IS256-spezifischen Moleküls katalysiert. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, daß der Strangtransfer während der Transpositionsreaktion eine geringe Spezifität aufweist, was dazu führt, daß verschiedene IS256-zirkuläre Intermediate mit unterschiedlicher Sequenz und Größe nachgewiesen werden konnten. Dies ist ein entscheidender Unterschied zu anderen IS-Elementen, bei denen die Anzahl der zwischen den Enden eingeschlossenen Basenpaare konstant ist. Möglicherweise ist das die Ursache für die große Anzahl von Deletionen, Insertionen und Umordnungen, die im Genom von Staphylokokken häufig zu finden sind.

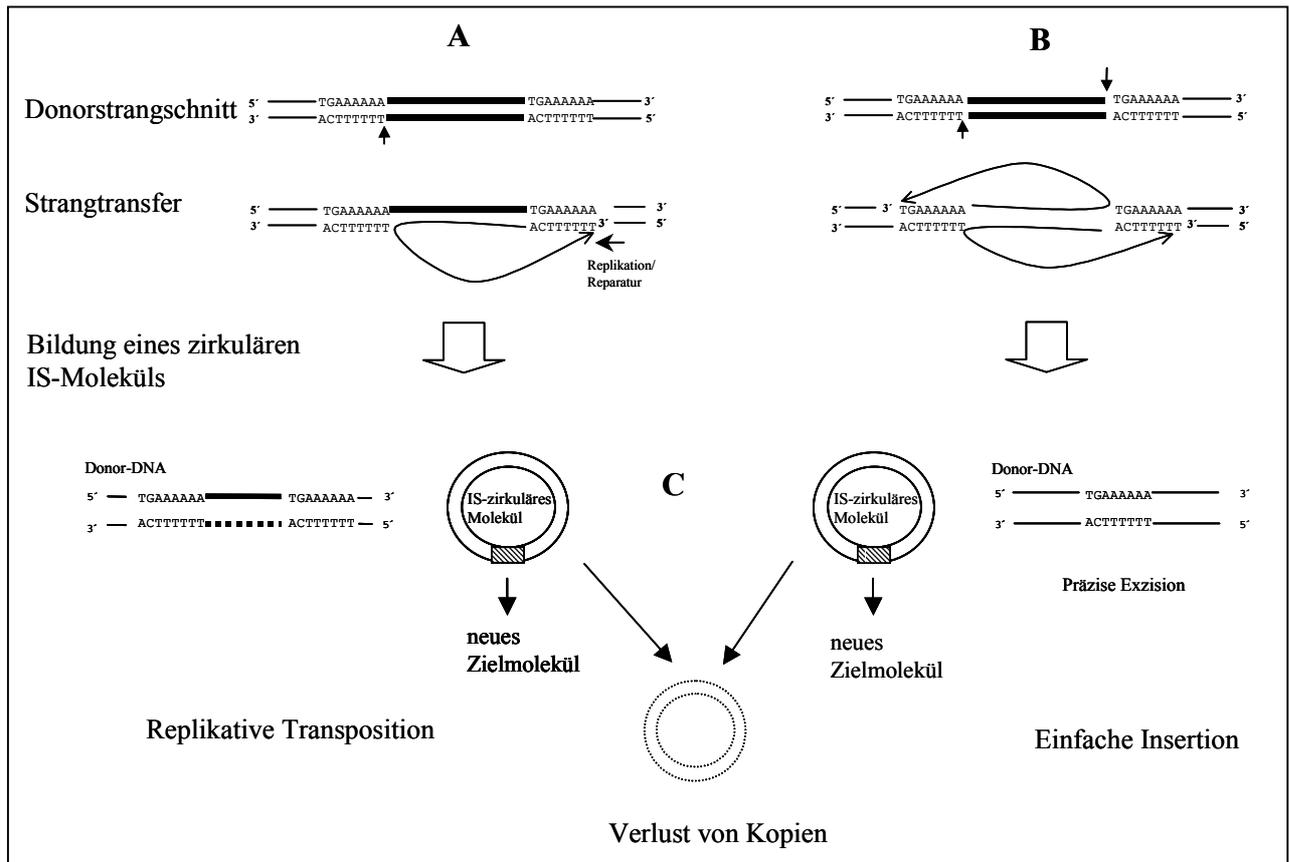
### **6.2.1. Die von IS256 kodierte Transposase vermittelt die Bildung von zirkulären IS256-Molekülen**

IS256 beinhaltet einen einzigen offenen Leserahmen, der für das Protein Tnp256 kodiert und die putative Transposase des IS-Elements darstellt. Die Vektoren pIL1 $\Delta$ tnp und pIL2 $\Delta$ tnp tragen mutierte Transposasegene. Nach Transformation der Vektoren in die Stämme *E. coli* DH5 $\alpha$  und *S. aureus* RN4220 konnte mit Hilfe der IS256-inversen PCR kein zirkuläres IS256-Molekül mehr nachgewiesen werden. Das läßt vermuten, daß der offene Leserahmen von IS256 tatsächlich eine Transposase kodiert und diese für die Bildung eines zirkulären IS256-Moleküls verantwortlich ist. Über den genauen Mechanismus, der zur Bildung der zirkulären DNA-Moleküle führt kann momentan noch nichts gesagt werden. Auch bleibt offen, ob möglicherweise wirtsspezifische Faktoren in die Reaktion involviert sind.

### **6.2.2. Modelle für die Bildung der zirkulären IS256-Moleküle**

Die Art und Weise, wie sich ein IS-Element aus der Donor DNA herauslöst und in einen Zielstrang integriert bestimmt das Ergebnis einer Transpositionsreaktion. Bei der *Cut-and-paste* Transposition kommt es zum vollständigen Herausschneiden des Elements aus der Donor-DNA und damit zu einem Doppelstrangsnitt an beiden Enden des Transposons. Im Gegensatz dazu wird bei der replikativen Transposition nur das 3'-Ende des IS-Elements in beiden DNA-Strängen geschnitten und das Donor-DNA-Rückgrat bleibt über einen Einzelstrang mit dem 5'-Ende des IS-Elements verbunden. In beiden Reaktionen wird eine freie 3'-OH-Gruppe gebildet, die die Phosphodiesterbindung des Zielstranges der neuen Insertionsstelle angreifen kann und zur Insertion des IS-Elements in den Zielstrang führt. Die Transpositionsreaktion, bei der ein zirkuläres Intermediat entsteht, läuft im Allgemeinen über den gleichen Reaktionsmechanismus ab. Ein entscheidender Unterschied ist jedoch, daß das freie 3'-OH-Ende einen intramolekularen Strangtransfer zum entgegengesetzten Transposonende des gleichen Stranges durchführt. Das zur Zeit am besten untersuchte System

ist die Transposition des IS-Elements IS911. In diesem Fall bildet sich eine zirkuläres Intermediat, indem an einem Transposonende ein Einzelstrangbruch erfolgt, und die dadurch freie 3'-OH-Gruppe am entgegengesetzten Ende desselben Stranges einen Strangbruch auslöst. (Polard und Chandler, 1995). Der dadurch entstandene Transposoneinzelstrang löst sich durch einen unbekanntem Mechanismus auf, wonach er schließlich als zirkuläres doppelsträngiges Molekül vorliegt, bei dem Transposonanfang und -ende benachbart sind. Die Bildung von zirkulären IS-Molekülen konnte auch bei anderen IS-Elementen nachgewiesen werden, z. B. bei IS1, IS2, Tn7, Tn10, Tn916 und IS30 (Turlan und Chandler, 1995; Lewis und Grindley, 1997, Biery *et al.*, 2000, Morisato und Kleckner, 1987; Scott *et al.*, 1988; Kiss und Olsasz, 1999). Kürzlich wurde gezeigt, daß eine vektorkodierte Kopie des Transposons Tn4001 in *E. coli* die Bildung von IS-Tandemdimern und zirkulären IS256-Molekülen verursacht (Prudhomme *et al.*, 2002). Interessanterweise besteht die Verbindung von Transposonanfang und -ende bei IS911 immer aus drei Basenpaaren, während dieser Abschnitt bei IS256 von unterschiedlicher Länge ist. Momentan kann man noch nicht sagen, wie der Strangtransfer bei IS256 erfolgt, unsere Daten legen aber nahe, daß es sich hierbei um einen Mechanismus handelt, der sich von den Zirkularisationsreaktionen anderer IS-Elemente unterscheidet. Obwohl IS911, Tn7 und IS10 unterschiedliche Wege in der Bildung der zirkulären Transpositionsintermediate einschlagen, transponieren alle über einen konservativen *Cut-and-paste* Mechanismus. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß sich die Zahl der IS256-Elemente während der Transpositionsreaktion vergrößern aber auch verkleinern kann. Das bedeutet, daß sowohl eine *Cut-and-paste* Reaktion, eine Replikation während der Transposition oder ein Verlust von IS256-Kopien stattfinden kann. Abbildung 6.1. zeigt unterschiedliche Modelle, wie die Transpositionsreaktion von IS256 ablaufen könnte. Das erste Modell geht von einem Einzelstrangbruch an einem Transposonende aus (Abb. 6.1. A). Das 3'-OH-Ende vermittelt den Strangbruch am entgegengesetzten Ende desselben Stranges und als Resultat der nachfolgenden Reaktionen wird ein Intermediat gebildet, das dem der *Figure-eight*-Moleküle entspricht, wie sie für IS911 beschrieben wurden (Polard und Chandler, 1995). Der Donorstrang wird durch Replikation von einem freien 3'-OH-Ende aus repariert. Es besteht nun die Möglichkeit, daß sich das zirkuläre IS-Intermediat in einen neuen Zielstrang integrieren kann. Wird der Donorstrang gleichzeitig repariert, so kommt es zu einer Verdopplung des IS-Elements und man spricht von replikativer Transposition. Ein weiteres Modell ist in Abbildung 6.1.B dargestellt. Hier nimmt man an, daß der Einzelstrangbruch und der Strangtransfer simultan an beiden Transposonenden stattfinden. Auf diese Art kommt es zu einem kompletten Herauslösen des IS-Elements aus dem Donorstrang. Falls das IS-Element eine neue Zielsequenz für seine Integration findet, könnte dieser Transpositionsweg einen *Cut-and-paste*-Mechanismus widerspiegeln. Eine präzise Exzision des IS-Elements ist dann möglich, wenn die Strangtransferreaktion in die benachbarte Sequenz so stattfindet, daß eine der 8-bp-Duplikationen als *Circle-junction* in das zirkuläre Zwischenprodukt integriert wird und damit aus dem Donorstrang entfernt wird.



**Abb. 6.1.:** Modelle für die Bildung zirkulärer IS256-Moleküle. **A:** Nach einem Einzelstrangbruch an einem Transposonende wird der Donorstrang repariert, gleichzeitig wird ein zirkuläres IS-Molekül gebildet. Es kann nach der Integration des zirkulären IS-Moleküls in ein Zielmolekül zur Verdopplung des IS-Elements kommen, wobei man von replikativer Transposition spricht. **B:** Der Einzelstrangbruch findet gleichzeitig an beiden Transposonenden statt. Es kommt zum kompletten Herauslösen des IS-Elements aus dem Donorstrang, was zu einer einfachen Insertion des IS-Elements in ein Zielmolekül führen kann. **C:** Mutierte oder verkürzte zirkuläre IS-Kopien können nicht mehr in einen Zielstrang integrieren und gehen verloren (s. auch Text).

Diese komplette Exzision von IS256 wurde schon in einer früheren Studie beobachtet und spielt eine Rolle bei der Phasenvariation der Biofilmbildung bei *S. epidermidis* (Ziebuhr *et al.*, 1999). Es ist vorstellbar, daß in allen oben beschriebenen Reaktionen auch die Bildung von inkompletten IS-zirkulären Molekülen, bei denen entweder das eine oder andere Ende fehlt, möglich ist. Es stellt sich die Frage, was mit diesen inkompletten Transposonkopien geschieht. Untersuchungen der IS911-Transpositionsreaktion haben gezeigt, daß zirkularisierte IS-Kopien linearisiert werden können und dann *in vivo* und *in vitro* in einen Zielstrang integrieren (Ton-Hoang *et al.*, 1997; Ton-Hoang *et al.*, 1998). Diese Reaktion wird durch die Transposase des IS-Elements IS911 vermittelt und setzt vollständige Transposonenden voraus. Es ist durchaus denkbar, daß IS256 einen ähnlichen Weg bei der Auflösung der zirkulären Moleküle beschreitet. IS256-Kopien, die verkürzte oder mutierte Enden aufweisen, sind vermutlich nicht in der Lage in einen Zielstrang zu integrieren und werden verloren gehen (Abb. 6.1. C). Es müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um den Transpositionsmechanismus von IS256 aufzuklären. Interessant wäre dabei zu erfahren, welcher der vorgestellten Mechanismen der Bildung der zirkulären Moleküle

zugrunde liegt. Von besonderem Interesse ist auch die Art und Weise der Spaltung des Donor- und des Zielstrangs, das Schicksal des zweiten Transposonstrangs und die mögliche Beteiligung von Wirtsfaktoren an der Transpositionsreaktion von IS256.

### **6.2.3. Der Einfluß der IS256-Transposition auf die Genomplastizität von *S. epidermidis***

Pathogene *S. epidermidis* und *S. aureus* sind für ihre ausgesprochene genotypische und phänotypische Variabilität bekannt. Überraschenderweise weiß man jedoch wenig über die molekularen Mechanismen, die diesen Organismen diese schnelle Anpassung an veränderte Bedingungen erlauben. Die Ergebnisse zum Transpositionsmechanismus von IS256 machen deutlich, welche große Rolle mobile genetische Elemente bei der Flexibilität des Staphylokokken-Genoms und der heterogenen Genexpression spielen. Bei nosokomialen *S. epidermidis* variiert vor allem die Biofilmbildung und die Expression von Resistenzgenen, was direkt mit der Pathogenese dieser Stämme in Verbindung gebracht werden kann. Phänotypische Änderungen gehen häufig mit geänderten IS256-Hybridisierungsmustern einher, die Phasenvariationsprozesse, DNA-Umordnungen und Deletionen des *ica*-Operons widerspiegeln (Ziebuhr *et al.*, 1999; Ziebuhr *et al.*, 2000; Ziebuhr *et al.*, 2001). Die Transposition von IS256 über ein zirkuläres Molekül könnte zumindest teilweise die charakteristischen Merkmale dieses IS-Elements im Genom von *S. epidermidis* deutlich machen. Die hohe Transpositionsaktivität und die präzise Exzision des Elements aus dem *icaC*-Gen im Zuge der Phasenvariation der Biofilmbildung könnte möglicherweise mit der Bildung von zirkulären IS256-Molekülen zusammenhängen. Es ist weiterhin denkbar, daß durch eine unpräzise Exzision des IS-Elements aus dem Donorstrang Mutationen zurückbleiben. Diese Mutationen könnten zur heterogenen Genexpression führen, die typisch für klinische *S. epidermidis*- und *S. aureus*-Isolate ist. IS256-Transpositionen müssen aber nicht notwendigerweise nur Geninaktivierungen nach sich ziehen. Es wurde schon früher gezeigt, daß IS256 keine Transkriptionsterminationssignale aufweist (Ziebuhr *et al.* 1999). Außerdem enthält die Nukleotidsequenz von IS256 verschiedene Promotorstrukturen, die unter Umständen die Expression benachbarter Gene beeinflussen kann (Rouch *et al.*, 1987; Maki und Murakami, 1997). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, daß bei der Klonierung der spezifischen IS256-zirkulären PCR-Produkte und nachfolgender Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  hauptsächlich  $\beta$ -Galaktosidase-positive Klone erhalten wurden. Die Sequenzanalyse der *Inverted-repeats* (IR) von IS256 zeigt, daß im rechten IR eine putative -35-Region und im linken IR eine putative -10-Region vorkommt (Abb. 2.3.). Es kann sich im Verlauf der Transformation über ein zirkuläres IS-spezifisches Zwischenprodukt ein Hybridpromotor bilden, bei dem -10 und -35-Region in geeigneten Abstand zueinander gelangen. Die Bildung eines solchen, oft starken Promotors kann die Expression der Transposasegene steigern. Die IS-Elemente IS911, IS492 und IS21 sind gut untersuchte Beispiele, bei denen nachgewiesen wurde, daß die Expression der Transposase

durch die Bildung von zirkulären IS-spezifischen Zwischenprodukten stark ansteigt (Ton-Hoang *et al.*, 1997; Berkins-Balding *et al.*, 1999; Reimann *et al.*, 1989). Es ist außerdem denkbar, daß ein IS-Element in der Zielsequenz durch Formation eines starken Hybridpromotors nachfolgende Gene aktiviert. Die Nukleotidsequenz von Staphylokokken weist einen sehr niedrigen GC-Gehalt auf. Basenabfolgen, die mögliche –10-Regionen darstellen sind recht häufig. Wenn ein IS-Element in geeigneten Abstand zu einer solchen putativen –10-Region gelangt, dann ist es möglich, daß nachfolgende Gene aktiviert werden. Es ist beschrieben worden, daß durch Transposition von IS256 und Bildung eines Hybridpromotors die Methicillinresistenz von *S. aureus* beeinflusst wird (Maki und Murakami, 1997). Ein aus der Transposition von IS257 hervorgegangener Hybridpromotor aktiviert die Transkription des *tetA*-Gens, das Tetrazyklinresistenz in *S. aureus* vermittelt (Simpson *et al.*, 2000).

Aufgrund dieser Beobachtungen kann angenommen werden, daß die IS256-Sequenz tatsächlich die Expression von benachbarten Genen beeinflusst und damit zur phänotypischen Variabilität bei *S. epidermidis* beiträgt. Schließlich kann IS256 auch passiv als repetitives Element bei Umordnungen des Genoms oder Deletionen von DNA-Abschnitten durch homologe Rekombination eine Rolle spielen, was an anderer Stelle bereits diskutiert wurde (s. 6.1.3.1.).

Zusammenfassend kann man sagen, daß IS256 eine treibende Kraft bei der Variation der Biofilmbildung und damit der unterschiedlichen Genexpression des *ica*-Operons bei *S. epidermidis* ist. Eine detaillierte Aufklärung des Transpositionsmechanismus könnte daher neue Einblicke in den Prozeß der Genomvariation dieses nosokomialen Pathogens liefern. Darüber hinaus existieren aber wahrscheinlich auch noch andere Mechanismen, die einen Einfluß auf die Adhärenz und damit die Pathogenität von *S. epidermidis* haben und deren Analyse genauso wichtig für das Verständnis der Pathogenese von *S. epidermidis*-Infektionen ist.

### **6.3. Die Bedeutung von mobilen genetischen Elementen für die Genomevolution**

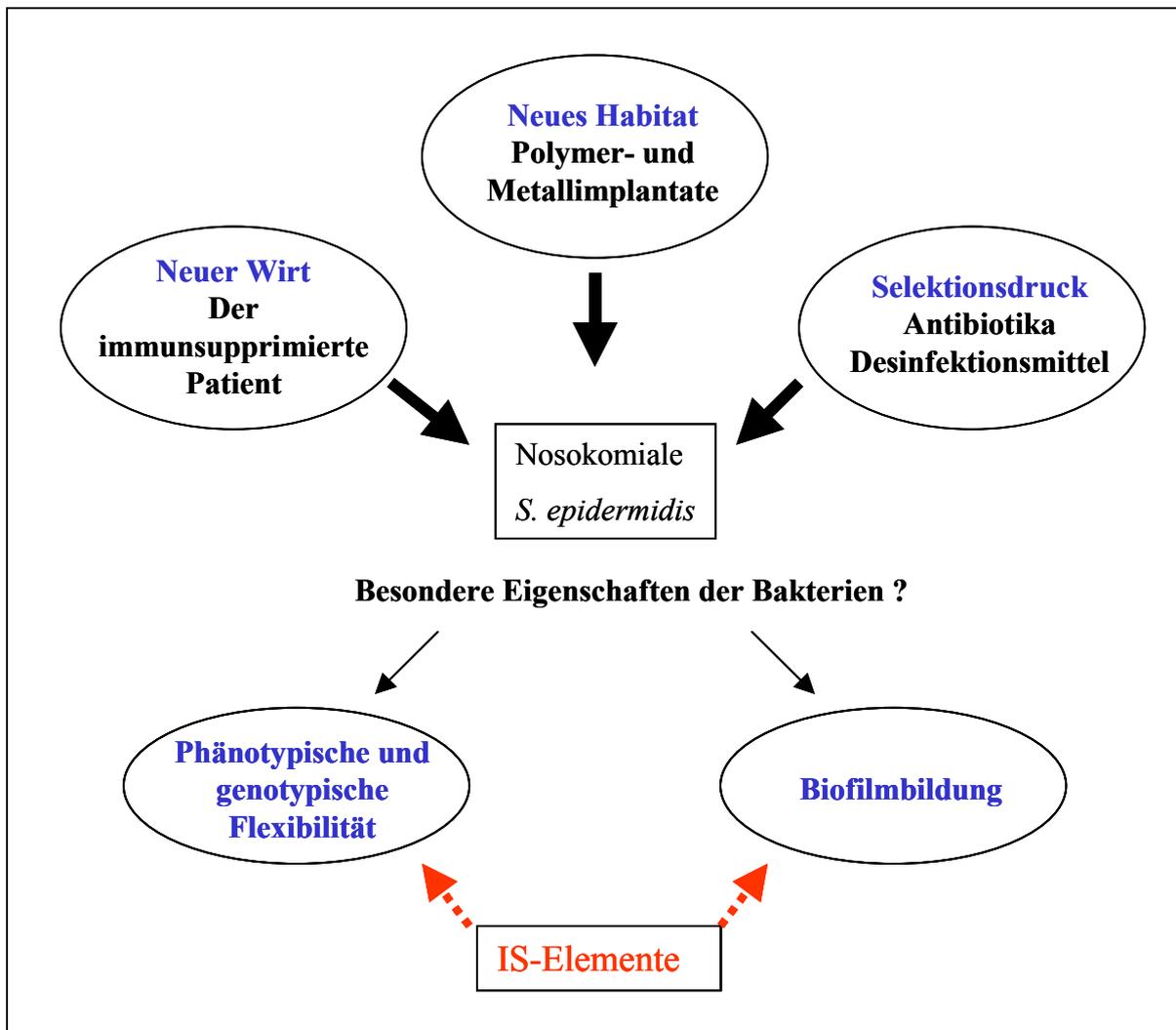
Vor mehr als fünfzig Jahren überraschte Barbara McClintock die wissenschaftliche Welt mit ihrer Entdeckung mobiler genetischer Elemente im Maisgenom (McClintock, 1950). Ihre Entdeckung war so ungewöhnlich, daß sie zunächst nicht beachtet wurde. Im Laufe der Jahre wurde klar, daß Transposons oder Insertionselemente universelle Bestandteile nahezu jedes Genoms sind. Sie sind die treibende Kraft für Umordnungen, Insertionen und Deletionen in der Genomsequenz und tragen damit entscheidend zur Anpassung und Evolution von Bakterien, Archaea und Eukaryonten bei.

Die Analyse des Humangenoms zeigt, daß repetitive Sequenzen, zu denen auch die Transposons und Insertionssequenzen gehören, einen sehr großen Teil der Gesamtgenomgröße einnehmen können. Weniger als 5% des Humangenoms bestehen aus kodierenden Sequenzen, wohingegen etwa die Hälfte repetitive Sequenzen sind (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Punktmutationen verändern das Genom sehr langsam. Die Insertion von Transposons hat einen weitaus größeren und direkten Effekt auf die Expression und Evolution von Genen (Nekrutenko und Li, 2001).

Horizontaler Gentransfer ist ein weiterer Mechanismus, der zur Genomvariabilität beiträgt und der sich auf die Eigenschaften von Organismen auswirken kann. Hier sind ebenfalls mobile genetische Elemente wie Transposons, Plasmide oder Bakteriophagen bzw. Viren beteiligt. Es können Gene übertragen werden, die für die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen von Vorteil sind. Hierzu zählen Antibiotikaresistenzen, Gene für ungewöhnliche Stoffwechselwege und Virulenzgene (de la Cruz und Davies, 2000). Neben der Aufnahme von DNA-Abschnitten, die unter bestimmten Voraussetzungen auch als Pathogenitäts-, Symbiose oder Resistenzinseln bezeichnet werden, wird auch der Verlust von DNA-Bereichen beschrieben. Die Auswirkungen derartiger Deletionen sind sehr vielfältig. Es können einzelne Gene bis hin zu großen Sequenzabschnitten deletiert werden. Letzteres führt unter Umständen dazu, daß neue Arten entstehen. Intrazelluläre Parasiten und Symbionten sind gut untersuchte Beispiele für dieses Phänomen. Das 3,27 kb-große Genom von *Mycobacterium leprae* ist 1,12 kb kleiner als das Genom von *M. tuberculosis*. Die geringere Genomgröße ist auf extensive Rekombinationsereignisse zwischen repetitiven Sequenzen zurückzuführen. Es wurden Gene deletiert, die nicht für den hochspezialisierten Lebensraum von *M. leprae* benötigt werden. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Rickettsien, Chlamydien und *Haemophilus influenza* gemacht. Diese Bakterien haben u. a. Stoffwechselgene deletiert, da sie viele Metaboliten aus der Umgebung, dem Zellinneren, aufnehmen können.

*Staphylococcus epidermidis* verfügt nicht über spezifische Virulenzfaktoren und Toxine wie zum Beispiel *S. aureus*. Trotzdem ist *S. epidermidis* der häufigste Erreger nosokomialer fremdkörperassoziierter Infektionen. Es stellt sich die Frage, wie es diesen Bakterien gelungen ist, sich unter starkem Selektionsdruck zu etablieren und welche ihrer Eigenschaften dazu beigetragen haben. In Abbildung 6.2. ist ein Modell zur Entwicklung von *S. epidermidis* als nosokomialer Infektionserreger dargestellt. Das vermehrte Auftreten von *S. epidermidis*-Infektionen geht mit der zunehmenden Verwendung von implantierten Fremdkörpern in der modernen Medizin einher. Die betreffende Patienten haben ein geschwächtes Immunsystem und werden häufig mit Antibiotika behandelt. Dadurch entsteht eine Nische, die vorwiegend von Staphylokokken besiedelt wird. Viele nosokomiale *S. epidermidis*-Stämme verfügen über die für Adhärenz und Biofilmbildung nötigen Gene. Die Resistenz gegenüber Antibiotika ist auf das Vorhandensein entsprechender Gene oder auf die Einbettung der Bakterien in die Polysaccharidmatrix eines Biofilms zurückzuführen. Letztendlich aber spielt die

phänotypische und genotypische Flexibilität von *S. epidermidis* eine wichtige Rolle in der Anpassung an verschiedene Lebensräume.



