

**Epidemiologische und molekulare Untersuchungen zur
Biofilmbildung in *Staphylococcus epidermidis* und
*Staphylococcus aureus***

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

**Vorgelegt von
Seung-Hak Cho
aus Seoul (Süd-Korea)
Würzburg 2001**

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. J. Hacker

Gutachter: Prof. Dr. R. Gross

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Erklärung

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

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Desweiteren erkläre ich, daß ich früher weder akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Seung-Hak Cho

meiner Frau Jeong-Min

Die Experimente zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von März 1997 bis Oktober 2000 am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Jörg Hacker danke ich für die Bereitstellung der Thematik und die mannigfaltige Unterstützung während meiner gesamten Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Dr. Wilma Ziebuhr für die sehr zuverlässige Betreuung meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Roy Gross vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg bedanke ich mich für die Begutachtung meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Witte vom Robert-Koch-Institut in Wernigerode, Prof. Dr. Reinhard Marre von der Universität Ulm und Prof. Dr. Kurt Naber vom Elisabeth-Krankenhaus in Straubing möchte ich für die zur Verfügung gestellten Stämme danken, ebenso Herrn Prof. Dr. Friedrich Götz von der Universität Tübingen für den anti-PIA Antikörper.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für die freundliche Hilfe und angenehme Laboratmosphäre. Ich danke Hilde Merkert und Arthur Altenhöfer für die Hilfe am Computer und Julia Blaß für die Zusammenarbeit bei der Sequenzierung. Besonders danke ich Petra Hess, Gabi Kemmer und Joachim Schmidt-Brauns für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern für die Jahre der Unterstützung und für ihre große Liebe.

Zum Schluß möchte ich gern meiner Frau Jeong-Min diese Arbeit widmen, die während meiner Arbeit immer an meiner Seite stand, immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mich somit in verschiedener Art und Weise unterstützte.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	5
2.1. Biofilmbildung bei Staphylokokken als Pathomechanismus.....	5
2.1.1. Allgemeines.....	5
2.1.2. Primäre Bindung von Staphylokokken an Polymeroberflächen.....	7
2.1.3. Faktoren für die Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i>	9
2.1.4. Biofilmbildung in <i>S. aureus</i>	11
2.2. Antibiotikaresistenz bei Staphylokokken und der Einfluß von Biofilmen auf die Antibiotikaresistenz.....	12
2.2.1. Antibiotikaresistenz.....	12
2.2.2. Der Einfluß von Biofilmen auf die Resistenz.....	13
2.3. Phänotypische und genotypische Variabilität.....	14
2.4. Genregulation in Staphylokokken.....	15
2.4.1. Agr (Accessory gene regulator)-System in <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i>	16
2.4.2. Sar (Staphylococcal accessory regulator)-System in <i>S. aureus</i>	17
2.4.3. Der alternative Sigma-Faktor SigB in <i>S. aureus</i>	18
3. Material.....	22
3.1. Bakterienstämme.....	22
3.2. Oligonukleotide.....	22
3.3. Chemikalien.....	24
3.4. Geräte und Sonstiges.....	25
3.5. Medien und Agarplatten.....	26
3.6. Puffer und Lösungen.....	27
3.7. DNA- und RNA-Größenmarker.....	28
3.7.1. DNA-Größenmarker.....	28
3.7.2. RNA-Größenmarker.....	29
3.8. Antibiotika-Testblättchen.....	29
4. Methoden.....	30
4.1. Isolierung der Staphylokokken aus der Nase und spezifische Identifizierung.....	30

4.1.1. Nasenabstrich („Transwab“-Kit).....	30
4.1.2. Katalase-Test.....	30
4.1.3. Koagulase-Test mit dem „Staphylect Plus“-Kit.....	30
4.1.4. Api-Staph-Test.....	30
4.2. Antibiotikaresistenz-Test (Kirby-Bauer-Test).....	31
4.3. Biofilm-Test.....	32
4.4. Herstellung von Variantenstämmen für die Biofilmbildung.....	32
4.5. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	33
4.6. Reinigung von PCR-Produkt mit „QIAquick™Spin“-Kit.....	33
4.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	34
4.8. Phenolisierung von Plasmid-DNA.....	34
4.9. Alkoholische Fällung von DNA.....	34
4.10. Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen.....	35
4.11. Spaltung von chromosomaler DNA mit Restriktionsenzymen.....	35
4.12. Horizontale Gelelektrophorese.....	35
4.13. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen („Gene Clean“-Kit).....	36
4.14. Isolierung von Plasmid-DNA.....	36
4.14.1. Schnelllysate-Methode mit Diatomenerde.....	36
4.14.2. Qiagen Midi-Präparation (Qiagen Plasmid-Handbuch, 2000).....	37
4.15. Isolierung von chromosomaler DNA.....	38
4.16. Southern-Hybridisierung.....	39
4.16.1. Gelelektrophorese.....	39
4.16.2. Vakuublotten.....	39
4.16.3. Markierung der DNA-Sonde und Hybridisierung („ECL“-Kit).....	40
4.17. Isolierung von Gesamt-RNA aus Staphylokokken („FastRNA“-Kit).....	41
4.18. Northern-Hybridisierung.....	41
4.18.1. RNA-Gelelektrophorese.....	41
4.18.2. Northern-Blot.....	42
4.19. Untersuchung der Gesamtproteine.....	43
4.19.1. Gewinnung von bakteriellen Gesamtzellsaten durch Lyse mit Lämmli-Puffer.....	43
4.19.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	43
4.19.3. Färben von Proteingelen mit Coomassie-Blau.....	44
4.20. Immunoblot gegen PIA.....	45

4.21. Sequenzierung von DNA (Fluoreszenz-Methode „Thermosequenasen“-Kit).....	46
4.22. PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese).....	46
4.22.1. Isolierung von genomischer DNA aus Staphylokokken für die PFGE.....	46
4.22.2. Restriktionsendonukleasespaltung von genomischer DNA im Agaroseblöckchen.....	47
4.22.3. Pulsfeldgelelektrophorese mit dem CHEF-DRII-System.....	47
4.23. Herstellung kompetenter Zellen.....	48
4.23.1. CaCl ₂ -Methode.....	48
4.23.2. Elektrokompente <i>S. aureus</i> -Zellen (Schenk und Laddaga, 1992).....	49
4.24. Transformation.....	49
4.24.1. CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	49
4.24.2. Elektroporation von <i>S. aureus</i> (Schenk und Laddaga, 1992).....	49
4.25. Statistik.....	50
5. Ergebnisse.....	51
5.1. Epidemiologische Untersuchung zur Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i>	51
5.1.1. Vorkommen des <i>ica</i> -Genlokus in <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i>	52
5.1.2. Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i>	53
5.1.3. Zusammenhang zwischen dem <i>ica</i> -Genlokus und der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i>	54
5.1.4. Nachweis der Insertionssequenzen IS256 und IS257.....	55
5.1.4.1. Vorkommen von IS256.....	55
5.1.4.2. Vorkommen von IS257.....	57
5.1.5. Antibiotikaresistenz der <i>S. epidermidis</i> - und <i>S. aureus</i> -Isolate.....	58
5.1.5.1. Antibiotikaresistenz der <i>S. epidermidis</i> -Isolate.....	58
5.1.5.2. Antibiotikaresistenz der <i>S. aureus</i> -Isolate.....	59
5.1.6. Zusammenhang zwischen Gentamicin-Resistenz und dem Nachweis von IS256.....	60
5.1.7. Zusammenhang zwischen Biofilm und Antibiotikaresistenz.....	61
5.2. Induktionstest für die Biofilmbildung.....	64
5.2.1. Einfluß von Synercid? auf die Biofilmbildung.....	65
5.2.2. Einfluß von Tetrazyklin auf die Biofilmbildung.....	66

5.2.3. Einfluß von NaCl auf die Biofilmbildung.....	67
5.2.4. Zusammenfassender Überblick zur Induktion der Biofilmbildung durch Antibiotika und Osmolarität.....	68
5.3. Phasenvariation der Biofilmbildung in einem <i>S. epidermidis</i> -Harnwegsisolat.....	70
5.3.1. PCR-Amplifikation der <i>ica</i> -Gene in Biofilm-negativen <i>S. epidermidis</i> -Stämmen.....	70
5.3.1.1. PCR-Amplifikation von <i>icaA</i>	70
5.3.1.2. PCR-Amplifikation von <i>icaB</i>	71
5.3.1.3. PCR-Amplifikation von <i>icaC</i>	71
5.3.2. Nukleotidsequenzierung des <i>icaC</i> -PCR-Produktes aus <i>S. epidermidis</i> 569.....	72
5.3.3. Reversion der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> 569.....	73
5.3.4. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)-Analyse von <i>S. epidermidis</i> 569 und den revertanten, Biofilm-positiven Stämmen.....	73
5.3.5. Vergleichende PCR-Analyse des <i>icaC</i> -Gens von <i>S. epidermidis</i> 569 und den revertanten Stämmen.....	74
5.3.6. Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz in <i>S. epidermidis</i> 569 und den revertanten Stämmen.....	75
5.3.7. Hybridisierungsmuster von IS256 und IS257 im Genom von <i>S. epidermidis</i> 569 und den revertanten Stämmen.....	77
5.3.7.1. IS256- und <i>icaC</i> -Hybridisierung.....	77
5.3.7.2. IS257-Hybridisierung.....	78
5.4. Variabilität der Biofilmbildung in <i>S. aureus</i>	80
5.4.1. Biofilmentstehung bei ursprünglich nicht-biofilmbildenden <i>S. aureus</i> -Stämmen.....	80
5.4.2. Api-Staph-Test, Slidex-Staph-Test und Biofilm-Test mit <i>S. aureus</i> 483 und den varianten Stämmen.....	81
5.4.3. PFGE-Analyse von <i>S. aureus</i> 483 und den varianten Stämmen.....	83
5.4.4. Vergleich der Antibiotikaresistenzen von <i>S. aureus</i> 483 und den varianten Stämmen.....	83
5.4.5. Vergleich des Gesamtproteinengehaltes von <i>S. aureus</i> 483 und den varianten Stämmen durch Polyacrylamidgelelektrophorese.....	84

5.4.6. Vergleich der PIA-Expression von <i>S. aureus</i> 483 und den varianten Stämmen durch Immunoblot.....	85
5.5. Genetische Untersuchungen zur Variation der Biofilmbildung in <i>S. aureus</i>	87
5.5.1. Southern Blot-Analyse von <i>agr</i> -, <i>sar</i> -, <i>sigB</i> - und <i>ica</i> -Operons.....	87
5.5.1.1. Southern Blot-Analyse des <i>ica</i> -Operons.....	88
5.5.1.2. Southern Blot-Analyse des <i>agr</i> -Systems.....	88
5.5.1.3. Southern Blot-Analyse des <i>sarA</i> -Gens.....	88
5.5.1.4. Southern Blot-Analyse des <i>sigB</i> -Gens.....	89
5.5.2. Untersuchung zur Transkriptionsaktivität des <i>agr</i> - und <i>sigB</i> -Systems durch Northern Blot-Analyse.....	90
5.5.2.1. Northern Blot-Analyse des <i>agr</i> -Systems.....	90
5.5.2.2. Northern Blot-Analyse des <i>sigB</i> -Systems.....	91
5.5.3. Sequenzanalyse des <i>sigB</i> -Systems.....	91
5.5.3.1. Sequenzanalyse des <i>rsbU</i> -Gens.....	92
5.5.3.2. Sequenzanalyse des <i>rsbV</i> -Gens.....	93
5.5.3.3. Sequenzanalyse des <i>rsbW</i> -Gens.....	94
5.5.3.4. Sequenzanalyse des <i>sigB</i> -Gens.....	95
5.5.4. Komplementation von SigB und Effekt auf die Biofilmbildung in SigB-negativen <i>S. aureus</i> 483-Varianten.....	96
5.5.4.1. Vergleich der Biofilmbildung.....	97
5.5.4.2. PFGE-Analyse.....	97
5.5.4.3. Southern Blot-Analyse mit dem <i>sigB</i> -Gen.....	98
5.5.4.4. Northern Blot-Analyse mit dem <i>asp23</i> -Gen und Sequenzierung des <i>sigB</i> -Operons.....	99
6. Diskussion.....	101
Nosokomiale Staphylokokkeninfektionen als Gesundheitsproblem der Gegenwart.....	101
6.1. Epidemiologische Untersuchungen.....	103
6.1.1. Das <i>ica</i> -Operon und Biofilmbildung kommen häufiger bei klinischen Staphylokokkenstämmen vor als bei saprophytären Isolaten.....	103
6.1.2. Die Biofilmbildung durch das <i>ica</i> -Operon wird von Umweltfaktoren beeinflusst.....	104

6.1.3. IS256 als Marker für pathogene Staphylokokkenstämme.....	106
6.1.4. Antibiotikaresistenzen kommen häufiger bei klinischen Staphylokokken vor.....	107
6.1.5. Assoziation der Gentamicinresistenz mit IS256.....	108
6.1.6. Assoziation zwischen Antibiotikaresistenz und Biofilmbildung.....	108
6.2. Variationen der Biofilmbildung in Staphylokokken.....	109
6.2.1. Das natürlich vorkommende IS256-Element ist <i>in vivo</i> am An- und Ausschalten des <i>ica</i> -Operons in <i>S. epidermidis</i> beteiligt.....	110
6.2.2. Phasenvariation der Biofilmbildung in <i>S. aureus</i>	111
6.2.2.1. Die Biofilmbildung in <i>S. aureus</i> unterliegt einer starken Phasenvariation.....	111
6.2.2.2. Der Einfluß von SigB auf die Biofilmbildung in <i>S. aureus</i> 483.....	112
6.2.2.3. Mögliche Mechanismen der SigB-Expression in <i>S. aureus</i> 483.....	114
7. Literatur.....	117
8. Anhang.....	132
8.1. Stammsammlung.....	132
8.2. Abkürzungen.....	156
8.3. Publikationen und Tagungsbeiträge.....	158
8.4. Lebenslauf.....	159

1.1. Zusammenfassung

Staphylococcus aureus und *Staphylococcus epidermidis* gehören zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen bei immunsupprimierten Patienten. Gleichzeitig bilden diese Bakterien einen wesentlichen Teil der gesunden Hautflora des Menschen. Bisher ist wenig darüber bekannt, ob es Unterschiede in der genetischen Ausstattung zwischen klinischen und kommensalen Isolaten gibt und welche Faktoren zur Etablierung von Staphylokokken im Hospitalmilieu beitragen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Fähigkeit zur Biofilmbildung offensichtlich ein wesentliches Merkmal pathogener Staphylokokken ist. Die Expression dieses Virulenzfaktors ist dabei hochvariabel und hängt von der genetischen Ausstattung der Stämme mit dem für die Biofilmbildung verantwortlichen *ica*-Operon, bestimmten Umweltfaktoren und dem Einfluß von Insertionssequenzen ab.

In einer epidemiologische Untersuchung wurde gezeigt, daß in *S. epidermidis* das *ica*-Operon häufiger in klinischen als in kommensalen Stämmen vorkommt. Der überwiegende Teil dieser *ica*-positiven Stämme bildete phänotypisch einen Biofilm aus. Im Unterschied dazu enthielten alle untersuchten *S. aureus*-Stämme, unabhängig von ihrer Herkunft, das vollständige *ica*-Gencluster, wobei jedoch keiner dieser Stämme unter Laborbedingungen einen Biofilm bildete. Durch subinhibitorischen Konzentrationen bestimmter Antibiotika bzw. durch Osmostress ließ sich die Biofilmbildung in 30 Prozent der *S. aureus*-Stämme induzieren. Ebenso konnte in *ica*-positiven *S. epidermidis*-Stämmen die Biofilmbildung durch diese Umweltfaktoren stimuliert werden.

Die Studie ergab auch, daß es einen Zusammenhang zwischen der Biofilmbildung, der Antibiotikaresistenz und dem Vorkommen der Insertionssequenz IS256 gibt. So war IS256 signifikant häufig in klinischen *S. epidermidis* und *S. aureus*-Stämmen nachweisbar, während es keinen Unterschied im Auftreten von IS257 zwischen klinischen und saprophytären Isolaten gab. Die IS256-positiven *S. epidermidis*-Stämme wiesen überdurchschnittlich oft das *ica*-Operon auf und waren gegen mindestens zwei Antibiotika gleichzeitig resistent.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß IS256 an der Phasenvariation der Biofilmbildung *in vivo* beteiligt ist. Bei einem klinischen *S. epidermidis*-Stamm, der von einem Patienten mit

einer Katheter-assoziierten Harnwegsinfektion isoliert wurde, wurde die Insertion des Elementes im *icaC*-Gen nachgewiesen, was in einem Biofilm-negativen Phänotyp resultierte. Subkultivierung der Insertionsmutante führte nach wenigen Passagen zur Ausbildung eines Biofilms. Die Nukleotidsequenzierung ergab die vollständige Exzision von IS256 aus dem *icaC*-Gen einschließlich der duplizierten Zielsequenz von sieben Basenpaaren. Diese Daten stimmen vollständig mit den zuvor in einer *in-vitro*-Studie erhaltenen Ergebnissen überein und sie zeigen, daß IS256 die Expression des *ica*-Operons offensichtlich auch *in vivo* während einer Infektion beeinflusst.

Bei *S. aureus* konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine Phasenvariation der Biofilmbildung nachgewiesen werden. Durch Mehrfachpassagen wurden aus ehemals Biofilm-negativen Einzelkolonien mehrere Biofilmproduzenten gewonnen, die auch wieder zum Biofilm-negativen Phänotyp revertieren konnten. Die DNA-Analyse mittels Pulsfeldgelelektrophorese zeigte, daß es in den varianten Stämmen zu größeren DNA-Rearrangements gekommen war, die neben der variablen Biofilmbildung auch mit Unterschieden in der Expression des alternativen Transkriptionsfaktors SigmaB einhergingen. Die Nukleotidsequenzierung des *sigB*-Systems ergab in den Varianten mehrere Punktmutationen in den SigB-Regulatorgenen *rsbU* und *rsbW*. Dies legt nahe, daß der SigB-Genlocus einer starken genetischen Variabilität unterliegt, die wiederum pleiotrope Effekte auf die Genexpression in *S. aureus* ausübt. Durch Northern-Blot-Analysen konnte allerdings gezeigt werden, daß die Biofilmbildung in den *S. aureus*-Varianten nicht mit der veränderten SigB-Expression in Zusammenhang steht.

1.2. Summary

Staphylococcus aureus and *Staphylococcus epidermidis* belong to the most frequent causes of nosocomial infections in immunocompromised patients. These bacteria form an essential part of the healthy skin flora of human beings. Little is known, whether there are differences in the genetic equipment between clinical and commensal isolates and which factors contribute to the setup of staphylococci in the hospital environment.

The results of the presented work show that the ability to form biofilms is an essential feature of pathogenic staphylococci. The expression of this virulence factor is highly variable and depends on the presence of the *ica* operon which is responsible for biofilm formation, specific environmental factors and the influence of insertion sequences.

In an epidemiological investigation, it was shown that the *ica* operon in *S. epidermidis* is more often present in clinical strains than in commensal ones. The predominant part of these *ica*-positive strains formed phenotypically a biofilm. In contrast, all examined *S. aureus* contained, independent of their origin, the complete *ica* gene clusters, while, however, none of these strains formed a biofilm under laboratory conditions. Biofilm formation could be induced by subinhibitory concentrations of specific antibiotics or osmotic stress in 30 percent of the *S. aureus* strains. Also, biofilm formation could be stimulated in *ica*-positive *S. epidermidis* strains through these environmental factors.

The study also revealed that there is an association between biofilm formation, antibiotic resistance and the occurrence of the insertion sequence IS256. Thus, IS256 was significantly more often detected in clinical *S. epidermidis* and *S. aureus* strains, while there was no difference in the occurrence of IS257 between clinical and saprophytic isolates. Most of the IS256-positive *S. epidermidis* strains carried the *ica* operon and were simultaneously resistant against at least two antibiotics.

Furthermore, it was shown that IS256 is involved in phase variation of biofilm formation *in vivo*. In case of a clinical *S. epidermidis* strain that was isolated from a patient with a catheter-associated urinary tract infection, the insertion of the element in the *icaC* gene was detected resulting in a biofilm-negative phenotype. Subcultivation of the insertion mutant resulted in biofilm-forming variants after a few passages. Nucleotide sequencing indicated the complete

excision of IS256 from the *icaC* gene including the duplicated target site sequence of seven base pairs. These data are in agreement with the results received in a recent *in vitro* study and show that IS256 has an influence on the *ica*-expression during an infection.

In this study, phase variation of biofilm formation was also shown in *S. aureus*. After serial passages, several biofilm producers were derived from formerly biofilm-negative single colonies which could also revert to the biofilm-negative phenotype again. DNA analysis by pulsed-field gel electrophoresis showed that in the variants large DNA-rearrangements took place. In addition to the variable biofilm production, differences in the expression of the alternative transcription factor SigmaB were observed in the variants. Nucleotide sequencing of the *sigB* system indicated several point mutations in the SigB regulatory genes *rsbU* and *rsbW* of the variants. This implies that the SigB gene locus is subject to a strong genetic variability that results, in turn, in pleiotropic effects on gene expression in *S. aureus*. However, Northern blot analysis revealed that the biofilm formation in the *S. aureus* variants are not associated with the varying SigB expression.

2.1. Biofilmbildung bei Staphylokokken als Pathomechanismus

2.1.1 Allgemeines

Staphylokokken gehören zur Familie der Mikrokokken. Sie sind unbewegliche, nicht sporenbildende, fakultativ anaerobe Gram-positive Kokken mit niedrigem GC-Gehalt, die als Besiedler der Haut und Schleimhäute von Menschen und Tieren weit verbreitet sind. Staphylokokken unterscheiden sich von Mikrokokken, neben zahlreichen biochemischen und morphologischen Kriterien, hauptsächlich durch ihre Empfindlichkeit gegenüber Lysostaphin. Der Genus *Staphylococcus* enthält gegenwärtig ca. 30 Arten, von denen besonders die Spezies *Staphylococcus aureus* eine herausragende human- und veterinärmedizinische Bedeutung hat. Lange Zeit wurde dieser Erreger als einziger Vertreter der Gattung für krankheitserregend gehalten und aufgrund von Koagulase-Produktion, der Verwertung von Mannitol- und der Anwesenheit von ProteinA auf der Zelloberfläche von den anderen Spezies unterschieden. Die restlichen Arten wurden unter der Speziesbezeichnung *S. albus*, die sich nachfolgend zu *S. epidermidis* änderte, zusammengefaßt. Später wurde der Begriff „Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)“ geprägt, unter dem man alle Staphylokokken versteht, die nicht zur Spezies *S. aureus* gehören und keine Koagulase bilden.

Durch DNA-DNA-Hybridisierung, und, soweit untersucht, auch durch spezifische Sequenzen der 16S rRNA-Gene, sind bisher 29 KNS-Spezies bestätigt (Ludwig *et al.*, 1994). Da derartige Sequenzdaten bisher noch nicht für alle KNS-Spezies verfügbar sind, wurde eine entsprechende PCR für die Speziesdiagnostik bisher nicht erprobt. Aus Gründen der praktischen Durchführbarkeit erfolgt daher die Speziesdiagnostik für KNS in der klinischen Diagnostik über biochemische Merkmalsprofile.

Koagulase-negative Staphylokokken galten noch bis vor kurzem als vollkommen apathogen. In den letzten beiden Jahrzehnten jedoch haben sie sich zu den häufigsten Erregern von Infektionen im Hospitalmilieu entwickelt. Hier treten sie vor allem bei immungeschwächten Patienten als Erreger von sogenannten Implantat-assoziierten Infektionen auf. Dabei kommt der Spezies *S. epidermidis* besondere Bedeutung zu. *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* und *S. lugdunensis* kommen ebenfalls als Infektionserreger vor, treten jedoch wesentlich

seltener auf. KNS gehören zu den häufigsten Erregern von Infektionen an implantierten Fremdkörpern wie z. B. Venenkathetern, CAPD-Kathetern, Liquorshunts, künstlichen Herzklappen und Gelenken sowie Gefäßprothesen, intraokulären Linsen und Herzschrittmachern (Pfaller *et al.*, 1988, Emori *et al.*, 1993, Kloos *et al.*, 1994, Rupp *et al.*, 1994).

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von infizierten Venenkathetern zeigten, daß *S. epidermidis* Polymeroberflächen in Form von adhärennten Biofilmen aus mehreren Zellschichten besiedeln kann, die von Exopolysacchariden umhüllt sind, welche als Schleim oder Glycocalyx bezeichnet werden (Christensen *et al.*, 1982, Franson *et al.*, 1984, Costerton *et al.*, 1987). Es gilt heute als sicher, daß die Fähigkeit zur Biofilmbildung eine wesentliche Ursache für die Pathogenität von *S. epidermidis* ist. Für den Nachweis von Staphylokokken-Biofilmen wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden entwickelt. So benutzten Christensen *et al.* (1982) eine Färbemethode für die makroskopische Detektion von Biofilmen auf der Innenwand von Plastik- oder Glas-Röhrchen. Andere Methoden nutzen die Elektronen- oder Hellfeld-Mikroskopie (Hogt *et al.*, 1983, Ludwicka *et al.*, 1983), um die Kolonisierung zu studieren. Ebenso wurde die Menge von ATP in adhärennten Bakterien durch ein Biolumineszenz-Verfahren bestimmt (Ludwicka *et al.*, 1985). Das am weitesten verbreitete Verfahren zum Nachweis der Biofilmbildung von Staphylokokken ist jedoch der quantitative Adhärenztest nach Christensen *et al.* (1985), bei dem die Bakterien in einem geeigneten Medium in einer 96-well Polystyren-Mikrotiterplatte angezogen werden und nach diversen Waschschrinen die Menge des gebildeten Biofilms durch das Messen der optischen Dichte in einem ELISA-Reader bestimmt wird.

Die Entstehung eines Biofilms auf einer Polymeroberfläche verläuft in zwei Phasen: der schnellen primären Bindung einzelner Bakterienzellen an eine Polymer-Oberfläche folgt die Proliferation und Akkumulation der Zellen in vielen Zellschichten. Hierzu ist die Fähigkeit zur interzellulären Adhäsion erforderlich. In der späteren Phase kommt es außerdem zur Bildung der Glycocalyx, die die Bakterienzellen umhüllt (Abb. 1). Besonders auffällig ist dabei, daß die Mehrzahl der in einen Biofilm integrierten Bakterien keinerlei direkten Kontakt zur Polymeroberfläche haben und deshalb interzelluläre adhäsive Kräfte ausüben müssen, um in einem solchen Biofilm integriert zu bleiben. Die einzelnen Faktoren, die bei der Biofilmbildung eine Rolle spielen sollen nachfolgend näher erläutert werden.

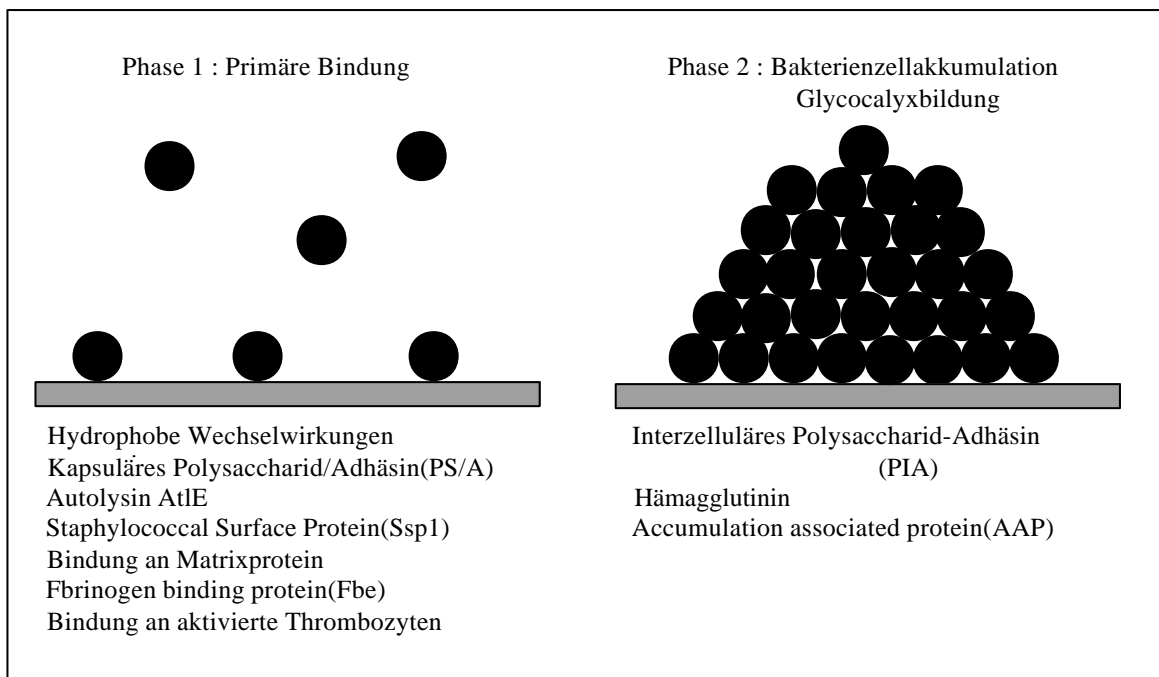


Abb.1. Phasen der Biofilm-Entstehung bei *Staphylococcus epidermidis*.

2.1.2. Primäre Bindung von Staphylokokken an Polymeroberflächen

Die primäre Bindung von Staphylokokken an Polymer-Oberflächen ist ein komplexer Vorgang, bei dem sowohl Oberflächenhydrophobizität und Ladung der Zellen als auch Zellwand-assoziierte Proteine eine wichtige Rolle spielen (Ludwicka *et al.*, 1984, Hogt *et al.*, 1985). Staphylokokken haben die Fähigkeit, ein breites Spektrum von extrazellulären Matrixproteinen (z. B. Fibronectin, Vitronectin), Gewebekomponenten und lösliche Faktoren auf ihrer Oberfläche zu binden (Pascual *et al.*, 1986, Peters *et al.*, 1987, Herrmann *et al.*, 1988, Vaudaux *et al.*, 1989, Espersen *et al.*, 1990, Muller *et al.*, 1991). Alle medizinischen Fremdkörper werden bereits kurz nach ihrer Implantation mit diesen Komponenten überzogen und bieten damit eine ideale Angriffsfläche für die Besiedlung durch diese Bakterien. Es ist bekannt, daß Staphylokokken auf ihrer Oberfläche eine spezielle Klasse von Proteinen tragen, die die Adhärenz an Kollagen, Fibronectin, Fibrinogen und andere Faktoren vermitteln (Foster und Höök, 1998). Diese Oberflächen-assoziierten Proteine sind kovalent mit der Zellwand verbunden und teilen strukturelle Gemeinsamkeiten (Navarre und Schneewind, 1999). Sie zeichnen sich durch eine ausgeprägte Domänenstruktur aus. Am N-Terminus ist regelmäßig eine typische Signalsequenz nachweisbar, die von einer oder mehreren Domänen

gefolgt wird, die für die entsprechende Ligandenbindung verantwortlich ist. Dieser Ligandenbindende Bereich ist in vielen Proteinen dieser Klasse durch ausgedehnte Repeatstrukturen gekennzeichnet, in denen besonders häufig Serin- und Aspartatreste als charakteristische Aminosäuren vorkommen (McCrea *et al.*, 2000). Am C-Terminus findet sich zwischen einer Peptidoglykan-spannenden Region und einem Membrananker ein charakteristisches LPXTG-Motiv. Diese LPXTG-Signatur wird auch als Zellwand-Sorting-Signal bezeichnet und stellt die Zielstruktur für ein Enzym dar, das Sortase genannt wird. Es vermittelt die kovalente Bindung der Proteine an das Peptidoglykangerüst der Zellwand und stellt damit ein Schlüsselenzym für die Präsentation von Oberflächenproteinen auf der Staphylokokkenzelle dar (Abb. 2).

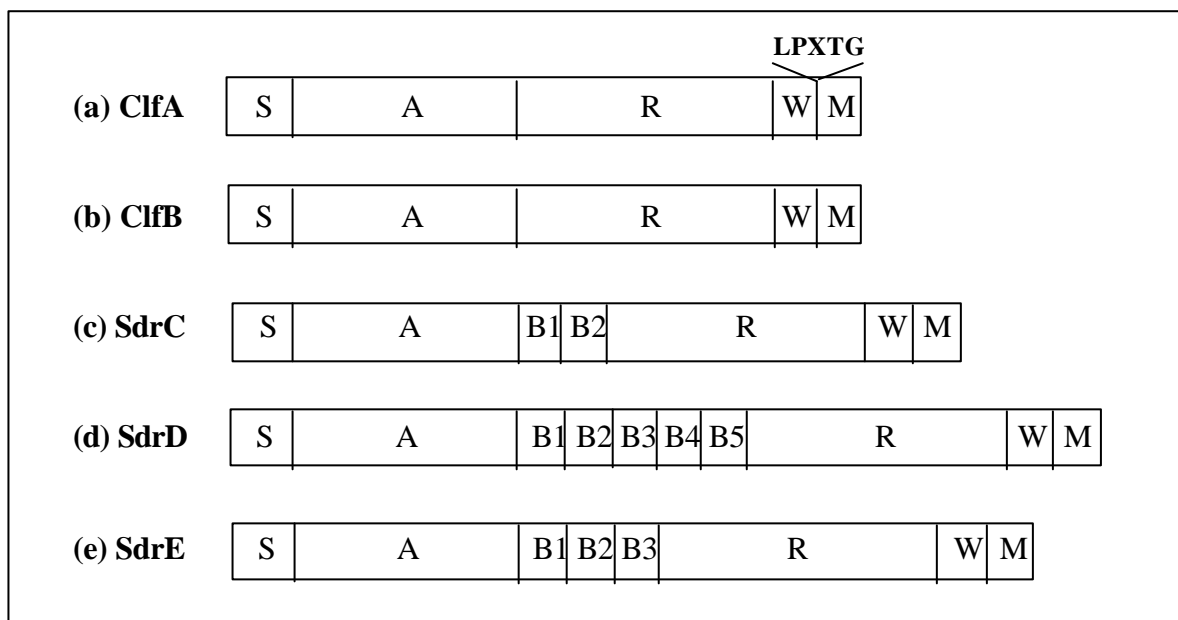


Abb. 2. Strukturelle Organisation von ClfA-Sdr-Proteinen : (a) ClfA, (b) ClfB, (c) SdrC, (d) SdrD und (e) SdrE.

S : Signalsequenz, A : A-Domäne, B : B-Repeat-Bereich, R : Ser-Asp-Dipeptid-Repeat-Bereich, W : Zellwand-Spanning-Bereich, M : Membran-Spanning-Bereich.

Neben diesen LPXTG-Proteinen wurden weitere Oberflächenproteine nachgewiesen, die ebenfalls in die Adhärenz auf Oberflächen involviert sind. Dazu zählen die Autolysinproteine AtlE von *S. epidermidis* (Heilmann *et al.*, 1997) und Aas von *S. saprophyticus* (Hell *et al.*, 1998). AtlE kodiert für ein Protein von 1335 Aminosäuren mit einer errechneten relativen Molekülmasse von 148 kDa. Dieses Oberflächen-assoziierte Adhäsinspielt offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der initialen Adhärenz von *S. epidermidis* an

Polymeroberflächen. Zusätzlich zu seinen Funktionen als Autolysin bei der Zellteilung und bei der Bindung an Polystyrol hat *AtIE* auch eine Affinität zu dem Matrixprotein Vitronektin. Das zu *AtIE* homologe Autolysin/Hämagglutinin (Aas) von *Staphylococcus saprophyticus* hat im Gegensatz dazu eine Bindungsaffinität zu Fibronektin (Hell *et al.*, 1998). In Übereinstimmung mit der Fähigkeit einiger *S. epidermidis* Stämme an Fibrinogen-modifizierte Oberflächen zu binden, wurde kürzlich das Gen eines Fibrinogen-bindenden Proteins (*fbe*) von *S. epidermidis* kloniert (Nilsson *et al.*, 1998). *Fbe* ist ein Protein mit einer errechneten relativen Molekülmasse von 119 kDa, das eine Homologie zum Clumpingfactor von *Staphylococcus aureus* aufweist. Durch PCR konnte *fbe* bei der Mehrzahl klinischer *S. epidermidis* Isolate nachgewiesen werden. Jedoch war die Bindungsfähigkeit von *fbe*-positiven *S. epidermidis*-Stämmen an Fibrinogen sehr heterogen ausgeprägt, was auf erhebliche quantitative Unterschiede der Expression dieses Proteins bei verschiedenen Isolaten hinweisen könnte (Pei *et al.*, 1999).

2.1.3. Faktoren für die Biofilmbildung in *S. epidermidis*

Eine Voraussetzung für die Akkumulation zu einem mehrschichtigen Biofilm ist die Fähigkeit der Bakterienzellen, untereinander adhäsive Kräfte auszuüben. Auf der Suche nach einem solchen interzellulären Adhäsion erzeugten Mack und Mitarbeiter durch Transposonmutagenese die beiden Biofilm-negativen Mutanten M10 und M11 und verwendeten ein Kaninchenantiserum, das gegen den Biofilm-bildenden *S. epidermidis*-Stamm 1457 erzeugt wurde. Sie wiesen damit eine Substanz nach, die offensichtlich die Adhäsion von Staphylokokkenzellen untereinander vermittelte (Mack *et al.*, 1992, Mack *et al.*, 1994a). Die Expression des entsprechenden Antigens variierte parallel zur Expression eines Biofilms, wenn die Bakterien unter verschiedenen physiologischen Wachstumsbedingungen angezüchtet wurden. Die Zerstörung des Antigens durch Periodat-Oxidation wies auf ein Polysaccharid als wesentlichen Bestandteil des Antigens hin. Das Polysaccharid wurde mit Gelfiltration und Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt und durch chemische Analysen und NMR-Spektroskopie charakterisiert (Mack *et al.*, 1996b). Dabei wurde gezeigt, daß das Adhäsion aus zwei Polysacchariden besteht. Polysaccharid I liegt als lineares Homoglykan aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften 2-Desoxy-2-amino-D-Glucopyranosyl-Einheiten vor, von denen durchschnittlich 15 bis 20 % der Zuckerreste nicht N-acetyliert und somit positiv geladen sind. Durch Kationenaustausch-Chromatographie

wurde Polysaccharid I in mehrere molekulare Spezies getrennt, deren Gehalt an nicht N-acetylierten Glucosamin-Resten zwischen 2 % und 26 % variierte. Polysaccharid II ist strukturell eng mit Polysaccharid I verwandt, jedoch hat einen geringeren Gehalt an nicht N-acetylierten Glucosamin-Resten und enthält Phosphat und Succinat, die zu einem leicht anionischen Verhalten führen. Ein Polysaccharid mit dieser Struktur wurde bisher nicht beschrieben. Aufgrund seiner Funktion wurde es als interzelluläres Polysaccharid-Adhäsion (PIA) bezeichnet. In einer Population von 179 klinischen *S. epidermidis* Isolaten bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Biofilmbildung und der PIA-Synthese (Mack *et al.*, 1996a).

Unabhängig davon isolierten Heilmann *et al.* (1996a) zwei Transposon-Mutanten (Mut2 und Mut2a), die einen sehr ähnlichen Phänotyp wie die Mutanten M10 und M11 aufwiesen. Genetische Analysen ergaben, daß die Mutanten Mut2 und Mut2a Transposon-Insertionen in einem Genlokus trugen, den man nachfolgend als *ica*-Lokus (für intercellular adhesion) bezeichnete. Durch Transformation mit dem Plasmid pCN27, das die *ica*-Gene enthält, konnten die Mutanten wieder zu einem Biofilm-positiven Phänotyp komplementiert werden (Heilmann *et al.*, 1996a). *Ica* kodiert für vier Gene *icaADBC*, die als Operon organisiert sind (Heilmann *et al.*, 1996b). *IcaA* ist ein Transmembranprotein von 412 Aminosäuren, das Homologie zu N-Acetylglucosaminyl-Transferasen aufweist. *IcaC* ist ein hydrophobes integrales Membranprotein von 355 Aminosäuren. *IcaB* besteht aus 289 Aminosäuren und wird vermutlich in den Überstand sezerniert. Die Inaktivierung jedes dieser drei Gene durch eine das Leseraster verschiebende Mutation führte zu einem Zellaggregations-negativen Phänotyp des rekombinanten *S. carnosus*- Stammes, in den diese Gene kloniert worden waren (Heilmann *et al.*, 1996b). Kürzlich wurde noch ein viertes mit *icaA* und *icaB* überlappendes Gen *icaD* beschrieben (Gerke *et al.*, 1998). *IcaA* allein zeigte nur eine geringe N-Acetylglucosaminyl-Transferaseaktivität, die jedoch durch Koexpression von *IcaD* um ein vielfaches gesteigert wurde. Diese beiden Proteine führten zur Synthese von N-Acetylglucosamin-Oligomeren bis zu einer Länge von 20 Zuckerresten. Nur wenn zusätzlich noch *icaC* koexprimiert wurde, wurden Oligomere synthetisiert, die mit einem PIA-spezifischen Antiserum reagierten. Um die Rolle des *ica*-Genclusters als möglichen Virulenzfaktor von *S. epidermidis* zu untersuchen, wurde eine epidemiologische Untersuchung zwischen klinischen und saprophytären Isolaten durchgeführt (Ziebuhr *et al.*, 1997). Dabei konnte gezeigt werden, daß die Spezies *S. epidermidis* hinsichtlich der Präsenz des *ica*-Operons in zwei genetisch distinkte Gruppen zerfällt. Durch PCR und Southern-

Hybridisierung wurden Stämme nachgewiesen, die die genetische Information zur Biofilmbildung enthalten, während bei anderen Isolaten das *ica*-Operon fehlte. Dabei fiel besonders auf, daß das *ica*-Operon in klinischen Isolaten von Patienten mit Katheter-assoziierten Infektionen wesentlich weiter verbreitet war als in Hautisolaten von gesunden Menschen. Neuere Studien bestätigen diese Befunde und unterstützen die These, daß die Fähigkeit zur Biofilmbildung ein wichtiger Virulenzfaktor für *S. epidermidis* ist, anhand dessen sich pathogene und saprophytäre Isolate möglicherweise unterscheiden lassen (Frebourg *et al.*, 2000, Galdart *et al.*, 2000).

2.1.4. Biofilmbildung in *S. aureus*

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß das gesamte *ica*-Operon auch in *S. aureus* vorkommt (Cramton *et al.*, 1999), wobei die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zu 59 % bis 78 % identisch waren (Abb. 3). Im Unterschied zu *S. epidermidis* scheinen alle bisher untersuchten Stämme die genetische Information zur Biofilmbildung zu besitzen. In vitro bilden jedoch nur wenige Stämme einen Biofilm auf Plastikoberflächen aus.

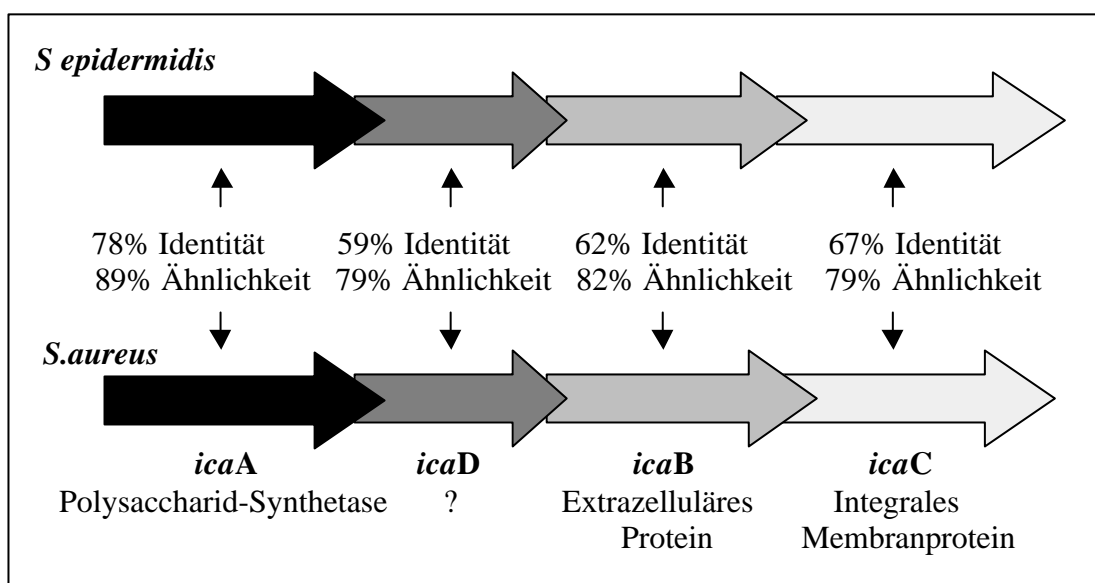


Abb. 3. Genomische Struktur des *ica*-Genclusters und Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zwischen den *ica*-Genen aus *S. epidermidis* und *S. aureus*.

2.2. Antibiotikaresistenz bei Staphylokokken und der Einfluß von Biofilmen auf die Antibiotikaresistenz

2.2.1. Antibiotikaresistenz

Nosokomiale Staphylokokkeninfektionen werden heute zunehmend von multiresistenten Stämmen verursacht, die die Therapie dieser Erkrankungen erheblich erschweren (Pfaller *et al.*, 1988, Emori *et al.*, 1993, Kloos *et al.*, 1994).

Seit seiner Entdeckung war Penicillin das Mittel der Wahl bei Staphylokokkenerkrankungen. Jedoch war die Penicillinresistenz in den 50iger Jahren durch β -Lactamaseproduzierende Stämme bereits so weit verbreitet, daß die Anwendung von Penicillin hier wirkungslos wurde. Für kurze Zeit wurde dieses Problem durch die Entwicklung halbsynthetischer, penicillinasefester Verbindungen aus der Methicillin- bzw. Oxacillingruppe gelöst. Zu Beginn der 60iger Jahre traten aber schon die ersten Infektionen durch methicillinresistenten *S.aureus* in europäischen Krankenhäusern auf (Stewart *et al.*, 1963, Benner *et al.*, 1968). Methicillinresistente *S. aureus* und methicillinresistente Koagulase-negative Staphylokokken sind heute weltweit verbreitet (Doebbeling, 1995). Mehr als 70 % der nosokomialen *S.epidermidis*- bzw. 12 bis 15 % der *S. aureus*-Isolate sind methicillinresistente Stämme (York *et al.*, 1996). Die molekulare Grundlage dieser Resistenz ist ein modifiziertes Penicillinbindendes Protein (PBP2a), an das β -Lactame nicht oder nur vermindert binden und das vom *mecA* Gen kodiert wird (Chambers *et al.*, 1997). Das *mecA*-Gen liegt auf einem etwa 50 kb großen chromosomalen DNA-Fragment (*mec*-DNA), das nur in methicillinresistenten Stämmen vorkommt und in der Nähe der *pur-nov-his* Gencluster im Chromosom von *S. aureus* lokalisiert ist (Kuhl *et al.*, 1978, Hiramatsu *et al.*, 1996). Die Kernregion der *mec* DNA besteht aus *mecA* für PBP2a, sowie *mecI* und *mecR1* für die Regulation der *mecA*-Transkription. *mecI* und *mecR1* liegen stromaufwärts vom *mecA* Promotor (Tesch *et al.*, 1990, Hiramatsu *et al.*, 1992). *mecI* reprimiert die *mecA*-Transkription während *mecR1* die *mecA*-Expression aktiviert. Dabei bestehen Ähnlichkeiten beider Elemente zu den β -Lactamase-Regulatoren *blaI* und *blaR1* (Dyke *et al.*, 1997). Das *mecA*-Gen ist zwischen den einzelnen Staphylokokken Spezies hochkonserviert, jedoch ist nicht bekannt wie diese genetische Information erworben wurde (Ubukata *et al.*, 1990, Archer *et al.*, 1994b). Das Vorkommen von einer oder mehreren Kopien des IS-Elementes IS431*mec* und von zwei

offenen Leserastern, die für Rekombinasen kodieren, legen nahe, daß die *mec*-DNA ein mobiles genetisches Element ist (Archer *et al.*, 1994a, Hiramatsu *et al.*, 1996, Ito *et al.*, 1999). Eine auffällige Eigenschaft Methicillin-resistenter Staphylokokken ist ihre Resistenz gegen zahlreiche weitere, nicht-verwandte Antibiotika. Vermutlich sind diese multiresistenten Stämme besonders leicht in der Lage, Resistenzdeterminanten, die auf Plasmiden oder Transposons lokalisiert sind, zu erwerben und Resistenzen durch die Anhäufung von Punktmutationen zu generieren. Die molekularen Ursachen dafür sind noch nicht bekannt, jedoch könnte die Präsenz von mobilen genetischen Elementen (z. B. Insertionssequenzen) dabei eine Rolle spielen. Häufig kommen bei nosokomialen Staphylokokkenisolaten Resistenzen gegen Aminoglykoside, Makrolide, Lincosamide, Streptogramine, Tetrazykline, Chloramphenicol aber auch gegen Fluorquinolone und Rifampicin vor. Gegenüber Glykopeptiden ist die Resistenzlage, im Unterschied zu Enterokokken, vergleichsweise günstig. Zwar wurden in der Vergangenheit gelegentlich Vancomycin-resistente Stämme beschrieben, meist handelte es sich dabei aber um *S. haemolyticus*, der eine gewisse intrinsische Resistenz gegen Glykopeptide besitzt und darüber hinaus nur eine untergeordnete Rolle als Humanpathogen spielt (Schwalbe *et al.*, 1987, Frogatt *et al.*, 1989, Veach *et al.*, 1990). In jüngster Zeit aufgetauchte *S. aureus* Stämme mit einer deutlich verminderten Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin geben dagegen zu höchster Besorgnis Anlaß (Wong *et al.*, 1999). Anders als in Enterokokken handelt es sich hier nicht um eine Resistenzdeterminante, die transferierbar ist und spezifisch die Zielstruktur für die Glykopeptide in der Zellwand modifiziert. Die genauen molekularen Mechanismen dieser verminderten Empfindlichkeit sind noch wenig verstanden, jedoch scheinen diese Stämme eine veränderte Peptidoglykanstruktur und einen gesteigerten Zellwand-turn-over zu haben (Cui *et al.*, 2000, Peschel *et al.*, 2000).

2.2.2. Der Einfluß von Biofilmen auf die Resistenz

Langjährige klinische Erfahrungen zeigen, daß die antibiotische Therapie von Staphylokokkeninfektionen im Zusammenhang mit Implantaten äußerst schwierig und in vielen Fällen sogar unmöglich ist. Dies ist auch der Fall, wenn der betreffende Keim unter *in-vitro*-Bedingungen gegen das verwendete Antibiotikum empfindlich ist. Ein Mechanismus der Resistenz gegen Antibiotika durch Biofilm basiert auf dem Unvermögen von Antibiotika, Biofilme völlig zu penetrieren (Faber *et al.*, 1990). Diese Hypothese wurde jedoch durch den

Befund widergelegt, daß das Durchdringen der bakteriellen Oberfläche durch Antibiotika nur minimal durch Biofilme verzögert wird (Dunne *et al.*, 1993) Eine Andere Hypothese beruht auf den physiologischen Status der individuellen Zellen (Williams *et al.*, 1997). Die Wachstumsrate ist ein wichtiger Faktor für die Resistenz gegen Antibiotika. Reduzierte Nahrungsnutzung von langsamwachsenden Bakterien kann die Zusammensetzung von bakteriellen Zellmembranen verändern. Diese Änderung der Zellmembranen kann einen Einfluß auf die Resistenz gegen Antibiotika haben (Anwar *et al.*, 1992).

2.3. Phänotypische und genotypische Variabilität

Eine typische Eigenschaft klinischer Staphylokokken-Stämme ist ihre Fähigkeit, schnell ihre phänotypischen und genotypischen Merkmale zu verändern. Dabei kann aus einer einzigen Zelle durch Mutationen, Rearrangements oder Deletionen eine Vielzahl an Klonen hervorgehen, die sich deutlich von der Elternzelle unterscheiden. Solche Veränderungen finden offensichtlich häufig während einer Infektion statt und wurden bisher besonders bei Implantat-assoziierten Infektionen beschrieben (Archer, G. L., 1997, Paulsen *et al.*, 1997, van Wijngaerden *et al.*, 1997, Ziebuhr *et al.* 2000b).

Eine besondere Form der Variabilität von Staphylokokken ist die Ausbildung von sogenannten Small-colony-variants (SCVs), die bereits vor 40 Jahren beschrieben wurden (Goudie *et al.*, 1955). Diese Varianten wachsen langsam und wachsen als kleine Kolonien. Sie zeichnen sich durch eine reduzierte Koagulase- und Exoprotein-Produktion, die Nichtverwertung von Mannitol, intrazelluläres Überleben sowie eine gesteigerte Resistenz gegen Aminoglykoside aus (Balwit *et al.*, 1994, Proctor *et al.*, 1994, Proctor *et al.*, 1995, Vesga *et al.*, 1996). Sie zeigen zusätzlich einen Auxotrophismus für Menadione und/oder Hemin, die wichtige Bestandteile der Atmungskettenenzyme sind (Proctor *et al.*, 1994, Proctor *et al.*, 1995, von Eiff *et al.*, 1997). Defekte in der Hemin und/oder Menadionsynthese führen zu einem deutlich verminderten Membranpotential der Zellen und damit zu einer Beeinträchtigung energieabhängiger Prozesse. Zu diesen Prozessen gehört beispielsweise die verminderte Aufnahme von Antibiotika und auch die deutlich verringerte Produktion von Toxinen. Die letztgenannte Eigenschaft führt dazu, daß SCVs eukaryonte Zellen in ihrer Umgebung nicht mehr zerstören. Vielmehr sind SCVs nun in der Lage, in diesen Zellen zu

persistieren. Da SCVs jederzeit wieder zum vollvirulenten Phänotyp revertieren können, stellen sie eine Quelle für chronische Infektionen dar. Tatsächlich werden SCVs typischerweise bei Implantat-assoziierten Infektionen, insbesondere in der Orthopädie gefunden (Proctor *et al.*, 1994, Proctor *et al.*, 1995). SCVs lassen sich aber auch *in vitro* sehr leicht durch subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika (Aminoglykoside, Flourquinolone) induzieren.

Neben der Ausbildung von SCVs ist die Variabilität der Biofilmbildung eine weitere typische Eigenschaft pathogener Staphylokokken. Zahlreiche klinische Beobachtungen legen nahe, daß biofilmnegative Varianten, die von biofilmpositiven Stämmen abstammen, akute und chronische Staphylokokken-Infektionen auslösen (Baddour *et al.*, 1990, Deighton *et al.*, 1992, Baselga *et al.*, 1993). Die Variation der Biofilmbildung kann auch mit der Veränderung anderer Eigenschaften einhergehen. Insbesondere die Ausprägung von Resistenzeigenschaften ist häufig mit der Variablen Expression der Biofilmbildung verbunden. So wurde beispielsweise der Verlust der Transkription des *mecA*-Gens in biofilmnegativen Varianten von Methicillin-resistenten *S. epidermidis*-Stämmen beobachtet (Mempel *et al.*, 1994).

Ziebuhr *et al.* (1997) zeigten, daß die Expression des *ica*-Operons und damit die Biofilmbildung einem Phasenvariationsprozess unterliegt. Obwohl die molekularen Ursachen dieses Phänomens noch nicht vollständig verstanden sind, konnte nachgewiesen werden, daß in 25 bis 30 Prozent der Varianten die Phasenvariation durch die alternierende Insertion und Exzision des Insertionselementes IS256 in das *ica*-Operon ausgelöst wird. Interessanterweise scheint dabei das *icaC*-Gen einen Hot-spot für IS256-Insertionen darzustellen (Ziebuhr *et al.*, 1999).

2.4. Genregulation in Staphylokokken

Viele pathogene Bakterien haben hochkomplexe Signaltransduktionsmechanismen entwickelt, um optimal auf Veränderungen des sie umgebenden Milieus reagieren zu können. Darüber hinaus können unterschiedliche Umweltsignale die Expression bestimmter Gene spezifisch modulieren. Umweltsignale wie Temperatur und Osmolarität sowie physikalisch-chemische Faktoren wie Eisen und andere Ionen, Sauerstoff, Kohlendioxid, pH-Wert und

Kohlenstoffquellen sind wichtige Stimuli für die Expression von Virulenzgenen. Vor allem pathogene Bakterien mit einem Lebenszyklus außerhalb des Wirtes nutzen diese Umweltsignale und Umweltfaktoren (Tobe et al., 1991, Hromockyj et al., 1992). Diese Modulatoren können z.B. direkt auf regulatorische Elemente wirken, die die Transkription von verschiedenen Virulenzgenen kontrollieren. Einige Regulatorgene wie das *agr*-, *sar*- und *sigB*-System sind für die Regulation von Virulenzfaktoren bei Staphylokokken bekannt.

2.4.1. Agr (Accessory gene regulator)-System in *S. aureus* und *S. epidermidis*

Das Agr-System von *S. aureus* ist verantwortlich für die wachstumsphasenabhängige Regulation von Virulenzfaktoren (Morfeldt et al., 1996b, Ji et al., 1997). Das Agr-System von *S. aureus* ist ungefähr 3.5 kb groß und besteht aus zwei divergenten Transkriptionseinheiten, die von den Promotoren P2 und P3 gestartet werden (Peng et al., 1988). Das P2-Transkript kodiert Agr A, C, D und B und exprimiert RNAII (Novick et al., 1995). Das P3-Transkript exprimiert RNAIII, die das α -Hämolyisin (*hld*) kodiert (Kornblum et al., 1990). AgrA und AgrC kodieren ein sensorisches zwei-Komponenten-Transduktionssystem. AgrA, das nötig für die *agr*-Aktivation und ein Response-Regulator ist, ist wahrscheinlich nicht direkt mit einem *agr* Promoter verbunden (Morfeldt et al., 1996a), sondern beeinflusst sich gegenseitig mit SarA (Morfeldt et al., 1996b). AgrC ist der sensorische Signaltransmitter und das Target von Octapeptiden (Ji et al., 1995, Novick et al., 1995, Ji et al., 1997, Lina et al., 1998). AgrD und *agrB* produzieren das nötige Aktivierungssignal für AgrC. Das autoinduzierende Signal ist ein modifiziertes Octapeptid, das von *agrD* abgeleitet und durch *agrB* modifiziert wird (Ji et al., 1995, Ji et al., 1997). Die Modifikation besteht aus einer Thioester-Bindung zwischen internen Cysteinen und der C-terminalen Carboxy-Gruppe (Ji et al., 1997). RNAIII ist das Effektor-Molekül des Agr-Systems und reguliert verschiedene Targetgene durch einen unbekanntem Mechanismus.

Das Agr-System von *S. epidermidis* hat eine ähnliche Gen-Struktur und -Sequenz wie die von *S. aureus* und spielt eine vergleichbare Rolle (Otto et al., 1998). Das AgrA zeigt eine hohe Identität der Proteinssequenz im Vergleich zu *S. aureus* (87.3 %). Die Histidin-Kinase AgrC hat 50.5 % Identität im C-Terminus-Bereich, allerdings im N-Terminus nur eine niedrige Identität. Die AgrD-Sequenz zeigt eine Identität nur beim internen Cystein und am C-Terminus des Pheromon-Peptids, weil dieser Bereich wichtig für die Bildung der Thiolactone ist. AgrB zeigt eine relativ hohe Identität von 51.3 % zu *S. aureus* und 53.7 % zu *S.*

lugdunensis. Die Peptidsequenz des α -Toxins von *S. epidermidis* ist ebenfalls bekannt (Mckevitt *et al.*, 1990) und wird wahrscheinlich von der RNAIII exprimiert.

Das Agr-System wird während des Übergangs von der exponentiellen Wachstumsphase zur stationären Phase aktiviert (Ji *et al.*, 1997, Otto *et al.*, 1998). Das Agr-System von *S. aureus* führt zur Aktivierung der Produktion von Exoproteinen (α -Toxin, Toxic-Shock-Syndrom-Toxin 1, Serin-Protease u.a.) am Ende der exponentiellen Phase und zur Hemmung der Synthese von Zelloberflächenproteinen, wie zum Beispiel ProteinA, Coagulase, Fibrinogen-Bindeprotein und Clumping-Faktor (Janzon *et al.*, 1989, Kornblum *et al.*, 1990). Es wurde berichtet, daß der *agr*-Lokus in *S. aureus* die Adhärenz zu Fibrinogen (Schenkman *et al.*, 2001) und die Biofilmbildung auf Polystyren (Vuong *et al.*, 2000b) negativ reguliert.

Wie in *S. aureus*, ist das Agr-System in *S. epidermidis* wahrscheinlich verantwortlich für die positive Regulation der Exoproteine sowie für die negative Regulation von Zelloberflächenproteinen (Vuong *et al.*, 2000a).

2.4.2. Sar (Staphylococcal accessory regulator)-System in *S. aureus*

Das *sar*-System wird von drei überlappenden Transkripten gebildet, die im gleichen Bereich enden und von drei verschiedenen Promotoren aus transkribiert werden: das 0,58 kb-*sarA* von Promoter P1, das 0,84 kb-*sarC* von P3 und das 1,15 kb-*sarB* von P2. Wegen dieser Vielfalt der Promotoren ist die Aktivierung von *sar* vielschichtig und stellt einen wachstumsabhängigen Transkriptionsmodus dar. Sowohl das *sarA* als auch das *sarB*-Transkript werden in der exponentiellen Phase maximal exprimiert und beim Übergang zur stationären Phase dramatisch reduziert. Das *SarC*-Transkript entsteht während der exponentiellen Phase und vermehrt in der späten stationären Phase (Bayer *et al.*, 1996).

Der *sar*-Lokus beteiligt sich zumindest teilweise an der positiven Regulation der Transkription des *agrP2* und *agrP3*-Promotors (Heindrichs *et al.*, 1996, Cheung *et al.*, 1997, Chien *et al.*, 1998b). Das Hauptprodukt des *sar*-Systems (*sarA*) wirkt hauptsächlich zusammen mit dem P2 des *agr*-Systems und zu einem geringeren Teil auch mit dem P3 des *agr*-Systems zusammen, um die *agr*-Transkription zu stimulieren (Cheung *et al.*, 1997, Chien *et al.*, 1998a). Das größere *sarB*-Transkript ist notwendig für die vollständige Expression von RNAII und RNAIII, während *sarA* und *sarC*-Transkripte nur teilweise die *agr*-Transkription beeinflussen (Heindrichs *et al.*, 1996, Cheung *et al.*, 1997, Chien *et al.*, 1998a). Diese Beobachtung läßt darauf schließen, daß die ORF im Upstream Bereich des *sarA*-Systems eine

wichtige Rolle für die SarA-Expression und die Aktivierung des *agr*-Systems spielen (Chien *et al.*, 1998b). Die Konzentration von *sarA* ist ein wichtiger Parameter für die *agr*-Aktivierung. Die optimale Konzentration von SarA für die *agr*-Aktivierung bewegt sich zwischen 980 und 1680 ng pro mg zellulärer Proteine (Chien *et al.*, 1998b). Es gab kürzlich einen Bericht, der im Gegensatz zu der vorherigen Hypothese behauptet, daß der DNA-Upstream-Bereich des *sarA*-Gens keine Rolle für die Regulation der SarA-Produktion spielt (Blevins *et al.*, 1999) und die *sarA*-Transkription von *agrP2*, *agrP3*, *cna* und *sea* Promotor hemmt (Chakrabarti *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu P1 und P2 hat P3 einen *sigB*-abhängigen Promotor mit einer typischen -10 Promotor Box (GGGTAT) (Bayer *et al.*, 1996). In einer *sigB*-Mutante ist eine reduzierte P3-Promotor Aktivität beobachtet worden (Manna *et al.*, 1998) und es wurde berichtet, daß *sarA* von *sigB* abhängig ist (Deora *et al.*, 1997). Vor kurzem ist ein Homologes-Gen zu *sarA*, *sarH1*, identifiziert worden, daß einen neuen globalen Regulator auf einem anderen Genlokus darstellt und dessen Expression durch SarA und RNAIII gehemmt wird (Tegmark *et al.*, 2000). Ein weiterer Regulator aus der Sar-Familie ist das kürzlich geschriebene SarR (Manna *et al.*, 2001). Dieser Regulator wirkt offenbar reprimierend auf die *sarA*-Expression.

2.4.3. Der alternative Sigma-Faktor SigB in *S. aureus*

Eine weitere Möglichkeit der Genregulation in Bakterien ist die Beteiligung alternativer Transkriptionsfaktoren (Sigmafaktoren) an der Genexpression. Sigmafaktoren sind Untereinheiten der RNA-Polymerase, die für die Erkennung und Bindung von Promotorstrukturen zuständig sind. Bakterienzellen besitzen in der Regel unterschiedliche Sigmafaktoren, die jeweils verschiedene Promotorsequenzen erkennen und damit entsprechend unterschiedliche Gene koordiniert aktivieren können. So unterscheidet man beispielsweise vegetative Sigmafaktoren, die die Genexpression in der exponentiellen Wachstumsphase steuern, von alternativen Sigmafaktoren, die in der stationären Phase bzw. bei Hunger und Stress zum Tragen kommen (Helmann *et al.*, 1988). In *S. aureus* ist ein Gen für einen alternativen Sigmafaktor beschrieben und als *S. aureus-sigB* bezeichnet worden (Wu *et al.*, 1996). Das *sigB*-System von *S. aureus* besteht aus vier ORFs (*rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB*) und zeigt eine hohe Homologie zum *Bacillus subtilis-sigB* (Völker *et al.*, 1994, Wu *et al.*, 1996). Die *sigB*-Genstruktur von *S. aureus* ist in Abb. 4(A) dargestellt. Das *S. aureus-sigB*-System hat zwei Promotoren : P_A, upstream von *rsbU* und P_B, downstream von *rsbU*,

das *sigB*-abhängig ist. Die Transkription des *S.aureus-sigB*-Systems zeigt, daß das *sigB*-System am Anfang der stationären Phase und unter Ethanol und Hitze-Stress induziert werden kann (Kullik *et al.*, 1997). Es ist berichtet worden, daß die Transkription des *sar*-Systems mindestens teilweise durch *sigB* kontrolliert wird (Deora *et al.*, 1997).

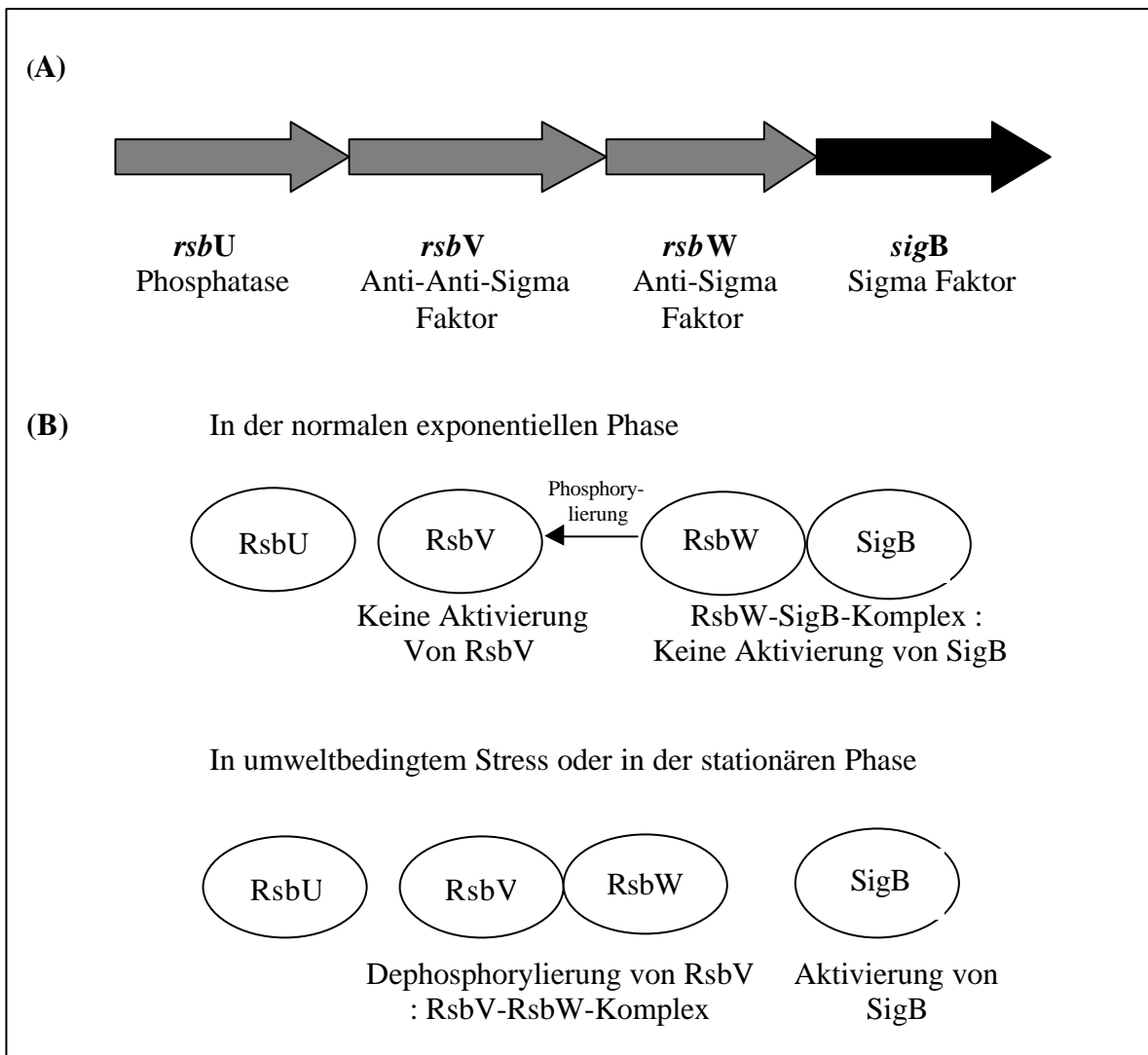


Abb. 4. Genetische Struktur von *sigB* in *S. aureus* (A) und Mechanismus der Aktivierung von SigB (B).

Das *rsbW*-Gen in *S. aureus* kodiert für einen Anti-Sigma-Faktor, der mit einer 1:1 Stöchiometrie an SigB bindet und dessen Funktion hemmt (Miyazaki *et al.*, 1999). Die vergleichbare Organisation des *sigB*-Systems in *S. aureus* und *B. subtilis* zeigt eine analoge Rolle für das regulatorische Protein RsbV (Wu *et al.*, 1996, Kullik *et al.*, 1997). RsbV in *B.*

subtilis ist ein Anti-Anti-Sigma-Faktor, der mit SigB um die Bindung an RsbW konkurriert (Dufour *et al.*, 1994). In der exponentiellen Phase inaktiviert RsbW RsbV durch Phosphorylierung und fördert die Bildung von RsbW-SigB-Komplexen. Im Zustand von Stress oder Hunger wird RsbV wieder dephosphoryliert und bindet an RsbW zur Bildung von RsbV-RsbW-Komplexen. Dann wird SigB von RsbW frei und aktiviert die Expression von SigB-abhängigen Genen (Dufour *et al.*, 1994, Yang *et al.*, 1996) (Abb. 4(B)). Der Stamm *S. aureus* 8325 enthält eine 11 bp-Deletion im *rsbU*-Gen. Eine intakte RsbU-Phosphatase in *B. subtilis* ist nötig für eine volle *sigB*-Aktivität im Stresszustand (Völker *et al.*, 1995a, Völker *et al.*, 1995b). Es wird vermutet, daß *S. aureus-sigB* durch Stress nur in Stämmen mit funktionellem RsbU aktiviert werden kann und damit ein notwendiger Faktor für die SigB-Aktivität ist (Kullik *et al.*, 1998). Dies wird auch dadurch belegt, daß durch die Komplementation mit einem intakten *rsbU*-Gen die SigB-Aktivität in einer Δ *rsbUVWsigB*-Mutante wiederhergestellt werden konnte (Giachino *et al.*, 2001).

Es wurde festgestellt, daß mehr als 30 Gene in *S. aureus* durch SigB kontrolliert werden (Gertz *et al.*, 2000). Das *asp23*-Gen, das für das Alkalische-Shock-Protein23 kodiert, ist ein Gen, das ausschließlich durch SigB aktiviert wird (Kullik *et al.*, 1998). Daher eignet sich das *asp23*-Gen besonders gut für den Nachweis der SigB-Aktivität in Northern-Blot-Studien. Auch Virulenzfaktoren werden von SigB positiv und auch negativ beeinflusst. Dazu gehören beispielsweise Δ -Hämolysin, der Clumping-Faktor, Koagulase und auch die Biofilmbildung (Rachid *et al.*, 2000b). Ebenso sind Resistenzeigenschaften in SigB-Mutanten verändert. Dabei scheint die Regulation in verschiedenen Stämmen jeweils unterschiedlich abzulaufen. So ist in einer *sigB*-Mutante des Stammes *S. aureus* RN6390 eine höhere Produktion von Δ -Hämolysin als beim Wildtypstamm beobachtet worden. Diese Hyperproduktion von Δ -Hämolysin tritt interessanterweise zusammen mit einer erhöhten *sarA*-Expression in der *sigB*-Mutante auf (Cheung *et al.*, 1999). Dagegen berichteten Chan *et al.* (1998), daß keine erhöhte Produktion von Δ -Hämolysin in der *sigB*-Mutante zu beobachten ist. Die Expression des Clumping Faktors und der Koagulase ist beim Stamm *S. aureus* RN6390 durch das *sigB*-System negativ reguliert, aber beim Stamm *S. aureus* WCUH29 positiv reguliert (Cheung *et al.*, 1999, Nicholas *et al.*, 1999). Eine drastische Veränderung von Resistenzeigenschaften gegen Antibiotika ist sowohl für die *sigB*-Mutante als auch für den dazugehörigen Wildtypstamm beobachtet worden. Die Resistenz gegen Methicillin bei den *sigB*-Mutanten vom Stamm *S. aureus* Col ist dagegen stark reduziert (Wu *et al.*, 1996). Neben diesen Virulenz- und Resistenzeigenschaften werden auch Stress-Proteine in *B. subtilis* durch SigB

kontrolliert (Antelmann *et al.*, 1997, Kruger *et al.*, 1996, Scharf *et al.*, 1998, Von Blon *et al.*, 1997). Hierzu gehören Hitze-Schock-Proteine (Ohta *et al.*, 1994, Chan *et al.*, 1998), Proteine, die in die Säure- und Äthanol-Toleranz involviert sind (Kullik *et al.*, 1997) und auch die Expression der Katalase, die zur oxidativen Stressantwort der Zelle gehört (Kullik *et al.*, 1998).

3.1. Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden 215 Stämme von *S. epidermidis* und 112 Stämme von *S. aureus* verwendet. Die Herkunft der verwendeten Stämme ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Die Herkunft der verwendeten *S. epidermidis*- und *S. aureus*-Stämme.

Spezies	Anzahl der Stämme	Ursprung der Stämme	Referenz
<i>S. epidermidis</i>	50	Blutisolate	Straubing
	41	Harnwegs isolate	Straubing
	35	Nasenabstrich	Europäer, Würzburg
	23	Nasenabstrich	Koreaner, Würzburg
	66	Hautisolate	Ambulanzpatienten, Ulm
<i>S. aureus</i>	10	TSST	Wernigerode
	10	TE	Wernigerode
	23	Multiresistente Isolate	Wernigerode
	25		wernigerode
	27		Straubing
	6	Nasenabstrich	Europäer, Würzburg
	8	Nasenabstrich	Koreaner, Würzburg
	3	Hautisolate	Ambulanzpatienten, Ulm

Die in dieser Arbeit verwendeten Staphylokokken-Stämme sind im Anhang ausführlich beschrieben.

3.2. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von MWG, München, Deutschland bezogen. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2. Sequenz der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung
icaA1	GACCTCGAAGTCAATAGAGGT	<i>icaA</i> -5'-Primer, <i>S. epidermidis</i>
icaA2	CCCAGTATAACGTTGGATAACC	<i>icaA</i> -3'-Primer, <i>S. epidermidis</i>
icaB1	ATGGCTTAAAGCACACGACGC	<i>icaB</i> -5'-Primer, <i>S. epidermidis</i>
icaB2	TATCGGCATCTGGTGTGACAG	<i>icaB</i> -3'-Primer, <i>S. epidermidis</i>
icaC1	ATAAACTTGAATTAGTGTATT	<i>icaC</i> -5'-Primer, <i>S. epidermidis</i>
icaC2	ATATATAAACTCTCTTAACA	<i>icaC</i> -3'-Primer, <i>S. epidermidis</i>
icaS.a.1	TACCGTCATACCCCTTCTCTG	<i>icaA</i> -5'-Primer, <i>S. aureus</i>
iSaA2	GACAAGAACTACTGCTGCGT	<i>icaA</i> -3'-Primer, <i>S. aureus</i>
iSaB1	CCCAACGCTAAAATCATCGC	<i>icaB</i> -5'-Primer, <i>S. aureus</i>
iSaB2	ATTGGAGTTCGGAGTGACTION	<i>icaB</i> -3'-Primer, <i>S. aureus</i>
iSaC1	CATGAAAATATGGAGGGTGG	<i>icaC</i> -5'-Primer, <i>S. aureus</i>
icaS.a.2	TCAAACCTGATTCGCCACCG	<i>icaC</i> -3'-Primer, <i>S. aureus</i>
IS256-f	TGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGC	IS256-5'-Primer
IS256-r	ATGTAGGTCCATAAGAACGGC	IS256-3'-Primer
IS257-f	GCTAATTTTCGTGGCATGGCG	IS257-5'-Primer
IS257-r	GTTATCACTGTAGCCGTTGG	IS257-3'-Primer
sarA-f	CCCAGAAATACAATCACTGTG	<i>sarA</i> -5'-Primer, <i>S. aureus</i>
sarA-r	AGTGCCATTAGTGCAAACCC	<i>sarA</i> -3'-Primer, <i>S. aureus</i>
RNAlII-1	CATAGCACTGAGTCCAAG	RNAlII-5'-Primer, <i>S. aureus</i>
RNAlII-2	ATCCCTAATCGTACTTGC	RNAlII-3'-Primer, <i>S. aureus</i>
asp23-f	GCATACGACAATCAAACCTGG	<i>asp23</i> -5'-Primer, <i>S. aureus</i>
asp23-r	CACTAAAATGGTGTGCCGAG	<i>asp23</i> -3'-Primer, <i>S. aureus</i>
sig11	GGACAATCACATCACGAAG	<i>sigB</i> -5'-Primer, <i>S. aureus</i>
sig22	CTAGCAGTGTTAATACTGC	<i>sigB</i> -3'-Primer, <i>S. aureus</i>
rsb1	GAGAAATACACTGACGAAG	<i>rsbU</i> -5'-Primer, <i>S. aureus</i>
rsb2	TTCTAATAGCAACCCACCT	<i>sigB</i> -3'-Primer, <i>S. aureus</i>

Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3. Die Sequenz der verwendeten Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung
icaC4	GACACACTTACTAACGCA	<i>icaC</i> -5'-Primer, <i>S. epidermidis</i>
IS-for	GCGAAGAGACCTGGACAACA	IS256-5'-Primer, <i>S. epidermidis</i>
rsb-seq	TCAGTTAGAGGTAGAGTGTT	<i>rsbU</i> -5'-Primer, <i>S. aureus</i>
rsb-seq.rev	CACAGCTTCACTAACTGCAA	<i>rsbW</i> -3'-Primer, <i>S. aureus</i>
sig-seq.rev	CTGATAGAAGGTGAACGCT	<i>sigB</i> -3'-Primer, <i>S. aureus</i>
M13-universal	TGTAACGACGGCCAGT	Klonierungsseite-5'-Primer
M13-reverse	CAGGAAACAGCTATGACC	Klonierungsseite-3'-Primer

3.3. Chemikalien

Alle benötigten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Boehringer, Mannheim, Deutschland; Difco, Augsburg, Deutschland; Fluka, Deisenhofen, Deutschland; Ferrak, Berlin, Deutschland; Gibco, Eggenstein, Deutschland; Merck, Darmstadt, Deutschland; Oxoid, Wesel, Deutschland; Roth, Karlsruhe, Deutschland; Serva, Heidelberg, Deutschland; und Sigma, Deisenhofen, Deutschland.

Die Enzyme stammen von den Firmen Boehringer; Eurogentec, Seraing, Belgien; Gibco; MWG; Serva; Pharmacia, München, Deutschland und Promega, Heidelberg, Deutschland.