**Abb. 6.2.:** Modell zur Entwicklung von Staphylokokken als nosokomiale Pathogene. Die Entstehung eines neuen Lebensraumes im Krankenhausmilieu, die Flexibilität und Fähigkeit zur Biofilmbildung hat es Staphylokokken ermöglicht, sich als Infektionserreger zu etablieren. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei der Einfluß von IS-Elementen.

Die Auswirkungen von IS-Elementen auf das bakterielle Genom ist in dieser Arbeit am Beispiel von IS256 deutlich geworden. Die Ergebnisse dieser Studien bieten einen interessanten Ansatz für weitere Untersuchungen, der auch die Präsenz und den Effekt anderer IS-Elemente bei der Genomplastizität von Staphylokokken einschließen sollte. Wichtige Impulse dafür sind in naher Zukunft vom Abschluß der beiden laufenden Sequenzierprojekte von *S. epidermidis* zu erwarten. Für das tiefere Verständnis der heterogenen Genexpression von Staphylokokken dürften aber auch andere Mechanismen wie die Untersuchung der DNA-Repairsysteme und die Aufdeckung regulatorischer Netzwerke von großer Bedeutung sein. In diesem Zusammenhang bieten die neuen DNA-Arraytechniken

breite Möglichkeiten, sowohl den gesamten Expressionsstatus einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erfassen als auch die Genome unterschiedlicher Stämme miteinander zu vergleichen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Allignet, J., S. Aubert, K. G. Dyke, and N. El Solh.** 2001. *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. *Infect Immun.* **69**(2):712-8.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**(3):403-10.
- Arber, W.** 1993. Evolution of prokaryotic genomes. *Gene.* **135**(1-2):49-56.
- Arciola, C. R., S. Collamati, E. Donati, and L. Montanaro.** 2001. A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in periprostheses infections. *Diagn Mol Pathol.* **10**(2):130-7.
- Arciola, C. R., L. Baldassarri, and L. Montanaro.** 2001. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* **39**(6):2151-6.
- Arvidson, S., and K. Tegmark.** 2001. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* **291**(2):159-70.
- Atkins, B. L., N. Athanasou, J. J. Deeks, D. W. Crook, H. Simpson, T. E. Peto, P. McLardy-Smith, and A. R. Berendt.** 1998. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol.* **36**(10):2932-9.
- Augustin, J., and F. Götz.** 1990. Transformation of *Staphylococcus epidermidis* and other staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **54**(1-3):203-7.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. A. Moore, J. G. Seidmann, J. A. Smith, and K. Strahl.** 1987. Current protocols in molecular biology, vol. 4. John Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y.
- Baddour, L. M., and G. D. Christensen.** 1987. Prosthetic valve endocarditis due to small-colony staphylococcal variants. *Rev Infect Dis.* **9**(6):1168-74.
- Baddour, L. M., L. P. Barker, G. D. Christensen, J. T. Parisi, and W. A. Simpson.** 1990. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. *J Clin Microbiol.* **28**(4):676-9.
- Baselga, R., I. Albizu, M. De La Cruz, E. Del Cacho, M. Barberan, and B. Amorena.** 1993. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and

virulence. *Infect Immun.* **61**(11):4857-62.

**Bayston, R., and S. R. Penny.** 1972. Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus* SIIA: a possible factor in colonisation of Holter shunts. *Dev Med Child Neurol Suppl.* **27**:25-8.

**Becker, P., W. Hufnagle, G. Peters, and M. Herrmann.** 2001. Detection of differential gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis. *Appl Environ Microbiol.* **67**(7):2958-65.

**Biery, M. C., M. Lopata, and N. L. Craig.** 2000. A minimal system for Tn7 transposition: the transposon-encoded proteins TnsA and TnsB can execute DNA breakage and joining reactions that generate circularized Tn7 species. *J Mol Biol.* **297**(1):25-37.

**Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**(6):1513-23.

**Bolland, S., and N. Kleckner.** 1995. The two single-strand cleavages at each end of Tn10 occur in a specific order during transposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(17):7814-8.

**Bolland, S., and N. Kleckner.** 1996. The three chemical steps of Tn10/IS10 transposition involve repeated utilization of a single active site. *Cell.* **84**(2):223-33.

**Brown, J. S., S. M. Gilliland, and D. W. Holden.** 2001. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol Microbiol.* **40**(3):572-85.

**Boyd, A., and A. M. Chakrabarty.** 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **60**(7):2355-9

**Brückner, R.** 1997. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**(1):1-8.

**Buchrieser, C., R. Brosch, S. Bach, A. Guiyoule, and C. Carniel.** 1998. The high-Pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis* can be inserted into any of the three chromosomal *asn tRNA* genes. *Mol. Microbiol.* **30**(5), 965-978.

**Bushman, F. D., A. Engelman, I. Palmer, P. Wingfield, and R. Craigie.** 1993. Domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 responsible for polynucleotidyl transfer and zinc binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**(8):3428-32.

**Byrne, M. E., D. A. Rouch, and R. A. Skurray.** 1989. Nucleotide sequence analysis of IS256 from the *Staphylococcus aureus* gentamicin-tobramycin-kanamycin-resistance transposon Tn4001. *Gene.* **81**(2):361-7.

**Byrne, M. E., M. T. Gillespie, and R. A. Skurray.** 1990. Molecular analysis of a gentamicin resistance transposonlike element on plasmids isolated from North American *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **34**(11):2106-13.

**Chakraborty, T., T. Hain, and E. Domann.** 2000. Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int J Med Microbiol.* **290**(2):167-74.

**Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**(4):781-91.

**Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, and E. H. Beachey.** 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* **22**(6):996-1006.

**Christensen, G. D., L. M. Baddour, and W. A. Simpson.** 1987. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* slime production in vitro and in vivo. *Infect Immun.* **55**(12):2870-7.

**Christensen, G. D., L. P. Barker, T. P. Mawhinney, L. M. Baddour, and W. A. Simpson.** 1990a. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **58**(9):2906-11.

**Christensen, G. D., L. M. Baddour, B. M. Madison, J. T. Parisi, S. N. Abraham, D. L. Hasty, J. H. Lowrance, J. A. Josephs, and W. A. Simpson.** 1990b. Colonial morphology of staphylococci on Memphis agar: phase variation of slime production, resistance to beta-lactam antibiotics, and virulence. *J Infect Dis.* **161**(6):1153-69.

**Cleary, P. P., L. McLandsborough, L. Ikeda, D. Cue, J. Krawczak, and H. Lam.** 1998. High-frequency intracellular infection and erythrogenic toxin A expression undergo phase variation in M1 group A streptococci. *Mol Microbiol.* **28**(1):157-67.

**Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:711-45.

**Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **284**(5418):1318-22.

**Costerton, J. W., and P. S. Stewart.** 2001. Battling biofilms. *Sci Am.* **285**(1):74-81.

**Coulter, S. N., W. R. Schwan, E. Y. Ng, M. H. Langhorne, H. D. Ritchie, S. Westbrook-Wadman, W. O. Hufnagle, K. R. Folger, A. S. Bayer, and C. K. Stover.** 1998. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Mol Microbiol.* **30**(2):393-404.

**Cramton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, and F. Götz.** 1999. The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. *Infect. Immun.* **67**(10):5427-5433.

**Cramton, S. E., M. Ulrich, F. Gotz, and G. Doring.** 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* **69**(6):4079-85.

- Crisostomo, M. I., H. Westh, A. Tomasz, M. Chung, D. C. Oliveira, and H. de Lencastre.** 2001. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(17):9865-70.
- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, and J. R. Penades.** 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol.* **183**(9):2888-96.
- Deighton, M. A., J. Capstick, and R. Borland.** 1992. A study of phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* using Congo red agar. *Epidemiol Infect.* **109**(3):423-32.
- Deighton, M., S. Pearson, J. Capstick, D. Spelman, and R. Borland.** 1992b. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* isolated from a patient with native valve endocarditis. *J Clin Microbiol.* **30**(9):2385-90.
- Deighton, M., and R. Borland.** 1993. Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun.* **61**(10):4473-9.
- Deplano, A., M. Vaneechoutte, G. Verschraegen, and M. J. Struelens.** 1997. Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. *J Clin Microbiol.* **35**(10):2580-7.
- Dyke, K. G., S. Aubert, and N. el Solh.** 1992. Multiple copies of IS256 in staphylococci. *Plasmid.* **28**(3):235-46.
- Emori, T. G., and R. P. Gaynes.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* **6**(4):428-42.
- Fang, Z., C. Doig, D. T. Kenna, N. Smittipat, P. Palittapongarnpim, B. Watt, and K. J. Forbes.** 1998. IS6110-mediated deletions of wild-type chromosomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **181**:1014-20.
- Fernandez, L., M. M. Beerthuyzen, J. Brown, R. J. Siezen, T. Coolbear, R. Holland, and O. P. Kuipers.** 2000. Cloning, characterization, controlled overexpression, and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **66**(4):1360-8.
- Fetherston, J. D., P. Schuetze, and R. D. Perry.** 1992. 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. *Mol. Microbiol.* **6**:2693-2704.
- Fitzgerald, J. R., D. E. Sturdevant, S. M. Mackie, S. R. Gill, and J. M. Musser.** 2001a. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(15):8821-6.
- Fitzgerald, J. R., S. R. Monday, T. J. Foster, G. A. Bohach, P. J. Hartigan, W. J. Meaney, and C. J. Smyth.** 2001b. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine

*Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. J Bacteriol. **183**(1):63-70.

**Frebourg, N. B., S. Lefebvre, S. Baert, and J. F. Lemeland.** 2000. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. J. Clin. Microbiol. **38**(2):877-80.

**Gatermann, S., H. G. Meyer, R. Marre, and G. Wanner.** 1993. Identification and characterization of surface proteins from *Staphylococcus saprophyticus*. Zentralbl Bakteriell. **278**(2-3):258-74.

**Gerke, C., A. Kraft, R. Sussmuth, O. Schweitzer, and F. Gotz.** 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. J Biol Chem. **273**(29):18586-93.

**Götz, F.** 1990. *Staphylococcus carnosus*. A new host for gene cloning and protein production. J Appl Bacteriol Vol. **69**, Symp Suppl 49-53

**Haack, K. R., and J. R. Roth.** 1995. Recombination between chromosomal IS200 elements supports frequent duplication formation in *Salmonella typhimurium*. Genetics **141**:1245-52.

**Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. Mol Microbiol. **23**(6):1089-97.

**Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu Rev Microbiol. **54**:641-79.

**Hammerschmidt, S., R. Hilse, J. P. van Putten, R. Gerardy-Schahn, A. Unkmeir, and M. Frosch.** 1996. Modulation of cell surface sialic acid expression in *Neisseria meningitidis* via a transposable genetic element. Embo J. **15**(1):192-8.

**Haren, L., B. Ton-Hoang, and M. Chandler.** 1999. Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. Annu Rev Microbiol. **53**:245-81.

**Hartford, O., P. Francois, P. Vaudaux, and T. J. Foster.** 1997. The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the *Staphylococcus aureus* cell surface. Mol Microbiol. **25**(6):1065-76.

**Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Gotz.** 1996a. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol Microbiol. **20**(5):1083-91.

**Heilmann, C., C. Gerke, F. Perdreau-Remington, and F. Gotz.** 1996b. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. Infect Immun. **64**(1):277-82.

**Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Gotz.** 1997. Evidence for autolysin-mediated

primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol.* **24**(5):1013-24.

**Heilmann, C., and F. Gotz.** 1998. Further characterization of *Staphylococcus epidermidis* transposon mutants deficient in primary attachment or intercellular adhesion. *Zentralbl Bakteriol.* **287**(1-2):69-83.

**Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Perdreau-Remington, and G. Peters.** 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* **65**(2):519-24.

**Hussain, M., G. Peters, G. S. Chhatwal, and M. Herrmann.** 1999. A lithium chloride-extracted, broad-spectrum-adhesive 42-kilodalton protein of *Staphylococcus epidermidis* is ornithine carbamoyltransferase. *Infect Immun.* **67**(12):6688-90.

**International Human Genome Sequencing Consortium.** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* **409**:

**Ito, T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu.** 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother.* **43**(6):1449-58.

**Jarvis, W. R., and W. J. Martone.** 1992. Predominant pathogens in hospital infections. *J Antimicrob Chemother.* **29 Suppl A**:19-24.

**Jaurin, B., and S. Normark.** 1983. Insertion of IS2 creates a novel *ampC* promoter in *Escherichia coli*. *Cell.* **32**(3):809-16.

**Jordan, I. K., K. S. Makarova, J. L. Spouge, Y. I. Wolf, and E. V. Koonin.** 2001. Lineage-specific gene expansions in bacterial and archaeal genomes. *Genome Res.* **11**: 555-65

**Kappes, R. M., B. Kempf, S. Kneip, J. Boch, J. Gade, J. Meier-Wagner, and E. Bremer.** 1999. Two evolutionarily closely related ABC transporters mediate the uptake of choline for synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* **32**(1):203-16.

**Katzman, M., J. P. Mack, A. M. Skalka, and J. Leis.** 1991. A covalent complex between retroviral integrase and nicked substrate DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(11):4695-9.

**Kennedy, A. K., A. Guhathakurta, N. Kleckner, and D. B. Haniford.** 1998. *Tn10* transposition via a DNA hairpin intermediate. *Cell.* **95**(1):125-34.

**Kiss, J., and F. Olsz.** 1999. Formation and transposition of the covalently closed IS30 circle: the relation between tandem dimers and monomeric circles. *Mol Microbiol.* **34**(1):37-52.

**Kloos, W. E., and T. L. Bannerman.** 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* **7**(1):117-40.

- Kreiswirth, B. N., S. Lofdahl, M. J. Betley, M. O'Reilly, P. M. Schlievert, M. S. Bergdoll, and R. P. Novick.** 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*. **305**(5936):709-12.
- Kresken, M., and D. Hafner.** 2000. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Chemotherapeutika in Mitteleuropa. *Chemotherap J*. **9**(2):51-56.
- Kulkosky, J., K. S. Jones, R. A. Katz, J. P. Mack, and A. M. Skalka.** 1992. Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases. *Mol Cell Biol*. **12**(5):2331-8.
- Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu.** 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. **357**(9264):1225-40.
- Lam, J., R. Cahn, K. Lam, and J. W. Costerton.** 1980. Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun*. **28**(2):546-56.
- Lewis, L. A., and N. D. Grindley.** 1997. Two abundant intramolecular transposition products, resulting from reactions initiated at a single end, suggest that IS2 transpose by an unconventional pathway. *Mol. Microbiol*. **25**(3): 517-29.
- Lillard, J. W. Jr., J. D. Fetherston, L. Pedersen, M. L. Pendrak, and R. D. Perry.** 1997. Sequence and genetic analysis of the hemin storage (Hms) system of *Yersinia pestis*. *Gene* **193**: 13-21.
- Lindsay, J. A., A. Ruzin, H. F. Ross, N. Kurepina, and R. P. Novick.** 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. **29**(2):527-43.
- Linhardt, F., W. Ziebuhr, P. Meyer, W. Witte, and J. Hacker.** 1992. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic restriction fragments as a tool for the epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiol. Lett*. **74**(2-3):181-5.
- Lorenz, U., K. Ohlsen, H. Karch, M. Hecker, A. Thiede, and J. Hacker.** 2000. Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. **29**(2):145-53.
- Mack, D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, and R. Laufs.** 1994. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun*. **62**(8):3244-53.

**Mack, D., M. Haeder, N. Siemssen, and R. Laufs.** 1996. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J. Infect. Dis.* **174**(4):881-4.

**Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, and R. Laufs.** 1996. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* **178**(1):175-83.

**Mack, D.** 1999a. Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect.* **43 Suppl**:S113-25.

**Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. H. Feucht, H. A. Elsner, R. Laufs, and M. E. Rupp.** 1999b. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect Immun.* **67**(2):1004-8.

**Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(3):725-74.

**Maki, H., and K. Murakami.** 1997. Formation of potent hybrid promoters of the mutant *llm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **179**(22):6944-8.

**May, E. W., and N. L. Craig.** 1996. Switching from cut-and-paste to replicative Tn7 transposition. *Science.* **272**(5260):401-4.

**McClintock, B., 1950.** Mutable loci in maize. *Carnegie Institute of Washington Year Book* **49**: 157-167.

**McCrea, K. W., O. Hartford, S. Davis, D. N. Eidhin, G. Lina, P. Speziale, T. J. Foster, and M. Höök.** 2000. The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology.* **146**(Pt 7):1535-46.

**McKenney, D., J. Hubner, E. Muller, Y. Wang, D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 1998. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect. Immun.* **66**(10):4711-20.

**McKenney, D., K. L. Pouliot, Y. Wang, V. Murthy, M. Ulrich, G. Döring, J. C. Lee, D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 1999. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science.* **284**(5419):1523-7.

**Mempel, M., H. Feucht, W. Ziebuhr, M. Endres, R. Laufs, and L. Gruter.** 1994. Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **38**(6):1251-5.

**Mira, A., H. Ochman, and N.A. Moran.** 2001. Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genetics.* **17** (10): 589-96.

- Mizuuchi, K., and K. Adzuma.** 1991. Inversion of the phosphate chirality at the target site of Mu DNA strand transfer: evidence for a one-step transesterification mechanism. *Cell*. **66(1):**129-40.
- Mizuuchi, K.** 1992. Polynucleotidyl transfer reactions in transpositional DNA recombination. *J Biol Chem*. **267(30):**21273-6.
- Mizuuchi, K.** 1992. Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of mu and other elements. *Annu Rev Biochem*. **61:**1011-51.
- Modun, B., and P. Williams.** 1999. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun*. **67(3):**1086-92.
- Morisato, D., and N. Kleckner.** 1987. Tn10 transposition and circle formation in vitro. *Cell*. **51(1):**101-11.
- Morvan, A., S. Aubert, C. Godard, and N. El Solh.** 1997. Contribution of a typing method based on IS256 probing of *Sma*I-digested cellular DNA to discrimination of European phage type 77 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*. **35(6):**1415-23.
- Murakami, H., H. Matsumaru, M. Kanamori, H. Hayashi, and T. Ohta.** 1999. Cell wall-affecting antibiotics induce expression of a novel gene, *drp35*, in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*. **264(2):**348-51.
- Newcombe, J., K. Cartwright, S. Dyer, and J. McFadden.** 1998. Naturally occurring insertional inactivation of the *porA* gene of *Neisseria meningitidis* by integration of IS1301. *Mol. Microbiol*. **30 (2):** 453-454.
- Noel, K. D., and G. F. Ames.** 1978. Evidence for a common mechanism for the insertion of the Tn10 transposon and for the generation of Tn10-stimulated deletions. *Mol. Gen. Genet*. **166:**217-233
- Novick, R. P., P. Schlievert, and A. Ruzin.** 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. *Microb Infect*. **3:** 585-594.
- O'Gara, J. P., and H. Humphreys.** 2001. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol*. **50(7):**582-7.
- Ochman, H., J. G. Lawrence, and E. A. Groisman.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. **405(6784):**299-304.
- Ohlsen, K., W. Ziebuhr, W. Reichardt, W. Witte, F. Götz, and J. Hacker.** 1999. Mobile elements, phages, and genomic islands of Staphylococci and Streptococci, p. 265- 287. *In* A. S. f. Microbiology (ed.), Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements, Washington, D.C.
- Patrick, C. C., S. L. Kaplan, C. J. Baker, J. T. Parisi, and E. O. Mason, Jr.** 1989. Persistent

bacteremia due to coagulase-negative staphylococci in low birth weight neonates. *Pediatrics*. **84**(6):977-85.

**Perkins-Balding, D., G. Duval-Valentin, and A. C. Glasgow.** 1999. Excision of IS492 requires flanking target sequences and results in circle formation in *Pseudoalteromonas atlantica*. *J Bacteriol.* **181**(16):4937-48.

**Peters, G.** 1988a. New considerations in the pathogenesis of coagulase-negative staphylococcal foreign body infections. *J Antimicrob Chemother.* **21 Suppl C**:139-48.

**Peters, G.** 1988b. Pathogenesis of *S epidermidis* foreign body infections. *Br J Clin Pract Suppl.* **57**:62-5.

**Petes, T.D, and C.W. Hill.** 1988. Recombination between repeated genes in microorganisms. *Annu. Rev. Genet.* **22**:147-168.

**Polard, P., and M. Chandler.** 1995. An in vivo transposase-catalyzed single-stranded DNA circularization reaction. *Genes Dev.* **9**(22):2846-58.

**Prentki, P., B. Teter, M. Chandler, and D. J. Galas.** 1986. Functional promoters created by the insertion of transposable element IS1. *J Mol Biol.* **191**(3):383-93.

**Prudhomme, M., C. Turlan, J. P. Claverys, and M. Chandler.** 2002. Diversity of Tn4001 transposition products: the flanking IS256 elements can form tandem dimers and IS circles. *J Bacteriol.* **184**(2):433-43.

**Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000a. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**(12):3357-63

**Rachid, S., S. Cho, K. Ohlsen, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000b. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: The possible involvement of the alternative transcription factor SigB., p. 159-166. *In* L. Emödy, G. Blum-Oehler, J. Hacker, and T. Pal (ed.), *Genes and proteins underlying microbial urinary tract virulence*. Plenum Press, New York.

**Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker, and W. Ziebuhr.** 2000. Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J. Bacteriol.* **182**(23):6824-6.

**Rice, L. B., and A. S. Thorisdottir.** 1994. The prevalence of sequences homologous to IS256 in clinical enterococcal isolates. *Plasmid.* **32**(3):344-9.

**Rice, L. B., and B. E. Murray.** 1995. Beta-lactamase-producing enterococci. *Dev Biol Stand.* **85**:107-14.

**Rice, L. B., L. L. Carias, and S. H. Marshall.** 1995. Tn5384, a composite enterococcal mobile element conferring resistance to erythromycin and gentamicin whose ends are directly repeated

copies of IS256. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**(5):1147-53.

**Rice, L. B., L. L. Carias, and S. H. Marshall.** 1995. Tn5384, an IS256-based composite mobile element in *Enterococcus faecalis*. *Dev Biol Stand.* **85**:71-5.

**Rice, L. B., and L. L. Carias.** 1998. Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* **180**(3):714-21.

**Rice, K., R. Peralta, D. Bast, J. de Azavedo, and M. J. McGavin.** 2001. Description of *Staphylococcus* serine protease (ssp) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. *Infect Immun.* **69**(1):159-69.

**Roche, R. J., and E. R. Moxon.** 1995. Phenotypic variation in *Haemophilus influenzae*: the interrelationship of colony opacity, capsule and lipopolysaccharide. *Microb Pathog.* **18**(2):129-40.

**Roth, J.R.** 1996. Rearrangements of the bacterial chromosome formation and applications. P. 2256-2276. *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Megasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.

**Rouch, D. A., M. E. Byrne, Y. C. Kong, and R. A. Skurray.** 1987. The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: expression and nucleotide sequence analysis. *J Gen Microbiol.* **133**(Pt 11):3039-52.

**Rupp, M. E., and G. L. Archer.** 1994. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* **19**(2):231-43.

**Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, and D. Mack.** 1999a. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun.* **67**(5):2656-9.

**Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht, and D. Mack.** 1999b. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun.* **67**(5):2627-32.

**Rupp, M. E., N. Sloot, H.-G. W. Meyer, J. Han, and S. Gatermann.** 1995. Characterization of the Hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis.* **172**: 1509-18

**Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

**Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **74**(12):5463-7.

**Schenk, S., and R. A. Laddaga.** 1992. Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. **73**(1-2):133-8.

**Scott, J. R., P. A. Kirchman, and M. G. Caparon.** 1988. An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn916. Proc Natl Acad Sci. USA. **85**(13):4809-13.

**Shapiro, J. A.** 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. Annu. Rev. Microbiol. **52**:81-104.

**Sidebottom, D. G., J. Freeman, R. Platt, M. F. Epstein, and D. A. Goldmann.** 1988. Fifteen-year experience with bloodstream isolates of coagulase-negative staphylococci in neonatal intensive care. J Clin Microbiol. **26**(4):713-8.

**Simpson, A. E., R. A. Skurray, and N. Firth.** 2000. An IS257-derived hybrid promoter directs transcription of a tetA(K) tetracycline resistance gene in the *Staphylococcus aureus* chromosomal mec region. J Bacteriol. **182**(12):3345-52.

**Smith, H. E., M. Damman, J. van der Velde, F. Wagenaar, H. J. Wisselink, N. Stockhofe-Zurwieden, and M. A. Smits.** 1999. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. Infect Immun. **67**(4):1750-6.

**Stewart, P. S., and J. W. Costerton.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. **358**(9276):135-8.

**Timmermann C. P., A. Fler, J. M. Besnier, L. de Graaf, F. Cremers, and J. Verhoef.** 1991. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. Infect. Immun. **59** (11): 4187-92.

**Timmons, M. S., M. Lieb, and R. C. Deonier.** 1986. Recombination between IS5 elements: requirement for homology and recombination functions. Genetics. **113**:797-810.

**Tojo, M., N. Yamashita, D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 1988. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. **157**(4):713-22.

**Ton-Hoang, B., M. Betermier, P. Polard, and M. Chandler.** 1997. Assembly of a strong promoter following IS911 circularization and the role of circles in transposition. Embo J. **16**(11):3357-71.

**Ton-Hoang, B., P. Polard, and M. Chandler.** 1998. Efficient transposition of IS911 circles *in vitro*. Embo J. **17**(4):1169-81.

**Turlan, C., and M. Chandler.** 1995. IS1-mediated intramolecular rearrangements: formation of excised transposon circles and replicative deletions. Embo J. **14**(21):5410-21.

**Turlan, C., and M. Chandler.** 2000. Playing second fiddle: second-strand processing and liberation of transposable elements from donor DNA. Trends Microbiol. **8**(6):268-74.

**van der Ende, A., C. T. Hopman, J. Dankert.** 1999. Deletion of *porA* by recombination between clusters of repetitive extragenic palindromic sequences in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* **67**(6):2928-34.

**van Putten, J. P., and B. D. Robertson.** 1995. Molecular mechanisms and implications for infection of lipopolysaccharide variation in *Neisseria*. *Mol Microbiol.* **16**(5):847-53.

**Veenstra, G. J., F. F. Cremers, H. van Dijk, and A. Fleer.** 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol.* **178**(2):537-41.

**Vink, C., A. M. Oude Groeneger, and R. H. Plasterk.** 1993. Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type I integrase protein. *Nucleic Acids Res.* **21**(6):1419-25.

**Walsh, C.** 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature.* **406**(6797):775-81.

**Wu, H., and P. M. Fives-Taylor.** 1999. Identification of dipeptide repeats and a cell wall sorting signal in the fimbriae-associated adhesin, Fap1, of *Streptococcus parasanguis*. *Mol Microbiol.* **34**(5):1070-81.

**Yanisch-Perron C., J. Vierra, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13 mp18 and pUC 19 vectors. *Gene* **33**: 102-119.

**Yarwood, J. M., J. McCormick, M. L. Paustian, P. M. Orwin, V. Kapur, and P. M. Schlievert.** 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3: implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem.* In press.

**Ziebuhr, W., C. Heilmann, F. Gotz, P. Meyer, K. Wilms, E. Straube, and J. Hacker.** 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun.* **65**(3):890-6.

**Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Lössner, F. Götz, and J. Hacker.** 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* **32**(2):345-56.

**Ziebuhr, W., K. Ohlsen, H. Karch, T. Korhonen, and J. Hacker.** 1999. Evolution of bacterial pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* **56**(9-10):719-28.

**Ziebuhr, W., K. Dietrich, M. Trautmann, and M. Wilhelm.** 2000a. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *S. epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:115-120.

**Ziebuhr, W., I. Loessner, S. Rachid, K. Dietrich, F. Götz, and J. Hacker.** 2000b. Modulation

of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. Analysis of genetic mechanisms. Adv Exp Med Biol. **485**:151-7.

**Ziebuhr, W., I. Loessner, V. Krimmer, and J. Hacker.** 2001. Methods to detect and analyze phenotypic variation in biofilm-forming Staphylococci. Methods Enzymol. **336**:195-205.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin/Adenosin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin/Cytidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cm	Chloramphenicol
d. h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et altera: und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin/Guanosin
h	Stunde/n
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar
MH	Müller-Hinton
min	Minute/n
m	Milli-
$\mu$	Mikro-
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen ( <u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> ra <u>m</u> e)
Ori	Replikationsursprung
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese

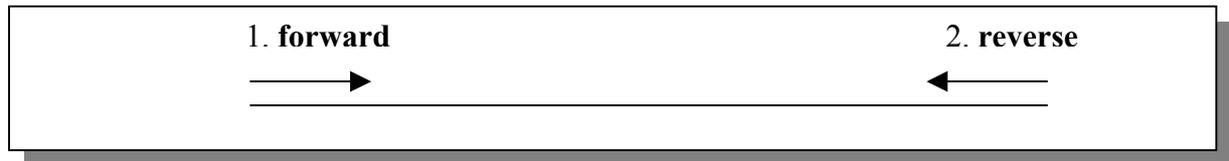
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute: Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SSC	Standard saline citrat
T	Thymin/Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBA	Tris-Borsäure-EDTA
TPE	Tris-Phosphorsäure-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSST	Toxisches Schock Syndrom Toxin
U	Unit
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## Anhang I: Sequenzdaten der *S. epidermidis* 307 Cosmid-Klone

Nachfolgend sind die Daten zusammengefaßt, die bei der teilweisen Sequenzierung von fünf unterschiedlichen *S. epidermidis* 307-Genbank-Klonen erhalten wurden (s. 5.2.2.1. und 5.2.2.2.). Die entsprechenden Klone wurden von mindestens zwei Punkten ausgehend ansequenziert (s. 1., 2. bzw. 3.). Unter **A**, **B** und **C** sind die offenen Leseraster, die Ähnlichkeiten der möglichen Proteine zu bekannten Proteinen und die Nukleotidsequenz des jeweiligen sequenzierten Bereichs aufgeführt. Daran anschließend findet sich eine Tabelle mit den Sequenzen der verwendeten Primer. Es handelt sich ausschließlich um Rohdaten, die nicht durch mehrfache Sequenzierung abgesichert wurden.

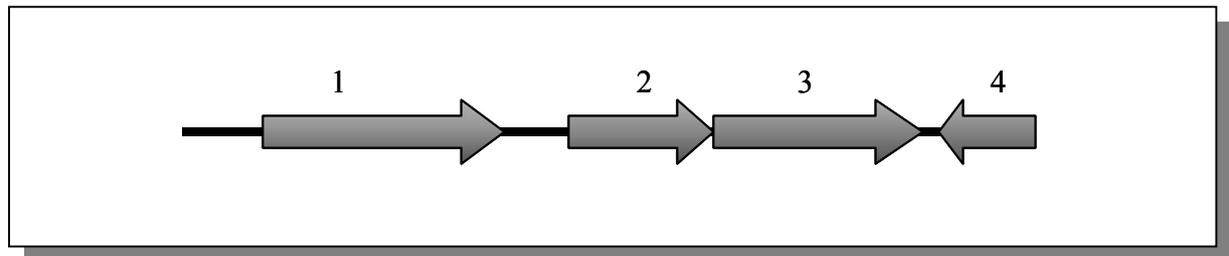
### Cosmid-Klon 40

Die Sequenzierung erfolgte ausgehend von zwei Punkten:



1. Sequenzierung mit SCos1forward-Primer und fortfolgenden:

**A:** Schematische Darstellung der identifizierten offenen Leseraster



**B:** Ähnlichkeiten der möglichen Proteine zu bekannten Proteinen

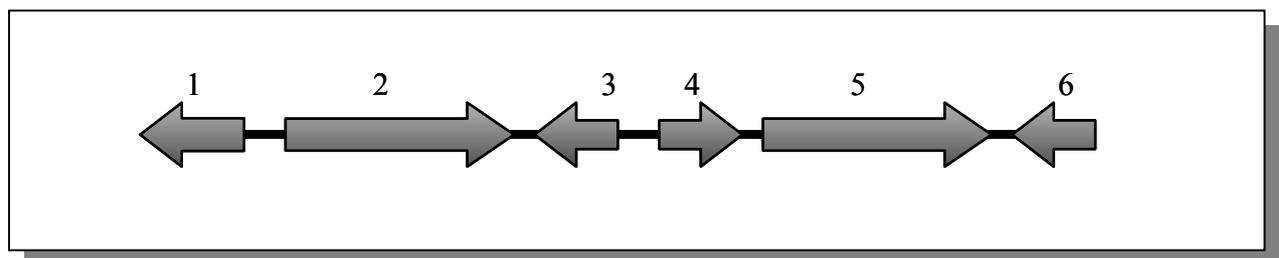
ORF	Ähnlichkeit	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	Hypothetisches Protein, ähnlich zu N-hydroxyarylamino O-Acetyltransferase ( <i>S. aureus</i> )	51/65	BAB43796	730
2	Histidin-Biosynthese: Bifunktionelles Protein HisIE ( <i>S. aureus</i> )	71/82	BAB43770	321
3	Cyclase-ähnliches Protein HisF ( <i>S. aureus</i> )	81/95	BAB43771	540
4	Hypothetisches Protein, ähnlich zu Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazol Carboxamid Ribotid Isomerase ( <i>S. aureus</i> )	62/79	BAB43772	354

**C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs**

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	AcAAMAAAC	AAAACAAMAM	AAAAACACC	aCAAWCTAIT	TGTTTATTTT	AAAATgAAAT	TTTTCTCGGT	AATTTGTTAg	80
81	ATgAAAATAT	TAATAATCAT	ACGTGGPATA	AATCCGAAAA	TTTTACTAAA	AATGGGTTIG	ATTGCTTCCA	TAACtATCTC	160
161	CTTCCFACCA	AAGGTAAACG	CTTCOCATAAT	CGTTCAAAAA	AATTTAAAT	ATAAAAATA	TTTTAATAGG	TCATAAAAgA	240
241	ATAATTCACF	TATCTACTTT	GGTTTGATTT	GAITTAAtATA	TTACATCGAT	GTTCACAATT	TGTCACAAT	TACATGCAAT	320
321	TTAATTTATTT	ATCATACTAA	TATTAATCT	AAAGAAATGA	TGGNAATCTA	TATATACTAa	AAAAWAAAA	AWANCNANTT	400
401	ANATAAAAAAC	AAAGGATGAT	TAGTAATGGA	TATACAAAAg	TTTGAATCTT	ANTTAAAAAT	TAAGCANICA	NAtTANTCAA	480
481	ACCctTCTCC	TGAAGCATTG	AAITACTANG	tAAAGACGCC	TTANGATAAC	TGTGCCATTT	GAAATATTA	ATGTTCAAAA	560
561	CAAGATTCCT	ATCTCAATCG	ATATCAAAGA	TTTATACAAT	AaaaTTGTTA	TTCAACGGCG	TGGCGGTTTT	TGCTATGAAT	640
641	TAaATCATT	GTTTGCTACG	TATTTAGAAC	ATAAAGGCTT	CCAGTCACC	TCGTGCTGCG	GCAACARtTC	ACACACCaaa	720
721	TGGTGGCGT	AGTCCCTGAAG	GCTCGCATAT	GTCACTTTAC	GTTAATATCG	AAGGAACACT	TTATATTACT	GATGTTGGAT	800
801	TTGGTGATTT	ACCTACaAGT	ATTATCGAGA	TAGGTTCTAA	aACACAATTC	ATTCCAACAT	ATGATAAaRA	TGGAGTTTAC	880
881	TGTGCTGTTT	GGATTAAATGA	CAATCAATAT	GCCTTACAGA	AGCTTAGACA	AAATaRaTGG	aTGACACTCT	ATGAAGCGCA	960
961	TTTAAAACT	CAAAGCATTa	AAGACTTTAA	AGATAAAATA	AGCTACAATG	AGCATCATCC	TCATTCTATT	TTTGTACGAC	1040
1041	ATTTGCTTAT	TACACAACCA	CAATCGTTTG	GACGTGCAAC	AATGACTTAT	CATTCITTTAA	CTTTAAGCAA	TGACAGTACT	1120
1121	AAACATAAAT	ATGACGTTAC	TACCAATTAAC	TACAAGTATT	TTTTAAAAAA	ATATTTTAAAT	TTAAATGTAT	CAATCATCCC	1200
1201	ATTTGaaCCA	TAAATAGGAT	GARATAICAC	TCACTTTCAT	CCTATTTTTTA	ATAATTGATT	TATAAGATTC	ATTGAATAAA	1280
1281	TTCCCTATTT	TAGATTAAT	AAVaTTCTAA	ATTATACTAC	CTTACCATT	TCGAACCTCT	TTGGCTGCG	CTTTRARAIT	1360
1361	ATTTCTTTTT	TGATGGOGAT	GCGCTAGTAC	CTGTCTACT	TCIGARAAT	GGAATATCTA	AVCTATGTAG	TAACACAAAa	1440
1441	aGGTGATACA	TGACATCTGC	TGTTTCATTA	aKGCStCTT	CACGANTANG	TTTTATCGCA	CCTATCACA	CTTCAAAATGC	1520
1521	CTCTTACCA	AATTTCTTGG	ATATTTTCTC	GATGCCFTCC	TTTAACAAAT	ATTGAGTGTa	AGAGTTAGAT	tGATTTGGCTT	1600
1601	TAGCACTTTG	ATGAATCGTT	TGTGCTAAAG	CTTGARTTTa	aAaRGGIGAT	TCAatTTCAC	TATTAAAAACA	ACTCAGACTT	1680
1681	CCAGTGTGAC	ATGTAGGACC	TTGTGGCATC	ACTTTGATTA	AGATCGCATC	TTGATCACA	TCTAGATGAA	TACTCTCAAC	1760
1761	GTGTTGAAA	TGACCAGAAG	TTTCACTTTT	AGTCCACAAA	CGTTGTTTAG	ATCTAGAGAA	GAAGGTTACT	TTCTTTTCTT	1840
1841	TCAGATTTTT	TTGATAAGCT	CTTTCATFCA	TATATCCCA	CATTAATACG	CTATCCGTTT	GTCGATGTTG	CAAAATFACT	1920
1921	GGTACTAATC	CTTTAGAAAA	GTCTATAAGT	TTATFCACT	CACGAGGATA	CCTCCTTAC	GCATTTTTATC	TTTTAATFCT	2000
2001	GCCACTGTAG	TTTCTTGTATC	ATGTAAAAKA	CTTGCTGCTA	AACCTGCCGA	AACATCTGTT	TGTTGAAATA	ATTCAACAAA	2080
2081	ATGTTGTGCA	TTTCCCTCCA	CCCCAGAGG	CGATAATOGG	AAATAITAAC	TAATTTGTTA	ATTTTGTGCTA	AATGTTCAAT	2160
2161	ATCAAAACCT	TGTTTCAATTC	CATCATGATG	CATGCTAGTT	ATAAGCAAIT	CCCCAGCACC	TAAATGCTCT	ACTTCTTGTA	2240
2241	CCCAATCATA	TACACTGACA	TCAGTTAGTT	TTTTACCACC	GTCGGTAGTA	CAGaATAAAT	CCTCTCTGCT	CTTTATCATA	2320
2321	AAAGCTATCA	ATAGCAATAC	AAATACATTG	ACGACCAAAT	TTCTCGCTTG	CTTGTGCAAT	TAATFCTGGA	TGTTTTAAAG	2400
2401	CGCTTGAGTT	GAGTGATAAT	TTATCTGCTC	CGTGATTTAA	TAGTTGTGTA	ATATCATCTA	AAITTTGAAT	CCCTCCTCCT	2480
2481	ACTGTCAAAG	GGATAAATA	TTGTTTTGCC	GTTGCTTCTA	TCACTTCTAT	CATaAGatCA	TGTCCTGCTT	CCGCTTTCGA	2560
2561	RATATCAAGA	aAGACTAGTT	CATCTGCaCC	GGCTTCATTA	TaATRRAGAG	CCAATCAAC	TGGRTTACCG	ATAICTCTTA	2640
2641	ATGACTGGgA	CTGGATACCC	tTTACGACGC	GTCATCTTT	DACATCTAAR	CATGGRATSA	CTCTTTTTTTT	RATCAAGATA	2720
2721	ATCCCTOCCA	GaaTTCATCC	AGATGTGCTG	CTTTTCCCTAC	AATAGCAGCA	TGaaCATTTA	ACGATFCTaA	TCGaaACAAG	2800
2801	TCFCTTGTAT	GTCTAATACC	TCCTGARGCA	ATCAGAGTIA	ACGATGTATA	AgGTGCGAGA	CGACCTGTCA	AATCAAAAtT	2880
2881	AGGTCCAgAa	AGTTTCCCMT	CTTTCGARAT	ATCGGTATAR	gTSACACCAC	CCMaAGGTaA	ATGCTCAAIT	TTGGCAACAT	2960
2961	AATCAaATAa	RITGAGTTTA	GcATCCTCTT	TCCATCCAIT	AATCTTTTtT	TtSTCTCCAA	AAGMATCTAC	AGATAAGTAg	3040
3041	AGTTtAITTTG	GAAATTTGATG	TGTCAATATG	GTTAaCACTC	TATATcTTGG	RTACTtttgT	aCCTACAATA	CAATAGTCTA	3120
3121	TTCCtGaaTG	AaTATRaTTT	TYaATTGTTTT	GTTT					3154
	10	20	30	40	50	60	70	80	

**2. Sequenzierung mit SCos1reverse-Primer und fortfolgenden:**

**A: Schematische Darstellung der identifizierten offenen Leseraster**



**B: Ähnlichkeiten der möglichen Proteine zu bekannten Proteinen**

ORF	Ähnlichkeit zu	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	Keine Ähnlichkeit			168
2	Konserviertes hypothetisches Protein ( <i>Vibrio cholerae</i> ) oder Alanin Dehydrogenase ( <i>S. aureus</i> )	56/72 28/48	AAF96684 BAB57871	513
3	Keine Ähnlichkeit			222
4	Zwei-Komponenten Response-Regulator ( <i>Listeria innocua</i> )	41/58	CAC97871	213
5	Hypothetisches Protein ( <i>S. aureus</i> )	43/64	BAB41548	504
6	E1-Protein (Papillomavirus)	39/57	BAA95696	186

**C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs**

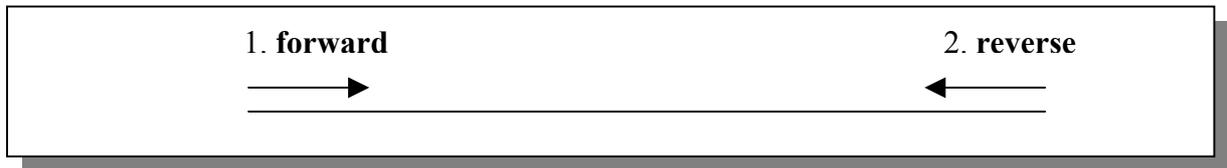
	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	CGaaMAYYTC	CTGATTCTTT	ATTAAATICT	GAACtGaaAC	AACGGGCTGT	GAGtGATTAC	TTAACGCGCG	TGtTTTCATAA	80
81	GCaGAtTCAA	TCAATAGTAG	CCCAAGATAA	AAMAGTAAGT	aAAAtTCAAA	TTGATAGTTG	TGGCCAAGaa	ATCTTAgAGC	160
161	GTACCGCaGT	AGTAAtTAAg	AATCGTCAAA	TTGAGGCACG	TAtTTGAAGTt	GGAtTTACCAG	CACGAGGACG	TACCAtATTA	240
241	GGTAGAAtAG	CaAGACATAC	ACTTAtTTAAT	GTAtTTACCTC	AMAtAGTAGA	ACAtGCCTTA	TGtTTATCGCM	ACAtTTAATAT	320
321	TTCACAAtTG	GRACAACaAG	TTGAAtTTAAT	GATAGATCaA	gAGGAGAtTA	GACaACAGTt	AGTAAAACGT	GACCTTGTtTG	400
401	CaTTTGTAGC	AAAtGGTGct	ATTTTACCAA	GAMAAAGTGG	TGtTTTCAGAT	CTCCCTATGA	aTAACGCTAT	TGAAtTTTAAA	480
481	AGTCTAAAC	AATATGAGAT	TGTAATGAAA	CTATCGAGtG	GCAAAGTtTAT	TAAGGGTATG	GGTAtTTCCCA	AAGGCAtTTAC	560
561	ACTAAtTAGTt	GGAGGCGGtT	ATCATGGTAA	ATCAACAtTTA	CtTTGAaCGGT	TAGAACGAGG	TGTAtTAtTaAt	CATAtTTGCTG	640
641	GTGATGGTAG	AGAAtATGTG	AItTCAaAATC	AAGATGCAAt	GAAAAtTCGT	GCTGAAGACG	GAAGAAgTAT	TCAAAAtGTtT	720
721	AATATCCAGC	CAtTTAtTGA	tCAItTTGCcA	GGTGAaAaAG	AtActTaCACA	TTTTTCAACT	GARAAtGCGA	GTGGTAgTAC	800
801	GTCTCAAGCT	GCAAtGTAA	TGGRAGMkTt	AGAAtCACAA	GCAACAttGT	KACTCAAtTG	ATGAAGAKAC	ATCTGCRACG	880
881	aAtTTSAAGA	TAAGAGAAGG	ACGTATGCaA	CGtTTAAKTA	GcTCCCGARA	AAGAGCCGAT	TACAcACTTT	TCTAAWAAGG	960
961	TAAAAGcATT	ATAtGASGAC	CAtTAAcGTGW	CGACTAtKct	AAtCGtTGGA	GGtTCCGGAG	AtWAtKtTGA	TaGtGGCAGA	1040
1041	tCAAGTAtaG	ATGAAGGATG	AAtTATGaGtT	GARAGAKGaT	ACGCAACATG	CWAAGACAT	TGCGCAGTCA	GACGGNtTAc	1120
1121	AAAGAAGGCN	TtCaTCTCAC	TAWCAGAtCg	GTAACAWTaa	ATCAAGaAtT	CCGTtGAGAG	CGAGtTTtAA	WcAaAaaGGG	1200
1201	AAACGTGATC	GCTTTAaaGc	TAAAGGRtTG	AatGtAgtTAA	CGTATGTGtAA	GGtWACTAtT	CAtAtTTtYtG	GCTTARAAaG	1280
1281	TCTtGTGCAT	GACAGTCAAA	CACAAGGtTT	AGCGATGATG	TTAAGtTATG	TAAAAaATGA	AtTGTCTAGAT	GACAAAAGtTA	1360
1361	CGAtTTGTAGA	AItTGACCAaT	AGtTTGTATC	AACGGAtTTGA	GAAACACGGa	TtAgAtGtTtA	TAtTCAAAtCA	TCAGGGGCAT	1440
1441	CCTGGTCAtT	TAGCGCTACC	TAGAAAGCHG	GAGtTTAtTTG	CGACACTTAA	TCGAtATCGT	AGAtTTAAaaa	TAAAGCAAAG	1520
1521	GGAAATAAATA	TAtGCCCAItT	TtAAAtATtTT	AItTATAAaAG	TAtTTTCAGAG	TTTGGCTCGA	TGtTAtTTGAAC	TTTtGAGACTA	1600
1601	ARAGtWAAGG	GGAGTAtGAR	GAtTGAAGTCT	TCAGtTCGAT	TGtTTGAaTCA	CAtCATARAG	ataAtGgACT	TACAACAAtTC	1680
1681	AItTAAItTATA	AGAGATGAAC	AGtGGAAtTCA	ATCTTAtTAG	GCAtTACAAtT	TtAAAtAtTtAA	TGGCTACGTA	TtTtAAAAGTA	1760
1761	GGtTAGCTAA	GAAAACAACA	AAGAAAAAAG	GAtTAtTTtTTT	ATCGCTtTTGG	GAAAAAGATA	AAACAAGAA	AAAtTCGAGCA	1840
1841	TtTTGACTAtG	AGtCAItTTCC	TGGGAAAtTTA	AItTGTACACG	TGAtGGAtGA	TtCTCAAGtTA	GGtCAGtTtTA	TtTTTtCCAAA	1920
1921	ACAtGTACTT	TtTTCAtAAAG	GtAtTTtTtAAG	AAAtCATGCA	TCTAAAGGGa	AAAtGGCTTT	TCGAGtGTAT	CCTACAtGGG	2000
2001	AGAAAGAtTTT	AAAtCGtGTG	GCTCACAAAG	CACAAGAGtG	GCAAAaACaA	TACTTtTATAG	AtAtGTCTCA	AACAAtTTGAT	2080
2081	GTACCAAGTA	TtTAAaCGtGC	TtAtTTtTtAAT	GAAGAtTTGAT	TAtTAAAtTCA	AAAGCTGTAC	CACAACAGa	TAtGTGTAAA	2160
2161	TaTTGCtGtT	TtAtTTAGtAA	AItTTGAtTTAC	ATAACTGTCA	AtGAGtTTGGA	AtGAGtCTCA	TtTTTtTtAAtC	AItTTAtATtTG	2240
2241	aGGGAGGgTt	AAtGGtGTCT	TCGGAGtTATA	AaARAGGAAt	AItTTtTAGCT	TtAGGtGTCT	AtAtTTtTtATG	GGGAGtTTtTa	2320
2321	CCAtATAtTt	GGCGtTtAAt	TGAtGAAtAG	GCGCTTtTGA	aAtTTtTGCA	TtCCGtAtTtA	TtTtTtKcAGT	GAWAtTtAtTg	2400
2401	AItTTtTKgtGC	tCAItTAtAGG	AaAaAWtYAW	CGGGACStT	TtTTTtTtagAg	AtGtTAAYCa	GtTGGgAtCG	cNYCCGtGtC	2480
2481	aCtTWtTtTgc	MtCmTtWtGtT	GCAGGGKwIK	TtTKtTtBccG	tGAttTKGGG	GgcMttTKtg	KgGGGgGGD	K	2551
	10	20	30	40	50	60	70	80	

Für die Sequenzierung des Bereichs wurden folgende Primer verwendet:

Sequenzierprimer		
Name	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub>
SCos1forw.	cgg ccg caa tta acc ctc ac	61,4
S.e.LIPseq1	aat gga tga tgc acc tac gc	57,3
cosf3K40	cca cgt cac ctc gtg ctg cg	65,5
cosf4K40	gcc tta cag aag ctt aga c	54,5
cosf5K40	gaa tcg ttt gtg cta aag c	52,4
cosf6K40	cca ccg tgc gta gta cag	58,2
cosf7K40	gtc ata tgt gtt aac act	50,2
SCos1rev	gcg gcc gca taa tac gac tca ct	64,2
cosr2K40	cgt gct gaa gac gga aga ag	59,4
cosr3K40	gta gta acg tat ggt aag g	52,4
cosr4K40	gtc ttc agt tcg att gtt g	52,4

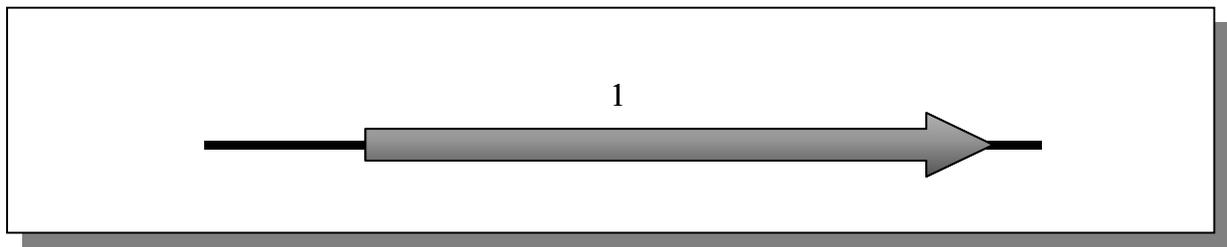
## Cosmid-Klon 114

Die Sequenzierung erfolgte ausgehend von zwei Punkten:



### 1. Sequenzierung mit SCos1forward-Primer:

A: Schematische Darstellung der identifizierten offenen Leseraster



B: Ähnlichkeiten der möglichen Proteine zu bekannten Proteinen

ORF	Ähnlichkeit zu	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	Hypothetisches Protein ( <i>S. aureus</i> ) oder ATP-abhängige RNA-Helicase ( <i>Plasmodium</i> )	36/62	BAB43750	642