Folgende Kits wurden verwendet:

„Api-Staph“, bioMerieux

„ECL“, Amersham

„FastRNA? Kit, BLUE“, Dianova

„Gene Clean“, Dianova, Hamburg, Deutschland

„pGEM®-T and pGEM®-TEasy Vector Systems“, Promega

„QIAquick™ Spin“, Qiagen

„Random primed DNA labelling“, Boehringer

„Staphytect Plus“, Oxoid

„T7 sequencing“, Pharmacia

„Thermo Sequenase“, Amersham

„Wab-Stab“, Mast Diagnostica

3.4. Geräte und Sonstiges

Alle Geräte für diese Arbeit wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Analysenwaage	Chyo MP-3000 Chyo JL-180
Autoklav	Webeco Tecnomara Integra Biosciences
Brutschrank	Memmert Tv40b Heraeus B5050E
Cleanbench	Nunc Inter Med
Computer	Pentium III
Computerprogramme	Microsoft Office 4.2
Drucker	HP Laser Jet 2100 Series PCL 6
Eismaschine	Scotsmann AF-20
Elektrophoresekammer	BioRad
Elektroporator	BioRad Gene Pulser Transfection
Filme	Hyperfilm ECL Fuji X-ray film RX
Kühlschrank	Quelle
Kühltruhe (-80°C)	Revco
Mikropipetten	Eppendorf Gilson
Mikrowellenofen	Philips
Mikrotiterplatte Reader	BioRad Model450
Netzgeräte	BioRad 200mA, 500V Consort E455 300mA, 3000V
Nylonmembran	Pall Biotyne B Schleicher & Schuell Nytran
PCR-Thermocycler	Eppendorf Techne Progene
pH-Meter	WTW pH 523
Photometer	Pharmacia Ultrospec 3000

Scanner	HP ScanJet IIcx
Schüttelinkubatoren	Bühler W55 swip GFL Wasserbad Innovar TM 4300
Sequenzanalyser	MWG-Biotech Model 4000
Speedvac-Concentrator	UNIVAPO 150H Uniequipe
Sterilfilter	Schleicher & Schuell 0.45µm, 0.22µm
Tischinkubator	Eppendorf Thermostat 5320 Liebsch
Ultraschallgerät	Branso Sonifer B12
UV-Transilluminator	UVP inc.
Vakuum-Blot-System	Pharmacia
Vakuumofen	Heraeus
Wasserbad	Köttermann GFL 1083
Whirlmix	Vortex Genie 2
96-Loch-Mikrotiterplatten (Flachboden)	Greiner
Zellzerstörungsgerät	Dianova Savant Instrument
Zentrifuge	Eppendorf 5415C Heraeus Biofuge 13R Heraeus Megafuge 1,0R Beckman J2-21

3.5. Medien und Agarplatten

Die Zusätze für die Medien wurden in dest. H₂O gelöst und für 20 min autoklaviert. Für die Agarplatten wurde 1,5 % Agar zugegeben.

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):

Caseinhydrolysat 10 g/l, Yeast Extract 5 g/l, Natriumchlorid 10 g/l, ad 1000 ml H₂O dest.

Trypticase-Soy-Broth (TSB-Medium) (Oxoid):

30 g in 1000 ml H₂O dest.

Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Difco):

37 g in 1000 ml H₂O dest.

Müller-Hinton Broth (MH-Medium) (Oxoid):

21 g in 1000 ml H₂O dest.

LB-Blutagarplatten:

5 % Humanerythrozyten (Baffico) wurden zu dem autoklavierten LB-Medium gegeben.

Kongorotagarplatten:

In jeweils getrennten Glasgefäßen wurden 37 g BHI mit 15 g Agar in 800 ml H₂O dest., 36 g Saccharose in 100 ml H₂O dest. und 800 mg Kongorot in 100 ml H₂O dest. gelöst. Alle Lösungen wurden getrennt autoklaviert und anschließend miteinander steril vermischt.

3.6. Puffer und Lösungen

Puffer für DNA-Agarosegelelektrophoresen

10 × TBE (Tris-Borat-EDTA): 108,9 g Tris-Base
55,69 g Borsäure
9,3 g EDTA
ad 1000 ml Aqua dest., pH 8,3

10 × TPE (Tris-Phosphat-EDTA): 108,9 g Tris-Base
15,5 ml Phosphorsäure, 85 %
40,0 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 1000 ml Aqua dest.

10 × TAE (Tris-Acetat-EDTA): 242 g Tris-Base
57,1 ml Eisessigsäure
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 1000 ml Aqua.dest.

<u>DNA-Probenpuffer:</u>	0,05 g Bromphenolblau
	0,05 g Xylencyanol
	5 ml Glycerol
	0,186 g EDTA
	ad 10 ml Aqua.dest.

Für Enzymreaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer und Lösungen verwendet. Alle selbst angesetzten Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden beschrieben. Steriles H₂O bidest. wurde für Enzymreaktionen und alle anderen Lösungen verwendet.

3.7. DNA- und RNA-Größenmarker

3.7.1. DNA-Größenmarker

Fragment (Nr.)	1 kb Leiter (MBI) (kb)	Lambda Leiter (BioLabs) (kb)	LowRange (BioLabs) (kb)
1	10,00	1018,5	194,0
2	8,00	970,0	145,5
3	6,00	921,5	97,0
4	5,00	873,0	48,5
5	4,00	824,5	23,1
6	3,50	776,0	9,42
7	3,00	727,5	6,55
8	2,50	679,0	4,36
9	2,00	630,5	2,32
10	1,50	582,0	2,03
11	1,00	533,5	0,56
12	0,75	485,0	0,13
13	0,50	436,5	
14	0,25	388,0	
15		339,5	
16		291,0	
17		242,5	

18	194,0
19	145,5
20	97,0
21	48,5

3.7.2. RNA-Größenmarker

0,24-9,5 kb Leiter (Gibco) (kb) :	9,49
	7,46
	4,40
	2,37
	1,35
	0,24

3.8. Antibiotika-Testblättchen

Die Antibiotika-Testblättchen für den Antibiotikaresistenz-Test wurden von Oxoid bezogen. Die Konzentrationen der verwendeten Testblättchen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4. Konzentrationen der verwendeten Antibiotika-Testblättchen.

Testblättchen	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN	W
Konzentration	30µg	1µg	30µg	10iµ	15µg	30µg	2µg	10µg	5µg

VA:Vancomycin, OX:Oxacillin, TE:Tetracyclin, P:PenicillinG, E:Erythromycin, C:Chloramphenicol, DA:Clindamycin, CN:Gentamicin, W:Trimethoprim

4.1. Isolierung von Staphylokokken aus der Nase und deren spezifische Identifizierung

4.1.1. Nasenabstrich („Transwab“-Kit)

Um Bakterien aus der Nase zu isolieren, wird der „Transwab“-Kit benutzt. Mit einem sterilen Tupfer wird ein Abstrich der Nasenschleimhaut entnommen. Der Tupfer wird dann in eine Transporthülse gesteckt. Bis zum Ausstreichen auf einer geeigneten Agarplatte kann diese Hülse bei Raumtemperatur liegen gelassen werden.

4.1.2. Katalase-Test

Wasserstoffperoxid wird durch das Enzym Katalase in folgender Reaktion gespalten :



Der Katalase-Test wird zur Unterscheidung von Staphylokokken im Vergleich mit Mikrokokken benutzt. Ein Tropfen Wasserstoffperoxid wird auf einen Objektträger gegeben und eine Kolonie von Bakterien damit gemischt. Entstehen dabei Blasen, so handelt es sich um Staphylokokken, ist die Reaktion dagegen Katalase-negativ, so liegen Mikrokokken vor.

4.1.3. Koagulase-Test mit dem „Staphylect Plus“-Kit

Der Dryspot Staphylect Plus-Test ist ein Latex-Objektträger-Agglutinationstest zur Differenzierung von Staphylokokken, die den Clumping-Faktor, ProteinA sowie bestimmte Kapselpolysaccharide (MRSA) bilden. Das Latex-Reagenz liegt in getrockneter Form auf dem Reaktionsobjektträger vor, der sowohl mit Schweinefibrinogen, Kaninchen-IgG als auch mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen die Kapselpolysaccharide von *S. aureus* beschichtet sind. Werden Staphylokokken in einer physiologischen Kochsalzlösung emulgiert und mit dem Latex-Testreagenz auf der Reaktionskarte vermischt, so kommt es zu einer Agglutination, die hervorgerufen wird durch eine Reaktion zwischen (i) Fibrinogen und Clumping-Faktor, (ii) dem Fc-Anteil von IgG und ProteinA, (iii) spezifischen Antikörpern und den Kapselpolysacchariden. Bei *S. aureus* ist diese Reaktion besonders deutlich.

4.1.4. Api-Staph-Test

Api-Staph ist ein miniaturisiertes System zur Identifizierung von Staphylokokken und Mikrokokken mit Hilfe standardisierter biochemischer Reaktionen. Eine Reinkultur wird auf TSB-Medium 18-24 Stunden bei 37°C angezüchtet. Eine Ampulle Api-Staph-Medium wird geöffnet und eine homogene Bakteriensuspension, deren Trübung dem McFarland Standard

0,5 entspricht, hergestellt. Das beimpfte Api-Staph-Medium wird mit einer Pipette in die Röhren des Streifens pipettiert. Die Reaktionen zum Nachweis von ADH und URE werden mit Paraffinöl überschichtet, so daß anaerobe Bedingungen entstehen. Die Inkubationswanne wird abgedeckt und 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wird jeweils ein Tropf von den nachstehenden Reagenzien in das Röhren pipettiert und die Reaktion wird nach der Farbe (gelb oder rot) anhand der Ablesetabelle abgelesen: VP Test;VP 1 und VP 2, NIT Test;NIT 1 und NIT 2 und PAL Test;ZYM A und ZYM B. Die Reaktionen werden auf dem Ergebnisblatt notiert und in Form eines numerischen Profils kodiert.

4.2. Antibiotikaresistenz-Test (Kirby-Bauer-Test)

Der Agardiffusionstest beruht auf einem ganz anderen Prinzip als die Verdünnungstests. Durch Diffusion des Wirkstoffes entsteht ein Konzentrationsgradient mit dem höchsten Gehalt am Blättchen und abfallender Konzentration nach außen. Empfindliche Bakterien wachsen unter Bildung eines kreisrunden Hemmhofs, dessen Durchmesser ein Maß für die Empfindlichkeit des Erregers ist. Ein Bakteriumstamm mit hoher Empfindlichkeit wird sich nur in großer Entfernung, d. h. bei niedriger Konzentration des Chemotherapeutikums, entwickeln, ein resistenter Stamm wird ohne Hemmzonenbildung an das Blättchen heranwachsen können.

Beim Agardiffusionstest wird das Müller-Hinton-Medium benutzt. Ein zu hohes Inokulum kann zu kleine Hemmhöfe verursachen und damit eine zu geringe Empfindlichkeit widerspiegeln. Zur Einstellung der Keimdichte werden verschiedene Methoden empfohlen, beim Vorgehen nach NCCLS z. B. die gleichmäßige Verteilung einer Bakteriensuspension entsprechend McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ Zellen) mit Wattepufer oder Spatel auf der Oberfläche des Nährbodens. Nach dem Trocknen der beimpften Nährböden werden Testblättchen mit definiertem Wirkstoffgehalt mit leichtem Druck auf die Agaroberfläche aufgelegt. Der Abstand der Blättchen untereinander und vom Rand der Petrischale muß dabei so bemessen sein, daß kreisförmige Hemmhöfe ohne Überschneidung entstehen können. Deshalb sollen höchstens 6 Testblättchen auf eine Agarplatte von 9 cm Durchmesser aufgelegt werden. Nach 20 Stunden Bebrütung bei 37°C werden die Hemmhöfe mit einem Lineal gemessen. Als Grenzen gelten die Ränder des deutlich reduzierten Wachstums.

4.3. Biofilm-Test

Mit Hilfe dieses Adhärenztestes kann die Biofilmbildung von Staphylokokken an einer Plastikoberfläche quantitativ bestimmt werden. Dazu zieht man die Teststämme über Nacht bei 37°C in TSB-Medium unter permanentem Schütteln an. Die Kulturen werden mit frischem TSB im Verhältnis 1:100 verdünnt. Je 200 µl der Suspension werden dann in die Vertiefungen von 96-Loch-Flachbodengewebekulturplatten pipettiert, wobei jeder Stamm 8fach angesetzt wird. Die Platten werden 18 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Kulturgefäße vorsichtig entleert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit PBS pH 7.2 gewaschen und die dann noch haftenden Bakterien mit Glutaraldehyd 10 min fixiert. Nach Entfernung der Lösung wird die Platte unter fließendem Wasser gewaschen und anschließend mit Kristallviolett für 5 min gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wird wiederum unter fließendem Wasser abgewaschen. Nach dem Trocknen kann die optische Dichte des adhärenen Bakterienfilms mit einem ELISA-Reader bei 490 nm bestimmt werden. Die Meßwerte für jeden Stamm werden addiert und gemittelt. Meßwerte unter einer OD von 0.120 werden als negativ bewertet, Stämme mit Werten zwischen 0.120 und 0.240 gelten als schwach adhärent und Ergebnisse über 0.240 als stark adhärent.

4.4. Herstellung von Variantenstämmen für die Biofilmbildung

Um biofilmbildende Stämme aus nicht-biofilmbildenden Stämmen herzustellen, wird eine modifizierte Methode nach Christensen et al (1987) benutzt. Ein nicht-biofilmbildender Stamm wird in einem Kultivierungstube mit TSB-Medium mit 2% Glucose angesetzt und ohne Schütteln bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die Bakterienkultur verworfen und dieses Tube wird mit sterilem PBS (Phosphate-buffered saline) dreimal gewaschen. Neues, frisches TSB-Medium wird in das Tube gegeben und bei 37°C wird weiter inkubiert. Diese Prozesse werden jeden Tag bis zur Bildung von Biofilm an der Wand des Kultivierungstubes wiederholt. Zur Detektion der biofilmbildenden Stämme werden adhärenierte Bakterien von der Wand des Tubes auf CRA (Congo red agar) ausplattiert.

4.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Diese Methode gestattet die Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Darüberhinaus ist es durch entsprechendes Primerdesign möglich, gewünschte Restriktionsschnittstellen in das zu amplifizierende Fragment einzubauen. Dadurch wird eine nachfolgende Klonierung des entsprechenden Fragmentes erleichtert. Bei der Auswahl der Oligonukleotid-Primer ist zu beachten, daß diese möglichst 50% GC enthalten und nicht durch längere komplementäre Abschnitte aneinander binden können. Für die PCR-Reaktion werden folgende Komponenten in ein Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel pipettiert: 10 µl von 10^x Taq-Polymerase-Puffer, 1 µl von 50 mM MgCl₂, 4 µl von 20 mM dNTP-Mix, 1 µl von 100 ng/µl Template-DNA, 1 µl von Primer 1 und 2, 1 µl von 5 U/µl Taq-Polymerase und ad 100 µl von H₂O bidest.. Am Thermocycler wird der Ablauf der Reaktion programmiert. Zunächst erfolgt ein zweiminütiges Denaturieren bei 95°C. Im Anschluß werden 30 Amplifizierungszyklen durchgeführt: Denaturierung der DNA für 1 min. bei 95°C, gefolgt vom Annealing der Primer für 1 min. bei der errechneten Temperatur sowie der Primer-Extension bei 72°C (1 min. je kb zu amplifizierender DNA). Anschließend wird noch eine 3minütige Amplifizierung bei 72°C durchgeführt, um noch nicht vollständig synthetisierte PCR-Produkte aufzufüllen. Ein Teil des Ansatzes (10 µl) wird dann zur Überprüfung der Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen.

Formel zur Errechnung der Primer-Annealing-Temperatur:

$$T_m = 69,3 + 0,4 (\%GC\text{-Gehalt}) - 650/\text{Länge des Oligos}$$

4.6. Reinigung von PCR-Produkten mit dem „QIAquick™Spin“-Kit

5 Volumen Puffer PB werden zu einer beendeten PCR-Reaktion zugegeben. Anschließend wird die gemischte Lösung in eine auf ein Tube gelegte QIAquick-Säule überführt und 30-60 sec zentrifugiert, um die DNA binden zu lassen. Zum Waschen werden 0,75 ml Puffer PE auf die Säule gegeben und 30-60 sec zentrifugiert. Die Säule wird noch einmal 1 min zentrifugiert, um Ethanol vollständig zu entfernen. Die Säule wird auf ein frisches Eppendorfgefäß gelegt. Nach der Zugabe von 50 µl Puffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) oder

H₂O auf die QIAquick-Membran wird die DNA aus der Säule durch 1 minütiges Zentrifugieren eluiert.

4.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung kann durch Messung der Absorption bei 260 nm am Photometer bestimmt werden. Dazu wird die zu untersuchende Probe 1:100 verdünnt und in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke gemessen. Die Konzentration der Nukleinsäuren wird unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors aus der Absorption bei 260 nm berechnet. Bei doppelsträngiger DNA entspricht 1 OD 50 µg/ml, bei RNA 40 µg/ml und bei Oligonukleotiden 33 µg/ml. Durch Messung der Absorption bei 280 nm wird dann die Reinheit der Untersuchungsprobe kontrolliert. Die Nukleinsäuren liegen in ausreichender Reinheit vor, wenn das Verhältnis A₂₆₀/A₂₈₀ nicht unter 1.8 liegt.

4.8. Phenolisierung von Plasmid-DNA

Durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion werden Proteine im Reaktionsansatz (z.B. Restriktionsendonukleasen, Phosphatasen oder das Klenow-Fragment) entfernt. Dazu wird der Ansatz mit 1 Volumen Phenol versetzt und die Proteine unter kräftigem Schütteln ausgefällt. Nach zweiminütigem Zentrifugieren wird die obere, wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und Phenolreste anschließend durch Extraktion mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Die gereinigte DNA kann nach Überführen in ein neues Reaktionsgefäß mit Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt werden.

4.9. Alkoholische Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wird die Lösung mit 1/10-Volumen 3M Na-Acetat-Lösung pH 4.8 und 2 Volumen absoluten Ethanol versetzt, gut gemischt und mindestens 20 min bei -70°C gefällt. Danach wird die gefällte DNA 10 min bei 13,000 rpm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet zur Entfernung von Salzen mit 70 % EtOH gewaschen und in der

Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wird nun in einem geeigneten Volumen H₂O bidest. gelöst und bei -20°C gelagert.

4.10. Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Überprüfung von Plasmiden oder zu präparativen Zwecken werden 1-2 µg DNA in einem 20 µl Ansatz für 2 h mit 4 U des gewünschten Restriktionsenzymes bei der geeigneten Temperatur (meist 37°C) gespalten. Zu dem Ansatz werden dann noch 2 µl 10 × Reaktionspuffer und zum Auffüllen H₂O bidest. gegeben. Zur Entfernung von RNA kann zusätzlich zum Spaltansatz 1 µl RNase (10 mg/ml) hinzugefügt werden. Bei Verwendung von Enzymen mit Staraktivität (z.B. *Bam*HI oder *Eco*RI) wird die Reaktionszeit auf 1h begrenzt. Bei Verwendung von Enzymen mit einer optimalen Reaktionstemperatur über 50°C (*Bcl*II, *Bhi*I, *Sfi*I) erfolgt die Inkubation im Wasserbad unter Mineralöl.

4.11. Spaltung von chromosomaler DNA mit Restriktionsenzymen

Für die Gelelektrophorese werden 5 µg chromosomaler DNA in einem 30 µl Ansatz ÜN mit 20 U des gewünschten Restriktionsenzymes inkubiert. Zu dem Ansatz wurden außerdem 3 µl 10 × Restriktionspuffer und zum Auffüllen H₂O bidest. gegeben. Zur Überprüfung des *ica*-Gens in Staphylokokken ist *Eco*RI geeignet. Am nächsten Tag werden 5U Enzym in das Reaktionsgefäß gegeben und 1 h weiter inkubiert. Zum Auftrennen der DNA durch Gelelektrophorese werden 5 µl DNA-Probenpuffer zugegeben.

4.12. Horizontale Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA wird ein Restriktionsansatz nach der entsprechenden Reaktionszeit durch Auftragen auf ein 0,8-1,5%iges Agarosegel und anschließender Elektrophorese aufgetrennt. Für die Herstellung der Gele wird die gewünschte Agarosemenge in einem geeigneten Laufpuffer (z.B. 1 × TAE, 1 × TPE) gegeben, im Mikrowellenofen geschmolzen, und nach Abkühlung auf ca. 60°C wird die flüssige Agarose in eine Gelwanne mit justiertem Kamm gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wird dann der Kamm sorgfältig entfernt

und das Gel in eine mit entsprechendem Laufpuffer gefüllte Gelkammer gelegt. Die Spaltansätze werden mit 1/10-Stoppuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Zusätzlich wird in einer Spur ein DNA-Größenmarker aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgt bei 90 V über 2 h oder bei 35 V ÜN. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird das Gel in einem Ethidiumbromidbad (10 µg/ml) angefärbt, kurz mit Wasser gespült und unter UV-Licht photographiert.

4.13. Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen („Gene Clean“-Kit)

Mit EtBr angefärbte Gele werden auf einen Transilluminator gelegt und unter UV-Licht angeschaut. Die gewünschten DNA-Fragmentbanden werden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend pipettiert man 3 Volumen einer NaI-Lösung in die Reaktionsgefäße und schmilzt die Agarosestücke bei 50°C im Wasserbad. Danach werden 5-10 µl Glasmilch hinzugefügt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Glasmilch mit der gebundenen DNA wird dann durch kurzes (ca. 5 s) Zentrifugieren bei 13,000 rpm pelletiert und in 200 µl „new wash“ Lösung resuspendiert. Man zentrifugiert wieder kurz und wiederholt den Waschvorgang noch zweimal. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt werden alle Waschlösungsreste sorgfältig entfernt, das Pellet in 10 µl H₂O bidest. gelöst und 5 min bei 50°C inkubiert. Die Glasmilch wird 1 min abzentrifugiert, der Überstand mit der gelösten DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

4.14. Isolierung von Plasmid-DNA

4.14.1. Schnelllysate-Methode mit Diatomenerde

1.5 ml einer unter entsprechendem Selektionsdruck gewachsenen ÜN-Kultur werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß kurz abzentrifugiert, und das Zellpellet wird in 150 µl Lösung 1 vollständig suspendiert. Anschließend werden 150 µl frisch angesetzte Lösung 2 zugegeben, mehrmals umgedreht bis die Zellsuspension aufklart und 5 min auf Eis inkubiert. Danach werden 150 µl Lösung 3 zugegeben, kurz gevortext und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA werden durch 5 minütiges Zentrifugieren pelletiert, und der Überstand wird in ein Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 900 µl L6-Puffer und

50 µl Diatomenerde-Suspension vorgelegt wurden. Gut gevortext wird der Ansatz 1 min bei RT stehen gelassen. Die Diatomenerde wird von der Flüssigkeit über einen Filter abgetrennt und mit 2 ml Waschpuffer gewaschen. Flüssigkeitsreste werden dann durch einmaliges, kurzzeitiges (20 s) Zentrifugieren entfernt. Die Filter werden auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und mit 50 µl H₂O bidest. 5 min inkubiert. Nach 20 s Zentrifugieren befindet sich die gereinigte Plasmid-DNA im Reaktionsgefäß und wird bei –20°C aufbewahrt.

Für die Plasmidisolierung aus Staphylokokken wird das Protokoll wie folgt modifiziert: Es werden 5 ml einer ÜN-Kultur in BHI-Medium verwendet und die Lösung I enthält zusätzlich 150 µg/ml Lysostaphin. Nach vollständigem Resuspendieren der Zellen in modifizierter Lösung I schließt sich eine 15 minütige Inkubation bei 37°C an.

Lösung I: 5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
1 ml RNase 10 mg/ml
ad 100 ml H₂O

Lösung II: 0,2 N NaOH
1 % SDS

Lösung III: 3 M Na-Acetat pH 4,8

L6-Puffer: 100 ml 0,1 M Tris-HCl pH 6,4
8,8 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
13,2 ml H₂O
2,6 ml Triton X-100
120 g Guanidinthiocyanat

Waschpuffer: 10 ml 5 M NaCl
5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
2,5 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
ad 250 ml H₂O
+ 250 ml EtOH

4.14.2. Qiagen Midi-Präparation (Qiagen Plasmid-Handbuch, 2000)

Eine 50 ml ÜN-Kultur in LB-Medium, unter entsprechendem Selektionsdruck angezogen, wird für 15 min in JA 20-Röhrchen bei 6000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4 ml Puffer I vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer II wird die Suspension vorsichtig geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird 4 ml eiskalter Puffer III dazugegeben, gründlich gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer und chromosomale DNA werden durch 30 minütiges Zentrifugieren bei 15000 rpm, 4°C entfernt. Der klare Überstand wird dann auf eine bereits mit 4 ml QBT-Puffer equilibrierte Säule (Tip-100) gegeben. Nach Passage des Überstandes,

der die Plasmid-DNA enthält, wird die Säule zweimal mit jeweils 10 ml QC-Puffer gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wird anschließend durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer QF eluiert und mit 0,7 Volumen Isopropanol bei RT gefällt. Nach 30 minütigem Zentrifugieren bei 13000 rpm, 4°C wird das Plasmid-DNA-Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 50 µl H₂O bidest. aufgenommen.

Diese Methode ist auch geeignet für die Isolierung von Plasmid DNA im Midi-Maßstab aus Staphylokokken. Jedoch werden die Zellen in BHI-Medium angezogen und der Puffer I enthält 150 µg/ml Lysostaphin. In Puffer I (mit Lysostaphin) resuspendierte Zellen werden für 15 min bei 37°C inkubiert.

Lösung I: 5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5
2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
1 ml RNase 10 mg/ml
ad 100 ml H₂O

Lösung II: 0,2 N NaOH
1 % SDS

Lösung III: 3 M Na-Acetat pH 4,8

Puffer QC: 1,0 M NaCl
50 mM MOPS
15 % Ethanol

Puffer QF: 1,25 M NaCl
50 mM Tris-HCl
15 mM Ethanol

Puffer QBT: 750 mM NaCl
50 mM MOPS
15 % Ethanol
0,15 % Triton X-100

4.15. Isolierung von chromosomaler DNA

Eine Übernachtskultur wird in LB-Medium+1 % Glycin 1:50 verdünnt und im Schüttler bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Von der Kultur werden 4 ml in einem Eppendorfreaktionsgefäß abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet löst man in 100 µl 10 mM Tris-HCl, 25 % Saccharose, pH 7.5 und fügt 15 µl 500 mM EDTA pH 8.0 sowie 20 µl

Lysostaphin (1 mg/ml) zu. Der Ansatz wird bei 37°C für ca. 10 min inkubiert, bis die Lyse der Bakterien eintritt (Ansatz wird klar und viskos). Anschließend fügt man 375 µl TE-Puffer pH 7.5, 225 µl 10 % SDS und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) zu und inkubiert bei 55°C für eine halbe Stunde. Nach dem Zufügen von 150 µl 5 M Natriumperchlorat pipettiert man die Lösung in ein 15 ml Schraubröhrchen und gibt 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol dazu. Das Röhrchen wird dicht verschlossen, flach auf einem Orbitalschüttler befestigt und für mindestens 1.5 Stunden geschüttelt. Der Ansatz wird in ein Eppendorfgefäß überführt und 10 min bei 10,000 U/min zentrifugiert. Danach sollten sich zwei Phasen gebildet haben. In der unteren befinden sich das organische Lösungsmittel mit den darin gelösten Proteinen und Lipiden. In der oberen Phase befinden sich die Nukleinsäure in wässriger Lösung. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert (ohne dabei die Interphase zu berühren!) und auf zwei neue Eppendorfgefäße verteilt. Die DNA wird nun durch die Zugabe von 2 Volumen absoluten Alkohol gefällt (i.d.R. 400 µl Überstand + 800 µl Alkohol). Anschließend zentrifugiert man für 20 min bei 14,000 U/min. Den Alkohol zieht man mit einer Pipette ab und läßt das DNA-Pellet eine halbe Stunde an der Luft trocknen. Das Pellet wird dann in 50 µl sterilem Aqua dest. gelöst und bis zum Reaktionsverdau im Kühlschrank aufbewahrt.

4.16. Southern-Hybridisierung

4.16.1. Gelelektrophorese

10 µg chromosomale DNA werden mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten und auf einem 1 %igen TPE-Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wird angefärbt und die DNA im Anschluß durch Vakuublotten auf eine Nylonmembran transferiert.

4.16.2. Vakuublotten

Eine Nylonmembran wird auf Gelgröße zurechtgeschnitten und nacheinander für jeweils 5 min. in H₂O dest. und 20 × SSC eingeweicht. Die Membran wird nun auf die angefeuchtete Trägerplatte der Blotapparatur gelegt und von einer Plastikmaske eingefast, wobei sich Membran und Innenkante des Fensters um 5 mm überlappen. Das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel wird anschließend luftblasenfrei auf das Fenster gelegt. Ein Vakuum von 50 bis 60 mbar H₂O wird eingelegt. Die Geloberfläche wird jetzt nacheinander für jeweils 15 min. mit Lösung I (Depurinierungslösung), Lösung II (Denaturierungslösung) und Lösung III

(Neutralisierungslösung) vollständig bedeckt. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgt im Anschluß für 90 min mit $20 \times$ SSC. Die Membran wird dann für je 60 s in 0,4 N NaOH und danach in 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5 geschwenkt. Nach kurzem Trocknen der Membran zwischen Whatmanpapier wird die DNA durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert. Die Nylonmembran kann jetzt für die Hybridisierung eingesetzt werden.

Lösung I (Depurinierungslösung): 0,25 N HCl

Lösung II (Denaturierungslösung): 0,3 M NaOH, 1,5 M NaCl

Lösung III (Neutralisierungslösung): 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5

$20 \times$ SSC: 300 mM Na-Citrat pH 7,0, 3 M NaCl

4.16.3. Markierung der DNA-Sonde und Hybridisierung („ECL“-Kit)

Durch Markierung einer spezifische DNA-Probe mit dem Enzym Peroxidase kann eine Bindung der markierten DNA an komplementäre Sequenzen auf der Membran durch eine Substraktion mit nachfolgender Lichtemission sichtbar gemacht werden. Zunächst werden 200 ng DNA in 10 μ l Wasser 5 min. bei 95°C denaturiert und sofort für 5 min. auf Eis gestellt. Der Ansatz wird dann mit 10 μ l DNA-Labelling-Reagens (enthält Peroxidase) versetzt, gut gemischt und nach Zugabe von 10 μ l Glutaraldehyd für 10 min. bei 37°C inkubiert. Die markierte Sonde wird dann sofort für die Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Für die Hybridisierung wird die Nylonmembran in ein Röhrchen mit Schraubdeckel eingerollt und zunächst 30-60 min. bei 42°C mit ca. 15-20 ml Hybridisierungslösung im Rotationsofen vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit der peroxidasemarkierten Probe erfolgt dann ÜN bei 42°C. Am nächsten Tag wird die Membran 2 mal 10 min. bei 55°C in $0,1 \times$ SSC/0,4 % SDS und 2 mal 5 min. bei Raumtemperatur in $2 \times$ SSC gewaschen. Die Membran wird in ein Schälchen überführt, mit je 10 ml Detektionslösung I und II benetzt und unter leichtem Schwenken 1 min. inkubiert. Dann wird die Membran in Folie eingeschlagen und ein Hyperfilm-ECL für 30 min bei RT in einer Exponierkassette exponiert.

4.17. Isolierung von Gesamt-RNA aus Staphylokokken („FastRNA“-Kit)

Die zelluläre RNA von Staphylokokken wird mit Hilfe des „FastRNA“-Kits (Bio 101) gewonnen. $1 \cdot 10^9$ Zellen von Staphylokokken (OD_{600} 1,0) in TSB-Medium mit 3 % NaCl werden mit 5,000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 200 µl DEPC-H₂O resuspendiert und die Bakteriensuspension wird in ein Fast Prep Blue-Tube mit 0,5 ml von 0,1 mm-Diameter Ziriconia/Slica Beads, 100 µl CIA, 500 µl CRSR-Blue und 500 µl PAR Reagenz gegeben. Die Zellen werden durch einen Homogenizer mit der Bedingung von zweimal für 30 sec und Stärke 6 von Temporate zerstört. Das Tube wird 2 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 15 min bei 13,000 rpm abzentrifugiert. Die flüssige obere Phase wird in frischen Eppendorfcaps gesammelt, mit 500 µl von CIA gemischt und für 10 sec gevortext. Die Probe wird 2 min bei 13,000 rpm abzentrifugiert und die obere Phase wird in frische Caps transferriert. Dazu werden 500 µl DIPS gegeben, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 5 min abzentrifugiert, um die RNA zu pelettieren. Das Pellet wird mit 500 µl SEWS gewaschen und dann für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das Pellet wird in 50 µl SAFE gelöst.

4.18. Northern-Hybridisierung

Beim Arbeiten mit RNA müssen verschiedene Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, um einen Abbau durch RNasen zu verhindern. Grundsätzlich sollten bei allen Arbeiten Handschuhe getragen werden. Sämtliche Lösungen werden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem H₂O angesetzt. Eine Ausnahme bilden nur Lösungen, die Tris enthalten, da DEPC von Tris sofort inaktiviert wird. DEPC-H₂O wird hergestellt, indem man 1 ml DEPC zu einem Liter H₂O dest. gibt, kräftig schüttelt und ÜN bei 37°C inkubiert. Das DEPC wird anschließend durch Autoklavieren zerstört.

4.18.1. RNA-Gelelektrophorese

Für ein 1,2 %iges Agarose/Formaldehyd-Gel werden 4,2 g Agarose in 304,5 ml DEPC-H₂O aufgekocht und im Wasserbad auf 60°C abgekühlt. Es werden 35 ml 10 % MOPS-Puffer und 10,5 ml 37 %iges Formaldehyd dazugegeben und in eine vorbereitete Gelwanne gegossen. Man lässt das Gel 45 min erkalten und füllt 1 % MOPS-Puffer in die Gelkammer, bis das Gel

vollständig bedeckt ist. Das Gel sollte 30 min in Laufpuffer equilibrieren. Die Proben werden wie folgt vorbereitet: 15 µg RNA, 1 % MOPS, 50 % Formamid und 7 % Formaldehyd in 50 µl Endvolumen. Die Proben werden 10 min bei 55°C inkubiert und mit 6 µl RNA Loading-Puffer gemischt. Anschließend wird das Gel mit den Proben beladen und in einer separaten Spur ein RNA-Größenmarker mit aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt für 3 h bei einer Spannung von 5 V/cm. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 30 min in H₂O gewässert, um das Formaldehyd auszuwaschen, mit Ethidiumbromid angefärbt und zusammen mit einem Lineal photographiert. Im UV-Licht wird die DNA sichtbar und man kann die Konzentration der aufgetragenen Proben sowie möglichen Abbau kontrollieren. Es sollten zwei scharfe rRNA-Banden (23S und 16S) sichtbar sein.

4.18.2 Northern-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Gesamtzell-RNA erfolgt der Transfer auf eine Nylonmembran durch Vakuublotten oder Kapillarblotten. Vor dem Blotten wird das Gel 30 min in 20 % SSC equilibriert. Depurinisierung, Denaturierung und Neutralisierung entfallen, da die RNA bereits unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Der RNA-Transfer erfolgt für 2 h bei 50-60 mbar H₂O in 20 % SSC. Im Anschluß wird die Membran 10 min in 2 % SSC gewaschen und kurz zwischen Whatmanpapier getrocknet. Die RNA wird dann auf der Membran durch UV-Bestrahlung mit dem entsprechenden Programm im Gene-Linker fixiert und kann für die Hybridisierung eingesetzt werden. Bei der Verwendung von DNA-Proben werden dieselben Hybridisierungs- und Waschbedingungen angewendet wie bei der Southern-Hybridisierung.

10 % MOPS-Puffer: 41,8 g MOPS werden in 800 ml H₂O gelöst und mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Man gibt 16,6 ml 3 M Na-Acetat und 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 dazu, füllt auf 1 l auf und filtert die Lösung. Der Puffer wird im Dunkeln bei RT aufbewahrt.

5 % RNA Loading-Puffer für Formaldehyd/Agarose Gele:

3084 µl deionisiertes Formamid	2 ml 86 % Glycerin
720 µl 37 % Formaldehyd	4 ml MOPS
80 µl 0,5 M EDTA pH 8,0	ad 10 ml DEPC-H ₂ O
16 µl Bromphenolblau	

4.19 Untersuchung der Gesamtproteine

4.19.1. Gewinnung von bakteriellen Gesamtzellysaten durch Lyse mit Lämmli-Puffer

1,5 ml einer ÜNK werden 5 min bei 14,000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 100 µl H₂O resuspendiert und mit 25 µl 5 × Lämmli-Puffer versetzt. Die Suspension wird 10 min bei 95°C aufgeköcht. Falls noch schleimartige Klumpen vorhanden sein sollten, wird länger aufgeköcht. Anschließend wird die Lösung abzentrifugiert (1 min bei 14,000 rpm in der Tischzentrifuge) und der klare Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfggefäß gegeben. Zur Proteinanalyse werden 3 µl auf ein Acrylamidgel aufgetragen, während für die Durchführung eines Westernblots 25 µl verwendet werden.

Lämmli-Probenpuffer: 1,1 g SDS
 0,41 g EDTA
 0,17 g NaH₂PO₄
 1,1 ml β-Mercaptoethanol
 pH auf 7,2 mit NaOH einstellen
 ad 10 ml mit H₂O
 1:1 mit 0,2% Bromphenolblau (in 50% Glyzerin) mischen

4.19.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Proteine werden durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt. Ein SDS-Gel besteht aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Zunächst wird das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (15 × 17,5 cm), die durch 1,2 mm Spacer voneinander getrennt werden, bis etwa 3 cm unter den oberen Rand gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wird in Abhängigkeit von der Größe der zu untersuchenden Proteine gewählt. Nach ca. 1 h wird das Butanol vorsichtig entfernt und das Sammelgel (5%ig) auf das Trenngel gegossen. Es wird dann ein Gelkamm mit der gewünschten Taschenbreite zwischen die Glasplatten eingeschoben. Nach Polymerisierung des Sammelgels wird der untere Spacer entfernt und das Gel mit den Glasplatten vertikal in der Gelelektrophoresekammer befestigt. Die Gelkammer wird mit 1 × Elektrophoresepuffer gefüllt, der Gelkamm entfernt und die Taschen mit Elektrophoresepuffer ausgespült. Die

Proben werden in die Taschen pipettiert und die elektrophoretische Auftrennung erfolgt ÜN bei 40 V. Zusätzlich wird separat ein Proteingrößenmarker mit aufgetragen. Am nächsten Tag können Proteinbanden durch Anfärbung (Coomassie-Blau-Färbung, Silberfärbung) sichtbar gemacht werden oder durch Transfer auf eine Nitrozellulosemembran im Westernblot untersucht werden.

13% Trenngel: 13 ml 30% Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
7,3 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
9 ml H₂O
300 µl 10% SDS
150 µl APS (100 mg/ml)
10 µl TEMED

5% Sammelgel: 2,7 ml 30% Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
4 ml 0,5 M Tris-HCl pH6,8
9 ml H₂O
160 µl 10% SDS
160 µl APS (100 mg/ml)
8 µl TEMED

10 × Elektrophoresepuffer: 30 g Tris
144,4 g Glycin
100 ml 10% SDS
ad 1 l H₂O

4.19.3. Färben von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können durch 30-minütiges Schwenken in Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht werden. Anschließend wird das Gel in Entfärbelösung überführt und mehrere Stunden bei RT geschüttelt, wobei die Flüssigkeit

mehrmals gewechselt wird, und das Einlegen von Papiertüchern die Entfernung des nicht an Proteine gebundenen Coomassie-Blau beschleunigt. Das Entfärben ist beendet, wenn sich die Proteinbanden deutlich hervorheben und das restliche Gel vollständig entfärbt ist. Anschließend kann es getrocknet werden.

Coomassie-Färbelösung: 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250
227 ml Methanol
46 ml Eisessig
ad 500 ml H₂O

Entfärbelösung: 30% Methanol
10% Eisessig

4.20. Immunoblot gegen PIA

Bakterien werden in TSB-Medium mit 1% NaCl über Nacht bei 37°C angezüchtet. Nach der OD₆₀₀-Messung werden gleiche Zellzahlen (ca. 1,5 bis 2 ml) abzentrifugiert. Das Pellet wird in 50 µl 1,5 M EDTA (pH 8,0) aufgenommen. Nach dem Kochen (5 min bei 100°C im Heizblock) werden die Zellen 10 min bei 14,000 rpm abzentrifugiert. 40 µl Zellüberstand werden dann mit 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird ProteinaseK 5 min bei 100°C hitzeinaktiviert. Nach der Zugabe von 5 µl Bromphenolblau-Puffer werden 5 µl auf Nitrozellulosemembran aufgetropft und gut antrocknen gelassen. Die Membran wird in eine Petrischale gelegt und mit 4% Magermilch in 1 × PBS für 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler abgeblockt. Der absorbierte PIA-Antikörper wird 1:5,000 in 1% Magermilch-PBS verdünnt und die Membran wird mit dem verdünnten Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wird mindestens 3 mal mit PBS-0,05% Tween 20 für je 10 min gewaschen. Ein gebundener Antikörper wird mit einem absorbierten Biotin-konjugierten Anti-Hasen-Immunglobulin G (IgG)-Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) detektiert. Der Sekundärantikörper (Peroxidase-markierter anti-Hasen-Antikörper) wird 1:1,000 in PBS verdünnt und die Membran wird mit dem Sekundärantikörper 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut 3 mal mit PBS-0,05% Tween 20 für je 10 min gewaschen. Die Membran wird mit ECL-

Detektionslösung für eine Minute inkubiert. Ein aufgelegter Film wird anschließend entwickelt.

4.21. Sequenzierung von DNA (Fluoreszenz-Methode „Thermo Sequenase“-Kit)

Die Nukleotidsequenzen werden hierbei durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Primern nach der Sanger-Kettenabbruchmethode bestimmt. Zunächst wird eine PCR-Reaktion durchgeführt. Dazu werden 1 µg DNA in maximal 12 µl H₂O mit 1 µl fluoreszenzmarkierten Primer gemischt. Jeweils 3 µl davon werden in 4 vorbereitete Reaktionsgefäße pipettiert, in denen bereits je 1 µl der Nukleotidmischungen A, C, G und T vorgelegt wurden. Die Proben werden dann mit Mineralöl überschichtet und in einer PCR-Reaktion nach folgenden Bindungen eingesetzt: 2 min 95°C für die Denaturierung und dann 30 Zyklen von 95°C 45 s Denaturierung, 30 s Annealing entsprechend der Schmelztemperatur des verwendeten Primers und 45 s Extension bei 70°C. Nach der Reaktion werden je 3 µl Stoppuffer hinzugegeben und 1,5 µl von jedem Ansatz auf ein vorbereitetes Sequenziergel aufgetragen. Der Gellauf erfolgt ÜN und die Auswertung der durch Laserscanning detektierten Signale erfolgt mittels spezieller Software am Computer.

A-, C-, G-, T-Reagens: Tris-HCl (pH 9,5), MgCl₂, Tween 20, Nonidet P-40, 2-Mercaptoethanol, dATP, dCTP, 7-deaza-dGTP, dTTP, thermostabile Pyrophosphatase, Thermo Sequenase DNA-Polymerase, sowie das entsprechende Didesoxynukleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP)

4.22. PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese)

4.22.1. Isolierung von genomischer DNA aus Staphylokokken für die PFGE

Die Staphylokokkenstämme werden in LB-Medium mit 1% Glycin über Nacht bei 37°C im Schüttler angezogen. Von der Kultur werden 2 ml abzentrifugiert, das Bakterienpellet zweimal mit SE-Puffer gewaschen und in 1 ml SE-Puffer resuspendiert. Anschließend wird

die Bakteriendichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dazu werden 100 µl der Suspension mit 900 µl H₂O dest. verdünnt und in Halbmikroküvetten überführt. Der Wert für die optische Dichte sollte dann zwischen 0,8 und 1,0 liegen. In einem Erlenmeyerkolben schmilzt man vorsichtig eine 2%ige LGT-Agarose-Pufferlösung. In einem vorgewärmten 2 ml Eppendorfcap mischt man nun schnell 500 µl der Bakteriensuspension, 10 µl Lysostaphin (Stammlösung 2 mg/ml) und 500 µl der LGT-Agarose und pipettiert das Gemisch sofort in eine geeignete Gießform. Nach dem Erstarren der Agarose kann man nun die Blocks mit einem sterilen Skalpell in kleine Blöckchen zerschneiden und in ein 15 ml Greinerröhrchen mit 3 ml EC-Puffer überführen. Die Röhrchen werden nun 30 min bis 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wird der Puffer abgegossen und durch 3 ml frischen EC-Puffer ersetzt, der 1 mg/ml Proteinase K enthält. Die Röhrchen werden für weitere zwei Stunden bei 55°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Dann wird der EC-Puffer entfernt und die Blöckchen mit 10 ml TE-Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur gewaschen. Dieser Vorgang sollte mindestens dreimal wiederholt werden. Die fertigen Blöckchen mit der genomischen DNA können in TE-Puffer bei 4°C bis zum Restriktionsverdau und bis zur PFGE aufbewahrt werden.

4.22.2. Restriktionsendonukleasespaltung von genomischer DNA im Agaroseblöckchen

Hierzu wird ein Agaroseblöckchen in ein 2ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und 1 ml des vom Enzymhersteller empfohlenen Restriktionsenzympuffers versetzt. Puffer und Blöckchen werden 1 Stunde bei 50°C miteinander vorinkubiert. Anschließend wird der Puffer mit einer Pipette entfernt und durch 100 µl frischen Puffer ersetzt. Nach der Zugabe von 20 Units des entsprechenden Enzyms inkubiert man 4 Stunden bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Im Fall von *Sma*I sind dies 25 °C und 37 °C bei der Verwendung von *Sst*II.

4.22.3. Pulsfeldgelelektrophorese mit dem CHEF-DRII-System

Für die Auftrennung großer DNA-Fragmente mittels PFGE werden 1%ige FastLane-Agarosegele (FMC) benutzt, die in 0,5 × TBE-Puffer präpariert werden. Die Blöckchen mit der gespaltenen DNA werden in die Geltaschen gebracht, wobei darauf zu achten ist, daß alle Blöckchen luftblasenfrei an der Vorderwand der Taschen plaziert werden. Anschließend werden sie mit flüssiger 2%iger LGT-Agarose fixiert. Das Gel befestigt man in der Elektrophoresekammer, die 1,5 Liter 0,5 × TBE als Laufpuffer enthält. Als Bedingungen für die Auftrennung von *Sma*I bzw. *Sst*II-verdauter DNA aus Staphylokokken hat sich eine

konstante Spannung von 200 V für eine Dauer von 18 Stunden bei stufenlos ansteigenden Pulszeiten von 5 bis 40 Sekunden bewährt. Das System wird dabei auf 12°C Laufpuffertemperatur gekühlt. Nach der Elektrophorese wird das Gel für etwa 30 Minuten mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt, mit Aqua dest. abgespült und unter UV-Licht fotografiert.

Puffer und Lösungen:

Puffer für LGT-Agarose: 10 × Konzentration: 10 mM Tris-HCl
 10 mM MgCl₂
 0,1 mM EDTA

1 × SE:	75 mM NaCl	1 × EC:	6 mM Tris-HCl
	25 mM EDTA (pH 7,5)		1 M NaCl
			100 mM EDTA (pH 7,5)
			0,5 % Brij 58
			0,2 % Deoxycholsäure
			0,5 % N-Laurylsarcosyl

4.23. Herstellung kompetenter Zellen

4.23.1. CaCl₂-Methode

1 ml einer ÜN-Kultur wird mit 49 ml LB-Medium versetzt, bis zu einer Dichte von 90-120 Klett bei 37°C geschüttelt und auf Eis abgekühlt. Der Ansatz wird auf zwei JA20-Röhrchen verteilt und 5 min bei 6000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Die Pellets werden dann in je 12,5 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung suspendiert und wieder abzentrifugiert (10 min, 6000 rpm, 4°C). Der Überstand wird verworfen und die Bakterienpellets werden nun in je 1,25 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, vereinigt und etwa für 1 h auf Eis gestellt. Anschließend werden 520 µl 87 % Glycerin (Endkonzentration 15 %) zugegeben. Die Bakterien werden in 150 µl Aliquots bei -70°C gelagert.

4.23.2. Elektrokompente *S. aureus*-Zellen (Schenk und Laddaga, 1992)

1 ml einer ÜN-Kultur wird in 199 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 angezüchtet. Die Bakterienkultur wird dann auf 2 JA20-Röhrchen aufgeteilt und für 5 min bei 6000 rpm, RT abzentrifugiert. Anschließend werden die Bakterien zweimal mit 100 % Volumen sterilem H₂O dest. gewaschen. Nach Zentrifugation (10 min, 6000 rpm, RT) erfolgen zwei weitere Waschschrte mit 20 % Volumen und 10 % Volumen 10 %igem Glycerin. Nach dem Resuspendieren in 10 % Volumen Glycerin werden die Zellen für 15 min bei RT stehen gelassen, anschließend abzentrifugiert, in 1 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 70 µl bei -70°C aufbewahrt. Die Endkonzentration an Zellen sollte zwischen 1 und 3 × 10⁹ Zellen /ml liegen.

4.24. Transformation

4.24.1. CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot kompetenter Zellen wird auf Eis aufgetaut, mit der Hälfte eines Ligationsansatzes (10 µl) gemischt und 30-60 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgt durch einen Hitzeschritt für 90 s bei 42°C. Anschließend wird das Reaktionsgefäß sofort für 5 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wird dann mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 150 µl verworfen. In der verbliebenen Flüssigkeit werden die Zellen resuspendiert und auf eine Selektionsplatte ausplattiert.

4.24.2. Elektroporation von *S. aureus* (Schenk und Laddaga, 1992)

Ein Aliquot (70 µl) kompetenter Zellen wird bei RT aufgetaut und mit einer geeigneten Menge DNA (ca. 1 µg) gemischt. Dieser Ansatz wird in eine Elektroporationsküvette mit 1 mm Spalt pipettiert und in die Elektroporationsapparatur gestellt. Die Elektroporation erfolgt dann bei 2,3 kV, 200 µs, 25 µF. Die optimale Zeitkonstante ist 2,5 ms. Sofort danach wird die Suspension mit 900 µl SMMP₇₅-Medium aufgefüllt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden bei 37°C für ca. 2 h inkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen DM-3-Agarplatten ausplattiert.

4.25. Statistik

Mit dem Chi-Quadrat (χ^2)-Test wurde untersucht, ob bei den klinischen Isolaten *ica*-Genloci, IS-Elemente und Biofilmbildung signifikant häufiger vorkommen als bei den saprophytären Stämmen (Glantz, S. A., 1987). Die Wahrscheinlichkeitswerte (p) von $\leq 0,05$ wurden als signifikant betrachtet.

5.1. Epidemiologische Untersuchung zur Biofilmbildung von *S. epidermidis* und *S. aureus*

Um eine Aussage zur Häufigkeit der Biofilmbildung bei Staphylokokken zu erhalten, wurden 215 *S. epidermidis*- und 112 *S. aureus*-Isolate unterschiedlicher Herkunft untersucht. Bei *S. epidermidis* wurden 50 Blutkulturisolate, 41 Harnwegsisolat und 123 Hautisolat und bei *S. aureus* 95 klinische Isolate und 17 Hautisolat untersucht. Die Hautisolat wurden von gesunden Probanden durch das Abstreichen der Nasenschleimhaut mit sterilen Watteträgern gewonnen. Die Anzucht erfolgte auf Blutagarplatten. Anhand der Koloniemorphologie und des Katalasetests wurden zunächst Staphylokokkenkolonien identifiziert. Mit Hilfe des Koagulasetests und der biochemischen Charakterisierung durch das Api-Staph-Profil wurde anschließend die Spezies bestimmt. Die Ergebnisse der Speziesidentifizierung sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. Identifizierung der Staphylokokken-Spezies aus der Nase.

Spezies	Zahl der Isolate	% Zahl aller Isolate
<i>S. aureus</i>	14	18
<i>S. epidermidis</i>	58	74
Andere Spezies	6	8
Total	78	100

Für genetische Untersuchungen wurde chromosomale DNA von allen Isolaten isoliert und Southern-Hybridisierungen mit verschiedenen Gensonden durchgeführt. Es wurden das Vorkommen des *icaADBC*-Operons, das für die Biofilmbildung notwendig ist, sowie die Insertionssequenzen IS256 und IS257 nachgewiesen. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des *ica*-Operons und der Expression eines Biofilms nachzuweisen, wurden quantitative Biofilmtests von allen Isolaten durchgeführt und mit dem Vorkommen des *ica*-Operons in Beziehung gesetzt. Außerdem wurden die Antibiotikaresistenzen der Isolate mit dem Kirby-Bauer-Test untersucht. Um eine Aussage darüber zu treffen, ob bestimmte Antibiotikaresistenzen mit der Biofilmbildung assoziiert sind, wurden die Ergebnisse des Biofilmtests und des Kirby-Bauer-Tests miteinander verglichen.

5.1.1. Vorkommen des *ica*-Genlokus in *S. epidermidis* und *S. aureus*

Um das Vorkommen der *ica*-Gene auf dem Chromosom unterschiedlicher Staphylokokken-Isolate aus verschiedenen Quellen zu vergleichen, wurden die chromosomale DNA der Stämme isoliert, mit dem Enzym *EcoRI* gespalten und durch Southern-Hybridisierung analysiert. Als Sonden für die Hybridisierung wurden jeweils PCR-Produkte des *icaA*-, *icaB*- und *icaC*-Gens benutzt. Für die Hybridisierung von *S. epidermidis*-Isolaten wurden die Sonden aus *S. epidermidis* RP62A amplifiziert. Die Sonden für *S. aureus*-Isolate wurden aus *S. aureus* 8325 gewonnen. Für diese Untersuchung wurden 215 *S. epidermidis*-Isolate (123 Stämme aus Nasenabstrichen, 41 Stämme aus Harnwegsinfektionen, 50 Stämme aus Blutkulturen) und 112 *S. aureus*-Isolate (17 Hautisolate, 95 klinische Isolate) getestet. Als positiver Kontrollstamm wurde *S. epidermidis* RP62A benutzt. In Abb. 5 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Bei *S. epidermidis* gibt es einen Unterschied im Vorkommen der *ica*-Gene zwischen klinischen Isolaten und Hautisolaten. Bei Blutkulturisolaten ist das *ica*-Operon in 56 % (28 von 50 Stämmen) und bei Harnwegsisolaten in 44 % (18 von 41 Stämmen) der Isolate nachweisbar.

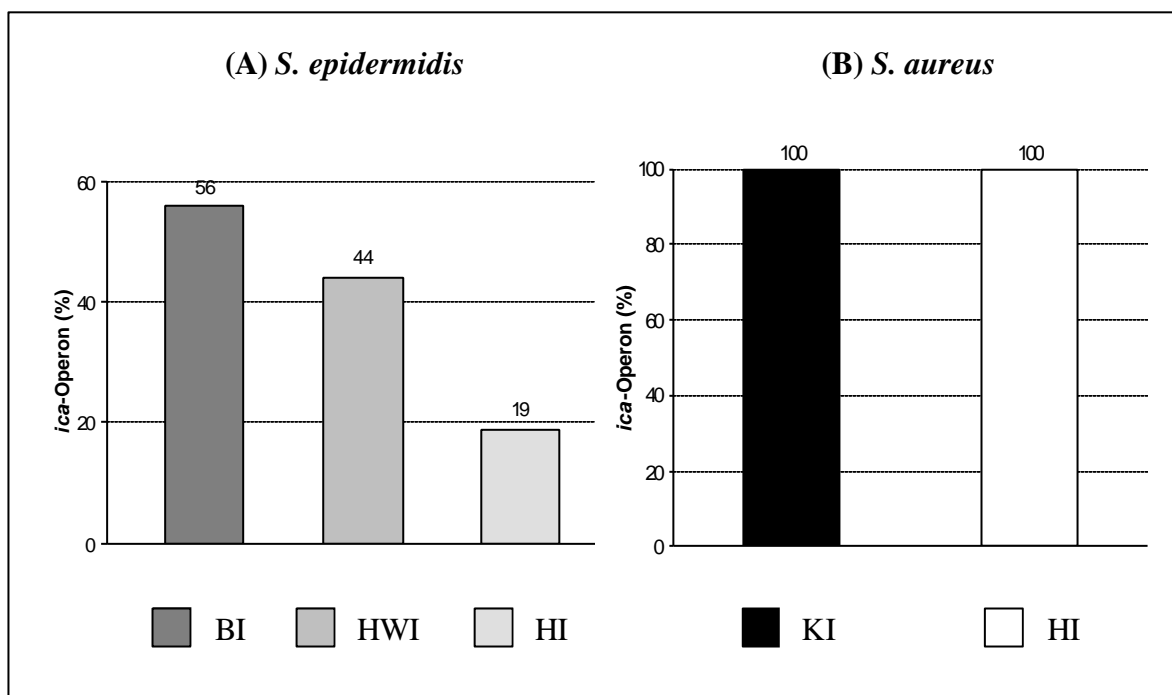


Abb. 5. Vergleich der Häufigkeit des *ica*-Vorkommens zwischen Stämmen unterschiedlicher Herkunft. (A) *S. epidermidis*, (B) *S. aureus*.

BI : Blutkulturisolat, HWI : Harnwegsinfektisolat, HI : Hautisolat, KI : Klinische Isolate

Der Unterschied im Vorkommen des *ica*-Genlokus zwischen Blutkulturoisolen und Harnwegsisolaten war nicht signifikant ($P > 0,25$ [χ^2 -Test]). Bei Hautisolaten dagegen ist das *ica*-Operon nur in 19 % (23 von 123 Stämmen) vorgekommen. Die Unterschiede im Vorkommen des *ica*-Genlokus zwischen Blutkulturoisolen und Hautisolaten ($P < 0,0001$) und Harnwegsisolaten und Hautisolaten ($P < 0,001$) waren signifikant. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man vermuten, daß das *ica*-Operon einen Marker für pathogene *S. epidermidis*-Stämme darstellt.

Bei *S. aureus* hingegen kam das *ica*-Operon interessanterweise in allen Stämmen unabhängig von ihrer Herkunft vor. Deshalb stellt sich die Frage, welche Rolle dieser Faktor in der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen spielt.

5.1.2. Biofilmbildung in *S. epidermidis* und *S. aureus*

Um zu testen, ob das *ica*-Gen exprimiert wird, wurden alle Stämme hinsichtlich ihrer Fähigkeit an Plastikmikrotiterplatten zu adhären mit dem quantitativen Adhärenztest nach Christensen (1982) untersucht. Als Positivkontrolle wurde dabei *S. epidermidis* RP62A eingesetzt. Werte unter einer optischen Dichte (OD) von 0,12 wurden als negativ bewertet. 215 *S. epidermidis*-Stämme und 112 *S. aureus*-Stämme wurden wie oben beschrieben untersucht (Abb. 6).

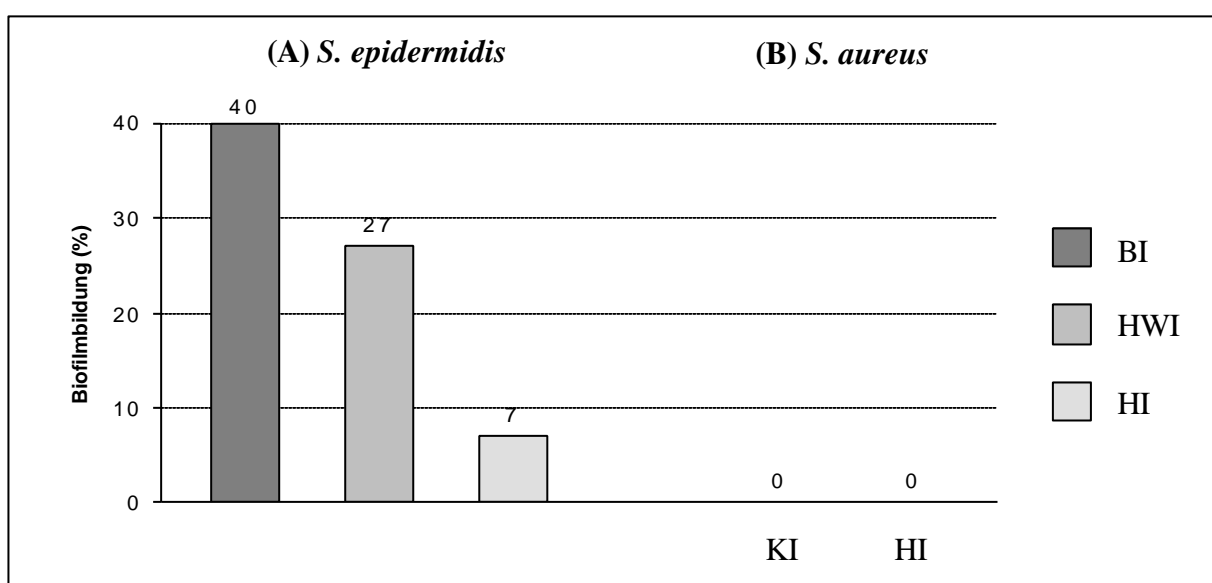


Abb. 6. Vergleich der Biofilmbildungen zwischen Stämmen unterschiedlicher Herkunft. (A) *S. epidermidis*, (B) *S. aureus*.

BI : Blutkulturisolate, HWI : Harnwegsisolats, HI : Hautisolate, KI : Klinische Isolate

Es war ein Unterschied in der Biofilmbildung auf dem Plastikmaterial zwischen klinischen Isolaten und Hautisolaten von *S. epidermidis* nachweisbar. Bei Blutkulturisolaten wurde der Biofilm in 40 % (20 von 50 Stämmen) und bei Harnwegsisolaten in 27 % (11 von 41 Stämmen) der Isolate produziert. Der Unterschied in der Biofilmbildung zwischen Blutkulturisolaten und Harnwegsisolaten war nicht signifikant ($P > 0,18$). Bei Hautisolaten wurde der Biofilm in 7 % (9 von 123 Stämme) auf dem getesteten Plastikmaterial gebildet. Die Unterschiede der Biofilmbildung zwischen Blutkulturisolaten und Hautisolaten ($P > 0,0001$) und Harnwegsisolaten und Hautisolaten ($P > 0,001$) waren dabei signifikant. Bei *S. aureus* konnten keine Stämme identifiziert werden, die Biofilme bildeten.

5.1.3. Zusammenhang zwischen dem *ica*-Genlokus und der Biofilmbildung in *S. epidermidis* und *S. aureus*

Aus den vorangegangenen Experimenten geht hervor, daß das *ica*-Operon und Biofilmbildung bei klinischen *S. epidermidis*-Stämmen im Gegensatz zu saprophytären Stämmen häufiger vorkommen. Genauere Informationen über den Zusammenhang zwischen dem *ica*-Genlokus und der Biofilmbildung sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6. Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des *ica*-Genlokus und der Biofilmbildung.

Spezies	Isolate von verschiedenen Quellen (Bakterienzahl)	<i>ica</i> -Gen (+) Biofilm (+) (%)	<i>ica</i> -Gen (-) Biofilm (-) (%)	<i>ica</i> -Gen (+) Biofilm (-) (%)	<i>ica</i> -Gen (-) Biofilm (+) (%)
<i>S. epidermidis</i>	BI (50)	19 (38)	21 (41)	9 (18)	1 (2)
	HWI (41)	9 (22)	21 (51)	9 (22)	2 (5)
	HI (123)	7 (6)	99 (81)	15 (12)	2 (1)
<i>S. aureus</i>	KI (95)	0	0	95 (100)	0
	HI (17)	0	0	17 (100)	0

Die *ica*-positiven, biofilmbildenden Stämme waren bei den klinischen Isolaten dominant. Im Gegensatz dazu wurden mehrere *ica*-negative, nicht-biofilmbildende Stämme unter den

saprophytären Isolaten gefunden. 1-5 % der Isolate waren *ica*-negative, biofilmbildende Stämme. Wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt, kann die Expression der *ica*-Gene von verschiedenen Umweltfaktoren beeinflusst werden (Rachid *et al.*, 2000). Wie Tabelle 6 zeigt, exprimierten tatsächlich nicht alle *ica*-positive Stämme einen Biofilm. Von 32 % (9 von 28 Stämmen) der *ica*-positiven Blutkulturisolate, 50 % (9 von 18 Stämmen) der *ica*-positiven Harnwegs isolate und 68 % (15 von 22 Stämmen) der *ica*-positiven Hautisolate wurde kein Biofilm gebildet (Abb. 7). Bei *S. aureus* hingegen trugen alle Isolate das *ica*-Operon, jedoch war bei keinem Stamm eine Expression des Genclusters nachweisbar.

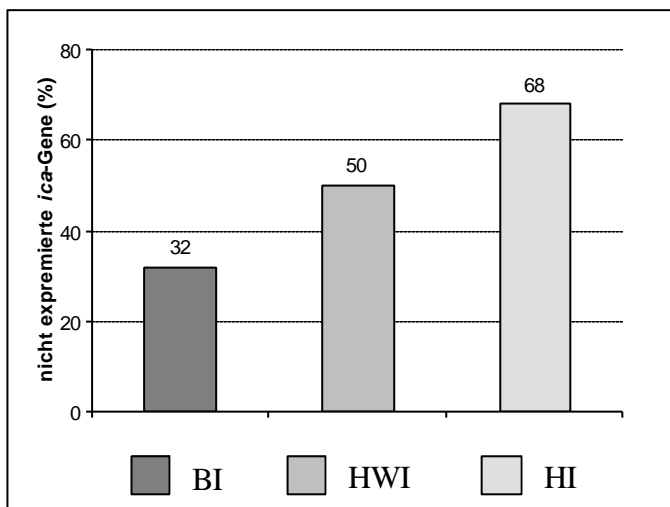


Abb. 7. Prozentzahl von nicht-exprimierten *ica*-Genen in verschiedenen *S. epidermidis*-Stämmen.

BI : Blutkulturisolate,

HWI : Harnwegs isolate, HI : Hautisolate

5.1.4. Nachweis der Insertionssequenzen IS256 und IS257

Genetische Variabilität ist eine Fähigkeit, die die Anpassung von Mikroorganismen an veränderte Umweltbedingungen begünstigt. Insertionssequenzen scheinen dabei eine wichtige Rolle für die Um- und Neuorganisation des Bakteriengenoms zu spielen. Um die Häufigkeit von IS-Elementen im Genom klinischer und saprophytärer Staphylokokken zu untersuchen, wurden die Stämme mit spezifischen Gensonden, die gegen zwei typische IS-Elemente Gram-positiver Bakterien gerichtet sind (IS256, IS257), untersucht.

5.1.4.1. Vorkommen von IS256

IS256 wurde ursprünglich als flankierende Region des zusammengesetzten Transposons Tn4001 beschrieben. Tn4001 kodiert für das bifunktionale AAC-APH Enzym, welches die Resistenz gegen die Aminoglycoside Gentamicin, Tobramicin und Kanamicin kodiert (Lyon

et al., 1987, Byrne *et al.*, 1989). Für die Hybridisierung wurde eine IS256-spezifische Sonde aus *S. aureus* 20/21 durch PCR gewonnen. Die meisten IS256-enthaltenden Stämme zeigten multiple Banden in der Southern-Hybridisierung. Das heißt, daß das Genom dieser Stämme eine Vielzahl von IS256 Kopien enthält. Die Anzahl der Kopien schwankte dabei zwischen 1 und 8 IS-spezifischen Fragmenten. Das Ergebnis des IS256-Nachweises ist in Abb. 8 dargestellt.

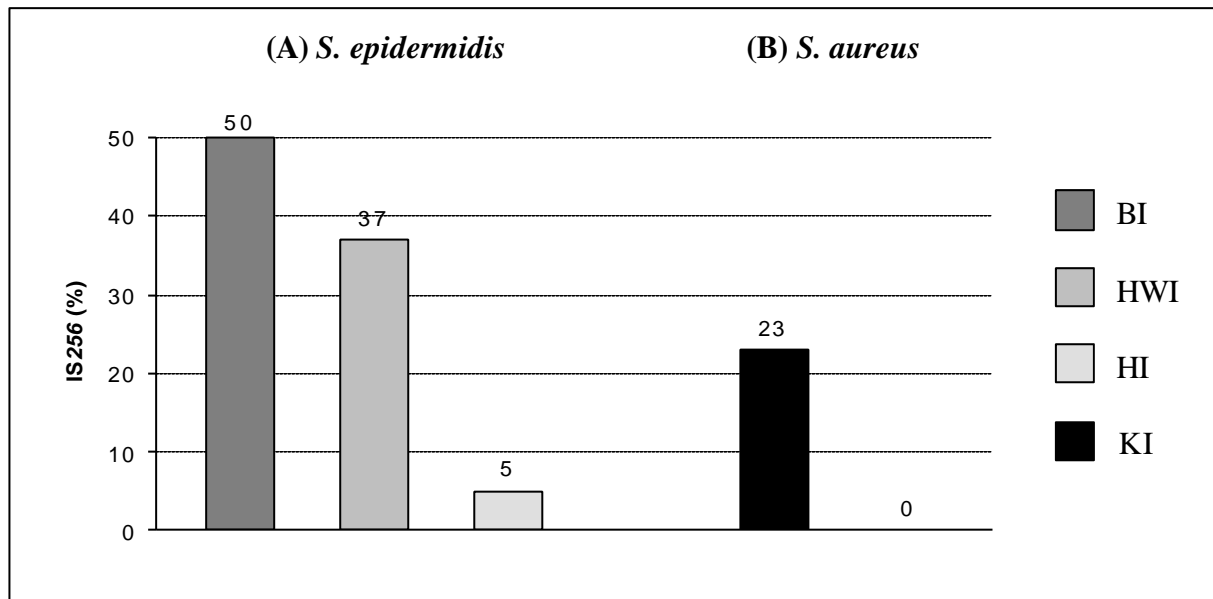


Abb. 8. Vergleich der Häufigkeit von IS256 zwischen Stämmen unterschiedlicher Herkunft. (A) *S. epidermidis*, (B) *S. aureus*

BI : Blutkulturisolate, HWI : Harnwegsisolat, HI : Hautisolate, KI : Klinische Isolate

Abbildung 8 zeigt, daß sowohl in *S. epidermidis* als auch in *S. aureus* das Vorkommen von IS256 zwischen klinischen und kommensalen Stämmen unterschiedlich ist. Bei den Blutkulturisolaten von *S. epidermidis* ist IS256 in 50 % (25 von 50 Stämmen) und bei den Harnwegsisolaten in 37 % (15 von 41 Stämmen) der untersuchten Stämme vorhanden. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Blutkultur- und Harnwegsisolaten ($P > 0,2$). Dagegen konnte bei den Hautisolaten von *S. epidermidis* nur in 5 % (6 von 123 Stämmen) der getesteten Stämme IS256 nachgewiesen werden. Die Unterschiede in der Häufigkeit von IS256 zwischen klinischen Isolaten und Hautisolaten von *S. epidermidis* waren signifikant ($P < 0,0001$).

Im Fall von *S. aureus* enthielten 24 % (23 von 95 Stämme) der klinischen Isolate IS256, jedoch konnte es in den Hautisolaten nicht nachgewiesen werden. Der Unterschied in der

Häufigkeit von IS256 zwischen klinischen Isolaten und Hautisolaten von *S. aureus* war signifikant ($P < 0,02$). Das bedeutet, daß IS256 öfter in klinischen Isolaten als in Hautisolaten von *S. epidermidis* und *S. aureus* vorkommt.

5.1.4.2. Vorkommen von IS257

IS257 wurde ursprünglich als flankierende Region des Transposons Tn4003 beschrieben. Tn4003 kodiert für die S1 Dihydrofolate-Reduktase (DHFR), welches die Trimethoprim-Resistenz vermittelt (Rouch *et al.*, 1989). Eine IS257-spezifische Sonde wurde von *S. aureus* 20/21 durch PCR gewonnen. Das Ergebnis des IS257-Nachweises ist in Abb. 9 dargestellt.

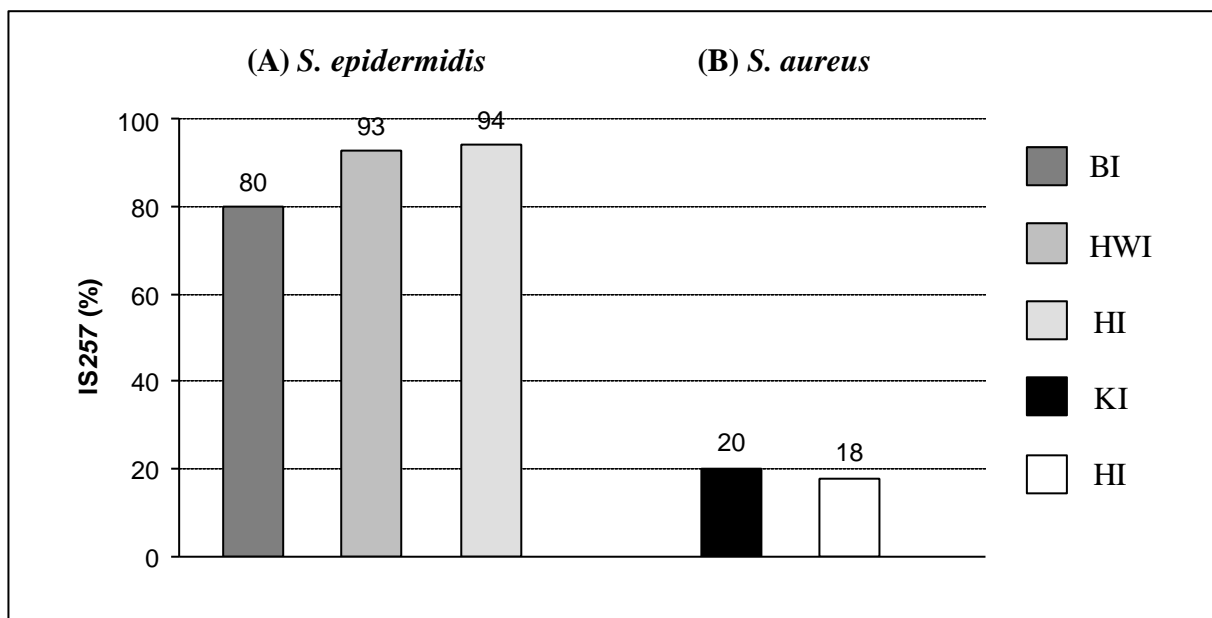


Abb. 9. Vergleich der Häufigkeit von IS257 zwischen Stämmen unterschiedlicher Herkunft. (A) *S. epidermidis*, (B) *S. aureus*

BI : Blutkulturisolate, HWI : Harnwegsisolate, HI : Hautisolate, KI : Klinische Isolate

Im Gegensatz zu IS256 kam IS257 in den meisten *S. epidermidis* unabhängig von ihrer Herkunft vor. IS257 konnte in 80 % der Blutkulturisolate, 93 % der Harnwegsisolate und 94 % der Hautisolate nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu *S. epidermidis* wurde IS257 in *S. aureus* wesentlich seltener gefunden. Das Element war bei 20 % der klinischen Isolate und 18 % der Hautisolate vorhanden. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, daß es im Genom von *S. epidermidis* eine größere Anzahl IS257-spezifischer Insertionen als bei *S. aureus* gibt.

5.1.5. Antibiotikaresistenz der *S. epidermidis*- und *S. aureus*-Isolate

Die zunehmende Verwendung von Antibiotika in der Medizin resultiert in einem vermehrten Auftreten von multiresistenten Staphylokokken-Isolaten. Die Agardiffusionsmethode wurde benutzt, um die Antibiotikaempfindlichkeit verschiedener Stämme zu untersuchen. Dafür wurden 215 *S. epidermidis*- und 112 *S. aureus*-Isolate getestet. Die Antibiotikabeladung der verschiedenen Testblättchen ist im Kapitel Material und Methoden (Tabelle 4) aufgelistet. In diesem Test wird der Durchmesser des Hemmhofes um das Testblättchen, in dem keine Bakterienkolonie wächst, zur Identifikation eines resistenten Stammes herangezogen. Für die verschiedenen Antibiotika wurden als Grenzwert folgende Durchmesser festgelegt : 13 mm für Erythromycin, 9 mm für Vancomycin, 10 mm für Oxacillin, 16 mm für Tetracyclin, 28 mm für Penicillin G, 20 mm für Chloramphenicol, 14 mm für Clindamycin, 12 mm für Gentamicin und 10 mm für Trimethoprim.

5.1.5.1. Antibiotikaresistenz der *S. epidermidis*-Isolate

Das Ergebnis der Antibiotikaresistenzuntersuchungen in *S. epidermidis* ist in Abb. 10 dargestellt.

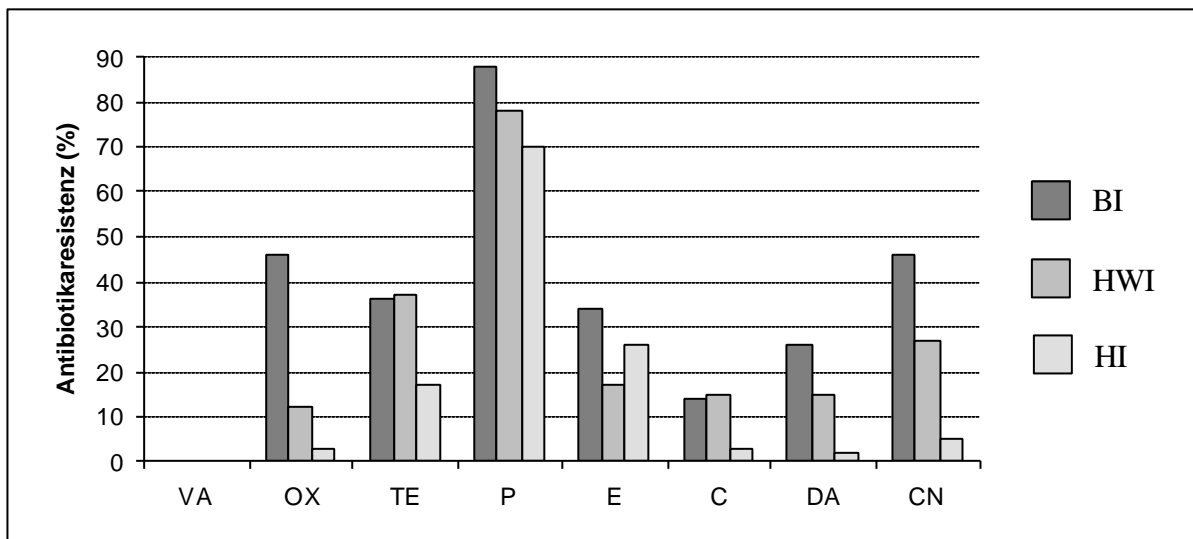


Abb. 10. Vergleich der Antibiotikaresistenz zwischen *S. epidermidis*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft. VA: Vancomycin, OX: Oxacillin, TE: Tetracyclin, P: PenicillinG, E: Erythromycin, C: Chloramphenicol, DA: Clindamycin, CN: Gentamicin

Resistenz gegen Penicillin G ist bei den meisten Isolaten (mehr als 70 %) unabhängig von ihrer Herkunft zu finden. Im Bezug auf die Resistenz gegen Oxacillin gab es allerdings einen Unterschied zwischen klinischen Isolaten und Hautisolaten. Mehr als 40 % der Blutkulturisolatate und 12 % der Harnwegsisolatate waren gegen Oxacillin resistent, während dies nur bei 3 % der Hautisolatate der Fall war.

Das Resistenzverhalten gegen andere Antibiotika war im Vergleich zwischen klinischen Isolaten und Hautisolaten ebenfalls unterschiedlich. Bei den klinischen Isolaten konnten häufiger resistente Stämme gefunden werden. Mehr als 30 % der Blutkulturisolatate und Harnwegsisolatate waren resistent gegen Tetracyclin, während nur 12 % der Hautisolatate Resistenz zeigten. Gegen Chloramphenicol waren 14 % der Blutkulturisolatate, 15 % der Harnwegsisolatate und 3 % der Hautisolatate resistent. 26 % der Blutkulturisolatate und 15 % der Harnwegsisolatate und nur 2 % der Hautisolatate waren resistent gegen Clindamycin. Bei Gentamicin waren 46 % der Blutkulturisolatate und 27 % der Harnwegsisolatate und nur 8 % der Hautisolatate resistent. Dagegen war die Resistenz gegen Erythromycin bei den Hautisolaten relativ hoch. 34 % der Blutkulturisolatate, 33 % der Hautisolatate und 16 % der Harnwegsisolatate waren resistent gegen Erythromycin. Lediglich gegen Vancomycin waren alle Isolate der untersuchten *S. epidermidis*- Stämme empfindlich.