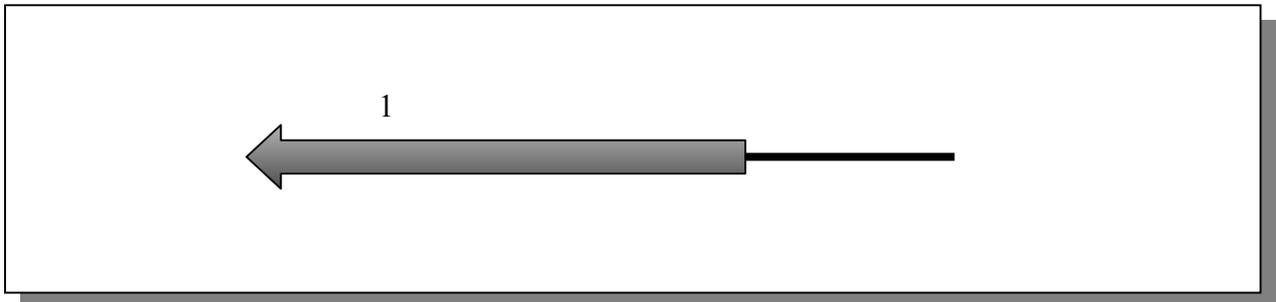
**C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs**

```

      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
1  TTTCAAATTC AAGCGATTAC gGGIGAYaAC ACGTTTTCTA AAATTCACIT CAGCCAAGag GgGTACSTGA TGTGGGTAGA 80
81 GGATTACAAG TATAGTACAA TTCAAAGACG ATTTGTATTC GATGATAGAG GAITTTATATY GGCAGTBCGT ACTTATACaC 160
161 BTGATGGGGA TAACAATAAA aMaCACTATT TTTCAAAGA TGGGAAGAA ATATTTGTTG AAGACTTAAA TGTTAATACa 240
241 GTaACGATTA ATAAaMMITT CCAATCAAAA TTTAAMaAGG TTACGTATT C ATCTATGGcT GAGTTGATAG AAGAGAAAIT 320
321 CCAATCATAT GTAGAAAGAG AAITGAATGA aGATGATICT GPTATAGTGG CATCTGATGA ACGTCATAAT TCAATGATGG 400
401 CTGCACAAT TGATGCACCG TCTTTATGtt TTTCTATITT TACTGAGCGA AATAMAGTGG TGaCACAAga TTTATATGAT 480
481 TCTaTTTCGA GAGCATATYA TTGICTCGIT GATACACAAG CTAATCAAAA TATGATTGAM CACTACGCAG GAITTGAaTAT 560
561 GAATMMYtYY ccYctITTA GGGTAACGcc TTTTGAITGCG cAGTCATTAC YTAACCAAAG TAGTCAAITG TATGACACTT 640
641 ATATYGGMIT ATGGaTAgAY GGTITGGACG AGAITGaaAT ACGAGAGatT GTAACAGCT TATTTCAATA TaT 713
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
    
```

**2. Sequenzierung mit SCos1reverse-Primer:**

**A: Schematische Darstellung des identifizierten offenen Leserasters**



**B: Ähnlichkeiten des möglichen Proteins zu bekannten Proteinen**

ORF	Ähnlichkeit zu	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	Extrazelluläres Elastase-Vorläufer-Molekül ( <i>S. epidermidis</i> )	93/94	P43148	591

**C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs**

```

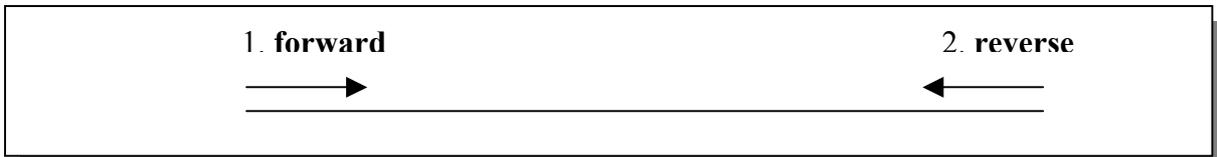
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
1  TTKACYWGTT TCAGCKTCAA TTTTCACAIT CCAATGAGAG AtTtTTGGTG AAGTTGTAAT AAITTCTATG TtATaAACAT 80
81 ATTTaTTTTt ttCTCCaTcH ATCTCAACTT TAITGGTTTT GATGACATCA CTTTTTAAGT TTTTAGCTTT TTGACGGTCA 160
161 ATTTTTATTG CYTGAaAGC TTTATCTGTC GCACTTCTT TACTMtOCG YACcTTATTC GTAGGTTGAA CTTTCTtaGC 240
241 MICAGIMTCM CCATTGACAA GAACTACBTT ACBBTCTTTA TTCGTAIGaa CTTTTACTTC TTTGCTGGT GCATACGIGT 320
321 tGCCACTTT CGGTTCaAT GTGTAATGCG TAAaTCCITT GPTATCTTTT TCAGTATCAG TSACcTTATA ATCMTTGtAa 400
401 TGCTTTTTTA TATTTTCAGA TTTTGGTAAC TCTTTCAATG CGTTAGTTC TTGAGAITCT TGGGTTACTT TCGCATCGAT 480
481 GTTTTGAGTY GCTGATACTT TMTCCITAGC GTCAACcTCC GTATTGACTA AAGGACTTC CACAGTTAAT GCGCAATAC 560
561 TTGTAAGTBC GAATtTAGAA AaaTCTTCA TTTTATTACS tCctATAAAT YaATGaaAAA CAACTACTA TATaMYMSTM 640
641 ATTaAWattt YCTGAaAAGT AAATgAaAAT TTCATTTAAT TCACATAATC ATCACTTATA AT 702
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
    
```

Für die Sequenzierung des Bereichs wurden folgende Primer verwendet:

Sequenzierprimer		
Name	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub>
SCos1forw.	cgg ccg caa tta acc ctc ac	61,4
SCos1rev	gcg gcc gca taa tac gac tca ct	64,2

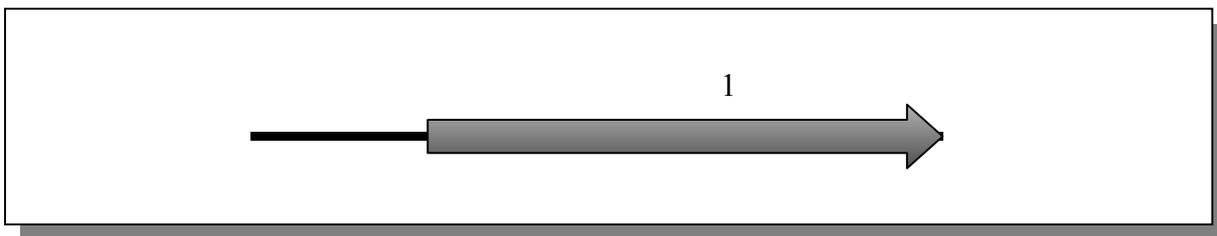
## Cosmid-Klon 130

Die Sequenzierung erfolgte ausgehend von zwei Punkten:



### 1. Sequenzierung mit SCos1forward-Primer:

A: Schematische Darstellung des identifizierten offenen Leserasters



B: Ähnlichkeiten des möglichen Proteins zu bekannten Proteinen

ORF	Ähnlichkeit zu	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	Ornithin-Transcarbamoylase	69/74	BAB43732	690

### C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs

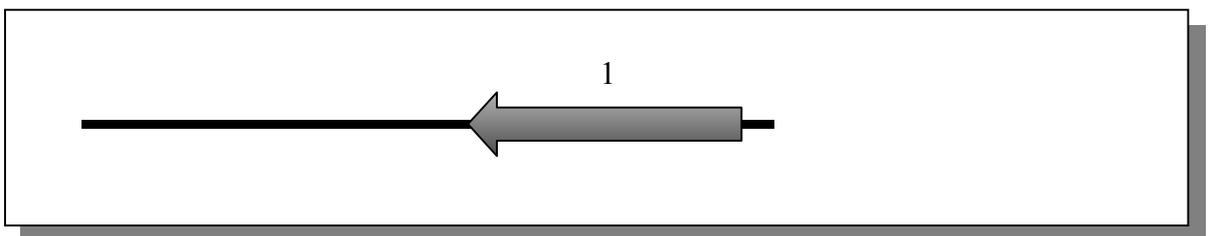
```

| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
1 GAATTTTITAG GAAATCTGA TATTCaATTA GGAaAHNNAG AMTCTGTITGA GGaTACTGCT AAASTTTTAG GCAGaATGTT 80
81 TGATGGaAITT GAaTTTtaGAG GTTTTTCCCA AANNNCTGTT GAaCAAITGG CCGANITCTC TGGaGTDCCA GTDITGGNATG 160
161 GGTTAACTGA TGATTGGCAT CCTACACAAA TGTTAGCTGA TTATVIGACA ATtRAgVVBV aTBTITGGATA TTTVVBVGGC 240
241 ATCaacCTIAA CTTATGIWGG ABACGGACGT HATANIGTITG CACAITCGCT TATGGTGGCG GGTGCGATGC TTGGTGTAAA 320
321 TGTRCGTRITT TGTDCACCOCT CATCaTTAAC ACCGAGAGAT GTATATKTta aTATTGCTAA RGaKCAAGCG TCTAATTATG 400
401 GAGGTTcAGT TAAGATAACT GATAACaTTC ATACTGCCGT CAAAGATGCA GATGTTaTTT ATRCTGATGT TTGGGTATCA 480
481 ATGGGTGAAG ARAGTGAaTT CGAaACACGT ATTCaTTTaT KGgJNRGactA TcaAGITaAT AGRRRaaKGC TTAaKTTtRRC 560
561 CGGTAAAGTA GATACGATAT TttKRSRITG TTTACCAGCT TTTCaTGATA CACAAACAGA ATATGGaCAG GRtATKkkKR 640
641 RRRRRKRIGG CTTAaCTGaA ATGGgAGTGA CAGACGADAT CTTTAgGRGT GAGCRITtCIA GAGTTTTITGa TCVAGCTGAR 720
721 aDtcGAtTGC aTACGATtIRA gCCCGTgATG GCAGCDaCtT TRGGct 766
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80

```

### 2. Sequenzierung mit SCos1reverse-Primer:

A: Schematische Darstellung des identifizierten offenen Leserasters



**B: Ähnlichkeiten des möglichen Proteins zu bekannten Proteinen**

ORF	Ähnlichkeit zu	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	Hypothetisches Protein ( <i>S. sciuri</i> )	75/85	CAA70423	300

**C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs**

```

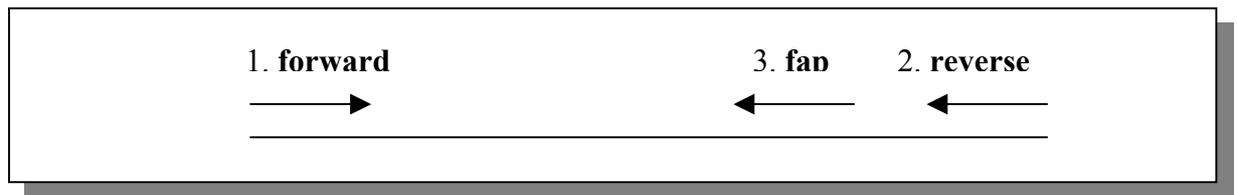
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
1  TGAGTATTT aCGATAATGA GCACITTCOC TTTATATCTT TTTAGTAAAt AGGTAGAGCC ATCATAATTc TCTACCTCAA 80
81 TATCATAAAAt RCTCATTTAG ATACACCTCT ACATCATITGc CAATKICAAT aAATcTATaA cGCCACTAGA aGCTcCAGGa 160
161 AATGCAAAaV taTTTTTaTT TaAGTtTTGT GCAGTAAGIT TTTTATTAAT GATAAAgaCT AGGAGAtTaA CCAAAATgACC 240
241 AGCGTCATTA CCATAAAATYC TCTGCTCCTA CTAAaCGITT GTKACTATCT AATACaAITG AcAITTTCAGC CTCTGTTTTCG 320
321 TTTTGATACT CAAATACCAT TTGICTTCCG AaTGGTATAT cTTTaATcAT ATACGTaTCA tCTTTcTTAG CCTCGCTAAC 400
401 TGTGACACCT ATTTGAGATa RACGAGGCAA TGaaTARDGC RCTGAaGGTA TTGGTGGATA CTGAaTGGcA TCTGTaITCa 480
481 ATCCAAGGaT ATGGGCAGCG ATATAaTKaG RCTCARATGT AGCTGTAGGA GTaAGTtTAG GaaTcAITTT RttGAtRRgG 560
561 KCCCCACTTG CGTATatRKD
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
    
```

Für die Sequenzierung des Bereichs wurden folgende Primer verwendet:

Sequenzierprimer		
Name	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub>
SCos1forw.	cgg ccg caa tta acc ctc ac	61,4
SCos1rev	gcg gcc gca taa tac gac tca ct	64,2

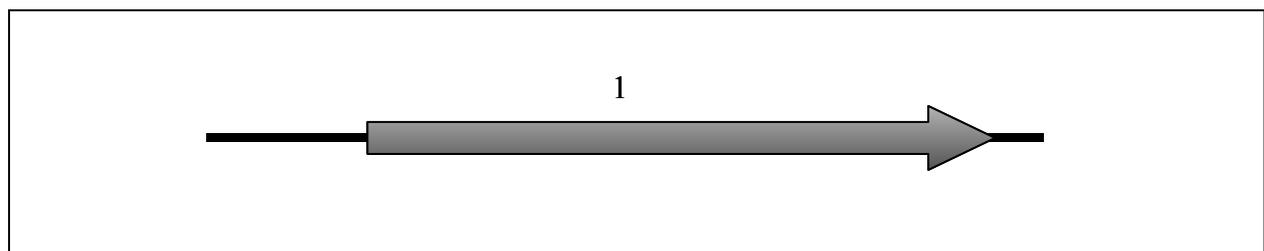
**Cosmid-Klon 1015**

Die Sequenzierung erfolgte ausgehend von drei Punkten:



**1. Sequenzierung mit SCos1forward-Primer:**

A: Schematische Darstellung des identifizierten offenen Leserasters



**B: Ähnlichkeiten des möglichen Proteins zu bekannten Proteinen**

ORF	Ähnlichkeit zu	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	YfhI ( <i>Bacillus subtilis</i> )	36/54	BAA24475	681

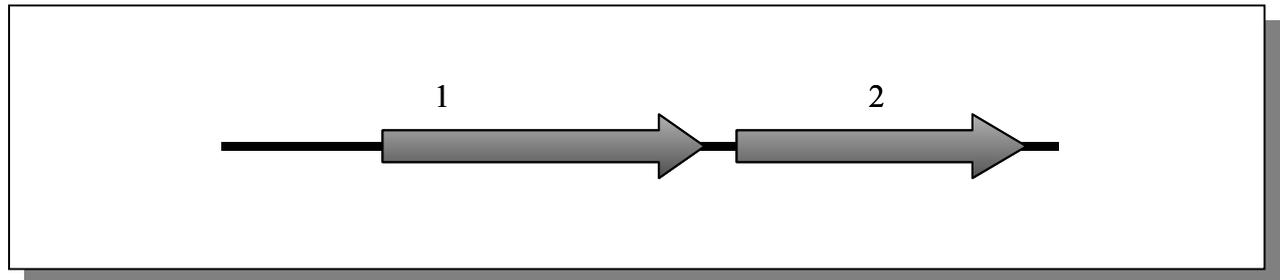
**C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs**

```

      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
1  GKCTtTTGTT AgWITACTTA CTAAGTtATG CCATCGTCAT TACATTACGA ATATAGAAGA GGTAAAGAACC GCAATCCTTA 80
81 AACGAGAGGC TGAGTCAACA ACTGctATCG GAATGAACGT TGCAATACCA CATGCTAAAt CTCATGCAGT TAAACGTCCT 160
161 ATCGTCGCTG TATTAAATCA TAAAGCAGGT GTAGAGTGGG AAAGTCTAGA TGAATCAaAT CCTCAGCTCA TTTTTCtTAT 240
241 TGCAGTtCCC AATGATAATR aCGATACACA TTTaARaCTG CTACAACGGT TATCACGAAC GCTCATGAaA GataATaCGC 320
321 GTGATGAGTT AATTCATGCT CAAAGTCGTG ATGAaATATT TaARAANNgR RRAGAGaTAT AAAGGRGCGT ATGACAAAtG 400
401 GtACTtTTtKC TTCAACCCGT ATtTCAAGAA CGtTTATGGG GTGGCACCAa TCTCACTCAa TTTGGCTACG ATAtTCCGAA 480
481 TAAtTCTACC GCGAATGCT GGGCAAtTtC CGCACATAAR agcGGKcCTA ACACAAtTCT CAACGGAAAA CaIWAGGGGR 560
561 AAtCYTTAaR aCAAgTTTGg gACGARATaA AGCaCTTTtC gGAAAtGACT CAcGTaAaGR gTTKgcACTT CtACTaRa 640
641 tKKKdgrIKY tYtTKAWtgr KTgTCMRtWC AagTaCMtCC YGA 683
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
    
```

**2. Sequenzierung mit Scos1 reverse-Primer:**

**A: Schematische Darstellung des identifizierten offenen Leserasters**



**B: Ähnlichkeiten des möglichen Proteins zu bekannten Proteinen**

ORF	Ähnlichkeit zu	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	Fruktose Phosphotransferase System fruA ( <i>S. aureus</i> )	62/75	BAB43739	270
2	Mannose-6-P-Isomerase ( <i>S. aureus</i> )	60/75	BAB43740	285

**C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs**

```

      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
1  GKCTtTTGTT AgWITACTTA CTAAGTtATG CCATCGTCAT TACATTACGA ATATAGAAGA GGTAAAGAACC GCAATCCTTA 80
81 AACGAGAGGC TGAGTCAACA ACTGctATCG GAATGAACGT TGCAATACCA CATGCTAAAt CTCATGCAGT TAAACGTCCT 160
161 ATCGTCGCTG TATTAAATCA TAAAGCAGGT GTAGAGTGGG AAAGTCTAGA TGAATCAaAT CCTCAGCTCA TTTTTCtTAT 240
241 TGCAGTtCCC AATGATAATR aCGATACACA TTTaARaCTG CTACAACGGT TATCACGAAC GCTCATGAaA GataATaCGC 320
321 GTGATGAGTT AATTCATGCT CAAAGTCGTG ATGAaATATT TaARAANNgR RRAGAGaTAT AAAGGRGCGT ATGACAAAtG 400
401 GtACTtTTtKC TTCAACCCGT ATtTCAAGAA CGtTTATGGG GTGGCACCAa TCTCACTCAa TTTGGCTACG ATAtTCCGAA 480
481 TAAtTCTACC GCGAATGCT GGGCAAtTtC CGCACATAAR agcGGKcCTA ACACAAtTCT CAACGGAAAA CaIWAGGGGR 560
561 AAtCYTTAaR aCAAgTTTGg gACGARATaA AGCaCTTTtC gGAAAtGACT CAcGTaAaGR gTTKgcACTT CtACTaRa 640
641 tKKKdgrIKY tYtTKAWtgr KTgTCMRtWC AagTaCMtCC YGA 683
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
    
```

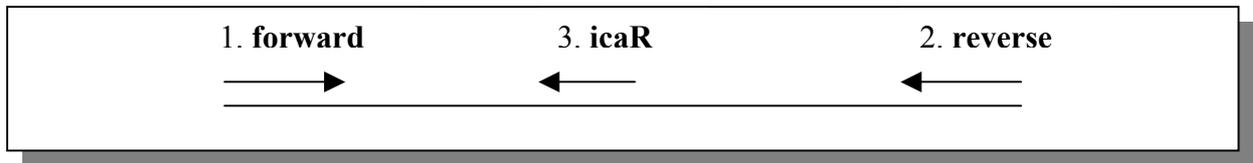


Für die Sequenzierung des Bereichs wurden folgende Primer verwendet:

Sequenzierprimer		
Name	Sequenz 5' → 3'	T <sub>m</sub>
SCos1forw.	cgg ccg caa tta acc ctc ac	61,4
SCos1rev	gcg gcc gca taa tac gac tca ct	64,2
faprev1seq	caa tag tga gac agt agc caa	55,9
faprev2	caa ctt caa gtc tga cat c	52,4
faprev3	ccg ttg gaa tag gtg gtt tg	57,3
faprev4	gac gta cgc tgg aca aac c	58,8

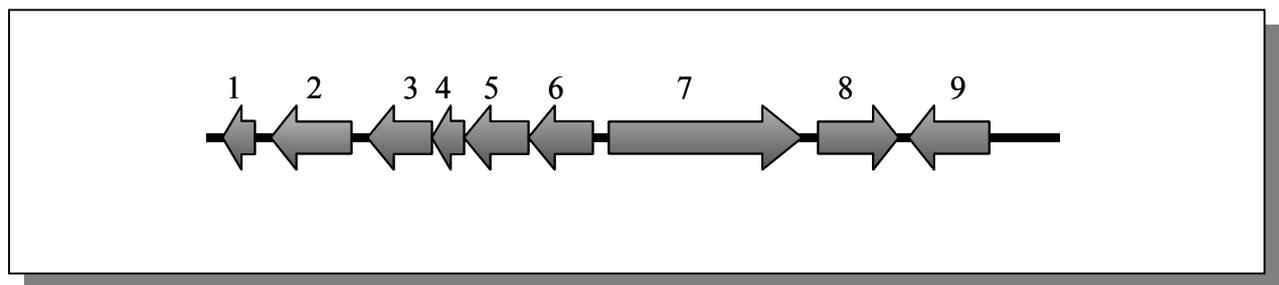
### Cosmid-Klon 1072

Die Sequenzierung erfolgte ausgehend von drei Punkten:



#### 1. Sequenzierung mit SCos1 forward-Primer und fortfolgenden:

A: Schematische Darstellung der identifizierten offenen Leseraster



B: Ähnlichkeiten der möglichen Proteine zu bekannten Proteinen

ORF	Ähnlichkeiten	Ident/Ähnl. [%]	Accession No.	Länge [bp]
1	Hypothetisches Protein, ähnlich zu Streptokokken-Hämagglutinin-Protein ( <i>S. aureus</i> ) oder Fimbrien-assoziiertes Protein Fap ( <i>Streptococcus parasanguinis</i> )	41/65 25/49	BAB43752 AAC79868	580
2	Cps2H: Protein aus <i>S. pneumoniae</i>	21/40	AAD10177	1206
3	Hypothetisches Protein, ähnlich zu Phosphonat-Transport-Permease ( <i>S. aureus</i> )	84/94	BAB41355	816
4	Hypothetisches Protein, ähnlich zu Phosphonat-Transport-Permease ( <i>S. aureus</i> )	84/91	BAB41356	624
5	Hypothetisches Protein, ähnlich zu Transport-System-Protein ( <i>S. aureus</i> )	87/95	BAB41357	774

6	Hypothetisches Protein, ähnlich zu Alkylphosphonat-ABC-Transporter ( <i>S. aureus</i> )	85/93	BAB41358	957
7	Hypothetisches Protein ( <i>S. aureus</i> )	69/81	BAB41359	1581
8	Hypothetisches Protein, ähnlich zu Lactokokken-Phosphatase ( <i>S. aureus</i> )	61/76	BAB41360	1452
9	YfhI ( <i>B. subtilis</i> )	39/56	BAA24475	996