5.1.5.2. Antibiotikaresistenz der *S. aureus*-Isolate

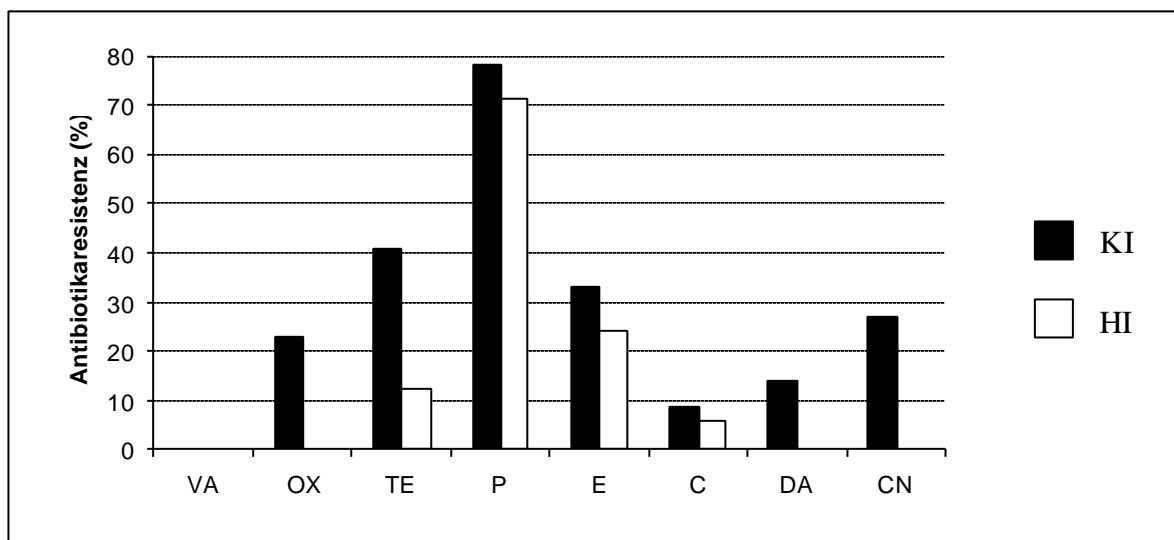


Abb. 11. Vergleich der Antibiotikaresistenz zwischen *S. aureus*-Stämmen unterschiedlicher Herkunft. VA: Vancomycin, OX: Oxacillin, TE: Tetracyclin, P: Penicillin, E: Erythromycin, C: Chloramphenicol, DA: Clindamycin, CN: Gentamicin

Die Resistenzverteilung von *S. aureus* ist ähnlich wie die von *S. epidermidis*. Wie in *S. epidermidis* waren mehr als 70 % aller untersuchten *S. aureus*-Stämme resistent gegen Penicillin G. Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene Studien, die eine weitverbreitete Resistenz gegen Penicillin in den verschiedensten Staphylokokken-Stämmen belegen. Dagegen wurden wie bei den *S. epidermidis*-Stämmen auch keine Vancomycin-resistenten *S. aureus*-Stämme gefunden. Darüber hinaus zeigten die untersuchten *S. aureus*-Stämme gegen alle anderen getesteten Antibiotika ähnliche Resistenzeigenschaften wie die *S. epidermidis*-Stämme (Abb. 11).

Sowohl bei *S. epidermidis* als auch bei *S. aureus* wurden unter den klinischen Isolaten im Vergleich zu den Hautisolaten eine größere Anzahl resistenter Stämme nachgewiesen.

5.1.6. Zusammenhang zwischen Gentamicin-Resistenz und dem Nachweis von IS256

Das *aac(6')-aph(2'')*-Gen kodiert für das bifunktionale AAC-APH-Enzym, das die Aminoglycoside Gentamicin, Tobramicin und Kanamicin inaktiviert. Dieses Gen befindet sich flankiert von zwei IS256-Elementen im Transposon Tn4001. Um nachzuweisen, ob die Präsenz von IS256 immer an die Resistenz gegen Aminoglycoside gekoppelt ist, wurde das Element in Gentamicin-resistenten und Gentamicin-sensiblen Stämmen mit Southern-Hybridisierung untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Abb. 12 dargestellt.

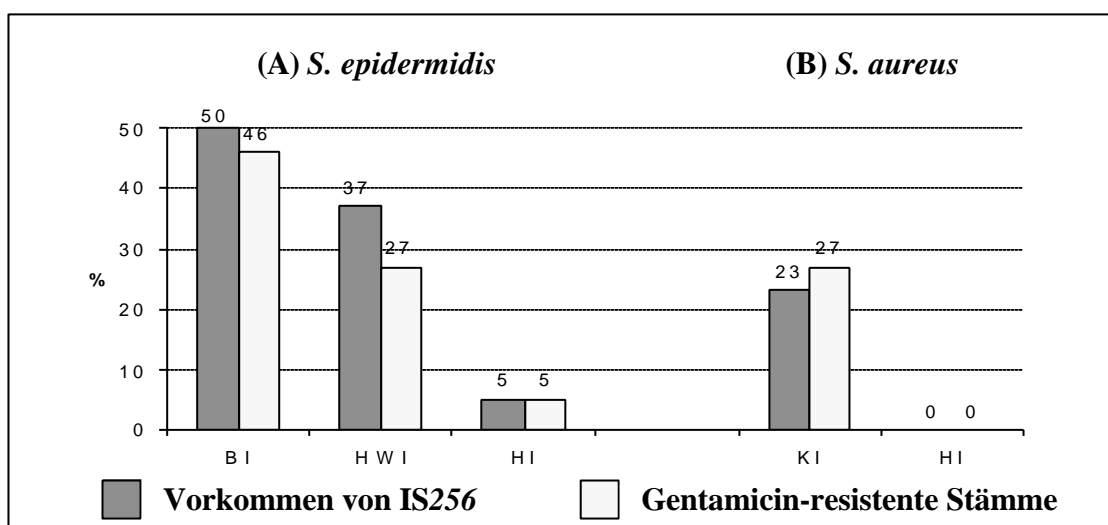


Abb. 12. Vergleich des Vorkommens von IS256 und der Gentamicin-Resistenz in Stämmen unterschiedlicher Herkunft. (A) *S. epidermidis* (B) *S. aureus*
 BI : Blutkulturisolate, HWI : Harnwegsisolat, HI : Hautisolate, KI : Klinische Isolate

Wenn *S. epidermidis*-Stämme resistent gegen Gentamicin waren, enthielten sie auch alle IS256, wobei das Element meist in multiplen Kopien vorkam. Allerdings wurden im umgekehrten Fall auch Gentamicin-sensible Stämme gefunden, in denen das IS256 unabhängig von der Resistenzdeterminante in mehreren Kopien vorhanden war. Es ist daher vorstellbar, daß IS256 nicht nur eine Rolle bei der Übertragung der Gentamicin-Resistenz spielt, sondern auch eine andere Funktion im Genom von Staphylokokken hat. Im Gegensatz dazu konnte in ca. 85 % (22 von 26 Stämme) der Gentamicin-resistenten klinischen *S. aureus*-Stämme das IS256 nachgewiesen werden. Darüber hinaus enthielten 4 Gentamicin-resistenten *S. aureus*-Stämme kein IS256, was darauf hindeutet, daß eine andere genetische Determinante in diesen Stämmen für die Vermittlung der Gentamicin-Resistenz verantwortlich ist.

5.1.7. Zusammenhang zwischen Biofilm und Antibiotikaresistenz

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz in Staphylokokken zu untersuchen, wurden das Vorkommen von Biofilmen und die Antibiotikaresistenz in *S. epidermidis*-Stämmen verglichen. Zuerst wurden biofilmbildende Stämme ausgewählt und dann wurden bei diesen Stämmen die Antibiotikaresistenz untersucht (Abb. 13).

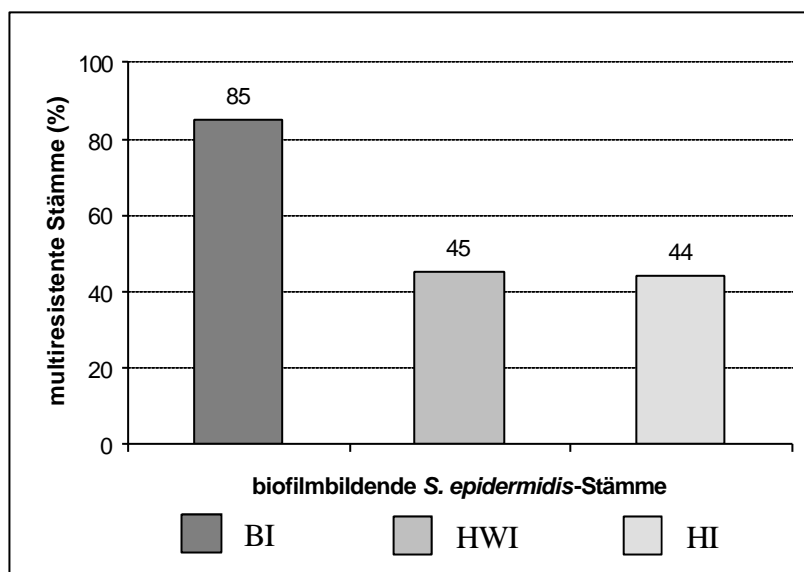


Abb. 13. Vergleich der Biofilmbildung und der Antibiotikaresistenz in *S. epidermidis*-Stämmen. BI : Blutkulturisolate, HWI : Harnwegsisolat, HI : Hautisolat

44 % (4 von 9 Stämme) der biofilmbildenden Hautisolate und 45 % (5 von 11 Stämme) der biofilm-positiven Harnwegsisolate waren multiresistente Stämme. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß die Antibiotkaresistenz in diesen Stämmen mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung korreliert. Bei Blutkulturisolaten war diese Tendenz noch deutlicher. 85 % (17 von 20 Stämme) von biofilmbildenden Blutisolaten waren multiresistente Stämme.

Zusammenfassung

- ? In *S. epidermidis* kommt das *ica*-Operon, das die für die Biofilmbildung benötigten Genprodukte kodiert, signifikant häufiger in klinischen Stämmen als in kommensalen Stämmen vor.
- ? Alle *S. aureus*-Isolate enthalten die *ica*-Gene, obwohl sie unter Laborbedingungen nicht exprimiert werden.
- ? In *S. epidermidis* wird das *ica*-Operon unter Laborbedingungen von 68 % der Hautisolate, 50 % der Harnwegsisolat und 32 % der Blutkulturisolat nicht exprimiert.
- ? Das Insertionselement IS256 ist häufig in klinischen *S. epidermidis*- und *S. aureus*-Stämmen nachweisbar, während es keinen Unterschied im Vorkommen von IS257 zwischen klinischen- und saprophytären Isolat gibt.
- ? Die Antibiotikaresistenztestung zeigt, daß Resistenzen am häufigsten bei klinischen Staphylokokken-Stämmen auftreten.
- ? IS256 ist meist mit der Aminoglykosidresistenz gekoppelt. Das Element kommt darüber hinaus auch unabhängig in multiplen Kopien im Genom klinischer Stämme vor.
- ? Multiresistenz gegen Antibiotika ist in *S. epidermidis* signifikant mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung assoziiert.

5.2. Induktionstest für die Biofilmbildung

Umwelteinflüsse spielen bei der Regulation von virulenzassoziierten Genen eine wichtige Rolle. Zu diesen Umweltfaktoren zählen Wachstumsphase, Temperatur, pH-Wert, Osmolarität, Sauerstoff, Kohlendioxid und subinhibitorische Konzentrationen von Antibiotika.

Antibiotika sind Substanzen, die verschiedene Wirkungen auf bakterielle Zellen haben. Neben den antibiotischen Eigenschaften wurden auch Einflüsse auf Adhärenz, Phagozytoseresistenz oder Toxinproduktion beschrieben (Lorian *et al.*, 1994, Ohlsen *et al.*, 1997, Ohlsen *et al.*, 1998).

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, daß die Expression des *ica*-Operons stark von Umweltfaktoren und subinhibitorischen Konzentrationen bestimmter Antibiotika beeinflusst wird (Rachid *et al.*, 2000a). Wie in Kap. 5.1.3. gezeigt wurde, bildeten nicht alle *ica*-positiven *S. epidermidis*-Stämme in dieser Studie einen Biofilm. Um zu untersuchen, ob die Biofilmbildung dieser Isolate durch äußere Faktoren stimuliert werden kann, wurde der Einfluß von Tetrazyklin und Synercid[®] und Natriumchlorid auf die Expression des *ica*-Operons untersucht. Die oben genannte Untersuchung zum Einfluß geringer Antibiotikakonzentration auf die *ica*-Expression hatte ergeben, daß Tetrazyklin und Synercid[®] die Biofilmbildung um das ca. 9- bis 11-fache steigern können (Rachid *et al.*, 2000a). Tetrazyklin hemmt die Proteinsynthese von Bakterien durch Bindung an die 30S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. Synercid[®] hemmt ebenfalls die Proteinsynthese. Es gehört zu den Streptogramin-Antibiotika und besteht aus den beiden Grundsubstanzen Dalfopristin und Quinupristin. Es ist als bakterizid wirksame Kombination gegen grampositive Bakterien bekannt (Lamb *et al.*, 1999). Die Konzentrationen der verwendeten Antibiotika und Natriumchlorid ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7. Konzentration von Antibiotika und NaCl im Medium.

Teststämme	Konzentration von Antibiotika im Medium (µg/l)	Konzentration von NaCl im Medium (%)
Sensitive Stämme	120 - 0,11	2 - 5
Resistente Stämme	2 - 0,008	2 - 5

Die verwendeten Antibiotikakonzentrationen liegen sowohl unter als auch über den subinhibitorischen Konzentrationen der jeweiligen Substanz. Das ausgewählten Natriumchloridkonzentrationen sind optimal für die Expression des *ica*-Operons (Rachid *et al.*, 2000a). Diese Konzentrationen wurden im Wachstumsmedium eingesetzt. Mit Hilfe des Biofilmtests wurde untersucht, ob ein Biofilm entsteht.

5.2.1. Einfluß von Synercid[®] auf die Biofilmbildung

Die verschiedenen Stämme, die unter Laborbedingungen das *ica*-Operon nicht exprimierten, wurden in TSB-Medium, das Synercid[®] in verschiedenen Konzentrationen enthielt, in 96-Loch-Mikrotiterplatten über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der quantitative Biofilmtest durchgeführt. Bei den *S. epidermidis*-Stämmen wurden 15 Hautisolate, 8 Harnwegs isolate und 8 Blutkulturisolate untersucht. Von den *S. aureus*-Stämmen wurden 10 Hautisolate und 55 klinische Isolate getestet. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abb. 14 dargestellt.

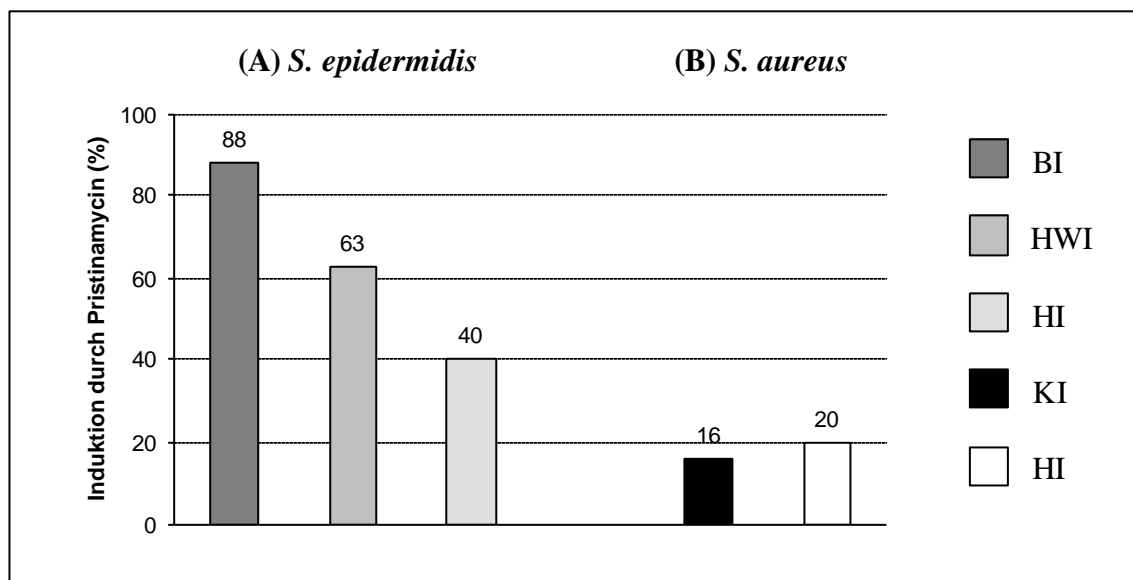


Abb. 14. Einfluß von Synercid[®] auf die Biofilmbildung in nicht-*ica*-exprimierenden *S. epidermidis*- (A) und *S. aureus*-Stämmen (B) unterschiedlicher Herkunft.

BI : Blutkulturisolate, HWI : Harnwegs isolate, HI : Hautisolate, KI : Klinische Isolate

Bei den *S. epidermidis*-Stämmen konnte man im Vergleich zwischen Hautisolaten und klinischen Isolaten ein unterschiedliches Induktionsverhalten finden. Im Fall der Blutkulturisolate wurde die Expression des *ica*-Operons in 7 von 8 Stämmen (88 %) durch Synercid[®] induziert. Dieser Anteil ist im Vergleich zu den Hautisolaten etwa doppelt so hoch. Insgesamt kann also die durch Synercid[®] induzierte Biofilmbildung häufiger in den klinischen Isolaten (Blutkulturisolaten, Harnwegsisolaten) als in den Hautisolaten beobachtet werden.

Bei *S. aureus*-Stämmen hingegen war die Induktion der Biofilmbildung zwischen Hautisolaten und klinischen Isolaten ähnlich. Im Vergleich zu den *S. epidermidis*-Stämmen war die Biofilmbildung nur in wenigen *S. aureus*-Stämmen induzierbar. Der Anteil induzierbarer Isolate betrug sowohl bei den Hautisolaten als auch bei den klinischen Isolaten etwa 20 %.

5.2.2. Einfluß von Tetrazyklin auf die Biofilmbildung

Der Einfluß von Tetrazyklin auf die Biofilmbildung wurde ebenfalls mit Hilfe des quantitativen Biofilm-Tests untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 15 dargestellt.

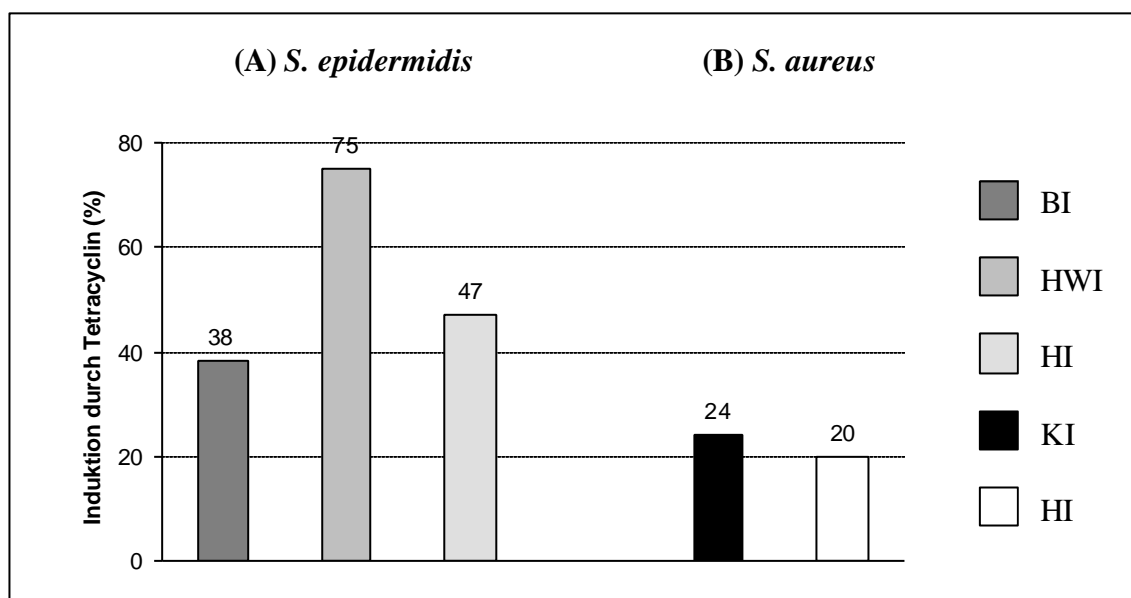


Abb. 15. Einfluß von Tetrazyklin auf die Biofilmbildung in nicht-*ica*-exprimierenden *S. epidermidis*- (A) und *S. aureus*-Stämmen (B) unterschiedlicher Herkunft.

BI : Blutkulturisolate, HWI : Harnwegsisolats, HI : Hautisolats, KI : Klinische Isolate

Tetrazyklin beeinflusste die Biofilmbildung in den *S. epidermidis*-Stämmen sehr unterschiedlich. Die Expression des *ica*-Operons wurde in 75 % der Harnwegs isolate induziert, wogegen in den Hautisolaten die Biofilmbildung nur bei wenigen Stämmen (47 %) stimulierbar war. Im Gegensatz zur Induktion durch Synercid? (in 88 % der Isolate) konnte mit Tetrazyklin nur in 38 % der Blutkultur isolate die Biofilmbildung verstärkt werden.

Bei den beiden Gruppen von *S. aureus* waren jeweils etwa 20 % induzierbar. Dies entspricht in etwa den für Synercid? erhaltenen Ergebnissen (Kap. 5.2.1).

5.2.3. Einfluß von NaCl auf die Biofilmbildung

Die Osmolarität im Wachstumsmedium ist ein Umweltfaktor, der die Expression einer Vielzahl virulenzassoziierter Gene beeinflusst (Dorman, 1991). Um zu untersuchen, ob Osmolarität die *ica*-Expression reguliert, wurden die Stämme, die unter Laborbedingungen das Operon nicht exprimierten, mit 2-5 % NaCl im Medium inkubiert und die Biofilmbildung quantitativ bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 16 dargestellt.

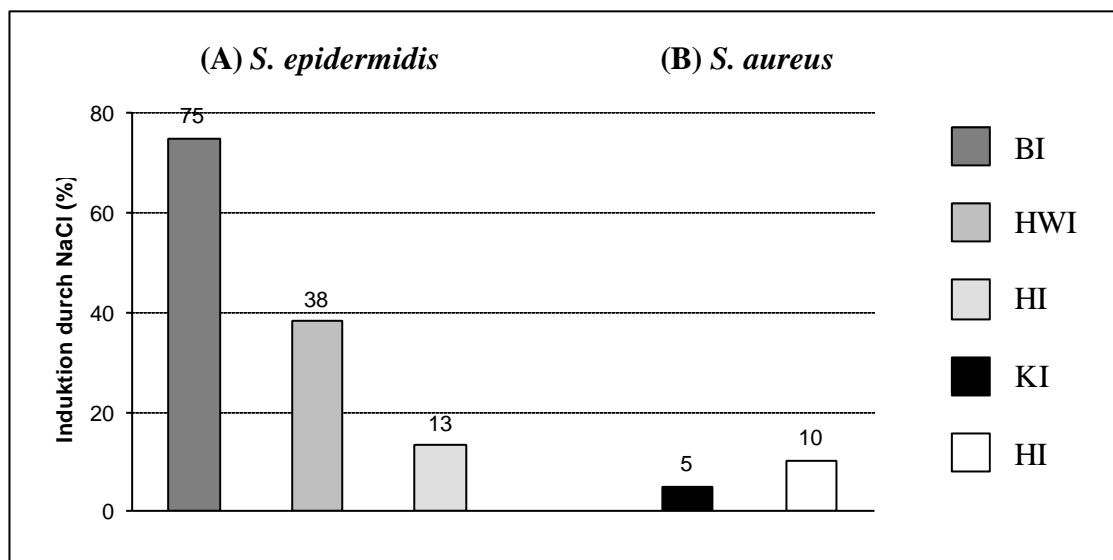


Abb. 16. Einfluß von NaCl auf die Biofilmbildung in nicht-*ica*-exprimierenden *S. epidermidis*- (A) und *S. aureus*-Stämmen (B) unterschiedlicher Herkunft.
 BI : Blutkultur isolate, HWI : Harnwegs isolate, HI : Haut isolate, KI : Klinische Isolate

Die Expression des *ica*-Operons war bei den meisten *S. epidermidis*-Blutkulturisolaten (75 %) induzierbar. Dagegen konnte die *ica*-Expression bei den Hautisolaten nur in relativ wenigen Stämmen (13 %) beobachtet werden. Diese Verteilung der induzierbaren Stämme innerhalb der verschiedenen Isolate ähnelt den für Synercid? erhaltenen Daten.

Die Induktion der *ica*-Expression bei den *S. aureus*-Stämmen war insgesamt weniger stark ausgeprägt als bei den *S. epidermidis*-Stämmen.

5.2.4. Zusammenfassender Überblick zur Induktion der Biofilmbildung durch Antibiotika und Osmolarität

Viele der unter Laborbedingungen biofilmbildenden Stämme konnten durch subinhibitorische Konzentrationen von Synercid? und Tetrazyklin sowie durch erhöhte Osmolarität induziert werden.

In *S. epidermidis* war das *ica*-Operon bei allen Blutkulturisolaten und 88 % der Harnwegs isolate durch mindestens eine der drei Substanzen induzierbar. Dagegen war die Biofilmbildung nur bei 53 % der *ica*-positiven Hautisolate stimulierbar. Bei *S. aureus* war in etwa 30 % der getesteten Stämme das *ica*-Operon induzierbar.

Die Expression des *ica*-Operons in *S. epidermidis* unter Standardbedingungen und in Anwesenheit einer induzierenden Substanz wurde miteinander verglichen (Tabelle 8).

Tabelle 8. Vergleich der Expression des *ica*-Operons unter Standardbedingungen und bei Anwesenheit der drei zur Induktion verwendeten Substanzen.

Stämme (Bakterien -zahl)	Biofilm-positive Stämme unter Standardbedingungen (%)	Biofilm-negative Stämme unter Stand- ardbedingungen (%)	Expression des <i>ica</i> -Operons nach Induktion	<i>Ica</i> - Expression (gesamt) (%)
BI (27)	19 (70)	8 (30)	8	27 (100)
HWI (18)	9 (50)	9 (50)	7	16 (89)
HI (22)	7 (32)	15 (68)	8	15 (68)

Tabelle 8 zeigt, daß sich durch die Anwesenheit verschiedener Umweltfaktoren die Anzahl der Biofilm-produzierenden Stämme erhöht. Die Ergebnisse zeigen, daß die

Biofilmexpression stark von äußeren Bedingungen beeinflusst wird, und nicht alle Isolate unter Standardbedingungen biofilme bilden. Zum sicheren Nachweis biofilmbildender Stämme ist daher die Induktion durch einen der genannten Faktoren empfehlenswert.

Zusammenfassung

- ? In diesem Teil der Studie wurde die Induzierbarkeit der Biofilmbildung in *ica*-positiven, Biofilm-negativen *S. epidermidis* und *S. aureus*-Stämmen durch die Zugabe von subinhibitorischen Konzentrationen von Tetrazyklin und Synercid? und Natriumchlorid im Wachstumsmedium untersucht.
- ? Alle unter Standardbedingungen Biofilm-negativen Blutkulturisolate und etwa 88 % der Harnwegs isolate von *S. epidermidis* waren in diesem Versuch induzierbar, während die Biofilmbildung nur in 53 % der Hautisolate stimulierbar war. Bei *S. aureus* waren etwa 30 % der getesteten Stämme durch mindestens eine der drei Substanzen induzierbar.

5.3. Phasenvariation der Biofilmbildung in einem *S. epidermidis*-Harnwegsisolat

Über die phänotypische und genotypische Variabilität der Expression von Virulenzfaktoren in Staphylokokken wurde in vielen Studien berichtet (Baselga *et al.*, 1993, Proctor *et al.*, 1995). Wahrscheinlich spielt diese Variabilität bei der Anpassung der Bakterien an veränderte äußere Bedingungen eine wichtige Rolle.

Einige Virulenzgene werden dabei nur unter bestimmten Umweltbedingungen exprimiert. So konnte gezeigt werden (Kap. 5.1.3), daß Biofilme unter Laborbedingungen nicht von allen getesteten Staphylococcus-Stämmen gebildet werden. In einem Induktionsversuch mit Tetrazyklin, Synercid[®] und Natriumchlorid konnte jedoch die Expression des *ica*-Operons in einem Großteil dieser Stämme ausgelöst werden (Kap. 5.2). Das deutet darauf hin, daß in diesen Stämmen unter Laborbedingungen die *ica*-Expression reprimiert ist. Bei den restlichen Stämmen, in denen trotz Induktion keine *ica*-Expression beobachtet wurde, könnten andere Mechanismen, wie z. B. Mutationen im *ica*-Operon selbst oder im Bereich von Regulatorgenen, für den Biofilm-negativen Phänotyp verantwortlich sein. Frühe Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe (Ziebuhr *et al.*, 1999) haben gezeigt, daß das *ica*-Operon einen Hotspot für die Insertion von IS256 darstellt. In einer in vitro Studie wurde eine Phasenvariation der Biofilmbildung beobachtet, die auf die alternierende Insertion und Exzision von IS256 zurückzuführen war (Ziebuhr *et al.*, 1999).

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Stämme, die unter Laborbedingungen keinen Biofilm produzierten (8 Blutkulturisolate, 7 Harnwegsisolate und 15 Hautisolate), mittels PCR auf mögliche Deletionen bzw. Insertionen im *ica*-Operon untersucht. Dazu wurde von jedem *ica*-Gen ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert und anschließend dessen Größe identifiziert. Als Vergleichsstamm wurde *S. epidermidis* RP62A herangezogen, der das *ica*-Operon unter Laborbedingungen exprimiert und dessen Genom teilweise sequenziert ist.

5.3.1. PCR-Amplifikation der *ica*-Gene in Biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stämmen

5.3.1.1. PCR-Amplifikation von *icaA*

Für die *icaA*-Amplifikation wurde das Primerpaar *icaA1* und *icaA2* benutzt. Die Größe der *icaA*-PCR-Produkte war bei allen untersuchten Stämmen gleich und entsprach der anhand der

Sequenz von *S. epidermidis* RP62A erwarteten Produktgröße (0,8 kb). Somit konnte eine IS256-Insertion in das *icaA*-Gen bei diesen Stämmen ausgeschlossen werden.

5.3.1.2. PCR-Amplifikation von *icaB*

Die PCR-Amplifikation wurde mit den beiden Primern *icaB1* und *icaB2* durchgeführt. Die Größe des amplifizierten Produktes war bei allen getesteten Stämmen gleich und entsprach der erwarteten Fragmentlänge von 0.5 kb.

5.3.1.3. PCR-Amplifikation von *icaC*

Die PCR-Amplifikation von *icaC* wurde mit den *icaC*-Primern *icaC1* und *icaC2* durchgeführt. Bei den Hautisolaten und den Blutkulturisolaten konnte man keine Änderung der Größe der PCR-Produkte finden. Dagegen konnte unter den Harnwegsisolaten ein Stamm (*S. epidermidis* 569) identifiziert werden, der im Vergleich zu *S. epidermidis* RP62A ein deutlich größeres PCR-Produkt als erwartet lieferte (Abb. 17). Das *icaC*-PCR-Produkt war um 1,3 kb größer als das des Wildtyps. Bei den übrigen Stämmen zeigten die *icaC*-PCR-Produkte die gleiche Größe wie der Wildtyp.

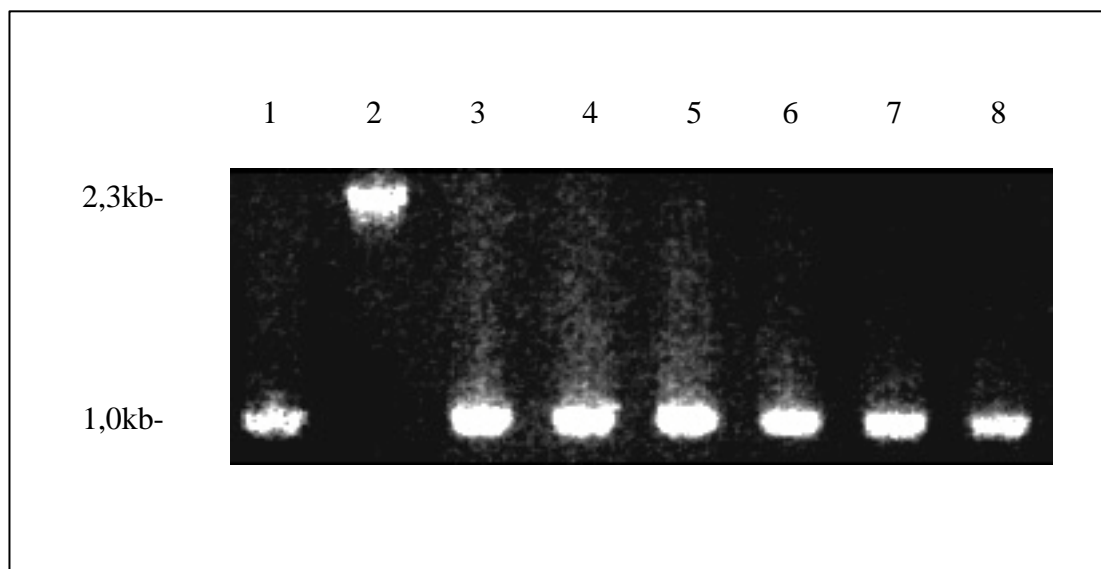


Abb. 17. Agarose-Gel-Elektrophorese von *icaC*-PCR-Produkten aus Harnwegsisolaten von *S. epidermidis*.

1. *S. epidermidis* 567, 2. *S. epidermidis* 569, 3. *S. epidermidis* 585, 4. *S. epidermidis* 587
5. *S. epidermidis* 589, 6. *S. epidermidis* 595, 7. *S. epidermidis* 598, 8. *S. epidermidis* RP62A

5.3.2. Nukleotidsequenzierung des *icaC*-PCR-Produktes aus *S. epidermidis* 569

Um das Ergebnis der oben beschriebenen PCR-Analyse zu überprüfen, wurde das um 1,3 kb vergrößerte PCR-Fragment direkt sequenziert. Die Analyse durch das Blast-Search Programm (Altschul *et al.*, 1990) ergab, daß es sich um eine Insertion von IS256 handelt. Die Insertion erfolgte in Position 3272 der publizierten *icaC*-Nukleotidsequenz (Gene Bank Accession Number U43366). Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt.

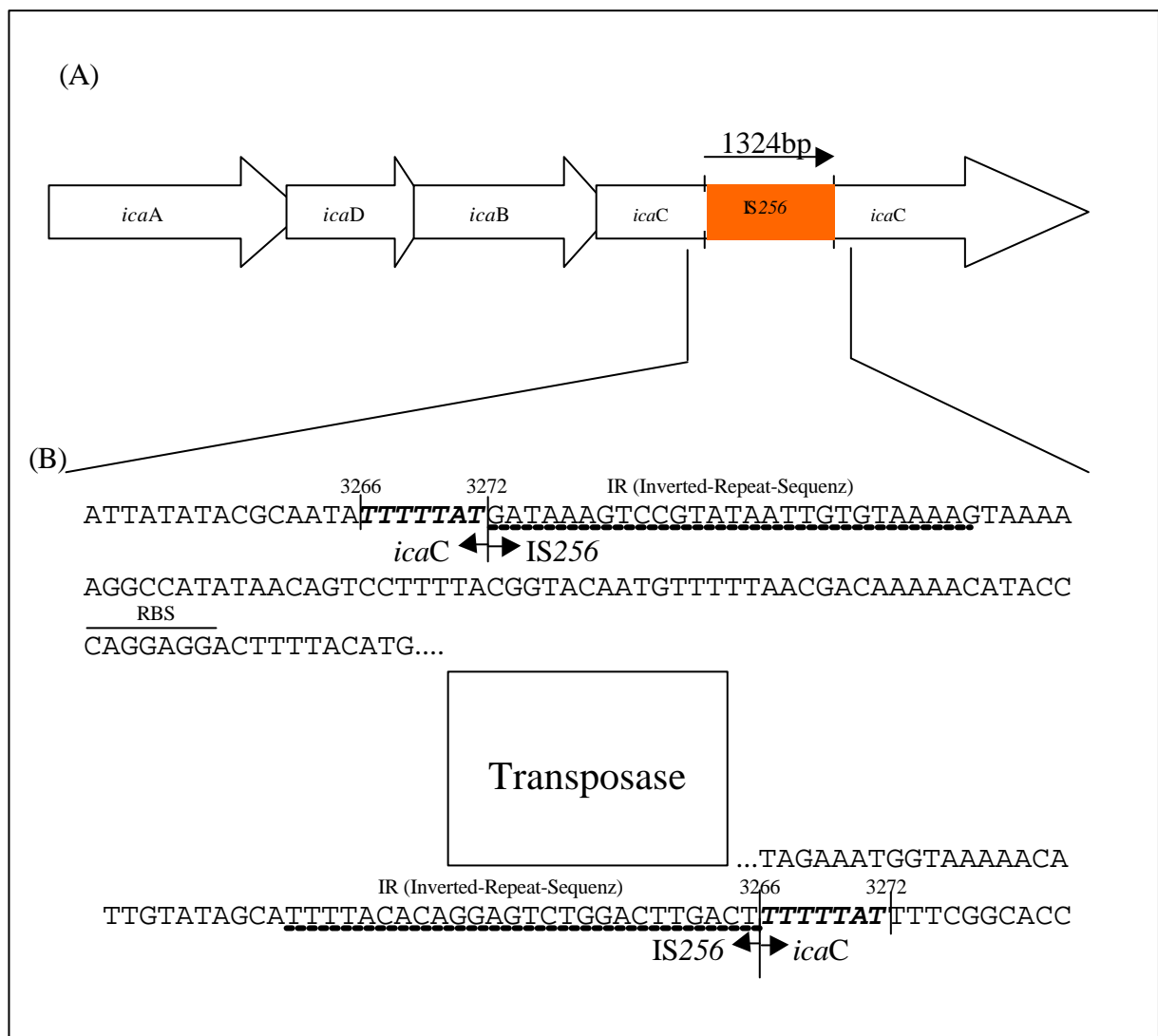


Abb. 18. Sequenz des *icaC*-Gens in Stamm *S. epidermidis* 569.

(A) *ica*-Operon in Stamm *S. epidermidis* 569, (B) Integrationsort von IS256 im *icaC*-Gen.

Die genaue Länge von IS256, das im *icaC*-Gen integriert ist, war 1324 bp. Die Leserichtung des IS256 entsprach der des *icaC*-Gens. In Nukleotidposition 3266-3272 des *icaC*-Gens wurde ein Direct-Repeat mit einer Länge von 7 bp (TTTTTAT) identifiziert, das der

duplizierten Zielsequenz des Insertionselementes entsprach. Interessanterweise sind bisher für IS256 nur Target-Site-Duplikationen von 8 bzw. 9 Basenpaaren beschrieben worden.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Gene *icaA*, *icaD* und *icaC* für eine PIA-Expression notwendig sind (Gerke *et al.*, 1998). Deswegen ist es sehr wahrscheinlich, daß aufgrund der Inaktivierung des *icaC*-Gens durch IS256 im Stamm *S. epidermidis* 569 eine Biofilmbildung nicht mehr möglich ist.

5.3.3. Reversion der Biofilmbildung in *S. epidermidis* 569

Um zu untersuchen, ob die Biofilmexpression in dieser Insertionsmutante wiederherstellbar ist, wurde eine Einzelkolonie gepickt und über mehrere Passagen kultiviert. Die Fähigkeit zur Biofilmbildung wurde als Hinweis für eine erfolgte Exzision des IS256 herangezogen. 15 Tage nach dem Start der Kultivierung wurde die Entstehung eines Biofilms an der Wand des Kultivierungsröhrchens beobachtet. Diese biofilmbildenden Bakterien wurden mit Hilfe einer Impföse abgelöst und auf KRA, einem Indikatormedium für Biofilmexpression, ausgestrichen. Nach eintägiger Kultivierung der Platte konnte man ungefähr ein Drittel schwarze, Biofilm-positive Kolonien unter der Mehrzahl roter, Biofilm-negativer Kolonien finden. Von den schwarzen Klonen wurden 9 Kolonien ausgewählt und auf einer BHI-Platte weiter kultiviert.

5.3.4. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)-Analyse von *S. epidermidis* 569 und den revertanten, Biofilm-positiven Stämmen

Für die epidemiologische und genetische Analyse großer DNA-Moleküle von verschiedenen Krankheitserregern hat sich die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) bewährt (Linhardt *et al.*, 1992). Sie basiert auf der Beobachtung, daß sich auch sehr große DNA-Fragmente elektrophoretisch trennen lassen, wenn man die Feldorientierung während des Laufes ständig ändert.

Um festzustellen, ob es bei den revertanten Stämmen zu Veränderungen im Genom gegenüber dem Stamm *S. epidermidis* 569 gekommen ist, wurde vom Stamm *S. epidermidis* 569 und den revertanten Stämmen genomische DNA isoliert und mittels PFGE untersucht. In Abb. 19 ist das *Sma*I-Restriktionsmuster der genomischen DNA aller Isolate dargestellt. Die Auswertung der PFGE zeigte ein identisches DNA-Fragmentmuster zwischen *S. epidermidis* 569 und allen

9 revertanten Stämmen. Es ist daher anzunehmen, daß alle Isolate eng miteinander verwandt sind und aus einem Klon hervorgegangen sind.

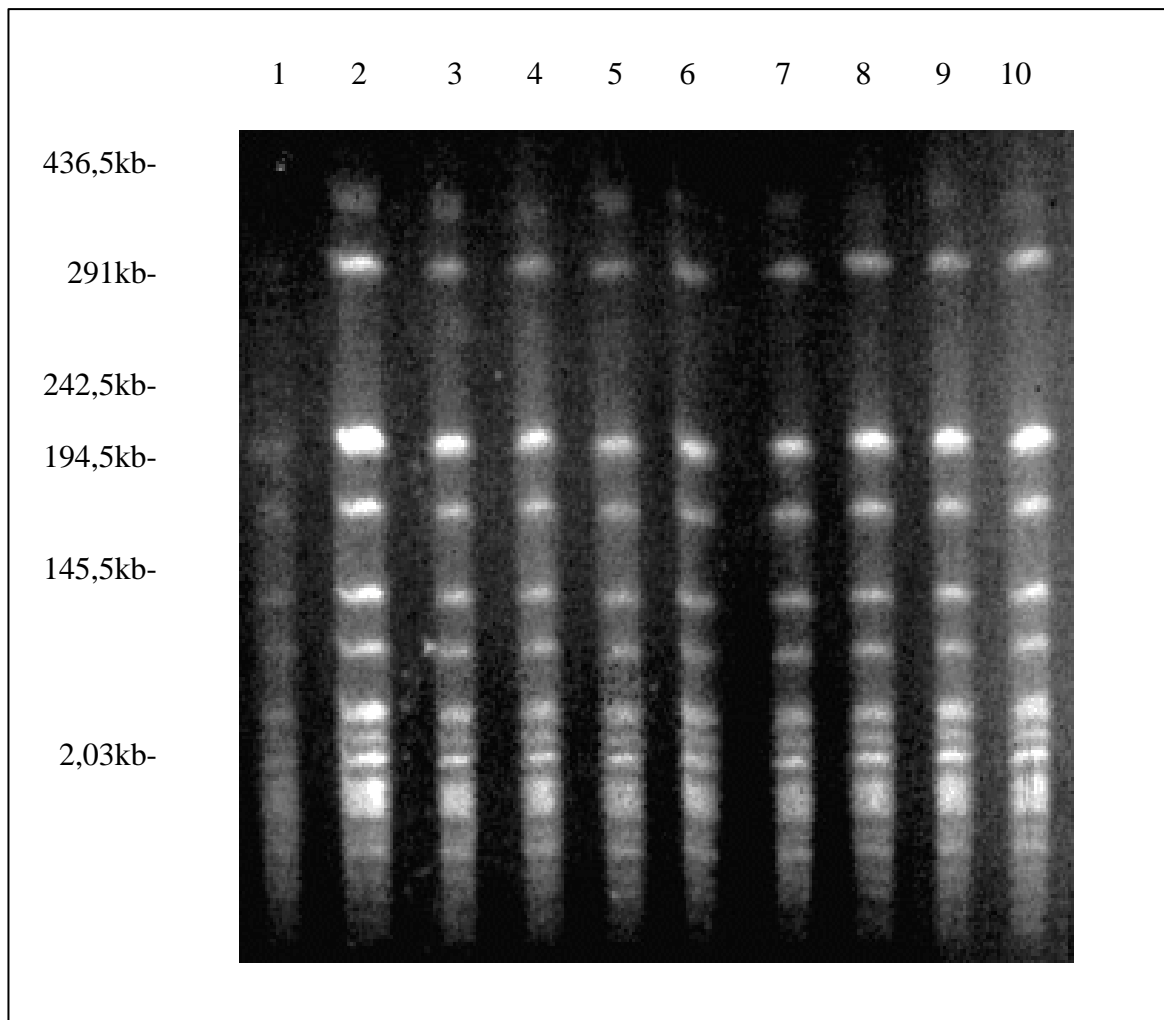


Abb. 19. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) von *SmaI*-geschnittener, genomischer DNA von *S. epidermidis* 569 und den Revertanten.

1. Stamm *S. epidermidis* 569; 2 – 10. Revertanten

5.3.5. Vergleichende PCR-Analyse des *icaC*-Gens von *S. epidermidis* 569 und den revertanten Stämmen

Um zu untersuchen, ob IS256 bei den revertanten Stämmen aus dem *icaC*-Gen vollständig exzidiert wurde, wurde eine PCR-Reaktion mit den *icaC*-spezifischen Primern durchgeführt.

Die Größe des amplifizierten Produkts war bei allen revertanten Stämmen 1,0 kb, d. h. sie waren um 1,3 kb kleiner als das vom Stamm *S. epidermidis* 569 (Abb. 20). Die direkte Sequenzierung des *icaC*-PCR-Produktes von einem ausgewählten revertanten Stamm zeigte, daß in diesem Stamm die ursprüngliche *icaC*-Nukleotidsequenz wieder vorlag. Das heißt, daß das IS256 vollständig aus dem *icaC*-Gen entfernt wurde, inklusive der 7 bp-Target-Site-Duplikation.

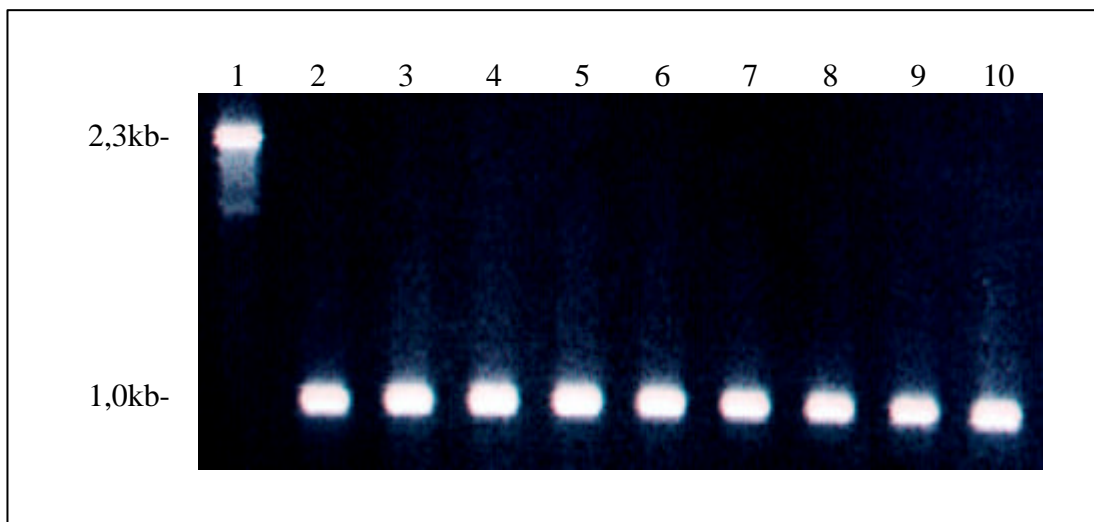


Abb. 20. Agarose-Gel-Elektrophorese von *icaC*-spezifischen PCR-Produkten von *S. epidermidis* 569 und den Revertanten.

1. Stamm *S. epidermidis* 569; 2 - 10. Revertante.

5.3.6. Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz in *S. epidermidis* 569 und den revertanten Stämmen

Um die Expression des *ica*-Operons zwischen *S. epidermidis* 569 und den revertanten Stämmen zu vergleichen, wurde ein Biofilmtest durchgeführt. Alle revertanten Stämme produzierten Biofilm in hohem Maße. Die quantitative, spektrometrische Auswertung ergab für die revertanten Stämme im Vergleich zu *S. epidermidis* 569 einen sechs mal höheren Wert. Das bedeutet, daß das *ica*-Operon in den revertanten Stämmen nach dem Herauspringen von IS256 wieder aktiv ist (Abb. 21).

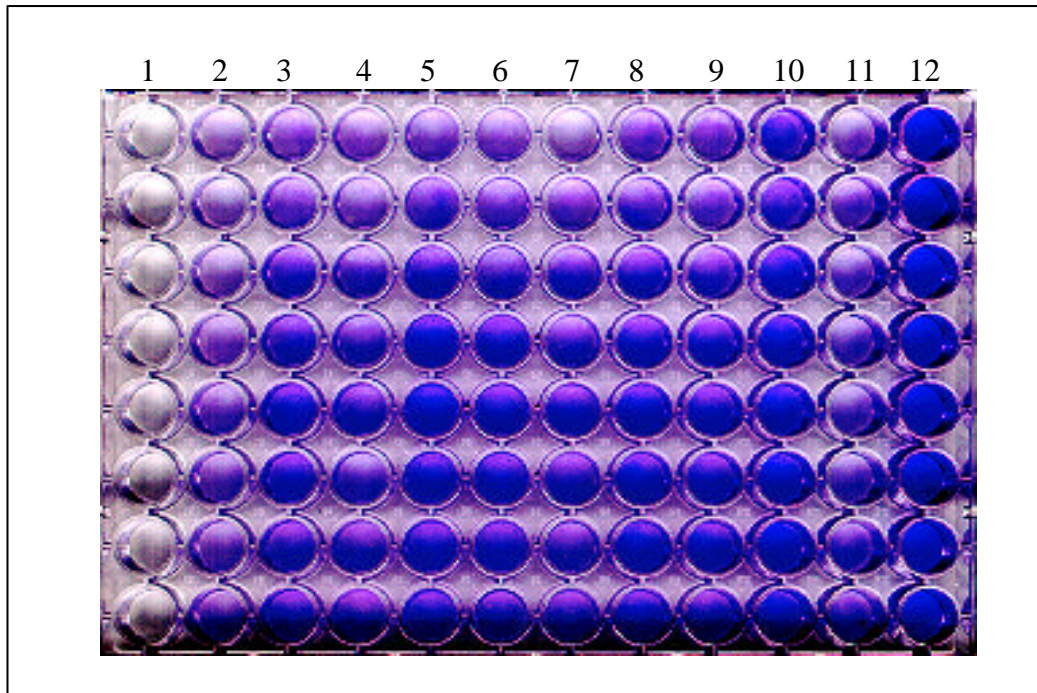


Abb. 21. Biofilmbildung von *S. epidermidis* 569 und den Revertanten.
1. Stamm *S. epidermidis* 569; 2 - 12. Revertanten

Um zu untersuchen, ob durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung die Antibiotikaresistenz der revertanten Stämme beeinflusst wird, wurden die Resistenz gegen verschiedene Antibiotika zwischen dem Wildtyp und den Revertanten verglichen (Tabelle 9). Wie in Tabelle 9 dargestellt ist, konnte kein Unterschied in der Resistenzexpression festgestellt werden. Es ist daher anzunehmen, daß die Biofilmbildung in diesen Stämmen die Resistenzausprägung nicht beeinflusst.

Tabelle 9. Vergleich der Antibiotikaresistenzen zwischen *S. epidermidis* 569 und den Revertanten.

Stamm	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN	W
<i>S. epidermidis</i> 569	s	r	s	r	s	s	s	r	r
Revertante	s	r	s	r	s	s	s	r	r

VA: Vancomycin, OX: Oxacillin, TE: Tetrazyklin, P: Penicillin G, E: Erythromycin, C: Chloramphenicol, DA: Clindamycin, CN: Gentamicin, W: Trimethoprim

5.3.7. Hybridisierungsmuster von IS256 und IS257 im Genom von *S. epidermidis* 569 und den revertanten Stämmen

Um Informationen über die Verteilung von IS256 und IS257 im Chromosom zu erhalten, wurde durch eine Southern-Hybridisierung das Vorkommen von IS256- und IS257-Kopien in der chromosomalen DNA von *S. epidermidis* 569 und den revertanten Stämmen untersucht.

5.3.7.1. IS256- und *icaC*-Hybridisierung

Der mit IS256-Transposase-DNA hybridisierte Blot ist in Abb. 22 dargestellt.

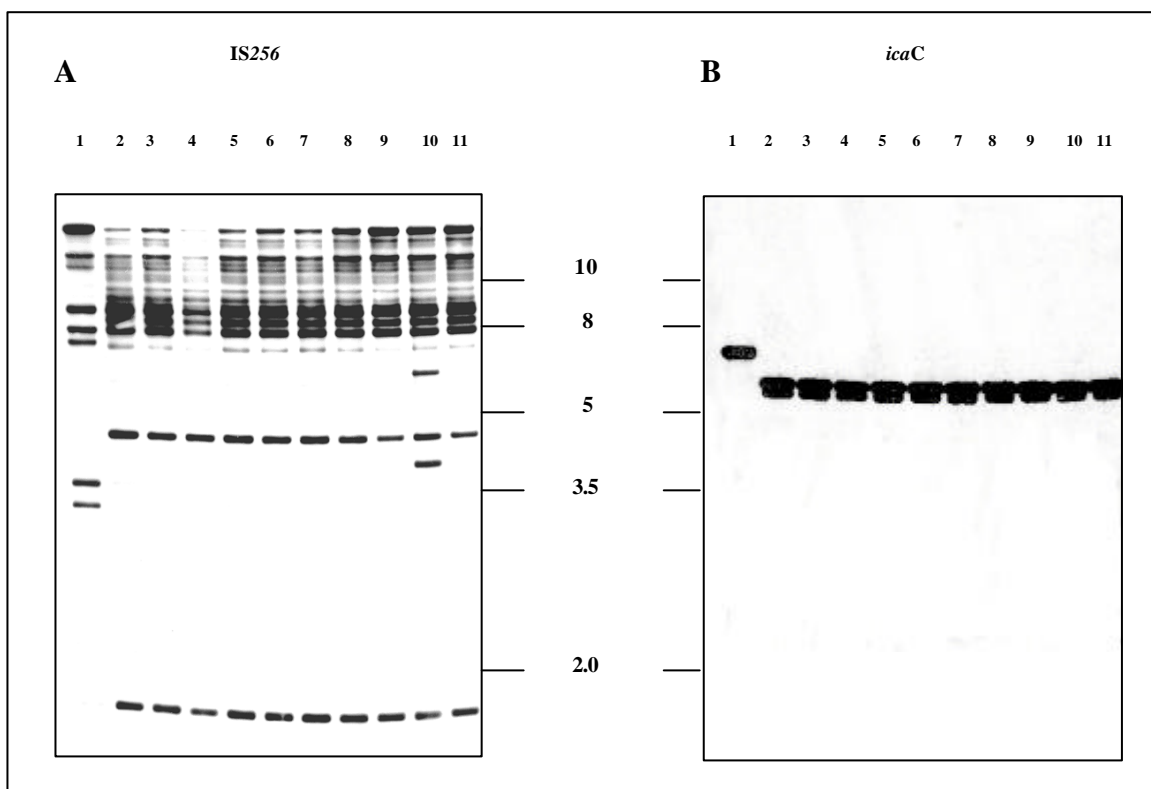


Abb. 22. Hybridisierung von IS256 (A) und *icaC* (B) und in der chromosomalen DNA von *S. epidermidis* 569 und den Revertanten. 1. *S. epidermidis* 569, 2 – 11. Revertanten

Für den Southern-Blot wurde die chromosomale DNA mit *EcoRI* verdaut. In IS256 selbst ist keine *EcoRI*-Restriktionsstelle vorhanden. ECL-markierte IS256-DNA wurde als Hybridisierungssonde benutzt. Im Vergleich zwischen der chromosomalen DNA von *S. epidermidis* 569 und den revertanten Stämmen wurden unterschiedliche IS256-Hybridisierungsmuster beobachtet. Der revertante Stamm auf Spur 10 (Abb. 22. A) enthielt zwei zusätzliche Kopien von IS256. Die zusätzlichen DNA-Banden können daraufhin deuten,

daß eine Replikation des IS256 während der Transposition stattgefunden hat. Anschließend wurde der gleiche Blot mit dem *icaC*-Gen als Sonde hybridisiert, um zu bestimmen, auf welchem DNA-Fragment beide Gene vorkommen. In *S. epidermidis* 569 konnte ein 7,3 kb großes DNA-Fragment sowohl mit der IS256- als auch mit der *icaC*-Sonde hybridisiert werden. Dagegen wurde bei den revertanten Stämmen das entsprechende 6 kb große DNA-Fragment nicht mit der IS256-Sonde detektiert.

5.3.7.2. IS257-Hybridisierung

Der Blot wurde mit IS257-Transposase-DNA hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abb. 23 dargestellt. In der chromosomalen DNA von *S. epidermidis* 569 wurden 11 IS257-spezifische Fragmente gefunden. Ein Vergleich der IS257-Hybridisierungsmuster zwischen *S. epidermidis* 569 und den revertanten Stämmen zeigte keinen Unterschied. Dies deutet darauf hin, daß IS257 in diesen Isolaten weniger aktiv ist als IS256 und die Biofilmbildung nicht beeinflusst.

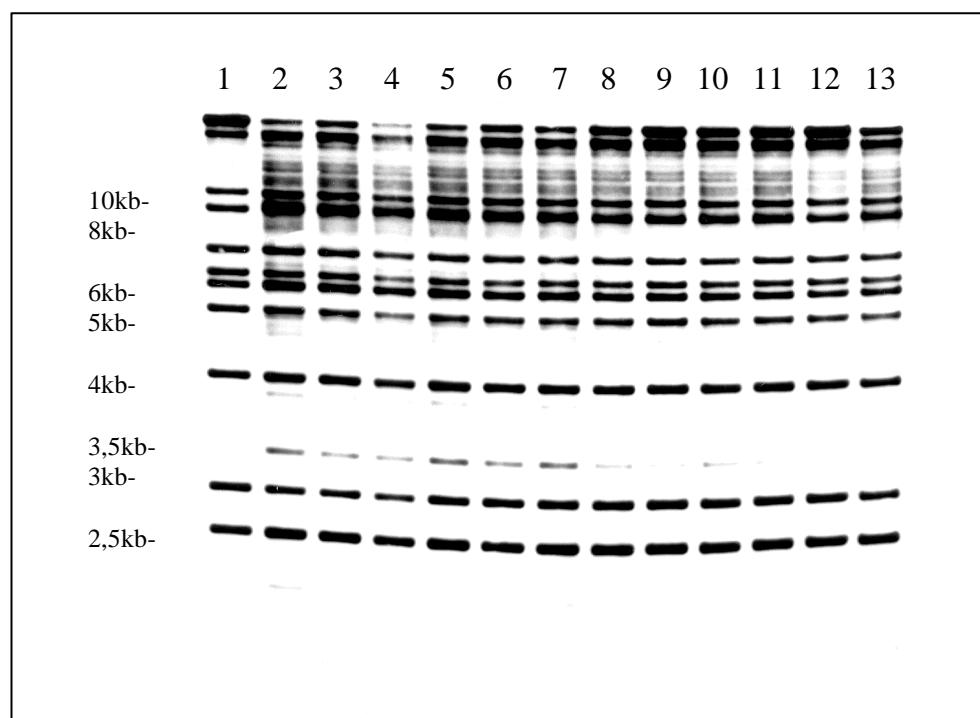


Abb. 23. Hybridisierung von IS257 in der chromosomalen DNA von *S. epidermidis* 569 und den Revertanten.

1.Stamm *S. epidermidis* 569, 2 – 13. Revertanten

Zusammenfassung

- ? Um mögliche Insertionen bzw. Deletionen im *ica*-Operon von *ica*-positiven aber Biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stämmen unter Laborbedingungen nachzuweisen, wurde von jedem *ica*-Gen ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert.
- ? Eine Insertion von IS256 wurde im *icaC*-Gen in einem Harnwegsisolat (*S. epidermidis* 569) beobachtet.
- ? Die Länge der verdoppelten Zielsequenz (Direct-Repeat) in der Insertionsstelle im *icaC*-Gen von *S. epidermidis* 569 betrug 7 bp (5'-TTTTTAT-3').
- ? Die Insertion von IS256 im *icaC*-Gen hemmte die Expression des *ica*-Operons.
- ? Nach Mehrfachpassage konnte die Biofilmbildung revertiert werden.
- ? In den Revertanten war IS256 präzise aus dem *icaC*-Gen exzidiert worden.
- ? Die Transposition von IS256 spiegelte sich auch in unterschiedlichen Hybridisierungsmuster zwischen *S. epidermidis* 569 und den Revertanten wieder.
- ? Die über den Zusammenhang zwischen der Transposition des IS256 im *icaC*-Gen und der Biofilmbildung in *S. epidermidis* 569 gewonnenen Daten stimmen mit den aus einer in vitro Studie erhaltenen Ergebnissen (Ziebuhr *et al.*, 1999) überein.

5.4. Variabilität der Biofilmbildung in *S. aureus*

Die Ergebnisse von Kap. 5.1 zeigten, daß bei *S. epidermidis* das *ica*-Operon eine wichtige Rolle für die Biofilmbildung spielt. Es stellt einen Marker für pathogene *S. epidermidis*-Stämme dar. Dagegen konnte bei *S. aureus* eine Biofilmbildung durch den quantitativen Biofilmtest auf Plastikmikrotiterplatten nicht nachgewiesen werden, obwohl alle getesteten Stämme das *ica*-Operon im Chromosom enthielten. Jedoch konnte eine Induktion der Biofilmbildung bei vielen Biofilm-negativen *S. epidermidis*-Stämmen durch subinhibitorischen Konzentrationen von Tetrazyklin, Synercid[®] sowie Natriumchlorid erreicht werden (Kap. 5.2). Diese Induktion der Biofilmbildung konnte interessanterweise auch bei ca. 30% der untersuchten *S. aureus*-Stämme beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, daß die Expression des *ica*-Operons von *S. aureus* unter Laborbedingungen durch bislang unbekannte Faktoren reprimiert wird, aber durch Umweltfaktoren wieder stimuliert werden kann.

In einer *in vitro* Studie wurde eine Phasenvariation der Biofilmbildung beschrieben (Baselga *et al.*, 1993). Die varianten, Biofilm-positiven *S. aureus*-Stämme wurden über eine Mehrfachpassage erhalten. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob *ica*-positive *S. aureus*-Stämme, die unter Laborbedingungen keinen Biofilm produzierten, nach Mehrfachpassage in der Lage sind, einen Biofilm zu bilden. Anschließend wurde untersucht, ob es noch weitere phänotypische Unterschiede zwischen Wildtyp und Varianten gibt.

5.4.1. Biofilmentstehung bei ursprünglich nicht-biofilmbildenden *S. aureus* Stämmen

Um Biofilm-bildende Varianten aus Biofilm-negativen *S. aureus* Stämmen zu gewinnen, wurde eine Mehrfachpassage in Flüssigkultur durchgeführt. Dazu wurden fünf *S. aureus* Stämme benutzt: *S. aureus* 463, *S. aureus* 473, *S. aureus* 483, *S. aureus* 409 und *S. aureus* 581 (s. Anhang). Fünf Tage nach Beginn der Kultivierung waren Biofilme an den Wänden des Kultivierungsröhrchens entstanden. Nach der Kultivierung der biofilmbildenden Bakterien auf KRA (Kongo-Rot-Agar) Platten wurden 10 schwarze Kolonien gepickt und anschließend in TSB-Medium kultiviert. Diese Kulturen wurden durch quantitative Biofilmtests mit den jeweiligen Wildtyp-Stämmen verglichen. Bei vier *S. aureus*-Stämmen (463, 473, 483, 409) produzierten alle erzeugten Varianten in hohem Maß Biofilm. Nur bei *S. aureus* 581 wurde kein Unterschied in der Biofilmbildung zwischen Wildtyp und Varianten gefunden (Abb. 24).

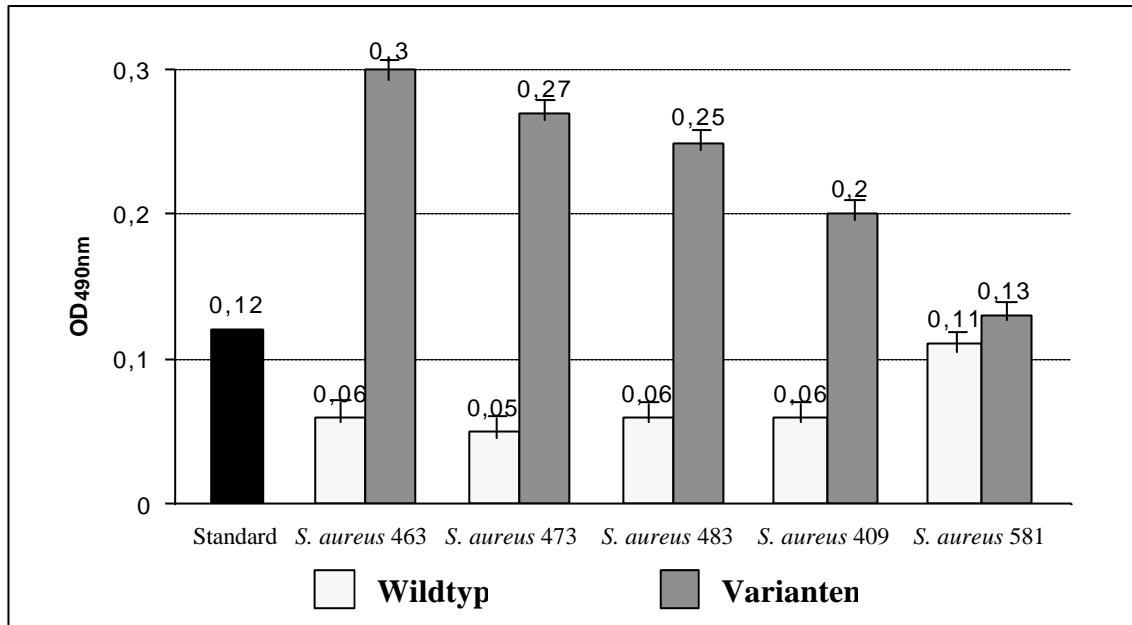


Abb. 24. Biofilmbildung einiger Varianten von ursprünglich nicht-biofilmbildenden *S. aureus*-Stämmen. Stämme wurden als Biofilm-positiv beurteilt, wenn der Wert für die OD über dem Standard von 0,12 liegt.

5.4.2. Api-Staph-Test, Slidex-Staph-Test und Biofilm-Test mit *S. aureus* 483 und den varianten Stämmen

Nach dem Ausstreichen einer Wildtypkolonie von *S. aureus* 483 auf BHI Agarplatten wurden zwei Phänotypen beobachtet. Der eine bildete gelbe Kolonien, während der andere weiße Kolonien bildete. Aufgrund dieser Beobachtung wurde angenommen, daß es sich um phänotypische Subpopulationen des Ausgangsstamms handelte. Deshalb wurden für die weiteren Tests jeweils eine gelbe und weiße Kolonie verwendet. Ebenso wurde mit dem varianten Stamm 483-1 verfahren, der in einem erneutem Vereinzlungsausstrich durchsichtige und weiße Kolonien zeigte. Insgesamt wurden sechs variante Stämme isoliert und in die nachfolgenden Untersuchungen einbezogen (Tabelle 10). Die Bakterien wurden durch den Api-Staph-Test auf ihre metabolische Aktivität hin charakterisiert. Alle Stämme wurden als *S. aureus* identifiziert, hatten aber nicht alle dieselbe Api-Auswertungsnummer. Die Varianten 483-1(w) und 483-3 hatten im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Stämmen aufgrund einer negativen biochemischen Reaktion mit D-Trehalose die Api-Auswertungsnummer 6726153. Der Phänotyp bezüglich der Agglutination (Clumping Faktor, ProteinA) im Slidex-Staph-Test war ebenfalls unterschiedlich. Lediglich die gelbe Kolonie des Wildtypes war Agglutinationspositiv.

Tabelle 10. Charakterisierung des Stammes *S. aureus* 483 und der Varianten durch den Api-Staph-Test und den Agglutinationstest.

Stamm	Koloniefarbe	Api-Auswertungsnummer	Agglutination (Slide-Latex-Test)
<i>S. aureus</i> 483(g)	gelb	6736153	positiv*
<i>S. aureus</i> 483(w)	weiß	6736153	negativ
<i>S. aureus</i> 483-1(d)	durchsichtig	6736153	negativ
<i>S. aureus</i> 483-1(w)	weiß	6726153*	negativ
<i>S. aureus</i> 483-2	weiß	6736153	negativ
<i>S. aureus</i> 483-3	weiß	6726153*	negativ
<i>S. aureus</i> 483-4	weiß	6736153	negativ
<i>S. aureus</i> 483-5	weiß	6736153	negativ

Die Mikrotiterplatte des Biofilmtestes ist in Abb. 25 dargestellt. Während keine Biofilme von den zwei Wildtypkolonien produziert wurden, konnte eine starke Biofilmbildung bei den sechs varianten Stämmen beobachtet werden.

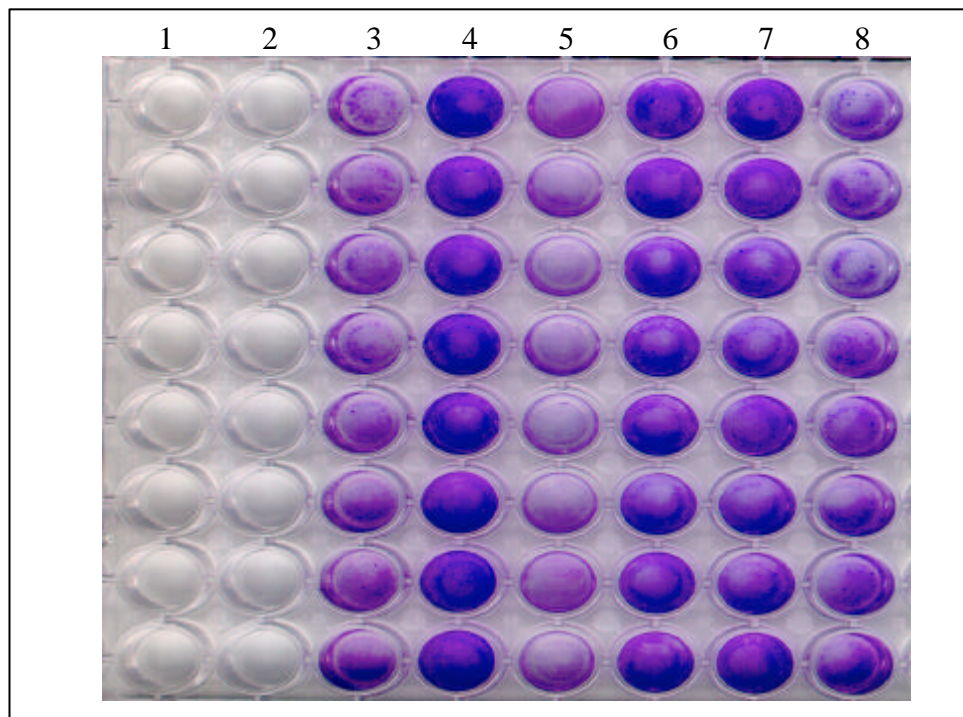


Abb. 25. Vergleich der Biofilmtests bei Stamm *S. aureus* 483 und den Varianten. 1. 483(g), 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5

5.4.3. PFGE-Analyse von *S. aureus* 483 und den varianten Stämmen

Um mögliche Umorganisationen im Genom der Stämme aufzudecken, wurden DNA-Fingerprints mittels PFGE von den zwei Wildtypkolonien und den varianten Stämmen erstellt. Aus der PFGE der *Sma*I-verdauten DNA war ersichtlich, daß alle Isolate ein ähnliches DNA-Fragment-Muster aufwiesen. Obwohl alle Isolate verwandte Stämme sind, war die Größe von einigen DNA-Banden unterschiedlich. Diese Fragmente sind in Abb. 26 mit Pfeilen gekennzeichnet. Die DNA-Fragmente mit Pfeil 1 waren bei den varianten Stämmen 483-1(d) und 483-5 größer als bei den anderen Isolaten. Die DNA-Fragmente aller anderen Isolaten mit Pfeil 2 waren größer als bei dem gelben Isolat vom Wildtyp (Abb. 26).

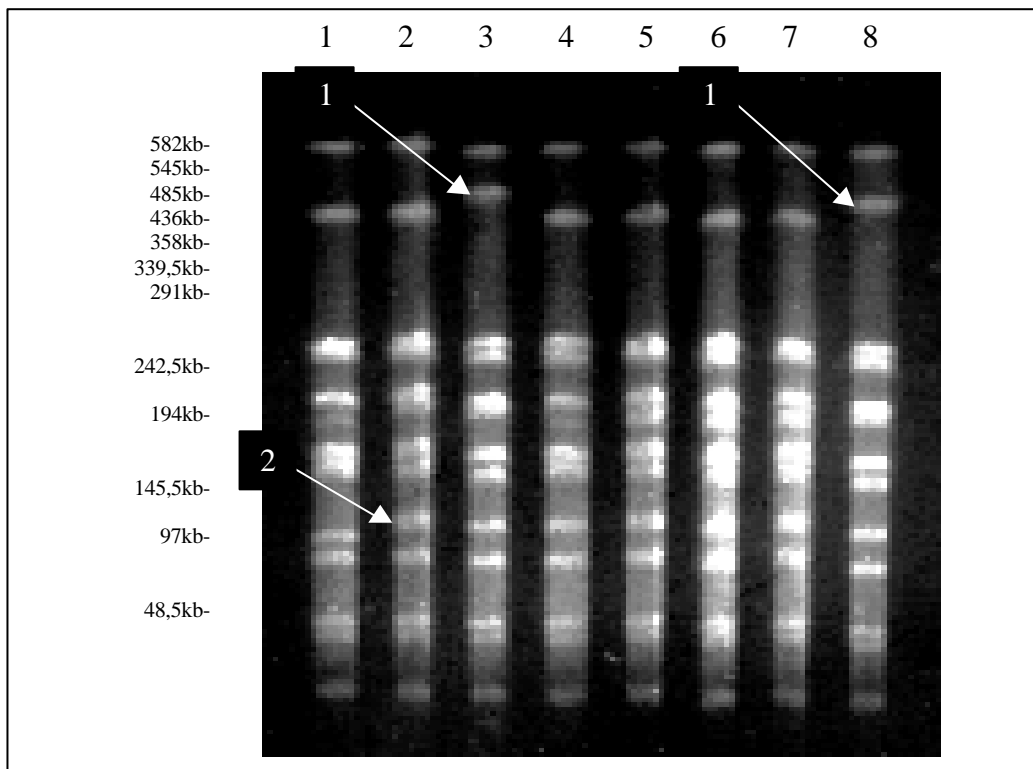


Abb. 26. Vergleich der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)-Analyse von Stamm *S. aureus* 483 und den Varianten. 1. 483(g), 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5

5.4.4. Vergleich der Antibiotikaresistenzen von *S. aureus* 483 und den varianten Stämmen

Um zu untersuchen, ob durch die Fähigkeit zur Biofilmbildung die Antibiotikaresistenz der varianten Stämme beeinflusst wird, wurde die Resistenz gegen verschiedene Antibiotika zwischen den Wildtypstämmen und den varianten Stämmen verglichen. Wie in Tabelle 11

dargestellt ist, wurden keine Unterschiede in den Antibiotikaresistenzen fest gestellt. Diese Ergebnisse zeigen, daß bei *S. aureus* 483 die Biofilmbildung keinen Einfluß auf die Expression der Antibiotikaresistenzen hat.

Tabelle 11. Vergleich der Antibiotikaresistenzen zwischen den Wildtypstämmen und den Varianten von *S. aureus* 483.

	VA	OX	TE	P	E	C	DA	GN	W
Wildtypstämme	s	s	s	r	s	s	s	s	s
Variante	s	s	s	r	s	s	s	s	s

5.4.5. Vergleich des Gesamtproteingehaltes von *S. aureus* 483 und den varianten Stämmen durch Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Expressionsunterschiede zwischen den Wildtypstämmen und Varianten zu vergleichen, wurden Gesamtzellextrakte dieser Stämme isoliert und eine Gelelektrophorese damit durchgeführt. Das Gel mit den Gesamtzellextrakten ist in Abb. 27 dargestellt.

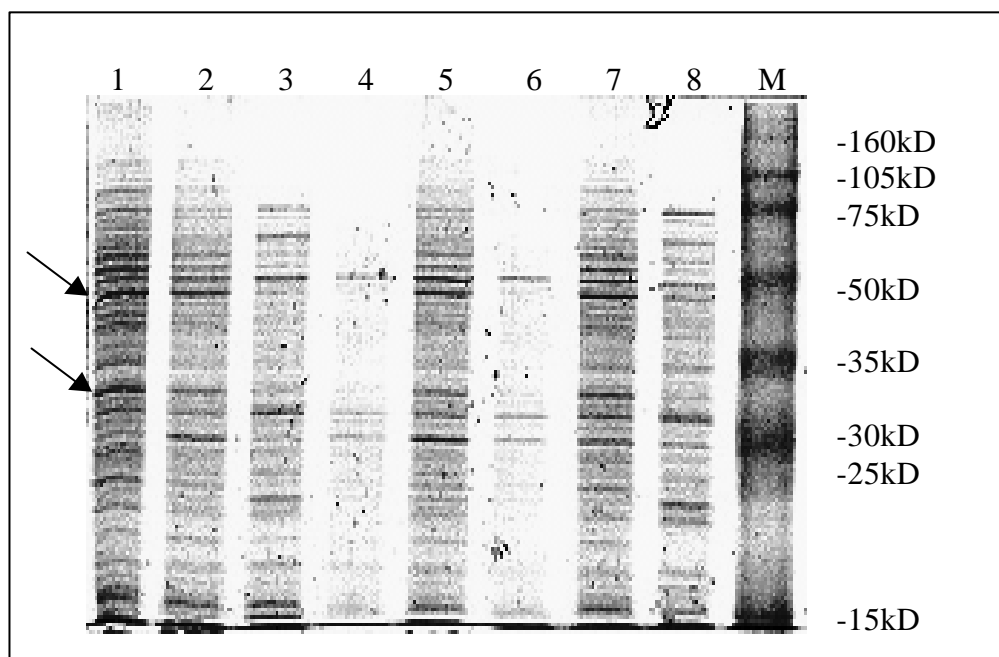


Abb. 27. Polyacrylamidgel mit Gesamtzellextrakten. 1. 483(g), 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5

Auf diesem Gel kann man erkennen, daß es einige kleine Unterschiede in Bezug auf die Proteinexpression zwischen den Stämmen gibt. Die mit den Pfeilen markierten Proteinbanden können in mehreren varianten Stämmen nicht beobachtet werden. Diese Unterschiede im Expressionsmuster können ein Hinweis darauf sein, daß die Genexpression in den verschiedenen Stämmen unterschiedlich reguliert wird.

5.4.6. Vergleich der PIA-Expression von *S. aureus* 483 und den varianten Stämmen durch Immunoblot

Es ist bekannt, daß die Biofilmbildung in *S. epidermidis* mit der Produktion von PIA (Polysaccharid Intercellular Adhäsion) korreliert. Die PIA-Produktion wird durch das *ica*-Operon vermittelt (Mack *et al.*, 1996b). Die *ica*-Expression in zwei Wildtypkolonien und den Varianten wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen PIA untersucht. Zelloberflächen-Extrakte wurden mit ProteinaseK behandelt, um die Cross-Reaktion zwischen ProteinA und IgG zu vermeiden. Wie Abb. 28 zeigt, produzierten die beiden Wildtypstämme kein PIA (A1 und A2), während es alle Biofilm-bildenden Varianten produzierten (A3, A4 und B1-B4).

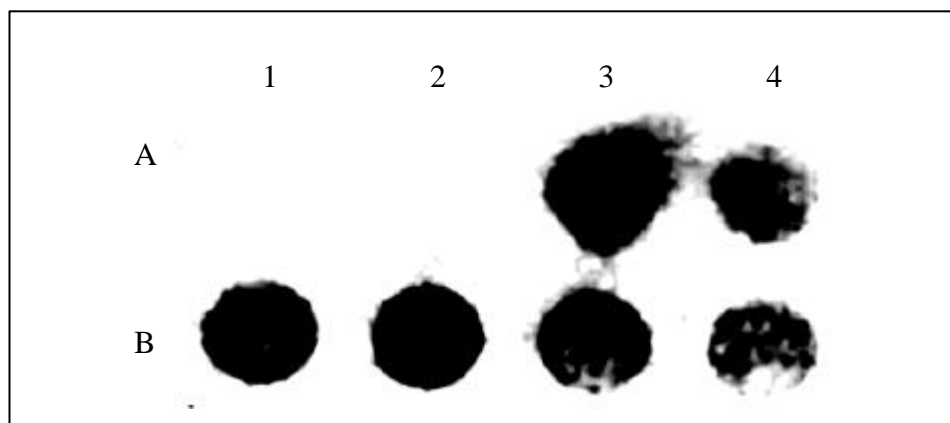


Abb. 28. PIA-Expressionsanalyse durch Immunoblot. A1. 483(g), A2. 483(w), A3. 483-1(d), A4. 483-1(w), B1. 483-2, B2. 483-3, B3. 483-4, B4. 483-5

Zusammenfassung

- ? Bei *S. aureus* konnte unter Laborbedingungen eine variable Biofilmproduktion beobachtet werden. Nach Mehrfachpassage bildeten vier von fünf vormals Biofilm-negativen *S. aureus*-Stämme in hohem Maß Biofilm.
- ? Von einem Wildtypstamm (*S. aureus* 483) wurden durch Mehrfachpassage sechs variante Stämme erhalten. Die PFGE-Analyse zeigte, daß alle Isolate klonalen Ursprungs sind.
- ? Es gab keinen Unterschied in der Antibiotikaresistenzausprägung zwischen den Varianten von *S. aureus* 483. Das bedeutet, daß durch die Biofilmbildung die Antibiotikaresistenz in diesen Stämmen nicht beeinflußt wird.
- ? Die Biofilmbildung in den varianten Stämmen ist auf die Produktion des Polysaccharid Interzellulären Adhäsins (PIA) zurückzuführen.