C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	GTGTGCACT	AATTATCATTG	TTAGTAGTTG	TACTCTCTAC	ATGGTCTGTG	GAGGCATATg	TATTTaACTT	AGATGAIITGA	80
81	cTTGATGCTT	CACTACTTTTG	TTGACTAAFT	CCATCTTTTT	CACITGAIITG	CgCIGTATTT	GTAACITCTG	AAGACAIITG	160
161	CTTATTTGTA	CTATTAGATT	GGTTTGATTC	CAAGCTTGTA	GAATTGACTG	TTTCTTTTTG	TGAGTcCTTA	ATCGTAGITG	240
241	AAFTTTGATT	GGCTACTGTC	TCACTAITGG	ATGAAATFTC	AGARGIGATT	GGTGTTCCTG	AgCGACGTAA	TGCTTGATGA	320
321	TTATTCACCA	TATTAATATGT	AAATgCTCCA	CCAACTAGGG	CTGTGTGTTT	CGCTACGCCT	TTTTTCATCT	TATGACCTTT	400
401	CGTCTTTTCA	GTAACAIITTT	CTTGTAITTC	GTTTTACTTT	AAAAaTGGTA	GCCOCATITG	TTTTAACCAAT	TCTAITTCAT	480
481	TAAACTITGC	TTTTTACCAG	CTTTTTCCIG	ACTTGTACAG	TTTTTACCCT	GTTTTTTGTT	GCTCAAGACT	TTTTTTATPA	560
561	TCCTTTTTCTT	TCITTTGTCAT	AATPAACTCC	CCATCGTTTT	CTTAGITTAAT	CATAGTCTTT	TATACCGAAA	ATATTCAITTT	640
641	TAACAAGTAT	ATaACTATGA	ACATGTAAAA	TGCAACTAAT	ACTTCTTAGT	TTTTAATAAAT	TACTATACAT	ATAAaGATAT	720
721	TAAACGATTG	TGCAAAGAAA	AACTGTTGAC	AAAAGGGTTA	ATtACTATT	AAAAAgCGTT	TTTTTATCTAT	ATTTCAACAT	800
801	ATTTATTATAT	TGAATTCAT	TAAATTTTTAT	CTAITTTAGTT	ACTAATITATA	TATAAAAaTT	CGAATCAAAA	TGAATATAAT	880
881	TtACGAAGAA	ACTTATAAAC	YATTTTTGTAT	ATTTATGTAT	GABTACGAAT	AAMaMACTAA	CTTTAAATAA	AGTYAGTTTT	960
961	AAAGTTAATG	ATTAAYAAAT	YTCTTTAGAC	AAAATGTTAT	TTACCAITGT	CCGYGTTGT	ATTGATACAT	ACCTTctTTTT	1040
1041	AAATATATTC	CCCAAAABAT	ATAACACAAT	AtACCTAGCC	CCATGGaATC	AAATAAAAaT	ATATGAKCCA	TATTAACAAA	1120
1121	GATAGTGATT	AAMAATPATA	AAASaGYAAT	ACTCAITGGA	AAAGTAACTA	AaAGTACCAT	ATGAGGCATG	TATATCGTAC	1200
1201	ATAAAGKAAG	TCCTAITtATT	CCAGTAAAGA	TAATCATACC	GAAGATGATA	TTACTCGTTG	CTACAITTAAA	GTATTGTATT	1280
1281	TCGAACTCG	CTTTTATCAT	TGGTATACCA	AAACCACITC	CTAAAAAAGG	ATGCTCAGTT	AGCGCATAAT	CAATAGCTTT	1360
1361	AATATTCATA	TCACTCGGCA	TAAAGACTTC	TTGGCTAITC	TTCCCTTTTA	AGAITTAGITT	AATAAAAAGA	TGATAAATAT	1440
1441	ATGGTTGATT	TAITTATAGCA	AITGTCAITTA	GTATCATAGC	ACCAAITATG	GGGIGTTTAA	TTCTCTTTTT	TATGTGAGAT	1520
1521	AACGGTAATA	GAAGTATTAG	ACATAAAAATA	ACAGATATGA	AAATATGACG	AGAGTTTIGAT	AAATAGAGCT	CTAITCAITCC	1600
1601	AATATTTTAA	AATAATPAAAT	TGAATACATC	ATAATCTTGT	TGTTTGAITTA	TTGTTACCAT	ATATAGAACT	AGACCCATAG	1680
1681	CAAGAATAAC	TGCGAATGAA	TGIGCATCCT	TGAAAACACT	TCTAAGTGAT	TCCTCAITCAA	TTAGATATGA	TTTTGGCGCT	1760
1761	ATAACTATAA	ATaAAAAAGT	AAAGGCAATC	AITTAGCGTGA	TAAATIGAIT	AAITCCAGTTA	ATGAGAITCT	TTATCTTTTT	1840
1841	TAITTAACTA	ACATACACAA	CAATCAAAAT	AAGCgGTATA	AAGAAGTTAA	GCaATTTAAG	AATAGAITCT	ATCGGATCAT	1920
1921	TAGATACGAC	TAAACTCATT	ATGATATAAA	GTAGCATAAG	AATCATAGTA	GATTTGATAA	ATCTTAAATAT	CAITTCATTTT	2000
2001	CTTATCCAAT	GTTTTACATA	TTTTAAATAGA	AAAaATACTC	CAAITTACATA	AATCaAGATA	TAITTTCATAC	TTACTATGTA	2080
2081	ATGCGCCATC	TCITGTGTGT	CATAGGGAGT	GTATATCTGC	GATCTGAGCA	TATAAAGTAT	GAITTAATTGA	ACGACACCTA	2160
2161	GTGCCCTCT	TTTTAAGAAGT	AATAAAGATA	AAGCGATAGA	TATCAITTAAT	GTCCAITTTAT	TAGGAATGCT	AACTATAAAA	2240
2241	AATGGATAAG	ATAATCaACC	ATTCGATCAA	TTTTACGTTGA	GTGATGTTTA	AaAATTTGTTT	CATGATATAA	GCCYCAAGTT	2320
2321	GTCTAAGTCG	TGATGTAAAGT	GTTTTGTCAA	TTTTTAAITTAC	GACATGTICAT	TATATTTICTA	TTATAAAATA	TTACACGCTA	2400
2401	TCAACAAAAT	ATTTTTTTTAA	ATAATTTTTGT	TATATTTTTAG	AaTTATTAACA	TGAACGCRIT	TCTACCGARA	ATtAAAAITTA	2480
2481	TAAATATGCC	GGAGCTCTTA	AAITPAAAITT	CTTATTTCCAA	TAAATGARAA	CaAITTAATGC	TTTTaACAAC	GAACATATCC	2560
2561	TTTTACAAATA	AACGCACITAA	ACGATACGTT	TACGAACCGC	GCCAGAKAIT	AAATCAACTA	AAGCGACCAT	CGCAATCAAA	2640
2641	CCAATPAGAA	TCATACCAAC	TCGGTCCCAA	GATCGTGTIT	GTAAGCAAAA	AAITTAAGGGT	GTACCTATGC	CACCTGCGCC	2720
2721	GATTAATCCT	AAAATGGAGG	CAGAACGTAA	AITCAAITTCA	AATCGATACA	AAATAAGGGA	AATAAACGAT	GGTAAGAITT	2800
2801	GTGGTATTAC	AGCAAACAITT	AACGTCTTCA	TTTTATTTTGC	TCCACTCGCC	TTTTaAAGAITT	CTACAGCGCT	AAAATCTAAA	2880
2881	CTTTCAATAT	CTTCAACAAA	AAGCTTCCCT	AACATGCCGA	CTGAATGAAT	CCCCAGTICA	AGTACACCTG	AAAATGAACC	2960
2961	TGGTCCAACA	GCTTTAATTA	ATAITTAACGC	CAITTACAAIT	TCAGGAAACA	CACGTATAAT	GCTTAAATATG	AATTTACTTTA	3040
3041	TGCCCATAAC	CGTCTGTAAT	TTTATCATAT	TTTTTAGCTCC	TAAAAAITGCA	AAAGGaATAC	ATATAAITTGA	RGCAATGAAC	3120
3121	GTGCCAATCA	CTGCCAATAGC	AAAAGTTTTCC	AGCAAACCTC	TAAGTAAGTc	TTCCACATCA	GgTATATATA	TGTAACITTAA	3200
3201	ATCTGGATGA	AATAGTCCGT	AAAAGATAGA	CTTTAATAITT	TCAATAGACT	TACTTTTTAAG	TTCAAGACCT	GGAATCCCTG	3280
3281	CAAACGCCCA	TATAAITTATA	GCTGCAACAA	CAATGACTAT	AACCCAAITTT	TTAATTTATTC	GCTGACGATG	TTTTTTTIGAT	3360
3361	TTTaaAITTCAT	AITTTACTATC	CAACGTAITTC	ATGCTAAITTT	tTCCCTCACT	TTCGAACTCA	CATAGTCAAT	AATAACTACA	3440
3441	ATGAIITAGAG	TGAACAGGAT	AATCAITTGCT	GTCTTTTTTAT	AITTGAaATAM	TCCTAACGTT	TGATCGIMGA	cMMCCCAAT	3520
3521	ACCACCTGCG	CCAACAAGAC	CTAAAACITG	TGATGCCCGA	aTGTITAAITTT	CAAAGGCAAA	TAACACATAT	GACATAAATG	3600
3601	ATGAAAGTGC	TTGAGGAACA	ACGCCAAATG	CAATCCAITTT	CACITTTAITTA	GCCCCTACAG	CTGTICATAGC	TTCCATAGGT	3680
3681	CCTGGATCAA	TTGTTTTCTAA	TGATTCATAT	AATTAATTTTAC	CAATGATACA	TAITTGTITAGA	ACAAACAGTG	CTAATACACC	3760
3761	CGAAITTTGT	CCAATACCAA	ATATGGCTAC	AAATACGC	GCTAATPATA	AATCAGGTAT	TGTGCGTACA	ATAITTAAGGA	3840
3841	CAAAACGTGA	TGGAATCGCA	ATCCACTTTG	TTTTGAACAAT	AITTACTCGCA	CACAGTACG	CTATAGGAAT	GGAGACAATA	3920
3921	CTTCCAAGAA	AAGTACCAGC	AAITGCCATA	OGAATCGTGT	CTAGCAITGG	TTGTGTAATA	TGATcTAGAT	AACCCCAATC	4000

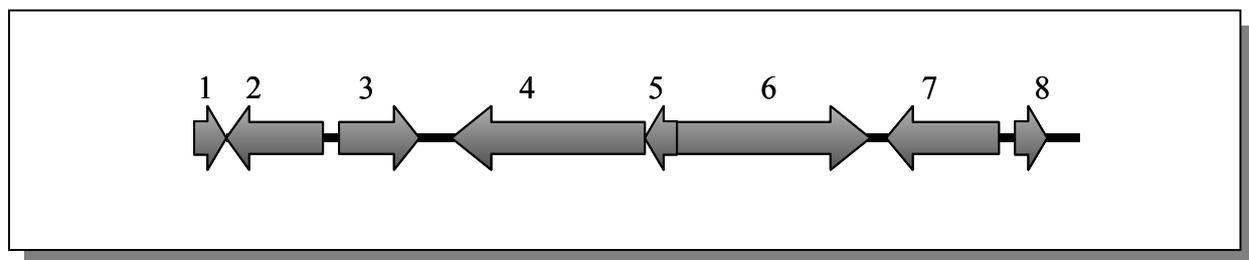
4001	TGGAGGTATC	ATTTGTTTGA	AGAATACGCC	AAITTTGcTGG	AAGACCTATC	ATTAAAATCTC	CAATGCTAAA	TCCTGTATAA	4080
4081	ATAAACTCC	AGATAATCAA	ACCCGTGATT	AAAATAAATG	AAAAGCTAGT	TTTAAGAGAC	ATCCTTTTAT	TTAAATAGCG	4160
4161	ATATATATTA	TGCGTTGTTG	GTGTCGTAC	TTTATTCAC	CCCTAATTTT	TCATCGTCT	TAATAGAGCG	ACCGTATATA	4240
4241	TGATTAAATA	CTTCATCATT	TGCCCTCAGC	GCGGGTCCAT	CATAAACGAG	CTCTCCCGCT	CTTAAACCAA	TTATTTCTCGA	4320
4321	GCCGTATTC	TTTGCCAAAT	CTACAAAGTG	TAAATTAAT	AAAATAGTAA	TACCAAGTTC	TTCATTGATT	TTCTTTAAGT	4400
4401	CATCCATCAC	TTGTTTTGTA	GTAAATGGAT	CTAATGAAGC	AACCTGGTTC	TCTGCTAATA	TAATGGTTGG	TTCTGTACAT	4480
4481	AACGCTCTAG	CTATTGATAT	ACGTTGTTGT	TGACCACCTG	ACAACCTGGT	AGAGCGTTGG	TCATATTTAT	CTAAAAATGT	4560
4561	TACACGTTCT	AAAGCAITCA	TTGCCCTGAC	TTTATCTTCT	TTAGGAAAAA	GACCAAGTAT	CATTTTCCAA	GTAGGATGAT	4640
4641	ATCCTACCT	GCCACTCAAA	ACATTTCTAA	GCATCTGTTGA	ACGCTTAACT	AAGTTAAAAT	GTGAAAAAT	CATTCCTATA	4720
4721	CTTCGACGCA	TTTCTAAATA	TTTTTTTACCA	CGTCTTTTAG	TTATTGACTG	ACCTTCGATA	GTaATATCAC	CTTTGGAAAT	4800
4801	ATCATGTAGC	CGATTAAACC	ATCGTAGTAA	AGTTGATTTA	CCTGCTCCAG	ACAATCCAAC	AATAACTGCA	AAATCACCTT	4880
4881	TTTCTATATT	TAAGTTAATA	TCFTTTAATC	CCACATGGCC	AITTTGGATAC	ACTTTACTAA	CATCCTTAAA	TTCTGATTTGA	4960
4961	CTCATCAACA	AACACCTTTC	TTTTTATAAG	AAAAGCTATG	AGACTCAAAC	CGCAAGAGGT	CTACAAACCT	TCACGTTTAA	5040
5041	TCCCTTAGCT	TTTCTTTTAA	TAAITTCATTC	AAITTTATTTT	AITTTCATATC	ATGAACAGCT	TTTTCATATT	GTCTAACGAT	5120
5121	ATCAAAGTCT	GAATCTTTAG	TATCAACATA	ACCTTCATGA	GAATATACCT	CGCTAATGAT	TTTTATGTCT	TTTTTTAGTTT	5200
5201	TAGAAATTT	TTTTAAaAGCT	TTTTTCAAIT	TATCTTGGAA	TTTTTTTATCC	ATATCAGGAC	GTACTGAAAT	CGTATCAITA	5280
5281	GGAATAGGTT	TAGTGAGTTT	TAAATTTTTA	GTATCTTTAA	ATACATTTGG	TTGATCTTTT	TTTTACAACG	TACGTGCATC	5360
5361	AITAAATACA	GCTGCTGCAT	CCACATCTCC	AITTTAACAA	GAAATAACTG	CTTGGTCTGT	TOCTTTAACA	TTGACTATTT	5440
5441	TCATATCTTT	TGTTGCATCA	ATACCAGCTT	CTTTTTTTTAA	TGTTACTAGA	GGGAATGTAT	ATYCTGTCT	AGAAGTTACA	5520
5521	TCITGTAATG	CTATTTTTTT	ACCTTTTAAA	TCITTTGAgAC	TATTAATACC	AGAGTCCCTT	TTAACAAGGA	TTTCTGATTT	5600
5601	ATAATCATCA	ACTAACTTTT	TACTTTGGAGA	CCCATCTTCA	TTAACGTCAT	AACGTTCTGC	CTTTAATAAT	AAATCCGCTG	5680
5681	CTTTTGTATC	GTGTGCTAAT	GTATATGCAG	TTGGTTGGCAA	GAAACCAACA	TCCACTTTCT	TAGATTTTCT	CGCTTCAACT	5760
5761	ATCGTGTGTT	AGTTTGTGTA	AACCTGACTT	TTAACCGGAA	TCCTTAATTT	ATCTGACAAC	AAITTTTTCTA	ACGGTTTTTGC	5840
5841	CTTAGCTTCC	AGTGTATCAG	CGTTTTGAGA	TGGTACAAAT	TGTTACTGTTA	ATTTCTTTAG	TGTATAACTA	CCTGATTTTGG	5920
5921	AATCTGATCT	ACTATCCGAA	CTTTTTATTTAT	TATCCAAAGA	ACTTTGAATTC	CCACAGGCTG	CTGCAAAAAT	AACCACCGAT	6000
6001	AAAACAAGCA	CCACTAAAAA	CTTAAGATTTT	TTTCAATCTAC	TTACTGTCCC	TTTTACATCA	ATATTGGTGT	AATATTGATA	6080
6081	TTTTTTGAAAC	TATATTTTATA	GATTTAGCATA	TCITTTAAGT	GATGGGTATT	TAATTTTTAAT	TAAAAITATA	AAITTTTTTAT	6160
6161	AAAAAACCCCT	AAGAAATTTGT	AAAAAACTGT	TTAAGCAAGC	ACAAAAAGCT	ATACTTTTTAT	ACTTACTTTT	TTAAAAATTC	6240
6241	CATCTTTTAC	ATAAGGRGTA	ATCATAGAGA	TGAAAMTATT	TAAaACTTTA	AGTTCTATAC	TAGTTACATC	TGTTCTTTCT	6320
6321	GTGACTGTGA	TTCCCTCAAC	AITTTGCATCA	ACAGAATCTA	CTGCTACAAA	TCAGACACAA	CAAACAGTAC	TTTTTGTATA	6400
6401	TTCTCATGCT	CAAACCTGCG	GCGCTGCCGA	TTGGGTGATT	GATGGCTCTT	TCTCAGATTA	TGCAGATTCA	ATGAGAAAGC	6480
6481	AAGGTTACCA	AGTTAAAGAA	CTAGAAGGAG	AATCAAACAT	TTCTGAGCAA	ACTTTACAGC	AGGCGCATGT	ATTAGTTATT	6560
6561	CCGAAGCTA	ACAATCCATT	TAAAGAAAAA	GAGCAGAAAG	CAATCAITTA	TTTTGTTAAA	AWTGGTGGTA	GCGICAAITTT	6640
6641	CATCTCAGAC	CACTATAATG	CCGATCGTAA	TTTTAAATCGT	AITTGATCTTT	CAGAATCAAT	GAATGGTTAT	CGACGTGGCG	6720
6721	CATACGAAAA	TATGACTTAA	GATATGAATA	ATGAAGAAAA	GAATTTCTAAC	GTTATGCATA	ACGTTAAGAG	TTCTGATTTGG	6800
6801	CTCTCACAAA	ACTTCGTTGT	TCCGTTTTAGA	TATTAATGCAC	TTGGAGATAT	CAATACGCAA	AAATATCGITT	CAAGCAAAGA	6880
6881	TAGTTTTTGGT	ATTACTTAAAG	GTGTACAAAT	AGTTTCCGATG	CACGCAGGTT	CAACATTAGC	AATAACTGAT	CCTAATAAAG	6960
6961	CTAAAGGCAT	tATTTATATG	CCGGAACAIT	TAACGCATAG	TCAAAAATGG	TCTCACGCAG	TTGATCAAGG	TATTTACAAT	7040
7041	GGGGTGGCA	TCAACGAAGG	ACCTTATGTA	GCCATTTCAA	AAATCCGCAA	AGGTAAAGCT	GCAITTTATTG	GCGATAGCTC	7120
7121	CTTTGTAGAA	GATCGTTTAC	CTAAATACCT	TGTTGAAGAT	AATGGGAAAC	CTAAAAAAAC	GTACGATGGT	TTTTAAAGAAC	7200
7201	AAGATAATGG	AAAGTTAATTA	AATAATTTAA	CAACATGGCT	AGGTAAAAAA	GAATCTCAAT	CTTCTATGAA	AGATATGGGT	7280
7281	AITTAACTTG	ATAATAAAAC	ACCGCTACTT	AACTTTGTAGC	AACCTGAGAA	TTCAATTTGAA	CCTCAAAAAG	AACCGTGGAC	7360
7361	TAACCAATA	GAAGTTTACA	AAITGGTATGA	TCGTTCAACA	TTTTAAAAAA	GtTAGTTCTG	GAAGTAAATCA	ACGGGGTCTC	7440
7441	GACGATGGCG	TAGATGACAA	AAGCTCTTCT	CATCAAAAATC	AAAATGGCCAA	AGTTGAATTA	ACTTTaCCTC	AAAATTTCCA	7520
7521	CGaaMAYTTC	CTGATTTCTT	AITTAAATTTCT	GAACCTGaaAC	AACGGGCTGT	GAGTGAITTAC	TTAACGCGCG	TGTTTCAATA	7600
7601	GCaGATTCAA	TCAATAGTAG	CCCAAGATAA	AAMAGTAAAT	aAAATTCAAA	TTGATAGTTG	TGGCCAAGaa	ATCTTAGAGC	7680
7681	GTACCGCaGT	AGTAAITTAAG	AATCGTCAAA	TTGAGGCACG	TATTTGAAGTT	GGAITTACCAG	CACGAGGACG	TACCATATTA	7760
7761	GGTAGAATAG	CaAGACATAC	ACTTATTTAAT	GTATTACCTC	AMATAGTAGA	ACATGCCCTTA	TGTTATCGCM	ACATTAATAT	7840
7841	TTCACAAATTG	GRACAACaAG	TTGAATTTAAT	GATAGATCaA	gAGGAGAITTA	GACaACAGTT	AGTAAAACGT	GACCTTGTGT	7920
7921	CaTTTGTAGC	AAATGGTGTc	AITTTTACCAA	GAMaaAGTGG	TGTTTTCAGAT	CTCCCTATGA	aTAACGCTAT	TGAATTTAAA	8000
8001	AGTCTTAAAC	AATATGAGAT	TGATCTTATC	GAAACAAGACT	GCGTGCACATA	TGACAGCAGT	GTAAGATTTG	ATAATGGAGA	8080
8081	CTTCTTACAA	GGTTCTCCAT	TATGTAACATA	CTTAGTATCC	AAAITTAAAGA	GTAGTCTCCC	AITTAAACATCA	ATATATAATC	8160
8161	GTTTTAGGGTT	TGATTTTTGGA	ACTGTTGGCA	ATCATGAATTT	TAATTTATGAT	TTACCTTATC	TAAAAACAGAC	CATCAATCAA	8240
8241	CTTCAITTACC	CAGTTTTTGTG	TGCAAAATATA	AITTGAAAATG	CACAGCCATT	CACTGGCCAA	GGTATTCAIT	AITTTTAAAGT	8320
8321	AAATGGTTTTA	ACTATAGGAA	CTAITTGGATT	AACCACTCAG	TATATCCCTC	ACTGGGAACA	ACCTGATTTAC	AITTAAGACAC	8400
8401	TCACTTTTAA	CAGTGTCTATC	CACACATTTAA	AATCTGAGTT	ACCTACACTT	AGGGAAAAAG	GTGATATTGT	AGTAGTAAAGT	8480
8481	TATCATGGTG	GTTTTGAACG	TGATTTAGAT	AGTGGCCCTC	CGACTGAGGC	GCTTACTGGG	GAAAACGAAG	GGTaTGATAT	8560
8561	TCTAAGACAG	TTTAGCGATA	GTATCGATGT	GTTGATAACC	GGCCATCAAC	ATCGTGATAT	TGCACAATC	AAGAACCAAA	8640
8641	CAGCCATCAT	TCAACCAGGT	TCAAAAGGTA	CAAAAGTTGG	AAAAATAGTT	TTTTGAATATA	CACATGATAA	AAAAGTATTA	8720
8721	AITTAAAGAAT	GTACTTTAAT	GAATGTTTACT	AACAGTACCT	CTTTTAAAGC	GAATGACGAA	GATATCGCTT	TACGTAATCA	8800
8801	AITTGAAGAT	TGGCTTTGATA	CTCAAACTCG	AGAACTCCCC	TACGCTATGA	GAATAAACAA	TTCATTTGAG	CGACAAAAT	8880
8881	CACCGCATGC	AITTTGTTAAC	CTTCTTAAIT	ATATTTTTAIT	AGAAAAAAGT	GGTGCAGATA	TTGATGTAC	AGCACTATTT	8960
8961	GATTCGCGAA	ATGGCTTTGA	TGAGAAAGTA	ACCATGCGCG	ATATCATCAA	TAATTTATCT	TTTCTAATA	CTTTTAAAGT	9040

```

9041 GATAGAACTT AGTGGAAAAG ATATTAACT TGCAATTGAA CGAAGCGCAA GTTATTTTGA CATTGTTAAT CATAAAATCA 9120
9121 CAGTTAATAA AGAGTTTCTA GAACCTAAAC CTCAGCATTT CAACTATGAC ATATTTGCAG GTATCCAATA TACAATTCAT 9200
9201 GTTAGTCATC TTACGGTGAA CGTGTTAGTG ATTTACTPAAT TAATGATGCA CCACTACAAA GTGATCAAAAT ATATACAATA 9280
9281 TCGTAAATA ATATAGAGC TGTGTGGTGC GGAATTTATG ATATGTACGT TAACAAACCT GTGATAAAG ATATTCAAAT 9360
9361 CGAAGGTGCT CAATTGTAA TAGATTACTT GTCTCACAAT GATTTATCTC AAATCCCACA AGTGATTGAT TTCAAATGTTG 9440
9441 TTAAGTAATC CCTCGTTCTA TTAATAATCT ATTGATGAAA AGTTTGATTG TATAAAGAAA AATCCTTATA GAGGCGTCGC 9520
9521 CACACTACTA TAAGGATTTT TTAATAATCA TGAATATTCa TTAATGTGA TATGTTTCTT TTCATAAAGT TGATTAACAA 9600
9601 GATTAAGAAG CATACCCAAC ACTATAATTC CaCCAGATAT CAAAGTAAT TGAATGTAAG GTAACCCATAT TGATAATPAT 9680
9681 ATAGATCCAA TGATTGCACC AAGAAAATTA GCAACATGTA AAATAGAAGC TGCTAACGTA CTTGCAAGAA GTGGTGCCTC 9760
9761 TTTTGCACCT AAGATAAATTT TGCTATTAAAG TAACGGTGTG GTACCAAAATG TACCAAAACC GAATAAGAAG CAAATGATTA 9840
9841 ATGCTAATAT TGAATTTTGA ATAACAGTAA CAAATAGTAT GATTTGTTACA AATAGTAAAA GAAATGTGAG GTATAAATTT 9920
9921 TTTGTTAAT TATCTCCCGG TAGATTACCA GTAATTAAT TCCTATCAC ACCGCCTAGA CCAAAACATAA ATAAACAAAC 10000
10001 AGTTAAACCT ACAATTTTAA ATGGAGAAAA ATCTCGTATC ATTTGGCTCCA TAAATGTATA AGTAGTAAAC ACACCAGAGT 10080
10081 AACCAACAC AATAATtGCA ATCACAATTA AAATGTGTGG ATTTCTTAAAC ACTGTTAAT CTTTGCTAAT ATTTGCTTCT 10160
10161 GCACTTAAAG AACATTTTG AACAAAATTA ATCATTCCTA ACATAGTAAT GATTGCCAAC ACAATCATAA ATCCAAAAAC 10240
10241 AACTCTCCA TTTGCAAAG CACCTAAAA TGATCCGAAT GGTACcCTA ACATTACAGC AATAGTTAAA CCTGCCTGAA 10320
10321 CAAGTCAAT GGCTGTGTT TTTTtagcag GAGGTGCGAC TGTCGCaGCA AcACTCATAC ACACACCgAA GAATGGcGCA 10400
10401 TGATTGCSG CAGACATGAG TCTTGATAAT aACAATACAT TAAATTCGG TGCTAACATT CCCACTAAAT tACTTATPAT 10480
10481 AAAAACTGCT ACTAAAAATCG GTAACAGACG GTGGCGTGA ACTTTCaATG TTATGATTCG CATaAARGCC CTATCAATGC 10560
10561 AACACTAATA GCATAcACAC TAATTAATAA ACCTGCACTC GAAATAGAAA CCTTCATATC GTCAGCGATT TGTGTAAGTA 10640
10641 ATCTGTICAC TACATATTCa GCCATTCTA CTGTAATGT YCCTATCATA AAAATAATGA ACAACATTTT ATTATCTTTC 10720
10721 ATGAGTGTCT CCTCCCTtT CTTAATATCA AAAATCAATA TGAGTGATAT ATTATAAAAA AATCGTCTCA ATGTGAAGAG 10800
10801 TAAGTtYTCA AATTTTCATC TtCCTCAAAAT ATTAAATCICA TAAGTTTICA TCTYATtTC ATGTAATAAT ATTAAAGCAA 10880
10881 TTTATGATGA CTTGATATAA AGCATATGtT TAAATATGTC TGATTGAAT GATTTAATTT TGATAAATAA AATTGAATAT 10960
10961 TCATGAATA ATGCAATtT TTTGACGAAC TCTCTTATAA TACGCTTCT TTTCCCTGTT TGATCATPAT TAAATGATtT 11040
11041 tTTAATAACT CGACAATAAT TATCTTTAAG TTCATTTTAA TGTTTGAAG TAATTTGGTG ATCAGAAAAT AAAATAGTTA 11120
11121 CCTAAAAAT AATGGTAGTA TGGACAATGT AGTAGTATGT GATTAATTTT GATTGAATGA TAATCACAGT CCAAAATGTA 11200
11201 TATTTTTTTA AGTGGCTTAA TGAAGACGAT TTACATGTTT ATAATGAAAA ACTAACTGTT GCTTTACAAA ACCTTCGATA 11280
11281 TATTATATGA TATTAAATGT TGAATTTTG GAGGATACT CAAGTCTGGT TTAAGAGGCT AATCATTCGT GATTAGTAGG 11360
11361 AGCTTTTTCG TCGCGTGGT TCAAATCCTT CTCCTCCGC TAATAATATT GATAAAATGG CCTGAGACGA TAAATGTCT 11440
11441 CAGGCCATTT AACGTTTATG CATTAATAT CTCAATCTAA ATAACATTTA TTTCAATTTT CCTTCATTTT AACTAATAT 11520
11521 AAAGTAAaAT AGTATATTCa ATGAAATTTG GTTCCACTCT CTkttTTAT TTAATCGAAC TTCACGATA CATTTCTTCT 11600
11601 TCATTATGTT ATTTGCTTAA CACTACGCTG TACCTCAIT CACTCCTtTT TCACGTAAAA GTaATAGICA CATTTATCTTA 11680
11681 TTTCTCATGT ACAAATCACA TAATATTCAT AAITTCATTT TGATTACAAA ACACCTACCA ATGTTTTACG AATGAGAATA 11760
11761 TAAATaTTTC GCGTTTATAG TAAGTTtTCA AAATATAAAA TAAGCACCTA TACTTAATTA GTATAGATGC TTTTATTTTAT 11840
11841 ACAAACAATA ATGAAAGAAM ACAATCATTA TTCCTTTAAA AITCGCAAAA GAACAAACAT tGCATATGTT AAACAGTTAT 11920
11921 TTATACGGT ATCATTCGAA TTTATGcCT TAAAACATGT ATACAATGAG TTTTACTATT TTTATAATTT TATTATAAAT 12000
12001 GTATTTGCAA ATAAAAAATA TTTaGCAAAA CTTAAAAAT GATTACTTCA TCTAAATAAT CTCAAATTTAA ATaACTGTTG 12080
12081 TCAACTACA 12089
    
```