5.5. Genetische Untersuchungen zur Variation der Biofilmbildung in *S. aureus*

Die Ergebnisse von Kap. 5.2 zeigten, daß die Biofilmbildung von *S. epidermidis* und *S. aureus* durch Tetrazyklin, Synercid[®] und Natriumchlorid induziert wurde. Dies kann ein Hinweis darauf sein, daß durch bestimmte Umweltfaktoren in Staphylokokken Regulatorgene aktiviert werden, die ihrerseits wiederum die Expression von Virulenzgenen beeinflussen. In Staphylokokken wurden schon einige regulatorische Gene beschrieben. Die Kontrolle der Expression sowie der Sekretion von Virulenzgenen wird in komplexen Prozessen durch globale regulatorische Systeme, z. B. Agr oder Sar, gesteuert. Es ist bekannt, daß Agr bei der Produktion von Toxinen, Enzymen oder Oberflächenproteinen sowohl auf transkriptioneller als auch auf translatorischer Ebene eine Rolle spielt (Morfeldt *et al.*, 1996b). Vermutlich erfolgt die Aktivierung des Agr-Systems über die Bindung von Sar an den *agr* Promotor P2, was u.a. auch zu einer Agr-kontrollierten Expression von Exoproteinen führt (Chien *et al.*, 1998b). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, daß der alternative Sigmafaktor SigB in einem *S. aureus*-Stamm eine Rolle für die Biofilmbildung spielt (Rachid *et al.*, 2000b). Die Biofilmbildung wurde hier durch SigB positiv reguliert.

Aus Kap. 5.4 geht hervor, daß in *S. aureus* die Biofilmexpression sehr variabel ist. Dies steht mit der variierenden PIA (Polysaccharid Interzelluläres Adhäsion)-Produktion im Zusammenhang, die durch das *ica*-Operon vermittelt wird. Um die der Variabilität der Biofilmbildung von *S. aureus* 483 zugrundeliegenden Ursachen näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit der Einfluß der globalen regulatorischen Gene *agr* und *sar* sowie des alternativen Sigmafaktors SigB auf die PIA-Expression untersucht.

5.5.1. Southern Blot-Analyse von *agr*-, *sar*-, *sigB*- und *ica*-Operons

Die Analyse des RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)-Musters wird oft für die Untersuchung von Größenvariationen in der genomischen DNA benutzt. Um Größenvariationen des *ica*-Operons und der Regulatorgene in den *S. aureus* 483 Wildtypstämmen und den varianten Stämmen zu untersuchen, wurden Southern Blot-Analysen mit *EcoRI*-verdauter chromosomaler DNA durchgeführt.

5.5.1.1. Southern Blot-Analyse des *ica*-Operons

Um zu untersuchen, ob die Variation der Biofilmbildung von Wildtypstämmen und den varianten Stämmen direkt auf Größenunterschiede (Insertionen oder Deletionen) im *ica*-Operon zurückzuführen ist, wurde ein Blot mit *Eco*RI-gespaltener chromosomaler DNA mit dem *icaC*-DNA-Fragment aus *S. aureus* hybridisiert. Bei allen Isolaten war die Größe der DNA-Banden gleich (Abb. 29). In den folgenden Untersuchungen wurde jeweils der gleiche DNA-Blot mit verschiedenen Regulatorgen-Sonden hybridisiert.

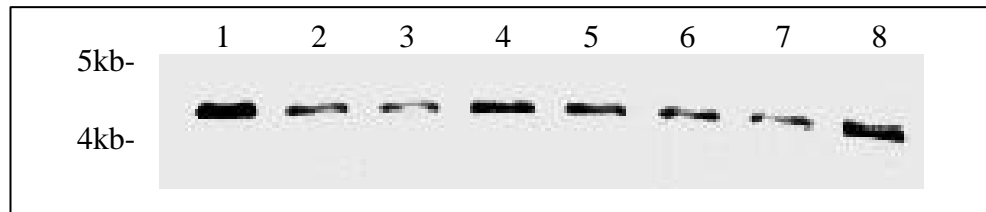


Abb. 29. Southern Blot mit dem *icaC*-Gen . 1. 483(g), 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5

5.5.1.2. Southern Blot-Analyse des *agr*-Systems

Der Blot wurde mit einem spezifischen DNA-Fragment aus dem *agrDC*-Bereich hybridisiert. Wie Abb. 30 zeigt, wurden DNA-Banden mit verschiedenen Größen beobachtet. Die Banden der varianten Stämme 483-1(d) und 483-5 hybridisierten auf einem kleineren Fragment als die der anderen Isolate. Diese Beobachtung korreliert mit dem Bandenmuster der Pulsfeldgelelektrophorese in Abb. 26. Dort waren die *agr*-spezifischen DNA-Fragmente im 485kb-Bereich (Pfeil 1) von den Stämmen 483-1(d) und 483-5 größer als die der anderen Isolate.

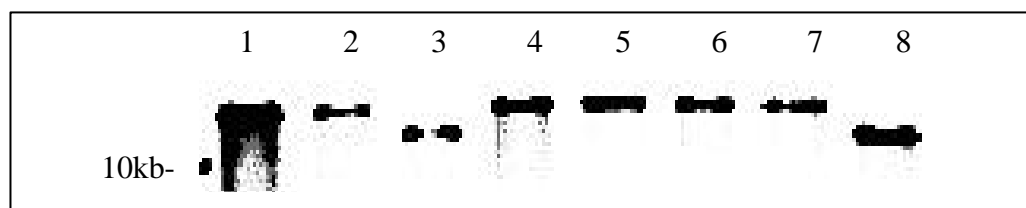


Abb. 30. Southern Blot mit dem *agrDC*-Gen. 1. 483(g), 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5

5.5.1.3. Southern Blot-Analyse des *sarA*-Gens

Der Blot wurde mit dem *sarA*-Gen als Sonde hybridisiert. Bei allen Isolaten konnten zwei Banden detektiert werden. Es gab keine Unterschiede im Hybridisierungsmuster (Abb. 31).

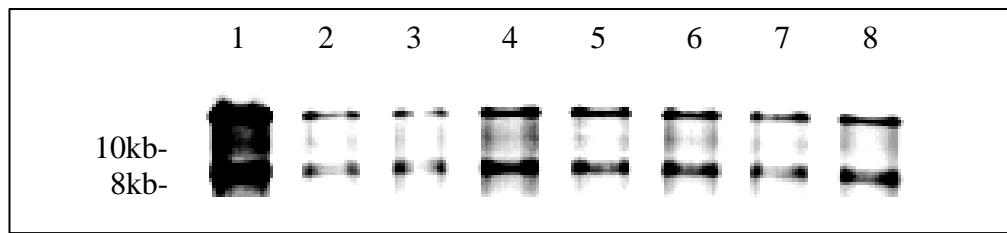


Abb. 31. Southern Blot mit dem *sarA*-Gen. 1. 483(g), 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5

Die oberen Banden in Abb. 31 entsprechen den mit dem *agr*-Gen als Sonde erhaltenen Banden in Abb. 30 mit Ausnahme der Stämme 483-1(d) und 483-5.

5.5.1.4. Southern Blot-Analyse des *sigB*-Gens

Bei der Hybridisierung mit dem *sigB*-DNA Fragment wurden vier verschieden große DNA-Fragmente beobachtet. Die DNA-Größe der Banden von den beiden Wildtypstämmen war unterschiedlich (Pfeil 1, 2). Darüber hinaus traten bei den varianten Stämmen zwei weitere Banden-Größen auf (Pfeil 3, 4). Das DNA Banden-Muster ist in Abb. 32 dargestellt.

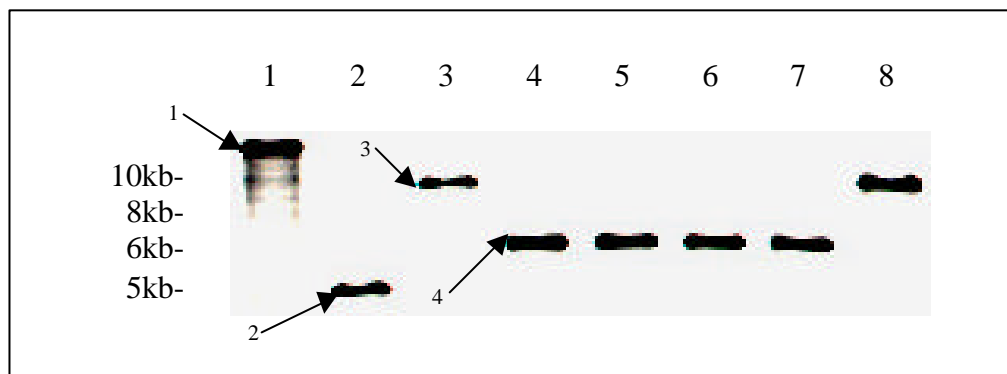


Abb. 32. Southern Blot mit dem *sigB*-Gens. 1. 483(g), 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5

Mit derselben *sigB*-Sonde wurde ein Blot des PFGE-Gels (Abb. 26) hybridisiert. Interessanterweise lagen die *sigB*-DNA-Fragmente auf Banden im Bereich zwischen 97 kb und 145,5 kb (Abb. 33), wobei die Bande des Wildtyp 483(g) auf einem kleineren Fragment hybridisierte als alle anderen Stämme.

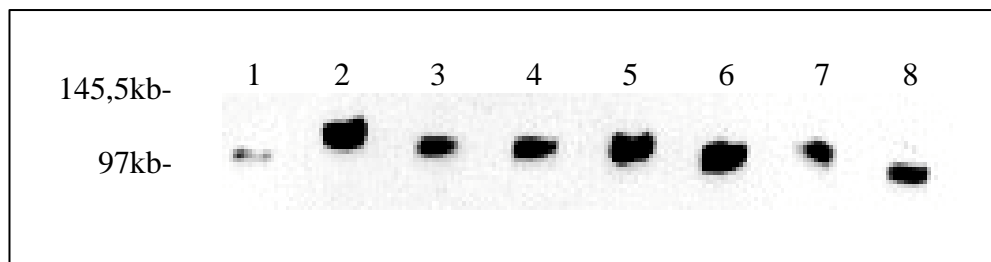


Abb. 33. Southern Blot mit dem *sigB*-Gen auf dem PFGE. 1. 483(g), 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5

5.5.2. Untersuchung zur Transkriptionsaktivität des *agr*- und *sigB*-Systems durch Northern Blot-Analyse

Um die Transkription des *agr*- und des *sigB*-Gens zu untersuchen, wurde ein Northern Blot mit Gesamtzell-RNA durchgeführt. Die entsprechenden Sonden wurden mit der ECL-Methode markiert.

5.5.2.1. Northern Blot-Analyse des *agr*-Systems

Um zu überprüfen, ob die *agr*-Transkriptionsaktivität in den Wildtypstämmen und den varianten Stämmen von *S. aureus* 483 mit der Biofilmbildung korreliert, wurden Northern Blot-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Stämme in TSB-Medium mit 3 % NaCl kultiviert. Als Sonde wurde das RNAlII-DNA-Fragment, ein Effektormolekül des *agr*-Genclusters, eingesetzt. Gesamtzell-RNA von *S. aureus* MA12 wurde als Positivkontrolle benutzt. In Abb. 34 ist zu erkennen, daß eine Transkription der *agr*-Gene bei den Stämmen *S. aureus* 483-1(d) und 483-5 nicht nachweisbar war. Dieses Ergebnis korreliert mit den aus den Southern-Blot-Analysen erhaltenen Daten. Dort hybridisierten die Sonden für *agr* bei den beiden Stämmen 483-1(d) und 483-5 nicht mit denselben chromosomalen DNA-Fragmenten wie bei den anderen Varianten (Abb. 30). Aus den vorliegenden Daten lassen sich im Augenblick keine Hinweise auf die Ursachen der fehlenden *agr*-Transkription ableiten. Eine Möglichkeit wäre jedoch, daß die Mutationen, die zum *agr*-Restriktionspolymorphismus geführt haben, auch die Inaktivierung des *agr*-Systems bewirkten. Eine weitere Ursache könnte aber auch die fehlende Aktivierung des *agr*-Systems durch den Sar-Regulator sein. Diese *agr*-Northern Blot-Analyse hat auch gezeigt, daß die Transkriptionsaktivität des *agr*-Systems nicht direkt mit der Biofilmbildung korreliert, da sowohl *agr*-positive als auch *agr*-negative Varianten einen Biofilm ausbilden konnten.

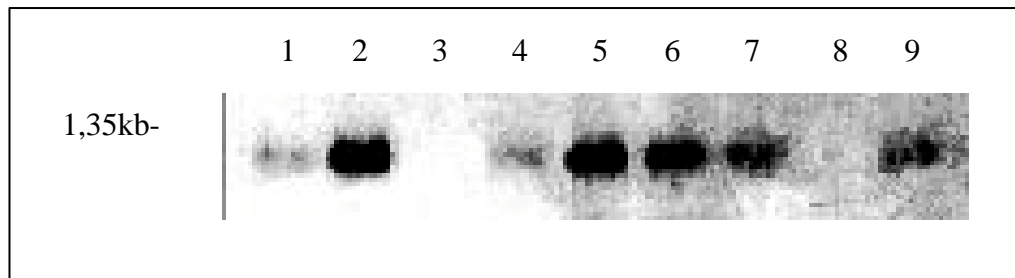


Abb. 34. Northern Blot mit dem RNAIII-DNA-Fragment. 1. 483(g), 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5, 9. MA12

5.5.2.2. Northern Blot-Analyse des *sigB*-Systems

Um zu überprüfen, ob die *sigB*-Transkriptionsaktivität mit der Biofilmbildung korreliert, wurde der gleiche Blot mit einer *asp23*-spezifischen-Sonde hybridisiert. *Asp23* kodiert für ein alkalisches Shockprotein, das einen SigB abhängigen Promotor besitzt und ausschließlich durch diesen Transkriptionsfaktor reguliert wird. Somit spiegelt die *asp23*-Transkription die Aktivität von SigB wider. Die in Abb. 35 dargestellten Ergebnissen zeigen, daß das *asp23*-Gen nur bei *S. aureus* 483(g) transkribiert wurde. Bei den biofilmbildenden Varianten wurde das *asp23*-Gen hingegen nicht transkribiert. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, daß durch SigB die Biofilmbildung bei *S. aureus* 483 reprimiert wird.

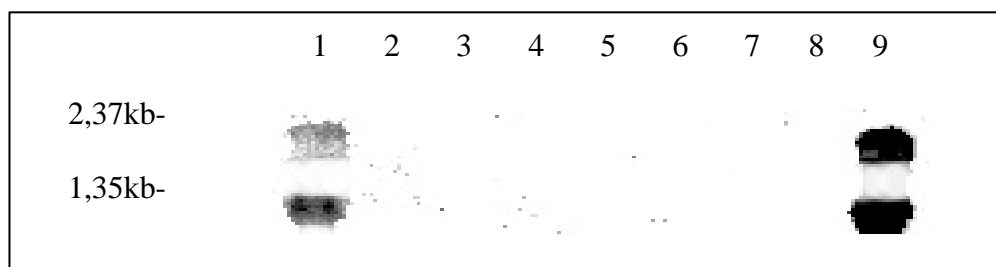


Abb. 35. Northern Blot mit dem *asp23*-Gen. 1. 483(g) 2. 483(w), 3. 483-1(d), 4. 483-1(w), 5. 483-2, 6. 483-3, 7. 483-4, 8. 483-5, 9. MA12

5.5.3. Sequenzanalyse des *sigB*-Systems

Es wurden die Sequenz des *sigB*-Systems von dem *sigB*-transkribierenden Stamm *S. aureus* 483(g) und den drei nicht-*sigB*-transkribierenden Stämmen (*S. aureus* 483(w), *S. aureus* 483-1(d) und *S. aureus* 483-3) miteinander verglichen. Diese Stämme wurden ausgewählt, weil die *sigB*-Sonde im Southern-Blot mit verschiedenen großen DNA-Fragmenten hybridisierte (Abb. 32). Mit der chromosomalen DNA dieser Stämme wurden PCR-Amplifikation mit dem *rsb1*- und dem *rsb2*-Primer durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt beträgt 2,8 kb und enthält

das *rsbU*, das *rsbV*, das *rsbW* und das *sigB*-Gen. Für die Sequenzierung wurden die PCR-Produkte in den pGEM-T-EASY-Vektor ligiert und in *E. coli* DH5 α transformiert. Nach der Isolierung der Vektorplasmide wurden Sequenzierungen mit dem Universal- und Reverse-Sequenzierungsprimer durchgeführt. Die Sequenzierungen wurden in beide Richtungen durch Primerwalking so lange fortgesetzt, bis die Sequenz beider Stränge bestimmt war. Für die Sequenzanalyse des *sigB*-Systems wurde der SigB-positive Stamm *S. aureus* Col als Referenzstamm ausgewählt.

5.5.3.1. Sequenzanalyse des *rsbU*-Gens

RsbU ist als positiver Kontrollfaktor für die SigB-Aktivität beschrieben worden (Giachino *et al.*, 2001). Die Sequenzen des *rsbU*-Gens im SigB-positiven Stamm 483(g) und in den SigB-negativen Stämmen 483(w), 483-1(d), 483-3 wurden miteinander verglichen, um zu untersuchen, ob die Ursache für die fehlende SigB-Aktivität auf Mutationen im *rsbU* zurückzuführen ist. Für die Sequenzanalyse wurde der SigB-positive Referenzstamm *S. aureus* Col verwendet. Der Sequenzvergleich des *rsbU*-Gens ist in Abb. 36 dargestellt.

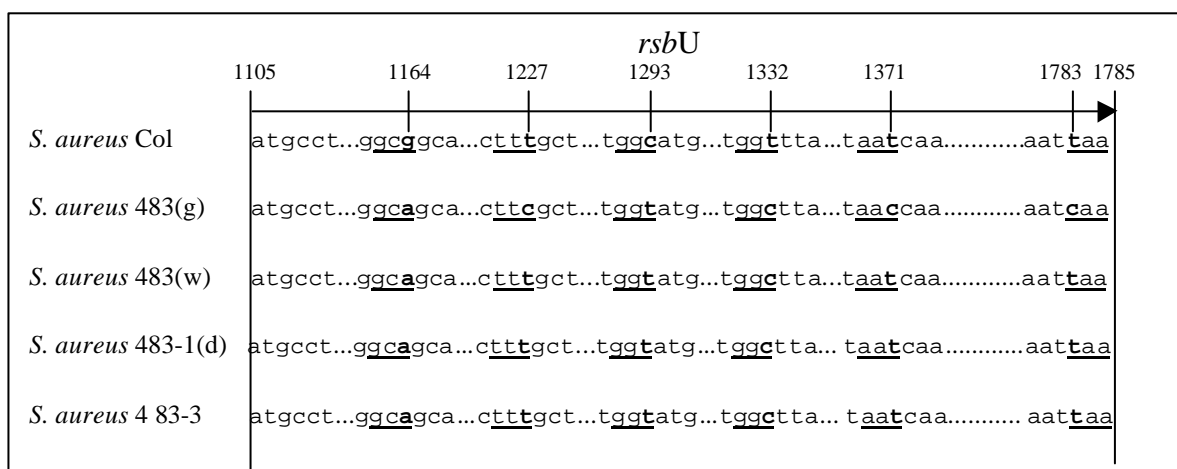


Abb. 36. Sequenzvergleich des *rsbU*-Gens bei dem *sigB*-positiven Stamm (483(g)) und den *sigB*-negativen Stämmen (483(w), 483-1(d) und 483-3).

Im Vergleich zwischen *S. aureus* 483(g) und *S. aureus* Col wurden insgesamt sechs Punktmutationen gefunden. Allerdings hatten diese Nukleotid-Austausche außer in Nukleotidposition 1783 keine Auswirkung auf die Aminosäuren-Sequenz (Tabelle 12). Durch den Austausch von Thymin durch Cytosin in Position 1783 im SigB-positiven *S. aureus* 483(g) wurde das offene Leseraster aufgrund des Wegfalls des Stopcodons um 14 Aminosäuren verlängert. Vergleicht man nun die *rsbU*-Sequenzen der drei SigB-negativen

Stämme, so findet man im Nukleotidposition 1783 wieder ein Stopcodon, wie es in dieser Position auch im Col-Stamm vorliegt. Das verlängerte RsbU-Produkt scheint in *S. aureus* 483 keine Auswirkungen auf die SigB-Aktivität zu haben.

Tabelle 12. Nukleotid- und Aminosäureaustausche in *rsbU*. Die jeweils ausgetauschten Basen sind als Großbuchstaben gekennzeichnet. Die „fett“ hervorgehobenen Nukleotid-Positionen geben die im Vergleich vom SigB-positiven Stamm 483 zu den SigB-negativen Stämmen veränderte Aminosäuren-Sequenz an.

Nukleotid- Position	Triplet : Aminosäure-Rest				
	<i>S. aureus</i> Col	<i>S. aureus</i> 483(g)	<i>S. aureus</i> 483(w)	<i>S. aureus</i> 483-1(d)	<i>S. aureus</i> 483-3
1164	gc G : Alanine	gc A : Alanine	gc A : Alanine	gc A : Alanine	gc A : Alanine
1227	tt T : Phenylalanine	tt C : Phenylalanine	tt T : Phenylalanine	tt T : Phenylalanine	tt T : Phenylalanine
1293	gg C : Glycine	gg T : Glycine	gg T : Glycine	gg T : Glycine	gg T : Glycine
1332	gg T : Glycine	gg C : Glycine	gg C : Glycine	gg C : Glycine	gg C : Glycine
1371	aa T : Asparagine	aa C : Asparagine	aa T : Asparagine	aa T : Asparagine	aa T : Asparagine
1783	T aa : Stopcodon	C aa : Glutamine	T aa : Stopcodon	T aa : Stopcodon	T aa : Stopcodon

5.5.3.2. Sequenzanalyse des *rsbV*-Gens

RsbV ist ein Anti-Anti-Sigma-Faktor, der mit SigB um die Bindung an RsbW konkurriert und damit SigB positiv reguliert (Dufour *et al.*, 1994).

Im Vergleich zu *S. aureus* Col wurden bei allen verwendeten Stämmen zwei Punktmutationen gefunden. Allerdings wurden keine Nukleotidsequenzunterschiede zwischen dem SigB-positiven *S. aureus* 483(g) und den drei SigB-negativen Stämmen 483(w), 483-1, 483-3 festgestellt (Abb. 37).

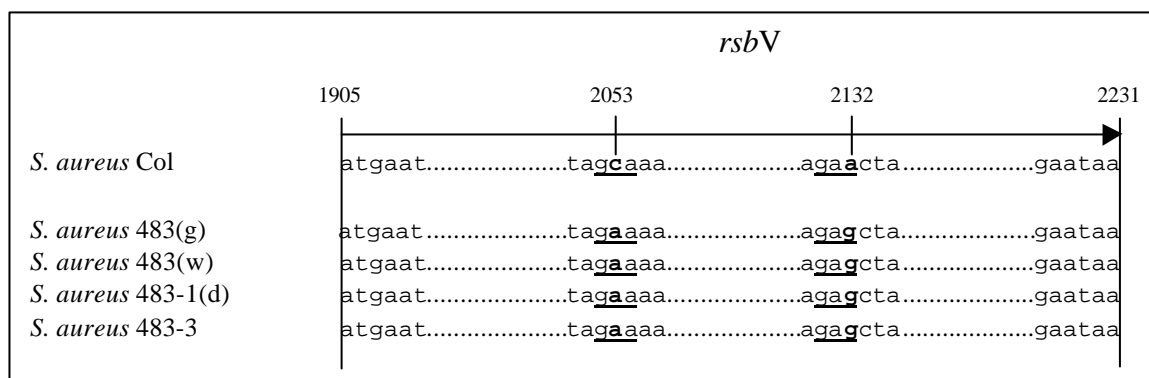


Abb. 37. Sequenzvergleich des *rsbV*-Gens bei dem *sigB*-positiven Stamm (483(g)) und den *sigB*-negativen Stämmen (483(w), 483-1(d) und 483-3).

Durch den Basenaustausch in Nukleotidposition 2053 wurde bei den untersuchten Stämmen die Aminosäure Alanin (gCa) zu Glutaminsäure (gAa) ersetzt. Dagegen hat sich in Nukleotidposition 2132 die Aminosäure nicht geändert (gaA → gaG : Glutaminsäure).

5.5.3.3. Sequenzanalyse des *rsbW*-Gens

RsbW ist ein Anti-Sigma-Faktor, der SigB negativ reguliert (Miyazaki *et al.*, 1999).

Der Sequenzvergleich des *rsbW*-Gens ist in Abb. 38 dargestellt.

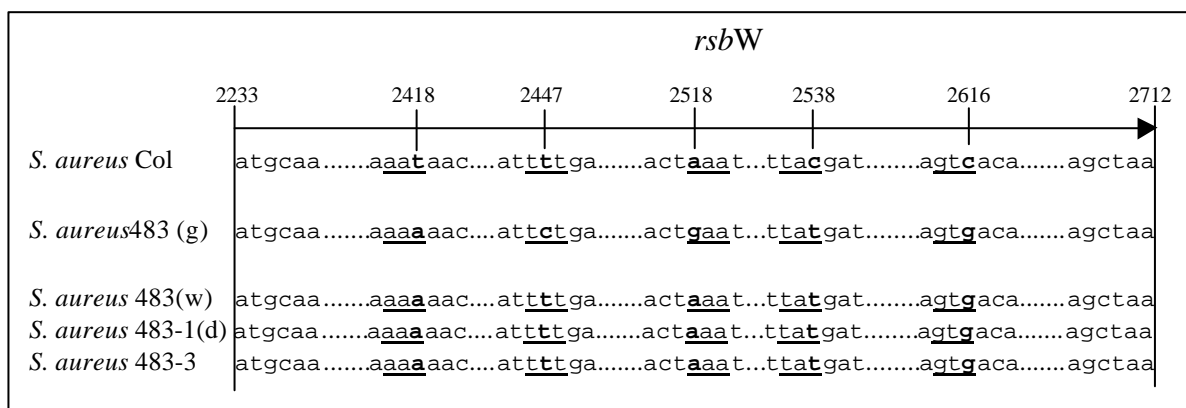


Abb. 38. Sequenzvergleich des *rsbW*-Gens bei dem *sigB*-positiven Stamm (483(g)) und den *sigB*-negativen Stämmen (483(w), 483-1(d) und 483-3).

Im Vergleich von *S. aureus* 483(g) mit *S. aureus* Col wurden insgesamt fünf Punktmutationen gefunden (Abb. 38). Der Basenaustausch in den Nukleotidpositionen 2418, 2447 und 2518 führte zu Änderungen in der Aminosäuren-Sequenz (Tabelle 13). Zwei Sequenzunterschiede zwischen dem *SigB*-positiven *S. aureus* 483(g) und den drei *SigB*-negativen Stämmen wurden in den Nukleotidpositionen 2447 und 2518 gefunden. In Nukleotidposition 2447 wurde die Base T durch C und in Position 2518 die Base A durch G ersetzt. Diese Mutationen bewirkten eine Änderung in der Aminosäuresequenz (Tabelle 13). Eventuell könnten diese beiden Punktmutationen zur Inaktivierung von *rsbW* in *S. aureus* 483(g) geführt haben und somit eine konstitutive *SigB*-Expression bewirkt haben.

Tabelle 13. Nukleotid- und Aminosäureaustausche in *rsbW*. Die jeweils ausgetauschten Basen sind als Großbuchstaben gekennzeichnet. Die „fett“ hervorgehobenen Nukleotid-Positionen geben die im Vergleich vom SigB-positiven Stamm 483 zu den SigB-negativen Stämmen veränderte Aminosäuren-Sequenz an.

Nukleotid- Position	Triplet : Aminosäure-Rest				
	<i>S. aureus</i> Col	<i>S. aureus</i> 483(g)	<i>S. aureus</i> 483(w)	<i>S. aureus</i> 483-1(d)	<i>S. aureus</i> 483-3
2418	aa T : Asparagine	aa A : Lysine	aa A : Lysine	aa A : Lysine	aa A : Lysine
2447	t T t : Phenylalanine	t C t : Serine	t T t : Phenylalanine	t T t : Phenylalanine	t T t : Phenylalanine
2518	A aa : Lysine	G aa : Glutaminsäure	A aa : Lysine	A aa : Lysine	A aa : Lysine
2538	t a C : Tyrosine	t a T : Tyrosine	t a T : Tyrosine	t a T : Tyrosine	t a T : Tyrosine
2616	g t C : Valine	g t G : Valine	g t G : Valine	g t G : Valine	g t G : Valine

5.5.3.4. Sequenzanalyse des *sigB*-Gens

Als ein alternativer Transkriptionsfaktor in *S. aureus* ist das SigB beschrieben worden (Wu *et al.*, 1996). Wie verschiedene Untersuchungen zeigen, wird *sigB* am Anfang der stationären Phase und unter Ethanol und Hitze-Stress induziert (Kullik *et al.*, 1997).

Zwölf Basen waren im Vergleich von *S. aureus* Col zu den anderen untersuchten Stämmen unterschiedlich. Allerdings wurden keine Sequenzunterschiede zwischen dem SigB-positiven *S. aureus* 483(g) und den SigB-negativen Stämmen gefunden (Abb. 39).

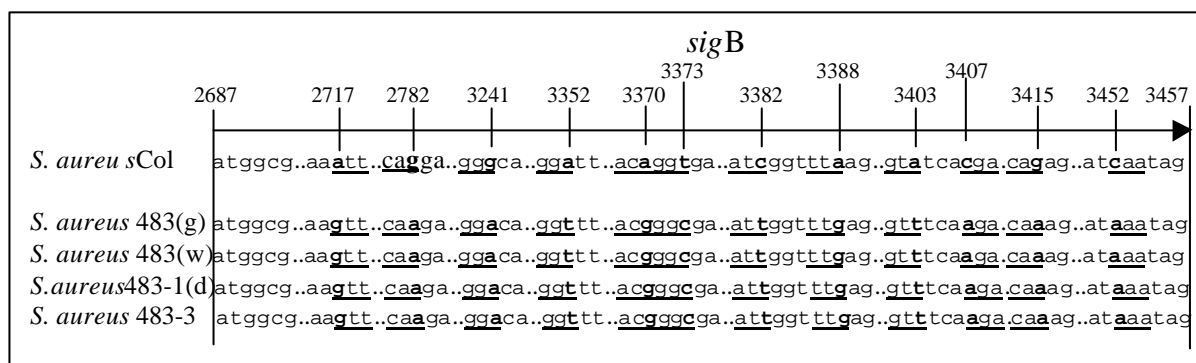


Abb. 39. Sequenzvergleich des *sigW*-Gens bei dem *sigB*-positiven Stamm (483(g)) und den *sigB*-negativen Stämmen (483(w), 483-1(d) und 483-3).

In den Nukleotidpositionen 2717 und 3452 wurde durch den Basenaustausch die Aminosäure-Sequenz verändert (Tabelle 14). Da die Sequenzen von dem SigB-positiven *S. aureus* 483(g) und den drei SigB-negativen Stämmen identisch ist, können die im Vergleich zum Col-Stamm gefundenen Mutationen eigentlich keine Rolle für die SigB-Aktivität spielen. Damit

ist die hohe SigB-Aktivität von *S. aureus* 483(g) am ehesten der unter 5.5.3.3 gezeigten Mutationen im *rsbW*-Gen zuzuschreiben.

Tabelle. 14. Nukleotid- und Aminosäureaustausche in *sigB*. Die jeweils ausgetauschten Basen sind als Großbuchstaben gekennzeichnet. Die „fett“ hervorgehobenen Nukleotid-Positionen geben die im Vergleich von *S. aureus* Col zu dem SigB-positiven 483(g) und den SigB-negativen Stämmen veränderte Aminosäuren-Sequenz an.

Nukleotid -Position	Triplet : Aminosäure-Rest		
	<i>S. aureus</i> Col	<i>S. aureus</i> 483(g)	<i>S. aureus</i> 483(w) <i>S. aureus</i> 483-1(d) <i>S. aureus</i> 483-3
2717	Att : Isoleucine	Gtt : Valine	Gtt : Valine
2782	ca G : Glutamine	ca A : Glutamine	ca A : Glutamine
3241	gg G : Glycine	gg A : Glycine	gg A : Glycine
3352	gg A : Glycine	gg T : Glycine	gg T : Glycine
3370	ac A : Threonine	ac G : Threonine	ac G : Threonine
3373	gg T : Glycine	gg C : Glycine	gg C : Glycine
3382	at C : Isoleucine	at T : Isoleucine	at T : Isoleucine
3388	tt A : Leucine	tt G : Leucine	tt G : Leucine
3403	gt A : Valine	gt T : Valine	gt T : Valine
3407	Cga : Arginine	Aga : Arginine	Aga : Arginine
3415	ca G : Glutamine	ca A : Glutamine	ca A : Glutamine
3452	Caa : Glutamine	Aaa : Lysine	Aaa : Lysine

5.5.4. Komplementation von SigB und Effekt auf die Biofilmbildung in SigB-negativen *S. aureus* 483-Varianten

Um zu testen, ob SigB eine Rolle für die Biofilmbildung in *S. aureus* 483 spielt, wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem das *sigB*-Gen in einem *sigB*-negativen Stamm (*S. aureus* 483-1(w)) komplementiert wurde. Für die Komplementation wurde der Shuttle-Vektor pHPS9, in dem das *sigB*-Gen in den Vektor pSK9 integriert wurde, benutzt. Allerdings war der Versuch, mit der Elektroporationsmethode den Shuttle-Vektor pHPS9 in *S. aureus* 483-1(w) zu transformieren, nicht erfolgreich. Obwohl einige Kolonien auf einer Selektionsagarplatte (Chloramphenicol) isoliert wurden, konnten keine Vektorplasmide von diesen Kolonien isoliert werden. Es wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um die Chloramphenicol-Resistenz dieser Stämme zu untersuchen. Die PFGE-Analyse ergab, daß die Stämme ein den *S. aureus* 483-Wildtypen sehr ähnliches Fragmentmuster aufweisen. Darüber hinaus wurde

festgestellt, daß diese Stämme Biofilm produzieren können. Deshalb wurde davon ausgegangen, daß es sich nicht um Kontaminanten, sondern bezüglich der Biofilmbildung um revertante Stämme handelt.

Nun wurde in dieser Arbeit mit zwei revertanten Stämmen untersucht, ob die Biofilmbildung von der SigB-Aktivität beeinflusst wird.

5.5.4.1. Vergleich der Biofilmbildung

Durch den Biofilmtest wurde nachgewiesen, daß die neu isolierten Stämme die Fähigkeit zur Biofilmbildung verloren haben (Abb. 40). Das bedeutet, daß diese Stämme in Bezug auf die Biofilmbildung revertiert sind. Deshalb wurden diese Stämme als revertante Stämme *S. aureus* K1 und K2 bezeichnet.

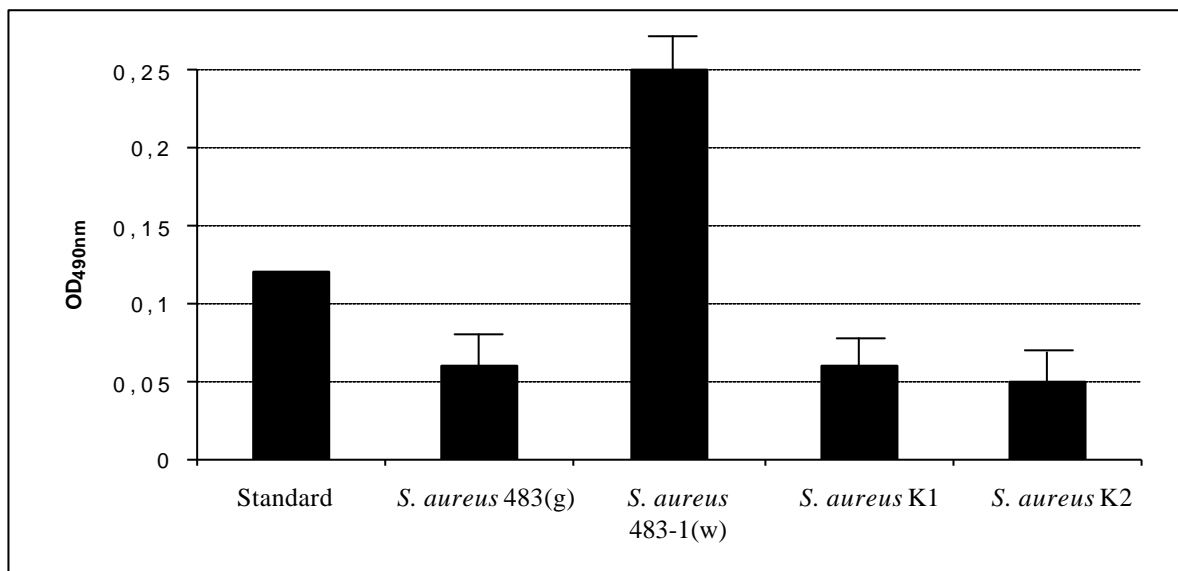


Abb. 40. Quantitativer Vergleich der Biofilmbildung bei verschiedenen *S. aureus*-Stämmen : Wildtypstamm 483(g), varianter Stamm 483-1(w), revertante Stämme K1, K2.

5.5.4.2. PFGE-Analyse

Um festzustellen, ob es sich bei den revertanten Stämmen nicht um Kontaminanten handelt, wurden die Isolate vom Biofilm-negativen Wildtypstamm *S. aureus* 483(g), einem Biofilm-produzierenden Varianten *S. aureus* 483-1(w) und zwei neu isolierten revertanten Stämmen (*S. aureus* K1 und K2) mit Hilfe der PFGE hinsichtlich ihrer genomischen Identität untersucht. In Abb. 41 ist das *Sma*I-Restriktionsmuster der genomischen DNA aller Isolate dargestellt.

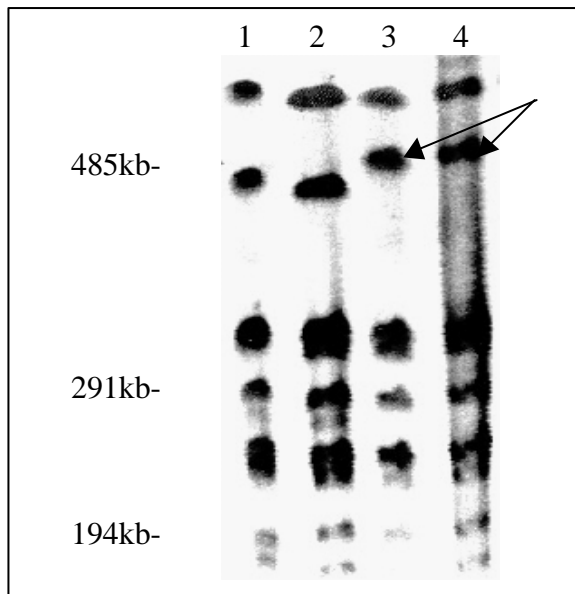


Abb. 41. Vergleich der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)-Analyse. 1. *S. aureus* 483(g), 2. *S. aureus* 483-1(w), 3. *S. aureus* K1, 4. *S. aureus* K2

Die Auswertung der PFGE zeigte, daß die revertanten Stämme im Vergleich mit dem Wildtypstamm und dem varianten Stamm im wesentlichen die gleichen DNA-Fragmentmuster zeigen, obwohl die mit Pfeilen gekennzeichneten DNA-Fragmente bei den revertanten Stämmen größer als bei dem Wildtypstamm und dem varianten Stamm waren. Man kann daher davon ausgehen, daß es sich um verwandte Stämme und nicht um Kontaminationen handelt.