2. Sequenzierung mit SCos1reverse-Primer und fortfolgenden:

A: Schematische Darstellung der identifizierten offenen Leseraster



B: Ähnlichkeiten der möglichen Proteine zu bekannten Proteinen

ORF	Ähnlichkeit zu	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	Keine Ähnlichkeit			201
2	Glycin-Betain-Transporter ( <i>B. halodurans</i> )	66/48	BAB07614	675
3	TypI-Kapsel-Synthese-Gen CapK ( <i>S. aureus</i> )	32/56	AAA64650	573
4	Konserviertes hypothetisches Protein ( <i>S. aureus</i> )	79/90	BAB43787	950
5	Keine Ähnlichkeit			168
6	Drp35 ( <i>S. aureus</i> )	76/87	BAB43786	705
7	Konserviertes hypothetisches Protein ( <i>S. aureus</i> )	71/81	BAB43785	612
8	Untereinheit der CytochromC-Oxidase ( <i>Bacillus firmus</i> )	35/56	AAA22367	171

C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs

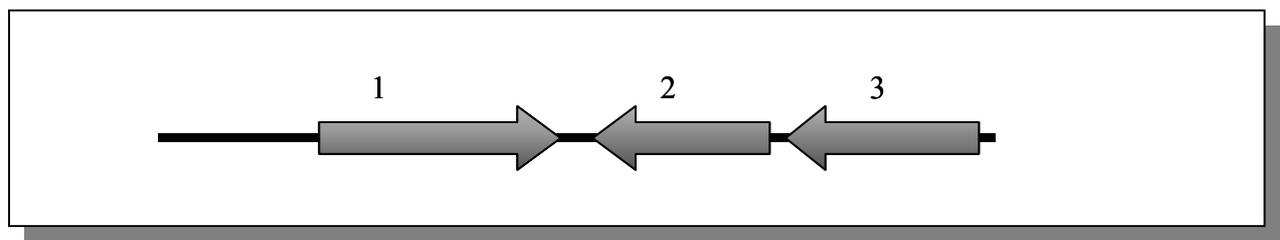
	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	ATGGCTACcA	TCAARRtAGT	aATtRAGAKT	TTRGTGARAT	tRITtAITTAGG	GACATCAaAG	AGAtGGITTTA	RTCCACCACC	80
81	GAtTTGCRtA	AKTCCCAAAC	CAATCGACGT	AGCAATtCCC	ATGACGGTtTG	CGATAaTaGC	KAAtATAtCA	aTRAtGTtCC	160
161	TGARAGgCGT	TTAtRAGCKT	CACCAARaC	GGGtTCCATA	GCTGtTGARA	TAAGCCCGtT	ACGtTGTtTTT	CTAAAtTGAR	240
241	AGTaTGCRCAC	GRtTAAtCCCT	GARAtTGCRA	AtRtTtGAOCA	TtTGtGAAAtA	CCCCAAtGGR	AGARtGTAtA	TCCCAtCGCg	320
321	ACACGtGCTG	AtTCTtTCAGA	GtGAKCtGCR	AtTtTtCCAG	GGRAGGGtGA	RtGGgGAtaA	TGCgtTARAG	GtTCTGcGAC	400
401	ACCCCAAAAG	ACTAtACCGA	CGCCAAGACC	TGCTGAgAAt	RACAtGCCAA	TCCAAGAtAG	CAtGGRAAt	TCTGGtTCTt	480
481	CtTCAtCCGA	ACCAAGtTTA	AAtCGACCA	AtCTAGAAAA	AGCTAAGAAt	AtTtAAAAAtA	CAtCTAAaAc	AAAGACAAtG	560
561	AtAAGGAAtA	GCCAACCAAA	CCAAtTtGtA	AtCCGAtCAt	AAACGCTCTG	cGCAtACAtC	CCAAAtGCtT	TAGGAAAGAt	640
641	ACCOGCAAtA	AGAGtAAtAA	CAACAAtAA	TAAaACAGAG	AtAGtATAAA	CAAGCGtAtT	GtTtTAtTtTt	CGtTtGtTtTt	720
721	TCAtTtTtAA	AtTtTtTtAtT	AtCCCTtTtT	AACTtGAAAA	GtAtTtGtTtT	AAAGtAtACA	GAtAAtTtAGA	AAtAtTtTtCA	800
801	AAAAtACTtT	TtGGAtTtTAA	AAtGAtTtTtA	TAAAtAAAGAG	AtTtTtGAtTt	AGAGAGtCT	GtTtGtAtAtG	AtAAAAGtAt	880
881	GAtAtTtAAcG	AGAtGGGtGA	CAAAAtGtAt	AAAtAtTtTAA	MaGAAAtCG	AtTtCTCAACA	CAGActTtCAA	TtAtTtAAAAMA	960
961	TGACGCTCAG	CAACCTGtTG	GtAtGAtAtC	GAAAGtGtAt	AAVaaTtTtA	TtCAAAAAtG	TAtTGGtTAt	TtGACCTtAG	1040
1041	GtTtTAAaAtT	AAAtCAAtAt	GAGAtAtGtG	AtGtGAAtAA	TAAAtAGtGA	GCTtTAtAtTtA	AGGtAtCGCG	AtAtAtGGAG	1120
1121	AAAaaCAAtT	TtAAAGtTGA	AtAtCAAtGAt	TCAAAAGGtA	GCGAGtGtGA	AGCGtTAtTtT	GAtAAGCAAA	GtAAAtGGtTtA	1200
1201	TGAGGAGACG	TAtGGAAAtT	TAAAaaTtGA	CGGtAtAAAt	TtAAAtAtTtC	AtGCTAAAtGA	GAAACAtCAt	ActActAtCA	1280
1281	AAGAtATAAA	GCGAGAtACA	CAAAAtGCGA	GtTtGGAAACA	AAAtGGtGAt	TAtGCTtAtG	CAGAAAGGAA	TGAtGGGCTA	1360
1361	TtTtAAAGAAC	AtCAAtTtAct	CtAtAtTtCtT	AtCAAtGCAG	CtTtTtGCTAA	TACAtAtGtG	AGCAAAcGtC	AAACGAActT	1440
1441	GAtGtTtCCCA	GGCCACCTG	TtTtAAAGtAC	AtACAAGAA	GAtTAtGtGAA	CtAAGAGAct	AtTtGgaTtCY	CCTAAAtCGGA	1520
1521	TCTtGtAtCT	tCACGAtGtCG	AtAGCTtTGA	TtGCTcAGtT	AWCCtTtTAC	GAtAtC		1576	
	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	TtTtAaaCGAC	GtTtGCCAtTC	TtCAAtTGCTA	AtAtGAtGAC	GGCAACGtA	GCGAtTGCcG	TCAAtGtTtTG	CACAAtCAAtA	80
81	CGAACAtGCA	CCTAAAtAtT	TtTtCTtCAAt	TtCTtTCAGaa	ACAAGAAAtT	GtTtTAtTACA	TtCAGGGtTtT	GCACAAtTAA	160
161	TGTAACGtTC	ACAAGGtGtT	CCAtCAAAAt	GCTCtTtTGCC	GAtGActGtT	TtAtCAAtTtT	GAtTCACAtC	GACActAAtA	240
241	CGtTCGtCA	AtACAtACAt	CtTtACCAAtC	CAAtAtTtGCC	CtTtTtAGtTtC	AGGgTtCtTtA	COGtAtGtAG	CAAtACCACC	320
321	AtGCAActGA	CCTACGtTtT	CAAAAtCCtTC	TtTtActTAAc	CAACCAGAAA	AtTtTtTtCGCA	ACGAAtGCCA	CCTGtTACAAt	400
401	AtGtGACAAt	AtTtTtTtCCG	TcGAGtTtGtT	CtTtTtAtTtAt	ACGCACCCAt	TcAGGtAAAG	CACGGAAtCG	TGtTAtAtCA	480
481	GGACGAAtAG	CtCCACGGAA	AtGtCCtTAA	TcGtAtTtCGT	AAtCAAtTtCG	AGCAAtCAAt	AtAACAGtAt	TtTtCAAtCtTC	560
561	TAAAtGCGCT	TtAAAtTtCtT	TAGGAGAA	GtAtTtTtACCG	GtAAtTtTtCAC	GtGGAtTtAAt	AtTtCtCtTtC	AAGtCGAGtG	640
641	CAACAAtTtTC	ACGtCtTtGGA	CcGACGtGCA	TcTtTtTtTAA	CcGAtGActT	TcAGCtTtCA	CAAtTtTtTAA	AGtTAAAtCA	720
721	GCAAAACGAt	TAtCTGCAAtG	CAtAtGCTCt	AtAtAtTtTtAt	CAGtAtCtTtC	TtTtAGtTtCCA	GAtAAtGtTtC	CAItTAAAtGCC	800
801	TtCCGtTtGAA	ActAGtAtTtC	TtCCtTtTtTAA	AtGAtGtTtCC	TtCAAAAAtT	TtAAAtGtTtC	GcGtCGCaAAA	gTtTcAGGGT	880
881	CAtCTAtAGt	TACAtAtTtTtA	TAAAtAAAGtA	GtActCtTAtA	AtCCAtAAAt	CtGtGCTCCT	CtTtTtAGtCAA	TtTtTtAGtTAA	960
961	TtTtAAAGtA	TtTtGAaGtTtA	TAtAAAAaAA	TGAtAGtGAt	TGAVGtTtTAA	AAAtTtAGAtA	TtTtTtAAtAtT	GtAtCAAAAt	1040
1041	GAGAAAtTtAct	TtCAAtTtAAGA	tAGCCtTAtAA	AtcGtCCAtT	TGACCGAtAt	AAGAYGtGAt	TGtBtTtTtCA	AtAtGAAtAA	1120
1121	MAGtGtAGtT	GtGtAGCtAt	AAtGACAtTtT	AAtAtAAAtY	TtTtTtAAAt	GAGAAAtAAAG	TCACTGAAtA	AAGAGAGGAA	1200
1201	TCCAAtCGAt	GGCAAAAtCAA	AAAtTtACCA	CAItTtAAAtA	TActCGtTAA	TcAGAAAGtG	CAGtGCCAAt	TGtGtCACAAA	1280
1281	AGtGAAtTtG	AAACGGtTtAAC	AGCAGACCG	TGGGtGAAAA	TtTtCGAtAA	AGGgTtTtACAA	CtAGAAGGAC	TtAAtTtTtTAA	1360
1361	TcCGGAAAGG	CAGtTtAtTtC	TAtTtAGACG	GtTtTtGAGGG	AAAtTtTtTtTtA	AAGtTtAAAtCC	CcCAACAAAA	GAGGtTtACAA	1440
1441	CAAAAtTtTtCA	GtCtGtTtTAA	GAtAAtCCGG	CAGCGAtTtAA	AGtTACAtAA	GAtGGtCGtT	TAtTtTtAtCtG	TtAtCTAGGt	1520
1521	GAtTtTtTtAAGA	CAActGGAGG	CAtAtTtTtCG	ACAACAGAAA	AAAGGtGAAC	AAAtAGAAAG	AAtTtAtTtTtC	GAtTtTtAAAtA	1600
1601	CAGAAAtTtTG	TAtTtGAtGAC	AtGGtTtTtGA	CAGTAAAGG	GGAtTtTtAtT	TCACTGAtTtT	TAGAGGGtAt	TCTACACAAC	1680

```

1681 CTTTGGGCGG TGTTACTAT GTAGATCCAG ACITTAAGAC GGTACGCCA ATTATTCAA ATATTCTGT GCGAATGGt 1760
1761 ATTGCITTA GTACGGATGA aAAAGTGCTA TGGGTAACCTG AaACTACAAC TAATCGACTT CACCGAATCG CATTAGAGGA 1840
1841 TGATGGTGTG AITATTGCAC CATTTGGAGC GACAATACCA TATTATTTTA CAGGTCATGA AGGACCGGAT TCTTGTGTGA 1920
1921 TTGATAGTGA TGATAAITTA TATGTAGCTA TGTATGGCCA AGGACGTGTA TTAGTTTTCA ATAAGAGAGG TTATCCTATA 2000
2001 GGTCAAATTT TAATGCCAGG ACGTGATGAT GGAAAGATGT TACGTACAAC ACATCCACAA TTTTATACCTG GTACAAATCA 2080
2081 ACTTATAAAT TGTACTAATG ATATTGAAAA CCATTTCTGAA GGTGGATCTA TGCITTTATAC AGTTAATGGT TTTGCTAAAG 2160
2161 GATATGAGAG TTATCAATTT CAATAAACTC TTGAAAAAGC GTATAGAATA AGTTGTTATG TATAAATAAA AGAAGTAGAA 2240
2241 CAAGGTTGA ATAAaACTTT ATGTTCTCA CTCGTATAGC TTAATTTGAA AAMTTGATAC AACTCAITGT ATTTTCTAIT 2320
2321 AATGCAACGA TTGCCATAAA TAAATATGCC TGAGACATTT AATGTGTCCC AGGCATTTAT aAYAcgYSTY CYtgIMHtTY 2400
2401 aCYGTcAAag AcAAaAGCcT AASAcAMtYY YCcMMACaC VCCGgYYTAA YtgTCGAYGc YAAAYCYgC cGAcGCcTCa 2480
2481 MATtTYaCST YTTIMCCYAA CAtCACGCCA CCaGTYTCYA AaGCYTGgYT AAMATtAAtA CCATATtTYy CGCgGTTAAT 2560
2561 TGTTCACAYA ACgATAAAAC CaGTGACTTG TTGTCCATTC AITGGATTTT YACYTACACC ATTAaAITCA ACATCAAAATG 2640
2641 TCCTtCATG AGTYTCACCY TTAATTGTCA AATCTcCaAC YACYTGAYTt TcGTyAATTT CYTTAGITAC AAATGTCAIT 2720
2721 TTATCGTTGT CTtCTGTACC AAAGAMATG TtTGABCYYA AATGGTTGTC tCTGTCCtCA TTTTGAGTGT CAAITGAACT 2800
2801 TGAATAAATA GTAGCTGTTG CtTTTAGTGA AGTTAAATCA TTAATAITCtC CATCTAATTG AACATCGAAT TGCTTAAATG 2880
2881 TTCCTTTTAC TTGGGACACC ATAAGATGTT TAAITTTAAA CTGAATATCA CTGTGAACIT GATCAAAGTT AAATTTTGTG 2960
2961 AITATTATAA CCCCCTcCY CTTTATTACA ATAATTAGT TTCYTGTACT TGTATTtCtA GATACAGTAA GATGACTTAT 3040
3041 CAATTTTTTT GCTcCAITTA AAMTTACGGC TTTTIAAACC AITTTTTTTAG TGtGTCTATA TTACTATATt CGTTAAAAAG 3120
3121 AAATGAAGTA TACATAAGAG AATGATGATA TTTGGCAATC AACAGTAAAT ATATCTTCCA GAAAAATGIT GtGAAAITTC 3200
3201 ACATAAATAT AAAAAAGAAC ATGIGATTGT TGATTGAGG TTGCTCATAG TGAGGATTAT TGAATTATAA ACTAAAAATA 3280
3281 TTTCAITTA TACTGAAGTA AAATAACGTA TGTCtCAAAA AATAAITAAA CACATACAIT TTCATTTGAC ATTGCaAITA 3360
3361 GAAGaAGTa ACATAACAIT AAATCGTAAT TTTTACGAIT TGGGAATGAT ATAGAGATGA TGGTTGgATG AATATAAGAK 3440
3441 GGACATATCC GTCCTGTCT AITTTAITTTG AAGTGCAAC AAAGTAAAA TTCTTCAATA CCTCATATAA TACATCAAIT 3520
3521 GACCATCATC TAITATATTG TTCTTTTAT GTTTAGITTC CTTTAITTC TAActCTTTT TAITTTCACT CGTCTTAGGA 3600
3601 CGGGTGTTTT TTATAGTAGA GTTATGAAAT TGITCAAGGT TCCGTTCGAT TATATTCTGA AAITAAATCA ATTCATAGAC 3680
3681 TTCTTCGTAT CTATGATGAC TTGCAACATG GAATTTTAAA TGGCCTTTAG TACAATGAAC ATAITTATAT AAAGAGTAAA 3760
3761 GGAGTTAAAC TACGTTTTTA AAAATGTATA ATGAGATGAT AITtAAGTTT GTTTTTATAT AAAGAGAGAT AAACITTAIT 3840
3841 TTTATATAGA AACGGTGTt ATAAAAaAta AAITGTgACG GAATCGTGTG ATTAGITATT TTAAATF..... 5416
    | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80
    
```

**3. Sequenzierung mit icaRrev-Primer und fortfolgenden:**

A: Schematische Darstellung der identifizierten offenen Leseraster



B: Ähnlichkeiten der möglichen Proteine zu bekannten Proteinen

ORF	Ähnlichkeit zu	Ident/Ähnl. %	Accession No.	Länge bp
1	YfhI ( <i>B. subtilis</i> )	44/62	BAA24475	1005
2	Hypothetisches Protein ähnlich zu Lactokokken-Phosphatase ( <i>S. aureus</i> )	59/74	BAB41360	945
3	Hypothetisches Protein ( <i>S. aureus</i> )	75/83	BAB41359	1152

C: Nukleotidsequenz des sequenzierten Bereichs

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	TGTAGTTGAC	AACAGTtATT	TAAATTGAGA	TTAITTTAGAT	GAAGTAATCA	AITTTTTAAGT	TTTGCTAAAT	AITTTTTTATT	80
81	TGCAAAATACA	TTTATAATAA	AAITATAAAA	ATAGTAAAAC	TCATTTGTATA	CATGTTTTTAA	GGtCATAAAT	TGCAATGATC	160
161	ACCGTATAAA	TAACtGTTTTA	ACATATGCaA	TGTTTTGTTCT	TTTGCGAATT	TAAAGGAAT	AATGATTTGK	TTCTTTCAIT	240
241	AITGTTTTGTA	TTCTTAAACC	AGACTTGAGT	ATCOCTCCAA	AAITTCACA	AITTAATATCA	TATAATATAT	CGAAGTTTT	320
321	GTAAGCAAC	AGTTAGTTTT	TCATTTATAA	CATGTAATC	GTCTTCATTA	AGCCACTTAA	AAAAATATAC	AATTTGGACT	400
401	GTGATTATCA	TTCAATCAAA	AITTAATCACA	TACTACTACA	TTGTCCATAC	TACCATTAAT	TTTTAGGTAA	CIATTTTTAAT	480
481	TTCTGATCAC	CAAAATTACCT	TCAAACATTA	AAATGAACIT	AAAGATAAAT	AITTGTCGAGT	TAITTAaAaAa	TCATTTAAT	560
561	ATGATCAAAC	AGGGAaAAG	AGACGTATTA	TAAGAGAGTT	CGTCAAAaAA	TTGACAITTAT	TTCAATGAATA	TTCAAITTTTA	640
641	TTTATCAAAA	TTAAATCAAT	TCAATCAGAC	ATAITTTAAaC	ATATGCTTTA	TATCAAGTCA	TCATAAAITG	TCTTAATATT	720
721	AITTACATGAA	AAATRAGATGA	AAACTTATGA	GAITTAATATT	TGAGGaAGAT	GAAAATTTGA	RAACTTACTC	TTACACAITGA	800
801	GACGAITTTT	TTATAATATA	TCACTCATAT	TGAITTTTGGA	TAITTAAGaAa	AGGGAGGAAA	CACCTCATGAA	AGATAATAAA	880
881	ATGTTGTTCa	TTAITTTTTAT	GATAGGRACA	TTTACAGTAG	GAATGGCTGA	ATATGTAGTG	ACAGGAIITAC	TTACACAAAT	960
961	CGCTGACGAT	ATGAAGTTTT	CTAITTTCAG	TGCAGITTTA	TTAGTTACTC	TGGTGTGTTT	ACTACTTATA	CATTTATGGA	1040
1041	GCCAATGATA	CGAGAITTTTT	CITCAITTTAA	AAITGTAGGT	TTAACTGTTT	GTTTTATTAT	GTTTTGGICTA	GGCGGTGTGA	1120
1121	TAGGGAATTT	AATTTACTGGT	AAITCTACCG	AAGATAAAAT	AACAaaaaAT	TTATACCTCA	CAITTTCTTTT	ACTAITTTGTA	1200
1201	ACAATCATAC	TATTTGTITAC	TGTTAITTCAA	AAITCAATAT	TAGCAITTAAT	CATTTGCTTC	TTATTCGGTT	TTGGTACAIT	1280
1281	TGGTACAACA	CCGTTACTTA	ATAGCAAAAT	TATCTTAAGT	GCAAAAGAAG	CACCCTTCT	TGCAAGTACG	TTAGCAGCTT	1360
1361	CIATTTTCAA	TGTTGCTAAT	TTTCTTTGGTG	CAATCATTTGG	ATCTATATTA	TTATCAATAG	GGTTACCTTA	CATTCAAAIT	1440
1441	ACTTTGATAT	CTGGtGGAAT	TATAGTGTG	GGTATGCTTC	TTAATCTTGT	TAATCAACTT	TATGAAAAGA	AACATATCAC	1520
1521	AITTAATGAA	TAITTCATGAT	TAITTAaaaa	TCCTTATAGT	AGTGTGGCGA	CGCTCTATA	AGGAIITTTTC	TTTATACAAT	1600
1601	CAAACITTTTC	ATCAATGAGA	TTTTAATAGA	ACGAGGGAIT	ACTTAACAAC	AITGAAATCA	ATCACTTGTG	GGAITTGAGA	1680
1681	TAAATCATTG	TGAGACAAGT	AAITCTAITTA	CAAITGACCA	CCITCGAITTT	GAATATCTTT	TATCACAGGT	TTGTTAITTAG	1760
1761	TGTgTATGCT	AITAGTGTG	CAITGATPAG	GCYTTaATGC	GAATCATPAC	AITGAAAGTT	CACGCCACC	GTCTGTTACC	1840
1841	GATTTTATGTA	GCGATTTTTTA	TAATAAGTaa	TTTTAGTGGGA	ATGTTAGCAC	CGAATTTTTAA	TGTAITTGTa	TTATCAAGAC	1920
1921	TCATGTCTGC	SGCAATGCAT	GCgCCAITTCT	TCCGTTGTG	TATGAGTgTT	GctGCGACAG	TCCGACCTCC	TGCTAAAAAA	2000
2001	ACACAGGCCA	TTGCACTTGT	TCAGGCAGGT	TTAACTAITG	CTGTAATGTT	AGGtGTACCA	TTCCGATCAT	TTTTAGGTGG	2080
2081	CTTTGCAAAAT	TGGAGAGTTG	TTTTTTGGAIT	TATGATTTG	TTGGCAATCA	TTACTAITGTT	AGGAATGATT	AAAITTTGTT	2160
2161	CAAAATGTTTC	TTTTAAGTGA	GAAGCAAAATA	TTAGCAAAAGA	AITTAACAGTG	TTTTAAGAAATC	CACACAITTTT	AAITTGTGATT	2240
2241	GCaATTATTTG	TGTTTTGGCGA	TTTTGAGTATC	AAGCCAATCT	TCCAATTTGAT	TACGTAAAAGC	GATATCTTCG	TCAITTCGGCT	2320
2321	TAAAGGAGGT	ACTGTTTATGA	ACAITTCATTA	AGITCAAITTC	TTTTAATTAAT	ACTTTTTTTAT	CATGTGTATA	TTCAAAAAAT	2400
2401	AITTTTTCCAA	CTTTTTGTACC	TTTTGAACCT	GGITGAATGA	TTGCTGTTTG	GITCTTGATT	GTCGCAATAT	CACGATTTG	2480
2481	ATGCCCGGTT	ATCAACACAT	CGATACTATC	GCTAAACTGT	CITPAGAAAT	CaTACCCTTC	GTTTTCCCCA	GTAAGCGCCT	2560
2561	CAGTCGGGAG	GCCACTATCT	AAATCAGTIT	CAAAACCACC	ATGATAACTT	ACTACTACAA	TATCACTCTT	TTCCCTAAGT	2640
2641	GTAGGTAACT	CAGATTTTTAA	TGTGTGGATA	GCACTGTTAA	AAGTGTGTT	CITTAATGTAA	TCAGGTTGTT	CCCAGTGAGG	2720
2721	GATATACTGA	GTGGTTAATC	CAATAGTTCC	TATAGTTAAA	CCAITTTACTT	TAAAATAATG	AATACCTTGG	CCAGTGAATG	2800
2801	GCTGTGCATT	TTCAATTTATA	TTTTGCACACA	AAACTGGGTA	ATGAAGTTGA	TTGATGGTCT	GTTTTAGATA	AGGTAAATCA	2880
2881	TAATTTAAAT	CATGATTTGCC	AACAGTTCCA	AAATCAAACC	CTAAACGATT	ATATATTGAT	GTTAATGGGA	GACTACTCTT	2960
2961	TAATTTGGAT	ACTAAGTAGT	TACATAATGG	AGAACCITGT	AAGAAGTCTC	CAITTATCAAT	CTTTACACTG	CTGTCAATAGT	3040
3041	GCAAGCaGTC	TTGTTGATA	AGATGATPAG	CTTTTAAACAA	ACCCATAGGt	AAATCTTTTTT	CTCTGTATGA	AAAAICTGTT	3120
3121	GGAAATATAA	AACCGTGGaC	ATCACTAAGG	aTATPAGAAAG	CaAITTTGAGA	CAITGAAITTA	ACCTCCTCAA	GTACGGGGaA	3200
3201	GAGACATAGT	TTTTGTGATAT	ATAAAITPAA	AACAATGTCT	CACTTTTTAAA	CACTAAGTTA	TTATCCGGTGT	TAAAATTTTTT	3280
3281	CAITTCATTTT	TTGAGITTAAT	AGAATTTTTTT	TCCCTTGTITT	AACACGAATA	TTAGCATCTT	TAATTTCAATC	TGTCACITTTA	3360
3361	GCTGTGAGTG	TGAATGAGGC	TTCAACCCGT	CCAITTTGTTT	TAATTTGATTTG	GCCAGGACTA	TAGCCGGGAG	TAITTGAATTTG	3440
3441	GtTACGGTTA	GAAGAAAAGC	TACCGaITTTG	TTTTACCTCCA	TCTTTATAAA	GTCCAACCTCT	TACATCGTTA	AITTGTGCTAT	3520
3521	TAGGCTCATA	TCCCGTGTG	TTGATTTGTA	AITTGAAGGG	ATGATGCGGT	TGGATAITTTT	GAGGtAAAGT	TAAITTCAACT	3600
3601	TTGGCAITTTT	GAITTTTGATG	AGAAGAGCTT	TTGTCACTTA	CGCCATCGTIC	AGCACCCCGT	TGATTTACTTC	CAGAACTAaC	3680
3681	TTTTTTTTAAA	TGTTGAACGA	TCATACCATT	TGTAAACITTC	TAITTGGGTTA	GTCCACGGTT	CTTTTTGAGG	TTCAAITGAA	3760
3761	TTCTCAGGTT	GCTCAAAGTT	AAGTAGCGGT	GTTTTAITTAT	CAAGTTTTAAT	ACCCATATCT	TTCAATAGAA	AITTGAATTT	3840
3841	TTTTTTTACCT	AGCCATGTG	TTAAAITTATT	TAATAACTTTT	CCAITTATCTT	GTTCTTTAAA	ACCATCGTAC	GTTTTTTTTAG	3920
3921	GTTTCCCAIT	ATCTTCACGA	AGGTAITTTAG	GTGAACGATC	TTCTACAAGG	GAGCTATCGC	CAATAAATGC	AGCTTTACCT	4000
4001	TTGCCGATTT	TTGAAATGGC	TACATAAGGT	CCITCGTTGA	TGCCACCCCC	AITTGTAAATA	CCITGATCAA	CTCGGTGAGA	4080
4081	CCAITTTTTGA	CTATGCGTTA	AAITGTTCCGG	CATATAAATa	ATGCCITTAG	CTTTAITTAGG	ATCAGTTAAT	GCTAATGTTG	4160
4161	AACCTGCGTG	CATCGAAACT	GAITTGTACAC	CTTTAGTAAAT	ACCAAAACTA	TCTTTGCTTG	AAACGATATT	TTGCGTATTG	4240
4241	ATATCTCCAA	GTGCATTTATA	TCTAAAGCGA	ACACCGAAGT	TTTGTGAGAG	CCAATCAGAA	CTCTTAACTG	TATGCATAAC	4320
4321	GTTAGAATTC	TTTTCTTTCAIT	TAITTCATATC	TTTTAGTCATA	TTTTGCTATG	CGCCACGTCG	ATAACCAITC	AITTGAITCTG	4400
4401	AAGAATCAAT	ACGATTTTAAA	TTACGATCGG	CAITTATAGTG	GTCTGAGATG	AAAITGACGC	TACCACCATW	TTTTACAAAA	4480
4481	TTAATGATTTG	CTTTCTGCTc	AITTTCTTTTA	AATG					4514
	10	20	30	40	50	60	70	80	

Für die Sequenzierung des Bereichs wurden folgende Primer verwendet:

<b>Sequenzierprimer</b>		
Name	Sequenz 5'→3'	T <sub>m</sub>
SCos1forw.	cgg ccg caa tta acc ctc ac	61,4
1072cosf2	cga ttg tgc aaa gaa aaa ctg	54
1072f3	gac ttc ttg gct att ctt ccc	57,9
1072f4	gtc gtg atg taa gtg ttt g	54,5
1072f5	atg aac gtg cca atc act gc	57,3
1072f6	cgc aca cag taa cgc tat ag	57,2
1072f7	ccc tgc cac tca aaa cat ttc	57,9
1072f8	gct gct gca tcc aca tct cca	61,8
1072f9	gtt aag caa gca caa aac gc	55,3
1072f10	tct cac gca gtt gat caa g	54,5
SCos1rev	gcg gcc gca taa tac gac tca ct	64,2
1072cosr2	cgc tct gcg cat aca tcc c	61
1072r3	caa acg aac ttg atg ttc cc	53,7
1072r4	Gca aaa cga tta tct gca tg	53,2
1072r5	Gga ggc ata ttt gcg aca ac	57,3
1072r6	cct cac tcg tat agc tta att	54
1072r7	gct ctc att aaa ttt acg gc	53,2
1072r8	gac gga atc gtg tga tta g	54,5
1072icaRrev	cta gta tgt aac aaa ttc gag	52
IcaRr2	cca gac ttg agt atc cct cc	55,3
IcaRr3	gtg ttg cat tga tag ggc	54,5
IcaRr4	cac cac ttc ttg caa gta cg	57,3
IcaRr5	gat gat atc gcg cat ggt tac	61,8
IcaRr6	ggc cag tga atg gct gtg cat	61,8
IcaRr7	tgt cat cta cgc cat cgt ca	57,3
IcaRr8	ggc att ata gtg gtc tga g	54,5

## Anhang II: Sequenzbereich aus *S. epidermidis* RP62A

In der folgenden Tabelle sind bekannte Proteine aufgeführt, die signifikante Ähnlichkeiten zu den möglichen Proteinen aufweisen, die im ca. 255 kb-großen Bereich in der Umgebung des *ica*-Operons (ORF 75-78) bei *S. epidermidis* RP62A identifiziert wurden. Im Anschluß sind die offenen Leserahmen graphisch dargestellt und möglichen Funktionen zugeordnet.

# ORF	Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit	Organismus	I/Ä %	Accession No.	Länge bp
1.	TagF Teichonsäurebiosynthese Protein F ORFID:SA0244	<i>B. subtilis</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. aureus</i>	26/47 23/42 27/50	P13485 AAD56434 BAB41468	1779
2.	Ähnlich zu Bakteriophagenprotein SPP1 ORF37,1		33/52	NP046673	1335
3.	ORFID:SA1222~Teil aus Transposase	<i>S. aureus</i>	67/83	BAB42482	165
4.	Evtl. Tetrahydrofolylpolyglutamat-Synthase	<i>Campylobacter</i>	41/48	C81312	174
5.	ORFID:SAS091~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	44/71	BAB43800	279
6.	Zuckerkinase	<i>E. coli</i> O157:H7	33/51	AAG57157	936
7.	Mögliches Transportprotein	<i>Streptomyces coelicolor</i>	30/55	T35663	1164
8.	Hypothetisches Protein	<i>E. coli</i>	43/61	AE005436	984
9.	IS257	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	100/100 94/94	C60634 AAB39825	597
10.	ORFID:SA1528~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	32/55	BAB42795	429
11.	ORFID:SAP004~CadD	<i>S. aureus</i>	93/97	BAB43874	615
12.	ORFID:SAP005~CadX	<i>S. aureus</i>	93/95	BAB43875	321
13.	Pos Regulator tra Operon [Plasmid R100]	<i>E. coli</i>	34/57	NP052945	195
14.	Keine Ähnlichkeit				150
15.	Transkriptionsregulator ArsR Familie Homolog yozA	<i>B. subtilis</i>	37/58	E69930	357
16.	Teil aus Transposase	<i>S. aureus</i>	84/94	BAB41280	126
17.	Hypothetisches Protein	<i>Thermotoga maritima</i>	44/67	B72392	228
18.	Kapsel Polysaccharid Biosynthese Homolog yvfC	<i>B. subtilis</i>	25/43	D70037	243
19.	IgA1 Protease	<i>S. sanguinis</i>	30/50	CAA73855	165
20.	keine Ähnlichkeit				198
21.	Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	67/74	BAB47513	309
22.	Chloramphenicol Resistenz Protein Homolog	<i>B. subtilis</i>	28/50	A69746	1137
23.	a) Transkriptionsregulator Malolactatfermentation b) ähnlich zu Transkriptionsregulator LysR-Familie	<i>L. lactis</i> <i>S. aureus</i>	23/45 25/47	P16400 BAB43424	804
24.	Hypothetisches Protein	<i>Saccharomyces</i>	33/50	NP014886	729
25.	Dihydropterin Pyrophosphokinase	<i>Plasmodium</i>	34/56	CAC24559	459
26.	Hypothetisches Protein	<i>Plasmodium</i>	26/42	T18489	597
27.	Invertase Recombinase	<i>E. faecalis</i> <i>S. epidermidis</i>	75/92 75/92	AAB08926 AAK38455	150
28.	ORFID:SA0281~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	81/90	BAB41505	336
29.	Transposase Transposase, IS200 Familie	<i>B. halodurans</i> <i>S. pneumoniae</i>	74/86 72/84	BAB03895 AAK75178	597
30.	Evtl. Transkriptionsregulator	<i>P. aeruginosa</i>	37/55	P31078	444
31.	ORFID:SA0182~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Indol-3-Pyruvat Decarboxylase	<i>S. aureus</i>	72/85	BAB41403	1659
32.	Hypothetisches Protein, ähnlich zu CapA	<i>S. pyogenes</i>	30/51	AAK33754	1164
33.	ORFID:SA2422~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Tributyrin Esterase	<i>S. aureus</i>	74/87	BAB43727	756
34.	ORFID:SA2424~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Transkriptionsregulator Crp/Fnr Proteinfamilie	<i>S. aureus</i>	60/81	BAB43729	684
35.	ORFID:SA2426~Arginine/Ornithin Antiporter	<i>S. aureus</i>	82/92	BAB43731	1407
36.	ORFID:SA2427~Ornithin Transcarbamoylase	<i>S. aureus</i>	82/90	BAB43732	1053
37.	ORFID:SA2428~Arginin Deiminase	<i>S. aureus</i>	84/93	BAB43733	1239
38.	ORFID:SA2429~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Arginin Repressor	<i>S. aureus</i>	54/77	BAB43734	459
39.	Elastase- Vorläufer	<i>S. epidermidis</i>	98/99	P43148	1521
40.	ORFID:SA1814~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Succinyl- Diaminopimelate Desuccinylase	<i>S. aureus</i>	42/62	BAB43094	1242
41.	Unbekanntes Protein	<i>Entamoeba</i>	30/51	AAA74501	402
42.	ORFID:SA1318~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	55/73	BAB42580	912
43.	ORFID:SA1320~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	51/71	BAB42582	189
44.	ORFID:SA0122~Acetoinreductase	<i>S. aureus</i>	77/84	BAB41341	786
45.	ORFID:SA2433~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Transkriptionsantiterminator BglG Familie	<i>S. aureus</i>	47/67	BAB43738	1869
46.	Fructose PTS-System	<i>S. aureus</i>	60/74	BAB43739	1983

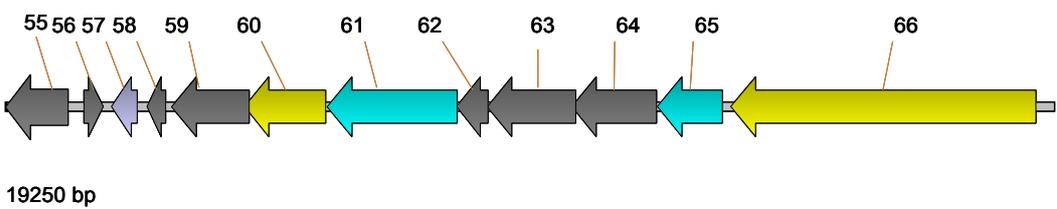
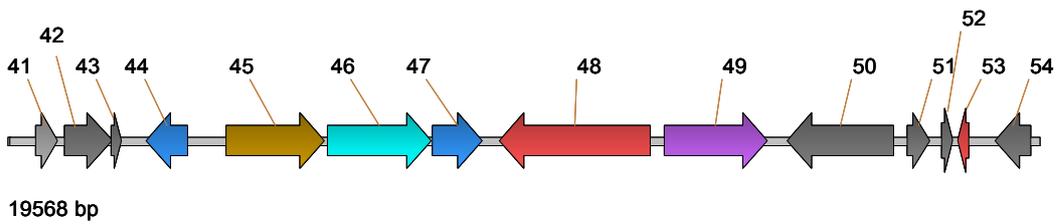
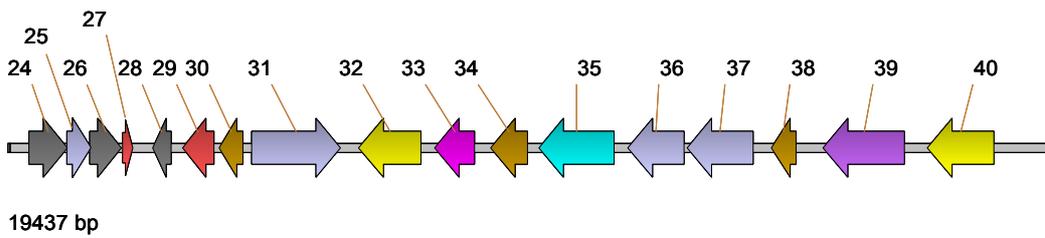
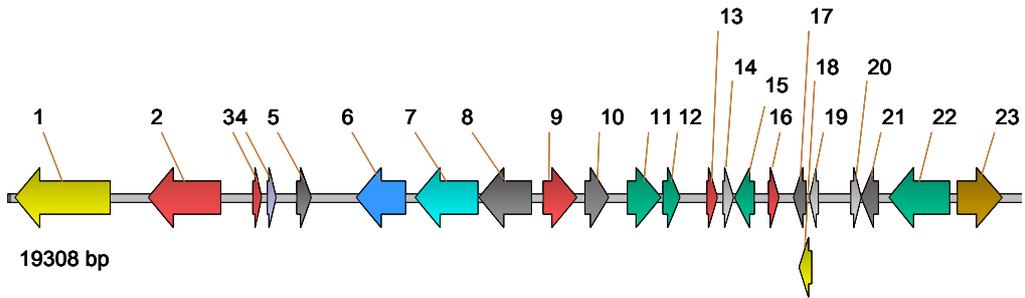
47.	ORFID:SA2435~Mannose-6-phosphate Isomerase	<i>S. aureus</i>	65/78	BAB43740	948
48.	ORFID:SA2436~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Phagen Infektionsprotein	<i>S. aureus</i>	66/79	BAB43741	2436
49.	ORFID:SA2437~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Autolysin Vorläufer	<i>S. aureus</i>	55/69	BAB43742	1965
50.	ORFID:SA2439~konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	36/58	BAB43744	2028
51.	ORFID:SA0755~Hypothetisches Protein, ähnlich zu allg. Stress protein 170	<i>S. aureus</i>	48/65	BAB41992	426
52.	ORFID:SA1432~konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	32/62	BAB42696	150
53.	a) Transposase] b) Unbekanntes Protein	<i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> <i>prophage phiPV83</i> <i>S. haemolyticus</i>	72/90 85/93	BAA97852 AAA73693	153
54.	Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	93/97	BAB43753	687
55.	Hypothetisches 44.2 kDa Protein in COTF-TETB intergenische Region	<i>B. subtilis</i>	23/44	P37498	1170
56.	a) Orf1 b) Hypothetisches Protein	<i>S. carnosus</i> <i>S. aureus</i>	52/65 72/82	AAB94649 BAB43756	354
57.	ORFID:SA2453~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Peptide Methionin Sulfoxid Reductase	<i>S. aureus</i>	65/78	BAB43758	477
58.	a) Hypothetisches Protein yvIA b) konserviertes hypothetisches Protein	<i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	31/59 24/49	C70043 BAB43359	345
59.	ORFID:SA2440~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	45/63	BAB43745	1422
60.	ORFID:SA2441~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Lipopolysaccharid Biosynthese Protein	<i>S. aureus</i>	63/81	BAB43746	1506
61.	ORFID:SA2442~Preprotein Translocase secA Homolog	<i>S. aureus</i>	66/81	BAB43747	2388
62.	ORFID:SA2443~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	38/62	BAB43750	570
63.	ORFID:SA2444~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	54/74	BAB43749	1620
64.	ORFID:SA2445~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	43/86	BAB43748	1554
65.	ORFID:SA2446~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Preprotein Translocase secY	<i>S. aureus</i>	53/78	BAB43751	1197
66.	ORFID:SA2447~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Streptococcus Hämagglutinin Protein „Fap“	<i>S. aureus</i>	56/66	BAB43752	5610
67.	Cps2H	<i>S. pneumoniae</i>	21/40	AAD10177	1299
68.	ORFID:SA0135~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Phosphonates Transport Permease	<i>S. aureus</i>	83/93	BAB41355	813
69.	ORFID:SA0136~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Phosphonates Transport Permease	<i>S. aureus</i>	84/92	BAB41356	798
70.	ORFID:SA0137~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Transport System Protein	<i>S. aureus</i>	87/95	BAB41357	771
71.	ORFID:SA0138~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Alkylphosphonat ABC Tranporter	<i>S. aureus</i>	85/91	BAB41358	669
72.	Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	62/77	BAB41359	1548
73.	ORFID:SA0140~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Lactococcus Phosphatase Homolog	<i>S. aureus</i>	61/77	BAB41360	1533
74.	Chloramphenicol Resistenz Protein Homolog yfhI	<i>B. subtilis</i>	42/60	B69801	1173
75.	Interzelluläres Adhäsionsprotein A	<i>S. epidermidis</i>	100/100	S77608	1236
76.	Interzelluläres Adhäsionsprotein D	<i>S. epidermidis</i>	100/100	AAC06120	303
77.	Interzelluläres Adhäsionsprotein B	<i>S. epidermidis</i>	100/100	S77609	867
78.	Interzelluläres Adhäsionsprotein C	<i>S. epidermidis</i>	100/100	S77610	1041
79.	Lipase	<i>S. epidermidis</i>	100/100	AAC38597	2073
80.	ORFID:SA2490~Hypothetisches Protein, ähnlich zu N-Hydroxyarylamine O-Acetyltransferase	<i>S. aureus</i>	55/70	BAB43796	783
81.	ORFID:SA2464~Histidine Biosynthese: bifunktionelles Protein HisE	<i>S. aureus</i>	64/78	BAB43770	633
82.	ORFID:SA2465~Cyclase-ähnliches Protein HisF	<i>S. aureus</i>	81/92	BAB43771	741
83.	ORFID:SA2466~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole Carboxamide Ribotide Isomerase	<i>S. aureus</i>	70/85	BAB43772	702
84.	ORFID:SA2467~Amidotransferase HisH	<i>S. aureus</i>	64/79	BAB43773	576
85.	ORFID:SA2468~Imidazoleglycerol-Phosphate Dehydratase	<i>S. aureus</i>	75/87	BAB43774	576
86.	ORFID:SA2469~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Histidinol-Phosphate Transaminase	<i>S. aureus</i>	70/75	BAB43775	120
87.	ORFID:SA2470~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Histidinol Dehydrogenase	<i>S. aureus</i>	70/84	BAB43776	1242
88.	ORFID:SA2471~ATP Phosphoribosyltransferase	<i>S. aureus</i>	68/84	BAB43777	612
89.	ORFID:SA2472~Hypothetisches Protein, ähnlich zu ATP Phosphoribosyltransferase regulatorische Untereinheit	<i>S. aureus</i>	58/73	BAB43778	810
90.	unbekannt	<i>B. halodurans</i>	44/63	BAB04143	414
91.	Hypothetisches Protein yjF	<i>B. subtilis</i>	41/65	A69849	423
92.	ORFID:SA2474~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	42/63	BAB43780	516
93.	ORFID:SA2400~Malate:Quinon Oxidoreduktase	<i>S. aureus</i>	83/91	BAB43705	1587
94.	NADH Dehydrogenase Untereinheit	<i>Triatoma dimidiata</i>	31/50	NP068650	201

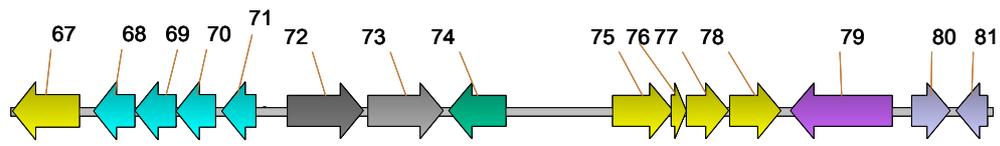
95.	ORFID:SA2479~konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	76/88	BAB43785	609
96.	ORFID:SA2480~Drp35	<i>S. aureus</i>	83/91	BAB43786	975
97.	ORFID:SA2481~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	77/88	BAB43787	960
98.	ORFID:SA2482~Pyrrolidone-Carboxylat Peptidase	<i>S. aureus</i>	62/70	BAB43788	636
99.	Unbekanntes konserviertes Protein	<i>B. halodurans</i>	52/69	BAB06108	390
100.	Glycine Betaine Transporter	<i>B. halodurans</i>	51/72	BAB07614	1608
101.	ORFID:SA2431~Immunodominantes Antigen B	<i>S. aureus</i>	32/54	BAB43736	510
102.	Transposase	<i>S. aureus</i> <i>prophage</i> <i>phiPV83</i>	79/91	BAA97852	153
103.	Acetoin Dehydrogenase E2 Komponente	<i>B. halodurans</i>	41/59	BAB05543	1275
104.	Acetoin Dehydrogenase E1 Komponente TPP-abhängige beta Untereinheit	<i>B. halodurans</i>	61/79	BAB05542	1028
105.	Acetoin Dehydrogenase E1 Komponente TPP-abhängige alpha Untereinheit	<i>B. halodurans</i>	57/71	BAB05541	951
106.	Dihydroliipoamide dehydrogenase	<i>B. halodurans</i>	41/61	BAB04498	1407
107.	Threonin Dehydratase Operon: Aktivator Protein	<i>E. coli</i>	29/54	AAC76154	162
108.	ORFID:SA2486~2-Oxoglutarat/Malat Translocator Homolog	<i>S. aureus</i>	85/94	BAB43792	1416
109.	Thiamine Biosynthese	<i>B. halodurans</i>	26/51	BAB06401	909
110.	ORFID:SA2487~Hypothetisches Protein, ähnlich zu rarD Protein	<i>S. aureus</i>	83/93	BAB43793	954
111.	ORFID:SA0324~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	43/64	BAB41548	501
112.	konserviertes hypothetisches Protein VCA0786 [imported]	<i>V. cholerae</i>	41/56	F82415	1701
113.	Metabolit Transport Protein Homolog yxcC	<i>B. subtilis</i>	53/75	D70073	1401
114.	a) Lipase Vorläufer (Glycerin Ester Hydrolase) b) Lipase Vorläufer	<i>S. epidermidis</i> <i>S. warneri</i>	48/63 52/66	AAA19729 AAG35723	2184
115.	ORFID:SA0174~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	43/68	BAB41395	621
116.	ORFID:SA0173~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Surfactin Synthetase	<i>S. aureus</i>	53/70	BAB41394	7200
117.	ORFID:SA0172~Hypothetisches Protein, ähnlich zu integralem Membran Protein LmrP	<i>S. aureus</i>	55/74	BAB41393	1308
118.	ORFID:SA1970~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Multidrug Resistenz Protein	<i>S. aureus</i>	53/75	BAB43259	1416
119.	Hypothetisches Protein	<i>L. lactis</i>	33/61	AAK05827	246
120.	Multidrug Resistenz Protein Homolog yubD	<i>B. subtilis</i>	21/45	G70006	1476
121.	ORFID:SA0607~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	53/74	BAB41840	372
122.	ORFID:SA0606~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	68/82	BAB41839	573
123.	ORFID:SA0605~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Dihydroxyaceton Kinase	<i>S. aureus</i>	70/86	BAB41838	960
124.	Glycerin Dehydrogenase	<i>B. stearo-thermophilus</i>	48/68	P32816	1101
125.	ORFID:SA2213~Biotin Synthase	<i>S. aureus</i>	77/88	BAB43515	1017
126.	ORFID:SA0295~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Outer Membrane Protein Vorläufer	<i>S. aureus</i>	79/90	BAB41519	714
127.	Fosfomycin Resistenz Protein Homolog, Glutathion Transferase fosB	<i>S. epidermidis</i>	64/81	Q03377	420
128.	101 KD Malaria Antigen	<i>Plasmodium</i>	30/64	P22620	222
129.	Ornithine Carbamoyltransferase	<i>S. aureus</i>	93/97	CAB75986	999
130.	ORFID:SA1013~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Carbamat Kinase	<i>S. aureus</i>	89/95	BAB42265	930
131.	a) ORFID:SA1014~Konserviertes hypothetisches Protein b) ORF N024 c) Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i>	92/96 99/99 99/99	BAB42266 BAB94653 BAB41283	1563
132.	ORFID:SA2422~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Tributyrin Esterase	<i>S. aureus</i>	63/79	BAB43727	765
133.	ORFID:SA2234~Glycine Betaine/Carnitine/Choline ABC Transporter opuCD	<i>S. aureus</i>	84/89	BAB43536	645
134.	ORFID:SA2235~Glycine Betaine/Carnitine/Choline ABC Transporter opuCC	<i>S. aureus</i>	74/85	BAB43537	957
135.	ORFID:SA2236~Glycine Betaine/Carnitine/Choline ABC Transporter opuCB	<i>S. aureus</i>	77/91	BAB43538	633
136.	ORFID:SA2237~Glycine Betaine/Carnitine/Choline ABC Transporter opuCA	<i>S. aureus</i>	78/91	BAB43539	1185
137.	ORFID:SA2138~konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	35/55	BAB43440	468
138.	Mögl. 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase PA5386	<i>P. aeruginosa</i>	51/68	F82972	963
139.	Konserviertes Hypothetisches Protein PA5387 [imported]	<i>P. aeruginosa</i>	52/69	G82972	894
140.	ORF-ID:slr0895~unknown protein	<i>Synechocystis</i>	38/61	BAA10445	537
141.	ORFID:SA0180~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Branched-Chain Aminosäure Transportsystem Carrier Protein	<i>S. aureus</i>	72/84	BAB41401	1359
142.	ORFID:SA1814~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Succinyl-Diaminopimelinsäure Desuccinylase	<i>S. aureus</i>	60/79	BAB43094	1251
143.	ORFID:SA0219~Formiat Acetyltransferase aktivierendes Enzym pflA	<i>S. aureus</i>	90/93	BAB41441	753
144.	ORFID:SA0218~Formiat Acetyltransferase pflB	<i>S. aureus</i>	91/95	BAB41440	2259
145.	ORFID:SA2250~hypothetisches Protein, ähnlich zu Anitbiotika Resistenz Protein	<i>S. aureus</i>	77/90	BAB43553	1188

146.	ORFID:SA2251~Oligopeptid Transporter putative ATPase Domäne	<i>S. aureus</i>	69/79	BAB43554	747
147.	ORFID:SA2252~Oligopeptid Transporter putative ATPase Domäne opp-1D	<i>S. aureus</i>	73/85	AAC69840	813
148.	ORFID:SA2253~Oligopeptid Transporter putative Membran Permease Domäne	<i>S. aureus</i>	79/90	BAB43556	876
149.	Oligopeptid Transporter putative Membran Permease Domäne opp-1B	<i>S. aureus</i>	81/92	AAC69838	933
150.	Oligopeptid Transporter putative Substratbindedomäne opp-1A	<i>S. aureus</i>	83/93	AAC69837	1596
151.	ORFID:SA2256~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	61/74	BAB43559	1290
152.	ORFID:SA2257~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	62/79	BAB43560	813
153.	ORFID:SA2258~hypothetisches Protein, ähnlich zu Diaminopimelinsäure epimerase	<i>S. aureus</i>	60/77	BAB43561	837
154.	ORFID:SA0267~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	53/77	BAB41491	444
155.	ORFID:SA0266~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	65/83	BAB41490	717
156.	2.3-Butandiol Dehydrogenase	<i>Corynebacterium</i>	47/65	BAA36159	771
157.	a) BIt-like protein SbtA b) ORFID:SA0099~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Transmembran Efflux Pumpen Protein	<i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i>	47/69	AAG43451 BAB41318	1374
158.	NADH-dependent Flavin Oxidoreductase Homolog yqiG	<i>B. subtilis</i>	39/57	C69961	3015
159.	Thiamine Biosynthese Protein ApbE	<i>S. pneumoniae</i>	45/68	AAK75564	903
160.	ORFID:SA2194~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Zn-binding Lipoprotein adcA	<i>S. aureus</i>	58/71	BAB43496	993
161.	ORFID:SA2370~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	60/77	BAB43675	1104
162.	ORFID:SA2369~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Eisentransporter Protein B	<i>S. aureus</i>	56/73	BAB43674	1308
163.	ORFID:SA2368~Hypothetisches Protein, ähnlich zu Cobalamin Synthese Protein CobW	<i>S. aureus</i>	56/75	BAB43673	879
164.	ORFID:SA Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	63/79	BAB43576	426
165.	Lipase Vorläufer	<i>S. epidermidis</i>	99/99	AAC67547	1938
166.	a) ORFID:SA1725~Staphopain, Cystein Proteinase b) Extrazelluläre Cystein Proteinase	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	59/74 100/100	BAB42995 CAC22343	1164
167.	ORFID:SA1726~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	32/59	BAB42996	315
168.	bap-like protein Bhp	<i>S. epidermidis</i>	100/100	AY028618	7206
169.	ORFID:SA2211~hypothetical protein, similar to 6-carboxyhexanoate-CoA ligase	<i>S. aureus</i>	57/77	BAB43513	699
170.	ORFID:SA2212~hypothetical protein, similar to 8-amino-7-oxononanoate synthase	<i>S. aureus</i>	53/71	BAB43514	1131
171.	bioA protein	<i>S. epidermidis</i>	100/100	CAB64453	1353
172.	bioD protein	<i>S. epidermidis</i>	100/100	CAB64454	678
173.	surface protein 51C	<i>Paramecium</i>	39/67	T28669	936
174.	Accumulation associated Protein	<i>S. epidermidis</i>	88/89	CAB77251	4494
175.	Keine Ähnlichkeit				150
176.	Keine Ähnlichkeit				150
177.	Serin Protease (V8 Protease)	<i>S. aureus</i>	27/38	AAF97928	738
178.	Keine Ähnlichkeit				153
179.	Exopolysaccharid Biosynthese (Glycosyltransferase)	<i>L. lactis</i>	26/54	NP053024	339
180.	ORFID:SA0217~Hypothetisches Protein ähnlich zu periplasmatischem Eisen Bindeprotein	<i>S. aureus</i>	74/85	BAB41439	972
181.	ORFID:SA0216~Hypothetisches Protein ähnlich zu zwei Komponenten Histidin Kinase	<i>S. aureus</i>	71/84	BAB41438	1536
182.	ORFID:SA0215~Hypothetisches Protein ähnlich zu zwei Komponenten Response Regulator	<i>S. aureus</i>	80/87	BAB41437	789
183.	ORFID:SA0214~Hexose Phosphat Transport Protein	<i>S. aureus</i>	97/99	BAB41436	801/55
184.	ORFID:SA0213~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	82/91	BAB41435	504
185.	Mögliche Transposase	<i>S. aureus</i>	95/97	T44088	312
186.	Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	94/95	T44089	219
187.	IS150 ähnliche Transposase	<i>S. aureus</i>	93/95	T44095	540
188.	Oxidoreduktase	<i>Thermotoga</i>	41/59	A72395	765
189.	ORFID:SA2400~Malat Quinon Oxidoreduktase	<i>S. aureus</i>	66/83	BAB43705	1488
190.	ORFID:SA0085~Konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	92/95	BAB41304	978
191.	G6 Protein Homolog	<i>Dictyostelium</i>	25/43	NP046746	357
192.	Repeat Motiv Protein bdrA4	<i>Borrelia</i>	28/43	AAF19768	840
193.	ORFID:SA2263~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	66/82	BAB43566	408
194.	Inversin	<i>Homo sapiens</i>	32/56	XP005589	183
195.	ORFID:SA1725~Staphopain, Cysteine Proteinase	<i>S. aureus</i>	33/55	BAB42995	243
196.	ORFID:SA0349~konserviertes hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	49/70	BAB41573	981
197.	ORFID:SA2269~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	71/85	BAB43572	783
198.	ORFID:SA2275~Hypothetisches Protein nicking Enzym	<i>S. aureus</i> <i>S. aureus</i>	69/85 23/46	BAB43578 AAB09712	777
199.	mögliches Membrane Protein Cj1560	<i>Campylobacter</i>	37/57	F81250	882
200.	Arsen Resistenz Operon Repressor arsR	<i>B. subtilis</i>	44/69	P45949	318
201.	ArsD	<i>Sinorhizobium</i>	40/62	AAD51848	387

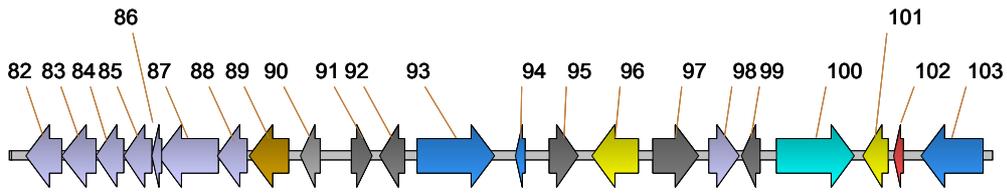
202.	ArsA	<i>Sinorhizobium</i>	43/64	AAD51849	1722
203.	Arsen Resistenz Operon Repressor arsR	<i>S. aureus</i>	67/84	P30338	376
204.	Arsen Pumpen Membranprotein arsB	<i>S. xylosum</i>	90/95	Q01255	1287
	Arsen Pumpen Membranprotein arsB	<i>S. aureus</i>	90/94	P30329	
205.	Arsen Reduktase (Arsen Pumpen Modifizierung) arsC	<i>S. aureus</i>	87/90	P30330	393
	Arsen Reduktase	Plasmid pI258			
		<i>S. xylosum</i> Plasmid pSX267	85/91	C41902	
206.	ORFID:SA0046~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	89/94	BAA94322	756
207.	ORFID:SACE015~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	100/100	BAA94324	240
208.	ORFID:SAE023~Hypothetisches Protein	<i>S. aureus</i>	96/93	BAA86644	1068

- |  |  |
|--|--|
| <span style="color: red;">█</span> Mobile genetische Elemente              | <span style="color: teal;">█</span> Resistenzen            |
| <span style="color: purple;">█</span> Sekretierte/ extrazelluläre Proteine | <span style="color: brown;">█</span> Regulation            |
| <span style="color: lightblue;">█</span> Aminosäurestoffwechsel            | <span style="color: blue;">█</span> Stoffwechsel allgemein |
| <span style="color: yellow;">█</span> Zellwand und -oberfläche             | <span style="color: grey;">█</span> Hypothetische Proteine |
| <span style="color: cyan;">█</span> Transport                              | <span style="color: grey;">█</span> sonstiges              |

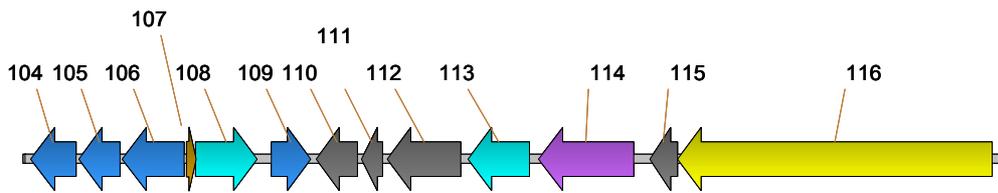




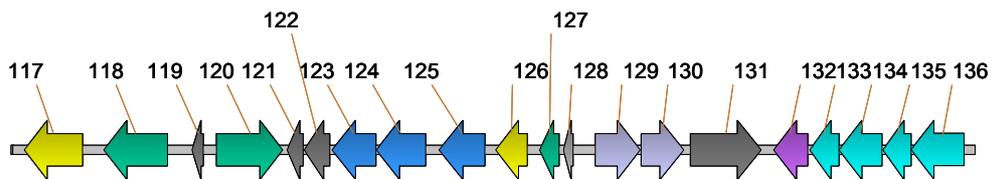
19981 bp



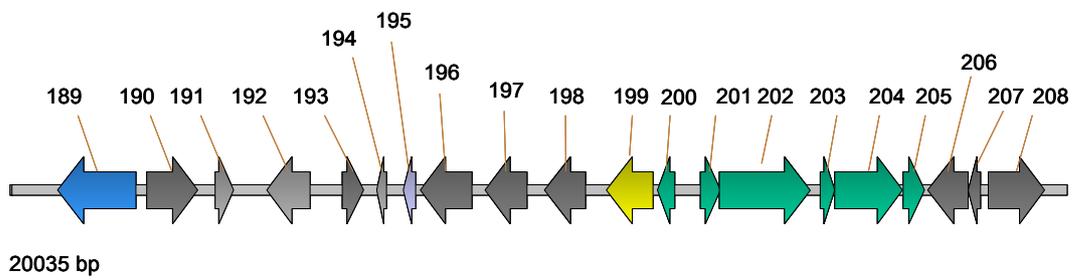
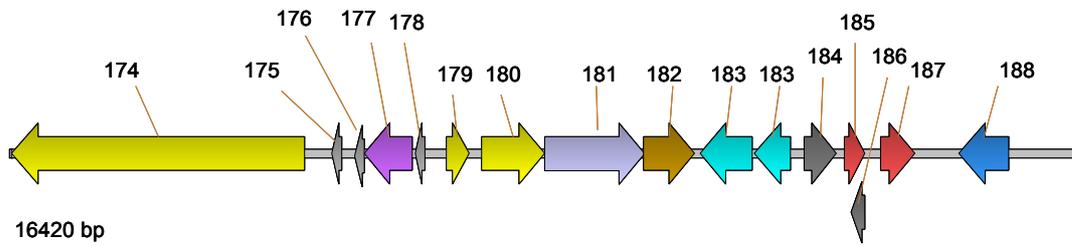
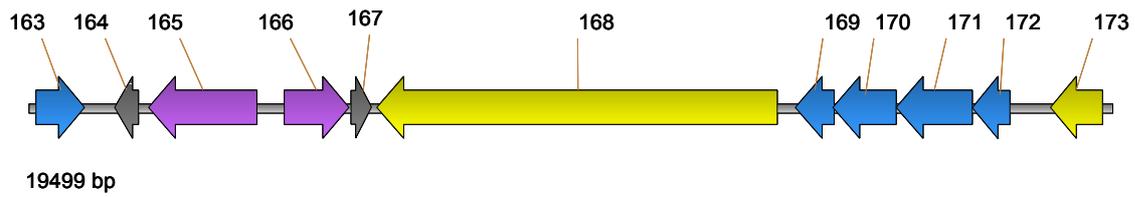
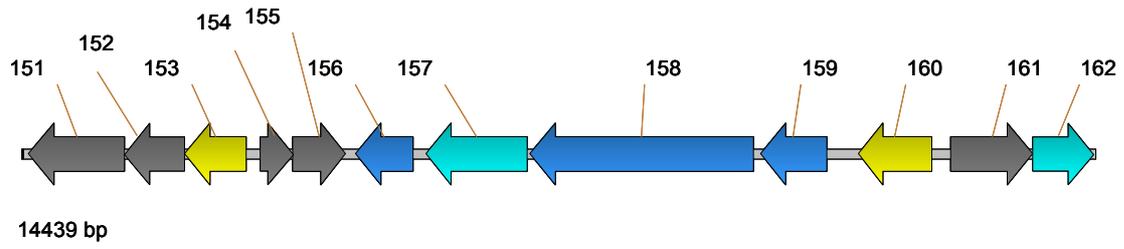
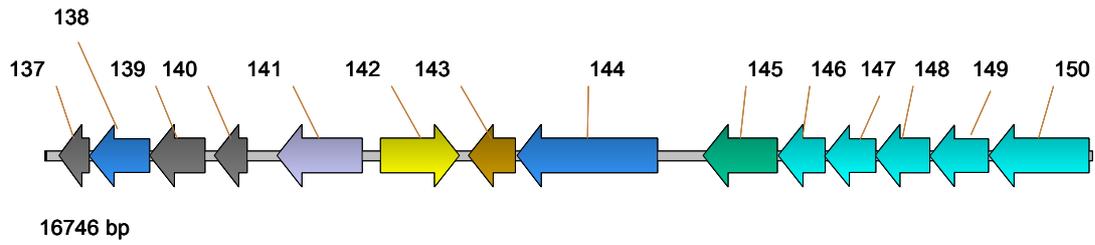
20188 bp



22465 bp



21424 bp



## Anhang III: Sequenz des Deletionsrandbereichs von *S. epidermidis* 307/56

	10	20	30	40	50	60	70	80	
1	CRAMTCaAtA	WARRgCGAAT	TGgGCCGACG	TCGCATGCNC	cCgGCCGCCA	TGGCGcCNGN	GNGAATTGGA	TTGGtATCCA	80
81	ACGTTTACT	GGGTTATCAA	TGCcGCAgTT	GTCATTATGG	CATTTCCCTAA	AGCATTAAAA	AGAAAGAWAG	GtGGCTATgC	160
161	TACATGGTCA	AGCCcAGACA	GAGGCAATAT	CCAACGGTAA	CcTCTTATTT	AAATATAGTT	AGGAGAGGCT	TAITTTATTAC	240
241	TATATcCGGA	GTATTTTGGG	TGTATTGTAT	CGTTGTGATG	AITGTTTTATA	TAGGAActCT	TATCAAITTCT	CAAAATGGAAA	320
321	GTGTTATAAC	AATACGTATT	GCAITAAATG	TTGAAAACAC	GGAAAITTAC	AAAITTATCG	GATGGATGAG	TTTGTTTGTGA	400
401	CTTATTATAT	TTATCTTTTT	TACATTTAGT	CTCGGTTTTC	AAAAATATAA	GAWAGGTCGT	gACATATGaa	ACCTTTCAAA	480
481	TTAATCTTTA	TTAGcCGATT	GATGATATTa	ATaATGACGA	ATGCWACACC	AATATCACAC	CTGAATGCTC	AAGCtAAITGA	560
561	AGAAAACAAG	AAGTTAAAGT	ACGAAAAAaA	TAGCGCACTC	GCGTTAAACT	ATCACAGAGT	AAGAWAWAAG	GATCCTTTTGA	640
641	ATGACTTTAT	AWTCaITACT	ATCTGGGCTA	ATAAAGCTAA	CGAITTACGAA	AActCTTTAA	CTTTTATATG	TGTATCGTTT	720
721	ATAAATTAAgT	tTTTAAAAAT	AAATGTATTA	TGCRATTTTT	AAGTTTTATGA	tAATCAtAGT	GAAAITTTTCA	TAAGTGTAAAT	800
801	AtGTaCTTTA	TATATAGatT	TTGTATAACG	CtGTTTTGAtA	AITTTAGTTGA	ATACGTAGAA	TTTACAGTAA	AatTTTTGCa	880
881	AAATGTGAAA	ATGCBaITAA	tAITTTAtVCB	GtKAACATAA	CcATATCBaG	TGtCTTATTT	CAGACAAAIT	TCACACTTAT	960
961	TTATTAaaKR	ABTCYYAAyT	tGGTGAaATTG	ACTATaTTGT	GTAAActGAC	ATAAAATaGCT	TTTACTTTTCT	CTTcTAITTA	1040
1041	VABGAaTTAT	TCAATACyTT	AATtaAGTaa	TTTTAATTTAA	TTTTAAGAKTT	AaaaTTGATT	AGCaTTAAaa	TCTAITTTAIT	1120
1121	TtCTcCAATA	AAACAITTTTA	TTAITTAAACM	tATCAAAAAA	ATCCAAITTAA	GtATCATGAt	AAAATGAAAA	CTCACAAITA	1200
1201	AITTTTTGAAT	CAITCAAAAG	ATCACAATAC	AITTTTTTACT	TTGATACGAA	TCCTATTACT	TTCAITCTCA	AGAITTAITC	1280
1281	TATTAGTATT	AGAAAAAGATG	ATACCCGTAA	TAAITTTTTTC	ATATAARATA	ATATTAATGA	tAATRAITGAT	TAADCAACTC	1360
1361	TTCAAAAATC	AcCTCTTAAT	AAAGTACCTT	TTTTAGCGAAC	AAITTAGTCT	ATACAActAA	TTTTCAAITCC	tACtATAAIT	1440
1441	TTTTAATCAGT	TTAATAAAAA	AITTAAAAITG	TAGTGGTTAA	AAITGTAAAA	AITTCGATAGA	AITTAATTTAC	TAAAITTTTAA	1520
1521	ATATTACAAA	TaAaAGGGAG	AaACAGATGA	AAAAAGTTAT	CAATAITTCTA	TTAATTGCaA	TACTATCCGT	TGTGCTAGTT	1600
1601	GGTTTGGTAT	TAATTGGCAT	TCGTTTTGCT	AAAGATATAT	GGaGCAGTAA	TGACTCGAAA	ACTGTAAATA	AITTCTCATCA	1680
1681	AGAAActTCT	AAAAATAACA	CAAAATCAAA	TCAAGATAAC	AACAATGTAA	ATaATAGCTC	ATCAGTAGAT	ACATCTGGAA	1760
1761	ATAATAWTTc	ATCTCAAGAT	TATaATTCTC	AaAACAATAT	GtCTTaCCAA	ACTGAAAATC	AAGAGGAATc	ATCGCAGAAA	1840
1841	AAAGACTTCA	ATCAAAATGC	tGTTAACCAA	TCTCTTGATA	AAGCAGCCCA	AAATATTGAA	CAAITTTGATG	AGGaTGGcGA	1920
1920	TGTCGAATT	GAAGATAGCG	AGCGAACCAc	AACTACAGAT	TTACTAGAAT	CTCAAGATAG	ACTAACGATT	TATAGCGAGC	2000
2001	ATAAAAGTGA	GGAAAGATAA	TGAAAActGC	AATAAAaATA	TTAGTATCAT	TAATTTGTTTT	TGTAAATAITA	GTTAITTTCTG	2080
2081	CtTTTTTTTG	ATACaGCAAA	ATCAAAAGAGA	ATGARAATtT	AARaVaACAA	CITTAGTGAaA	aACAATCCAA	CCaCACAaAT	2160
2161	ATGGRITCaA	CTTCAAGTCA	ACAaACAGAA	AATGCTACAG	AACAaACTAC	AAATGAAACA	ATAATAATGA	ATCGGAAAAC	2240
2241	GAAATACCTA	ATACAAAAGT	AACCCGIGAT	AAITGCTTTTG	ACTATGTTAT	AAAGGGAAIT	AATGATAGTg	GcGGTIGACGC	2320
2321	TTCGTTAATA	AGATTCCAAG	AACCAACATA	CGAGGCTAAT	AGTGATAGAT	GGTTTTATTGT	TGCAActAAT	AAATCAGGGG	2400
2401	TTGGTACAAC	ttATAaaATA	TACGTAGATA	ATACTGGACA	TGTAAcGATA	TATGAaGGTG	TAAATGATAA	CGTAGTAGTC	2480
2481	AATGATGATG	TTTTTTTTAAA	CTAACAAATA	ATGATGATTA	CTTGTTTTTAT	TGATCACcGA	TACATCTAAA	TAABataAGG	2560
2561	AGACTATaAT	GAAAAaATA	ATTAATATTC	TTTTAATTTGC	GATACTATCA	ATCATAITTTA	TTGGTGTAAc	GTTAITTTGTT	2640
2641	GTAAAITTTTG	CTAAAGATAC	GTTTTATCAGC	GATAATaAAA	aATCTGATAC	TGTAAGTaaG	aatCAAGAGG	AAGTCAGAAA	2720
2721	AGACACTAAT	AATAAATCGA	aACAaACAGA	TAAACAAAAC	GATCTATAT	cTAGTGAAGC	AAGTYAGAAAT	AATAGTCAAC	2800
2801	AAATTAATAA	TAACaATCAA	TCTTTAGAAA	CAAGTTCACA	AAATACGACT	AACAGCAACC	AATCtCAAAA	AACAAATAAT	2880
2881	CAAGATATTT	CTAAAAAITA	TGCAGATAAT	CAAAAAAAT	CAAATGAAGA	TCCtAACAAT	GTGATGCAAT	ACGATAAAaA	2960
2961	CGACGACGGT	ATCATATCTA	GCAGTGAAGT	AACACCAGAA	GCTCAAAAAC	TAGTTGATGA	AGGTAAAITTA	CAACCAACAT	3040
3041	CAGATGCATA	TTTTTAACTT	TTTTACTTTTT	TATCCGATTT	TTATGTCAAT	TTACTGGATA	GTAGGATCGA	TTTTACTAITT	3120
3121	TTTTAITTAAA	GAMAAACCC	TTAATCGATT	ATTGTTAGTA	AAATCTGAAC	ATCAACAAGT	TGAAGGCATA	TCCTTTTTTAT	3200
3201	TAGCTTGCTA	CAATGAAAGT	GAAACAGTTC	AAGACACGCT	TTCTAGTGT	TTATCTCTAG	AATATCCTGA	AAAAGAAAIT	3280
3281	ATCATTATCA	ATGATGGRAG	TTCTGATAAT	WCTGCTGAAA	TCATCTaTGA	WTTCAAGAAa	AATCATGATT	TT	3352

# LEBENS LAUF

Isabel Lößner

geb. am 18.02.1971 in Hilden

## SCHULAU SBILDUNG

1977 – 1981	Grundschule in Solingen
1981 – 1988	Gymnasium in Solingen
1988 – 1990	Gymnasium mit Abitur in Oberursel

## STUDIUM

10/ 1990 - 07/ 1992	Geographiestudium an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt/Main
10/ 1992 - 01/ 1998	Biologiestudium an der Technischen Universität Darmstadt: Schwerpunkte Mikrobiologie (Hauptfach), Biochemie, Immunologie und Bodenkunde
06/ 1997 - 01/ 1998	Externe Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. J. Kreft und Prof. Dr. F. Pfeifer (TU Darmstadt) Thema: „Charakterisierung des SlyA-Virulenz-Regulons von <i>Salmonella typhimurium</i> durch vergleichende zweidimensionale Proteingelelektrophorese“
20.01.1998	Abschluß: Diplom-Biologin Gesamtnote: sehr gut

## PROMOTION

Seit 04/ 1998	Anfertigung der Dissertation am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. J. Hacker
---------------	---

Würzburg, April 2002

## Publikationsliste

**Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Lössner, F. Götz, and J. Hacker.** 1999. A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol. Microbiol.* **32**(2):345-56.

**Ziebuhr, W., I. Loessner, S. Rachid, K. Dietrich, F. Götz, and J. Hacker.** 2000. Modulation of the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. Analysis of genetic mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* **485**:151-7.

**Ziebuhr, W., I. Loessner, V. Krimmer, and J. Hacker.** 2001. Methods to detect and analyze phenotypic variation in biofilm-forming Staphylococci. *Methods Enzymol.* **336**:195-205.

**Loessner, I., K. Dietrich, D. Dittrich, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2002. Transposase-dependent formation of circular IS256 derivatives in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (in Revision).