5.5.4.3. Southern Blot-Analyse mit dem *sigB*-Gen

Die mit *EcoRI* verdaute chromosomale DNA vom Wildtypstamm *S. aureus* 483(g), vom varianten Stamm *S. aureus* 483-1(w) und vom revertanten Stamm *S. aureus* K1 wurde durch Southern Blot-Analyse mit dem *sigB*-Gen als Sonde untersucht, um zu testen, ob es Größenshifts bei dem revertanten Stamm gibt. Wie Abb. 42 zeigt, konnte bei *S. aureus* K1 ein Größenshift beobachtet werden. Im Vergleich zum Biofilm-positiven *S. aureus* 483-1(w) ist die mit der *sigB*-Sonde hybridisierte Bande des revertanten Stamms größer, hat allerdings nicht dieselbe Größe wie die Wildtyp-Bande.

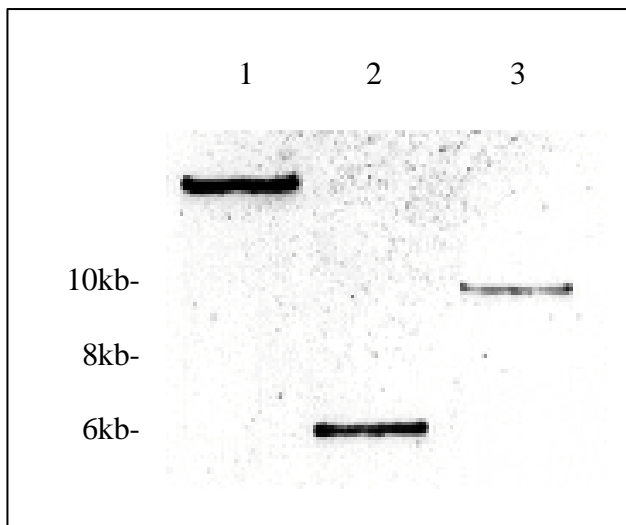


Abb. 42. Southern Blot-Analyse von mit *EcoRI* verdauter chromosomaler DNA, die mit dem *sigB*-Gen hybridisiert wurde. 1. *S. aureus* 483(g), 2. *S. aureus* 483-1(w), 3. *S. aureus* K1

5.5.4.4. Northern Blot-Analyse mit dem *asp23*-Gen und Sequenzierung des *sigB*-Operons

Um zu testen, ob die Transkription des *sigB*-Gens mit der Biofilmbildung korreliert, wurde eine Northern Blot-Analyse mit dem *asp23*-Gen durchgeführt. Die Transkriptionsaktivität des *asp23*-Gens korrelierte nicht mit der Biofilmbildung bei *S. aureus* K1 (Abb. 43). Obwohl der revertanten Stamm *S. aureus* K1 im Gegensatz zu *S. aureus* 483-1(w) keinen Biofilm produziert, ist die *sigB*-Transkriptionsaktivität in beiden Stämmen negativ. Das bedeutet, daß das Protein SigB für die Biofilmbildung bei diesen Stämmen keine Rolle spielt. Die Sequenzierung des *sigB*-Operons im revertanten Stamm K1 ergab, daß die DNA in diesem Bereich identisch zu den varianten Stämmen ist.

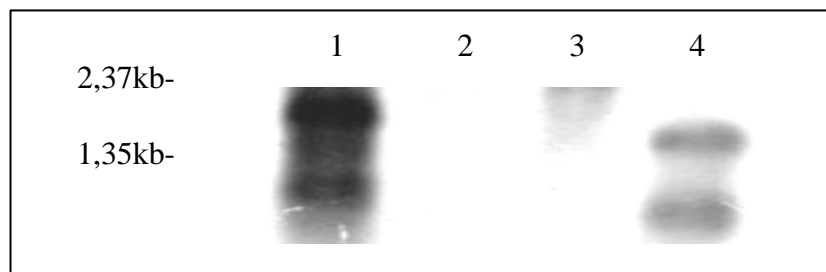


Abb. 43. Northern Blot mit *asp23*-Gen. 1. *S. aureus*483(g)
2. *S. aureus* 483-1(w), 3. *S. aureus* K1, 4. *S. aureus* MA12

Zusammenfassung

- ? Um die Ursache für die Phasenvariation in der Biofilmbildung von *S. aureus* 483 zu charakterisieren, wurden Regulatorgene wie das *agr*-, *sar*- und *sigB*-Gen untersucht.
- ? Bei der Southern Blot-Analyse mit einer *sigB*-Sonde wurden im Vergleich zu *S. aureus* 483 und den varianten Stämmen vier DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe beobachtet.
- ? Die Northern Blot-Analyse mit dem *asp23*-Gen zeigte, daß das *sigB*-Gen nur bei einem Wildtypstamm (*S. aureus* 483(g)) transkribiert wurde.
- ? Im Vergleich der Sequenz der Gene *rsbU* und *rsbW* vom SigB-positiven Stamm 483(g) und von den SigB-negativen varianten Stämmen wurden Punktmutationen in verschiedenen Positionen beobachtet. Jedoch konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob diese Mutationen für die SigB-Aktivität eine Rolle spielen.
- ? Das *sigB*-Gen spielte keine Rolle für die Biofilmbildung in *S. aureus* 483, weil die Northern Blot-Analyse und die Sequenzanalyse zeigten, daß der revertanten Stamm *S. aureus* K1 im Vergleich zu den varianten Stämmen in Bezug auf das *sigB*-Gen keine Unterschiede aufweist.

Nosokomiale Staphylokokkeninfektionen als Gesundheitsproblem der Gegenwart

Nosokomiale Infektionen sind Infektionen, die im Krankenhaus erworben werden. Aus einer aktuellen Studie geht hervor, daß in Deutschland *S. aureus* mit 13,3 % der häufigste Erreger aller Krankenhausinfektionen überhaupt ist, wobei 13,1 % dieser Isolate Methicillin-resistente Stämme (MRSA) sind. *S. aureus* stellt die wichtigste Ursache beatmungsassoziierter Pneumonien dar, während Katheter-assoziierte Septikämien vorwiegend durch Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) (33,9 %) ausgelöst werden (Steinbrecher *et al.*, 2000). Die am häufigsten isolierte Spezies ist hier *S. epidermidis*. Infektionen durch KNS nehmen nicht zuletzt durch die breite Anwendung von medizinischen Implantaten und die steigende Zahl immunsupprimierter Patienten in der modernen Medizin ständig zu. Der wichtigste Pathomechanismus für Implantat-assoziierte Staphylokokkeninfektionen ist die Fähigkeit dieser Bakterien, auf glatten Oberflächen mehrschichtige Biofilme auszubilden. In den letzten Jahren sind insbesondere bei *S. epidermidis* viele Faktoren, die an Adhärenz und Biofilmbildungen beteiligt sind, beschrieben worden (Christensen *et al.*, 1990b, Timmerman *et al.*, 1991, Mack *et al.*, 1992, Mack *et al.*, 1994b, Schumacher-Perdreau *et al.*, 1994, Heilmann *et al.*, 1997, Nilsson *et al.*, 1998). Von diesen Faktoren hat sich das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) und dessen genetische Grundlage, das *ica*A₁BC-Operon, als entscheidende Komponente für Zellaggregation und Biofilmbildung erwiesen (Heilmann *et al.*, 1996b, Mack *et al.*, 1996b). Das *ica*-Gencluster ist auch in *S. aureus* und einigen anderen Staphylokokkenspezies nachweisbar, wobei eine hohe Identität und Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der entsprechenden Enzyme besteht (Cramton *et al.*, 1999, Allignet *et al.*, 2001). Die Identität der Nukleotidsequenz zwischen *S. aureus* und *S. epidermidis* liegt dagegen nur bei 68 bis 70 % und nicht alle *ica*-positiven Staphylokokkenstämme bilden auch notwendigerweise Biofilme aus. So zeigte sich, daß nur wenige der bisher untersuchten *S. aureus* Stämme Biofilm-positiv waren, obwohl alle Isolate die vollständige genetische Information zur Biofilmbildung besaßen (Cramton *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das *ica*-Operon und die damit zusammenhängende Biofilmbildung einen für *S. epidermidis* und *S. aureus* entscheidenden Pathogenitätsfaktor darstellen. Gleichzeitig wurde die Frage nach der molekularen Ursache der unterschiedlichen Expression des *ica*-Operons gestellt. Zunächst wurden in einer vergleichenden epidemiologischen Studie saprophytäre und klinische Isolate von *S. epidermidis* und *S. aureus* hinsichtlich Biofilmbildung und auf das Vorhandensein des *ica*-Operons hin untersucht. Anschließend wurde eine weitere vergleichende Untersuchung dieser Isolate durchgeführt, um

festzustellen, ob das Vorkommen von bestimmten mobilen genetischen Elementen wie IS256 und IS257 sowie das Auftreten von Antibiotikaresistenzen in Zusammenhang mit der Biofilmbildung stehen. Ein Übersichtsschema ist in Abb. 44 (A) dargestellt.

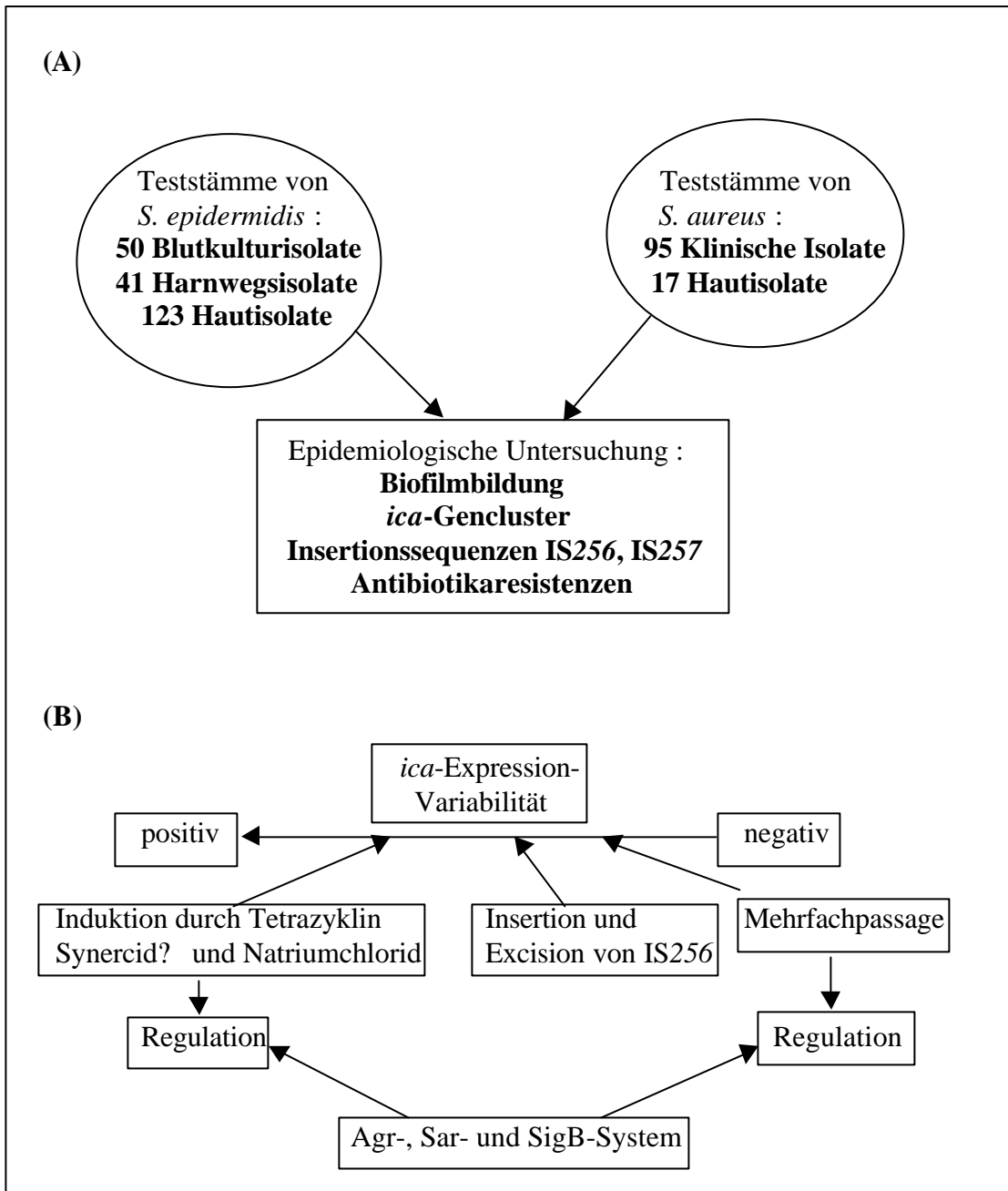


Abb. 44. Übersichtsschema.

(A) Epidemiologische Untersuchung zwischen saprophytäre und klinische Isolate Von *S. epidermidis* und *S. aureus*. (B) Einfluß verschiedener Faktoren auf die Variabilität in der Biofilmbildung von *S. epidermidis* und *S. aureus*.

Der zweite Teil dieser Arbeit befaßte sich mit der Charakterisierung der Variabilität der Biofilmbildung in *S. epidermidis* und *S. aureus*. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Rolle von

IS256 als Ursache der Phasenvariation der Biofilmbildung in einem *S. epidermidis*-Patientenisolat. Weiterhin wurde der Einfluß verschiedener globaler Regulatoren der Genexpression (*agr*-, *sar*- und *sigB*) auf die Biofilmbildung in *S. aureus* untersucht. (Abb. 44 (B)).

6.1. Epidemiologische Untersuchungen

6.1.1. Das *ica*-Operon und Biofilmbildung kommen häufiger bei klinischen Staphylokokkenstämmen vor als bei saprophytären Isolaten

In dieser Arbeit wurden die Biofilmbildung und das Vorkommen des *ica*-Operons bei klinischen Isolaten aus verschiedenen Quellen und Hautisolaten von gesunden Menschen in *S. epidermidis* und *S. aureus* verglichen. Die Ergebnisse zeigten bei *S. epidermidis* einen Unterschied zwischen klinischen Isolaten und Hautisolaten. Zunächst fiel auf, daß 40 % aller Blutkulturisolate und 27 % der Harnwegsisolats aber nur 7 % der Hautisolate Biofilme im quantitativen Biofilmtest bildeten. Dabei war das *ica*-Gencluster in 56 % der Blutkulturisolate und 44 % der Harnwegsisolats sowie 19 % der Hautisolate vorhanden. Die Unterschiede in der Biofilmbildung und im Vorkommen des *ica*-Operons zwischen den klinischen- und saprophytären Isolaten waren signifikant ($p < 0,0001$), wobei die Biofilmbildung bei 95 % der Blutkulturisolate, 82 % der Harnwegsisolats und 78 % der Hautisolate auf die Expression des *ica*-Operons zurückzuführen war (s. Tabelle 6). Die Ergebnisse zeigen, daß die Spezies *S. epidermidis* hinsichtlich des *ica*-Operons in zwei genetisch unterschiedliche Subgruppen zerfällt. *ica*- und Biofilm-positive *S. epidermidis*-Stämme finden sich dabei signifikant häufig bei Isolaten aus Fremdkörper-assoziierten Infektionen, während sich saprophytäre Isolate eher aus der *ica*- und Biofilm-negativen Subpopulation rekrutieren. Damit liegt es nahe, daß das *ica*-Operon für Infektionen mit Fremdkörperimplantaten durch *S. epidermidis* ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist. Die Daten aus dieser Untersuchung untermauern anhand einer großen Anzahl von Stämmen die Ergebnisse einer früheren Studie aus unserer Arbeitsgruppe. Damals wurde erstmalig gezeigt, daß das *ica*-Operon nicht in allen *S. epidermidis*-Isolaten gleichermaßen vorkommt und es sich möglicherweise um einen wichtigen Virulenzfaktor handelt (Ziebuhr *et al.*, 1997). Diese Hypothese wurde in den letzten zwei Jahren auch von anderen Arbeitsgruppen weltweit aufgegriffen (Frebourg *et al* 2000, Arciola *et al* 2001). Obwohl der prozentuale Anteil *ica*-positiven Isolate innerhalb der *S. epidermidis*-Populationen in den verschiedenen

Untersuchungen schwankt, bestätigen alle Studien die Tendenz, daß das *ica*-Operon bei klinischen Isolaten signifikant häufiger vorkommt, als bei saprophytären Stämmen. Interessanterweise zeigt die vorliegende Untersuchung aber auch, daß es neben dem *ica*-Operon noch andere Faktoren geben muß, die Biofilmbildung oder zumindest eine verstärkte Adhärenz an Plastikoberflächen ermöglichen, da nicht alle Biofilm-positiven Isolate auch das *ica*-Operon enthielten. Gegenwärtig bleibt völlig offen, ob die *ica*-negativen *S. epidermidis*-Stämme keinerlei genetische Information zur Synthese eines Biofilms enthalten, oder ob es vielleicht doch *icaA*-, *icaD*-, *icaB*- und *icaC*-homologe Gene gibt, die aufgrund ihrer stark abweichenden Nukleotidsequenz durch Southernblot und PCR in diesen Stämmen nicht nachweisbar sind. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß sich die Nukleotidsequenz des *icaADBC*-Operons in *S. aureus* mit Ausnahme eines konservierten Bereiches im *icaA*-Gen, so stark von der *S. epidermidis*-Sequenz unterscheidet, daß eine Detektion mit *S. epidermidis-icaADBC*-Sonden oder Primern nicht möglich ist. Trotzdem sind die *ica*-spezifischen Gene vollständig in bisher allen untersuchten *S. aureus*-Isolaten vorhanden, wobei aber die wenigsten Stämme auch Biofilme exprimieren. Es ist daher denkbar, daß auch die *ica*-negative *S. epidermidis*-Subpopulation solche bisher nicht näher charakterisierten Gene enthält. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß es sich bei dem *ica*-Operon um genetische Information handelt, die auf einem mobilen genetischen Element wie z. B. einem Phagen oder einer Pathogenitätsinsel lokalisiert ist und so von unterschiedlichen *S. epidermidis*-Stämme erworben werden kann. Wenn dies zutreffen sollte, bleibt aber weiterhin offen, woher diese genetische Information stammt und warum alle *S. aureus*-Stämme die *ica*-Nukleotidsequenz enthalten, diese aber nur selten nutzen.

6.1.2. Die Biofilmbildung durch das *ica*-Operon wird von Umweltfaktoren beeinflusst

Die epidemiologische Studie zur Biofilmbildung hat deutlich gezeigt, daß nicht alle *ica*-positiven Staphylokokkenstämme unter Laborbedingungen Biofilme exprimieren. Staphylokokken sind äußerst anpassungsfähige Mikroorganismen, die sehr schnell ihre phänotypischen Eigenschaften als Antwort auf Umwelteinflüsse verändern können. So konnte bereits früher gezeigt werden, daß die Zellwandstruktur und die Virulenz unterschiedlicher in Abhängigkeit von Umweltbedingungen variieren (van Lanevelde *et al.*, 1999). Einer dieser Umweltfaktoren sind subinhibitorischen Konzentrationen von Antibiotika, die auffallende Unterschiede in Genexpressionsmustern verursachen. In einer Studie wurde beschrieben, daß subinhibitorische Konzentrationen von Clindamycin in *S. aureus* für die Hemmung der Exoproteingene *spa* (Protein A), *hla* (alpha-haemolysin) und *spr* (Serin-Protease) und für die Aktivierung der

Koagulase und des Fibronectin-bindenden Protein B verantwortlich sind (Herbert *et al.*, 2001). Auch wurde eine Hemmung der Adhärenz bei *S. epidermidis* auf Plastikoberflächen durch subinhibitorische Konzentrationen von Vancomycin gefunden (Rupp *et al.*, 1998). Unsere Arbeitsgruppe konnte durch eine *ica::lacZ*-Reporterfusion kürzlich zeigen, daß die Expression des *ica*-Operons durch subinhibitorische Konzentrationen von Tetrazyklin und Synercid? sowie durch erhöhte Osmolarität im Wachstumsmedium stimuliert werden kann (Rachid *et al.*, 2000a). In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb diese Antibiotika und Natriumchlorid für Induktionstests verwendet, um die Induktion der Biofilmbildung in *ica*-positiven, aber Biofilm-negativen *S. epidermidis* und *S. aureus*-Stämmen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, daß subinhibitorische Konzentrationen von Tetrazyklin und Synercid? oder hyperosmolare Bedingungen bei *S. epidermidis* die Expression des *ica*-Operons in unterschiedlichen Maße bei klinischen- und Hautisolaten induzierten. Während alle nicht-exprimierten *ica*-Gene der Blutisolate und etwa 88 % der Harnwegsisolate durch Antibiotika oder Osmostress induziert wurden, wurden nur 53 % der Hautisolate beeinflußt. In *S. aureus* wurde die Biofilmexpression durch diese Umweltbedingungen deutlich seltener stimuliert. Hier wurden nur 30 % der Stämme zur Biofilmbildung angeregt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Ursachen für den Biofilm-negativen Phänotyp *ica*-positiver Stämme bei *S. aureus* und *S. epidermidis* unterschiedlich sind und sich beide Spezies möglicherweise auch in der Regulation der Biofilmbildung unterscheiden. Die Induktion der nicht-exprimierten *ica*-Gene bei *S. aureus* bedarf daher noch weiterer Untersuchungen.

Man kann aus diesen Ergebnissen schließen, daß äußere Bedingungen die Expression des *ica*-Operons bei *S. epidermidis* und *S. aureus* *in vitro* und sehr wahrscheinlich auch *in vivo* stark beeinflussen. Offensichtlich begünstigen dabei besonders Faktoren, die Stress für die Zelle bedeuten, die Biofilmbildung positiv. Da die einzelnen Partner der Regulationskaskade für die Biofilmbildung noch weitestgehend unbekannt sind, ist hier noch weitere umfangreiche Forschungsarbeit notwendig. Der molekulare Mechanismus der regulatorischen Wirkung der Antibiotika auf die Adhäsion-Expression ist ebenfalls noch unklar, aber folgende potentielle Mechanismen sind denkbar : (i) Änderungen im DNA-Supercoiling, das die Expression von vielen Genen beeinflußt, (ii) Induktion einer komplexen Expression von Genen, wie bei der SOS-Antwort, oder (iii) Induktion oder Repression regulatorischer Gene wie z. B. *agr*, *sar*, oder *sigB*. Ein interessanter Forschungsansatz zur Klärung dieser Fragen wird in naher Zukunft die Anwendung von DNA-Genom-Arrays bringen. Diese *S. epidermidis* bzw. *S. aureus*-Chips enthalten die gesamte genetische Information eines Erregers auf einem Glaträger. Mit Hilfe

dieser neuen Werkzeuge ist es möglich, Genexpressionsstudien durchzuführen und sich somit einen Überblick über die Aktivität aller Gene unter einer bestimmten Wachstumsbedingung zu verschaffen. Unter Einbeziehung entsprechender Mutanten in Regulatorgenen ist es dann möglich beispielsweise die Regulationskaskaden für die Biofilmbildung aufzuklären.

6.1.3. IS256 als Marker für pathogene Staphylokokkenstämme

Insertionssequenzen sind ein charakteristischer Bestandteil nahezu aller bakteriellen Genome. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Antibiotikaresistenzen, bei der chromosomalen Integration von Plasmiden und Rearrangements von Genomabschnitten. Desweiteren wurden auch Korrelationen zwischen IS-Elementen und Virulenzfaktoren beschrieben (Collins *et al.*, 1992, Fetherston *et al.*, 1994, Garcia *et al.*, 1994, Brynstad *et al.*, 1997, Hacker *et al.*, 1997). IS-Elemente können auch als ein Marker in RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)-Studien für die Biotyp-Analyse benutzt werden, wenn die Lokalisation eines IS-Elements auf einem bestimmten Bereich der chromosomalen DNA genügend stabil ist. Das ist zum Beispiel bei IS6100 in *Mycobacterium tuberculosis* (Small *et al.*, 1994), IS1296 in *Mycoplasma mycoides* (Cheng *et al.*, 1995), IS200 in *Salmonella* (Stanley *et al.*, 1993) und IS1004 in *Vibrio cholerae* (Bik *et al.*, 1996) der Fall.

Zum derzeitigen Zeitpunkt wurden 50 IS-Elemente aus 159 bakteriellen Spezies identifiziert und in 19 Familien eingeteilt (Mahillon *et al.*, 1998). In Staphylokokken sind bisher 12 IS-Elemente aus 4 Familien (IS6, IS256, ISL3 und NCY) bekannt. In dieser Arbeit wurde sich auf den Nachweis zweier Elemente (IS256 und IS257) konzentriert. IS256 ist ursprünglich als Bestandteil des zusammengesetzten Transposons Tn4001 aus dem Multiresistenzplasmid pSK1 beschrieben worden (Lyon *et al.*, 1987). Es hat 24 bis 41 bp-lange IR (Inverted-repeats) und produziert während der Insertion in die Target-DNA 8-bp-DRs (Direct-repeats). Das Resistenzgen, *aacA-aphD* aus Tn4001, welches für das bifunktionale AAC-APH-Enzym kodiert, das für die Resistenz gegen die Aminoglycoside Gentamicin, Tobramicin und Kanamicin verantwortlich ist, wird von zwei IS256-Elementen (IS256L und IS256R) flankiert (Byrne *et al.*, 1989). Unabhängig von Tn4001 kommt IS256 aber auch in freien Kopien im Genom von Staphylokokken und Enterokokken vor (Rice *et al.*, 1994, Ziebuhr *et al.*, 1999). IS257 gehört zur IS6-Familie und wurde als Teil des Transposons Tn4003 in pSK1 beschrieben. Das *dfpA*-Gen, das die S1 Dihydrofolate-Reduktase (DHFR) für die Trimethoprim-Resistenz kodiert, ist durch drei IS257-Elemente (IS257L, IS257R1 und IS257R2) flankiert (Rouch *et al.*, 1989). IS257 hat

unvollkommene IRs, die 27-28 bp lang sind und produziert 8-bp-Targetsequenzduplikationen in der Zielsequenz. Auch dieses Element kommt in freien Kopien im Staphylokokkengenom vor.

In dieser Arbeit wurde das Vorkommen von IS256 und IS257 in klinischen- und saprophytären Isolaten bei *S. epidermidis* und *S. aureus* untersucht. Wie im Ergebnisteil gezeigt wurde, ist die Verteilung beider IS-Elemente sehr unterschiedlich. IS256 war in klinischen Isolaten bei *S. epidermidis* und *S. aureus* signifikant häufiger vorgekommen als in den saprophytären Isolaten. Man nimmt an, daß einige Pathogenitätsfunktionen in klinischen Isolaten im Zusammenhang mit IS256 stehen. Dazu gehört offensichtlich auch die Biofilmbildung, da gezeigt werden konnte, daß das Element einen Hot-spot für Integrationen im *ica*-Operon besitzt und an der Phasenvariation der Biofilmbildung beteiligt ist (Ziebuhr *et al.*, 1999). Dagegen gab es keinen Unterschied im Vorkommen von IS257 zwischen klinischen Isolaten und saprophytären Isolaten. Deshalb geht man davon aus, daß IS257 eher eine untergeordnete Rolle für die Pathogenität in Staphylokokken spielt. IS256 dagegen könnte als Marker für die Identifizierung von pathogenen *S. epidermidis* und *S. aureus*-Isolaten dienen.

Vergleicht man insgesamt das Vorkommen der IS-Elemente IS256 und IS257 zwischen *S. epidermidis* und *S. aureus*, so wurde festgestellt, daß beide Elemente häufiger in *S. epidermidis* nachgewiesen werden konnten als in *S. aureus*. Da IS-Elemente eine wichtige Funktion für die Flexibilität des Bakteriengenoms haben, könnte dies frühere Befunde aus unserer Arbeitsgruppe erklären, die für *S. epidermidis* eine hohe Genomplastizität postulierten (Ziebuhr *et al.*, 2000a).

6.1.4. Antibiotikaresistenzen kommen häufiger bei klinischen Staphylokokken vor

Der vermehrte Einsatz von Antibiotika in den letzten Jahrzehnten führte auch zu einer Zunahme von resistenten Keimen (Cohen, M. L., 1994, Hancock, R. E. W., 1997). In dieser Arbeit wurden die klinischen und die saprophytären Isolate hinsichtlich ihrer Antibiotikaresistenz getestet. Für die Empfindlichkeitsprüfung ist die Boullonverdünnungsmethode, die im Röhrchen durchgeführt wird, normalerweise das Standardverfahren, an dem allen anderen Methoden gemessen werden. Trotzdem wurde die Agardiffusionsmethode als eine schnelle und einfache Methode in dieser Arbeit durchgeführt.

Die meisten Staphylokokken-Stämme waren penicillinresistent. Daraus kann man schließen, daß β -Lactamase-produzierende Stämme nicht nur bei klinischen Isolaten, sondern auch bei

Hautisolaten weit verbreitet sind. Die Hautisolate von *S. epidermidis* und *S. aureus* waren meist nur gegen ein Antibiotikum resistent oder noch voll empfindlich, während bei klinischen Isolaten von *S. epidermidis* und *S. aureus* neben der Penicillinresistenz oft noch weitere Resistenzen gegen andere Antibiotika auftraten. Darüberhinaus waren alle oxacillinresistenten Stämme auch resistent gegen Penicillin G. Wenn das *mecA*-Gen, das für ein modifiziertes penicillinbindendes Protein (PBP2a) kodiert, in einem Stamm aktiv ist, so ist dieser Stamm resistent gegen Oxacillin und Penicillin G. Obwohl vancomycinresistente Stämme von *S. haemolyticus* isoliert wurden (Schwalbe *et al.*, 1990), wurden keine vancomycinresistente *S. epidermidis*- und *S. aureus*-Stämme in dieser Arbeit gefunden.

6.1.5. Assoziation der Gentamicinresistenz mit IS256

Im Transposon Tn4001 ist das Gen *aac(6')-aph(2'')*, das für die Gentamicin-Resistenz kodiert, von zwei IS256-Elementen flankiert (Byrne *et al.*, 1989). Auch in dieser Arbeit konnte die Korrelation zwischen der Gentamicin-Resistenz und IS256 gezeigt werden. So waren in 85 % der gentamicinresistenten *S. aureus*-Stämme und in 100 % der gentamicinresistenten *S. epidermidis*-Stämme IS256-Kopien gefunden worden. Deshalb kann man davon ausgehen, daß Weitergabe und Verbreitung der Gentamicin-Resistenz überwiegend auf das Transposon Tn4001 und damit indirekt auf IS256 als flankierendes Element dieses Transposons zurückzuführen ist.

Weiter ist bekannt, daß das Gen *dfr*, das für die Trimethoprim-Resistenz in Tn4003 kodiert, von IS257 flankiert wird (Rouch *et al.*, 1989). Jedoch besaßen die in dieser Arbeit getesteten trimethoprimresistenten Stämme nur zu einem geringen Prozentsatz auch das IS257. Die Resistenz gegen Trimethoprim wird in den untersuchten Stämmen daher sehr wahrscheinlich durch andere Komponenten als Tn4003 verursacht.

6.1.6. Assoziation zwischen Antibiotikaresistenz und Biofilmbildung

In vielen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, daß adhärenente Bakterien gegen eine Vielzahl von Antibiotika verstärkt resistent sind. (Evans *et al.*, 1987, Gristina *et al.*, 1989). Der Resistenzmechanismus könnte dabei auf dem Unvermögen des Antibiotikums basieren, den Biofilm zu durchdringen (Faber *et al.*, 1990). Diese Hypothese wurde jedoch durch den Befund widerlegt, daß das Durchdringen der bakteriellen Oberfläche durch Antibiotika nur minimal durch Biofilme verzögert wird (Steckelberg *et al.*, 1989, Dunne *et al.*, 1993). Ein andere These

geht davon aus, daß die erhöhte Antibiotikaresistenz nicht auf den physikalischen Einfluß der Biofilm-Matrix, sondern auf den physiologischen Status der individuellen Zellen zurückzuführen ist (Williams *et al.*, 1997). Man geht davon aus, daß Membranen von langsamwachsenden Bakterien weniger durchlässig für Antibiotika sind als die von sich teilenden Zellen (Anwar *et al.*, 1992).

In dieser Arbeit wurde eindeutig ein Zusammenhang zwischen Biofilmbildung und Antibiotikaresistenz in Staphylokokken gezeigt. Durch Antibiotikaresistenztests konnte nachgewiesen werden, daß ungefähr die Hälfte der Haut- und Harnwegs isolate und 85 % der Blutkultur isolate multiresistente Stämme waren, von denen wiederum der überwiegende Teil Biofilm positiv war. Es ist wahrscheinlich, daß eine Ursache für dies hohe Resistenzrate in der Ausbildung von Biofilmen zu suchen ist. Andererseits wiesen diese Stämme auch Resistenzdeterminanten wie *mecA* oder *Tn4001* auf, so daß auch genetische Ursachen für die Resistenzprägung eine Rolle spielen.

6.2. Variationen der Biofilmbildung in Staphylokokken

Genetische und phänotypische Variation von Virulenzeigenschaften sind wichtige Mechanismen, die von pathogenen Bakterien für die Anpassung an verschiedene Umwelteinflüsse und für die Umgehung des Immunsystems des Wirtes genutzt werden (Robertson *et al.*, 1992). Die phänotypische Variation, insbesondere von oberflächenassoziierten Antigenen, dient dabei sowohl der Adaptation an veränderte Wachstumsbedingungen als auch der Auseinandersetzung mit der Wirtsabwehr. Die molekularen Mechanismen sind bisher u. a. an gramnegativen Bakterien ausführlich untersucht worden. Auch bei grampositiven Bakterien konnte gezeigt werden, daß klinische Staphylokokken-Stämme fähig sind, ihre phänotypischen Eigenschaften schnell zu verändern. Beispiele hierfür sind SCVs (Small Colony Variants) (Balwit *et al.*, 1994, Proctor *et al.*, 1994, Proctor *et al.*, 1995, Vesga *et al.*, 1996) und die Variationen von Virulenzfaktoren, wie die Koagulase (Goh *et al.*, 1992, Schwarzkopf *et al.*, 1994), das Protein A (Uhlen *et al.*, 1984), TSST1 (Kreiswirth *et al.*, 1989) und ClfA (McDevitt *et al.*, 1995). Darüberhinaus sind die heterogene Expression der Biofilmbildung in verschiedenen Staphylokokken-Stämmen beobachtet worden (Baddour *et al.*, 1987, Baddour *et al.*, 1990, Deighton *et al.*, 1992b, Baselga *et al.*, 1993, Ziebuhr *et al.*, 1997, 1999, 2000b). In dieser Arbeit

sind Variationen in der Biofilmbildung in *S. epidermidis* 569 und *S. aureus* 483 untersucht worden. Beim Stamm *S. epidermidis* 569 wurde das An- und Ausschalten der Biofilmbildung durch Integration und Exzision des IS256-Elementes gezeigt. Beim Stamm *S. aureus* 483 wurde die mögliche Regulation der Biofilmbildung durch die Gene *agr*, *sar* und *sigB* untersucht.

6.2.1. Das natürlich vorkommende IS256-Element ist *in vivo* am An- und Ausschalten des *ica*-Operons in *S. epidermidis* beteiligt

Obwohl viele biofilmbildungsnegative Varianten von *S. epidermidis*, die ursprünglich von biofilmbildungsfähigen Wildtypstämmen abstammen, beschrieben worden sind, sind die Mechanismen, die zum Verlust der Biofilmbildung führen, noch weitgehend unbekannt. Ziebuhr *et al* (1997) zeigten, daß die Expression des *ica*-Operons in biofilmbildenden Stämmen einer Phasenvariation unterliegt. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß diese Phasenvariation durch Insertion und Exzision des Insertionssequenz-Elements IS256 in verschiedenen Bereichen des *ica*-Operons verursacht werden kann (Ziebuhr *et al.*, 1999). Bisher wurde dieser Mechanismus nur in *in vitro* Studien auf Kongorot-Agar beobachtet und es wurde postuliert, daß diese Art der Phasenvariation auch während einer Infektion eine Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit wurden die *ica*-Operons biofilmbildungsnegativer *S. epidermidis*-Patientenisolate durch PCR-Analysen untersucht. Der Stamm *S. epidermidis* 569, ein Harnwegsisolat, wies ein um 1,3 kb größeres *icaC*-PCR-Fragment auf als der Wildtypstamm. Durch Sequenzanalyse konnte nachgewiesen werden, daß der Shift der DNA-Größe durch die Insertion eines IS256-Elementes bedingt war. Auch Ziebuhr *et al* (1999) konnten zeigen, daß das IS256 häufig das *icaC*-Gen als Target zur Integration nutzt. Dabei traten regelmäßig Duplikationen der Zielsequenz von 8 Basenpaaren auf, was allen bisher in der Literatur beschriebenen Sequenzverdopplungen entspricht. Interessanterweise wurde in dieser Untersuchung an der Insertionsstelle des IS256 eine Duplikation von 7 Basenpaaren gefunden (Abb. 17). Damit ist erstmalig eine Abweichung in der Targetsite-Duplikation für IS256 gezeigt worden. Um zu prüfen, ob die Biofilmbildung in der *icaC::IS256* Insertionsmutante *S. epidermidis* 569 wiederherstellbar ist, wurde der Stamm mehrfach passagiert. Aus diesem Experiment gingen mehrere Revertanten hervor, die in der Lage waren, Biofilme zu bilden. Die PCR-Analyse und Sequenzierung zeigten, daß IS256 in den Revertanten präzise aus dem *icaC*-Gen exzidiert worden war. Das bedeutet, daß die Expression des *ica*-Operons von *S. epidermidis* 569 durch Integration des IS256 blockiert war. Die Ergebnisse mit den Revertantenstämmen von *S. epidermidis* 569, die *in vitro* in hohem Maße Biofilme bildeten, deuten darauf hin, daß die *icaC::IS256*-Insertionsmutanten möglicherweise auch

in vivo revertieren können und dann den gleichen biofilmbildenden Phänotyp aufweisen. Es ist denkbar, daß dieser Mechanismus eine bisher noch unbekannt biologische Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Struktur von Biofilmen und damit für das Infektionsgeschehen hat.

Weiterhin zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß IS256 in klinischen *S. epidermidis* Stämmen sehr aktiv ist. Bisher war das Element als relativ stabiler Teil des Genoms beschrieben worden und folglich als Marker für die Molekulartypisierung von Stämmen empfohlen worden (Deplano *et al.*, 1997, Morvan *et al.*, 1997). Die vergleichenden Studien in dieser Arbeit zeigen, daß IS256 ein aktives mobiles Element in *S. epidermidis* ist, das die Expression des *ica*-Operons, eines wichtigen Virulenzfaktors, variieren kann (Kap. 5.1.4.1). Es ist anzunehmen, daß IS256 möglicherweise eine entscheidende Rolle für die Mikroevolution pathogener Staphylokokken spielt. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, daß das Element in Enterokokken an der Bildung und Integration großer, zusammengesetzter Transposons beteiligt ist und hier auch zur Mobilisierung von chromosomalen DNA-Abschnitten beiträgt (Rice *et al.*, 1995, Bonafede *et al.*, 1997, Rice *et al.*, 1998). Erste vorläufige Daten aus unserer Arbeitsgruppe geben Hinweise darauf, daß dies auch in Staphylokokken der Fall ist (Loessner und Ziebuhr, unveröffentlichte Beobachtungen).

6.2.2. Phasenvariation der Biofilmbildung in *S. aureus*

6.2.2.1. Die Biofilmbildung in *S. aureus* unterliegt einer starken Phasenvariation

In dieser Arbeit wurde beschrieben, daß alle getesteten *S. aureus*-Stämme unter Laborbedingungen keinen Biofilm produzieren, obwohl sie das *ica*-Operon besitzen. Die Biofilmbildung konnte bei 30 % der getesteten *S. aureus*-Stämme durch subinhibitorische Konzentrationen von Tetrazyklin und Synercid[®] oder durch osmolare Bedingungen mit NaCl induziert werden. Dies bedeutet, daß die Biofilmbildung in *S. aureus* einer Variation durch Umweltfaktoren unterliegt. Über die Variabilität der Biofilmbildung in *S. aureus* wurde von Watson (1989) berichtet, daß mehr als 80% der getesteten *S. aureus*-Stämme nach dem Wachstum *in vivo* Exopolysaccharid produzierten, aber der Anteil unter Laborbedingungen auf weniger als 10% reduziert wurde.

Nach Mehrfachpassage und durch die CRA-Methode, die normalerweise für die Detektion von biofilmbildenden Varianten in koagulasenegativen Staphylokokken benutzt wird, wurden biofilmbildende Varianten der *S. aureus*-Stämme isoliert. Von den fünf getesteten Stämmen zeigten vier Stämme hinsichtlich der Biofilmproduktion eine Variabilität. Hierbei bildeten die *S.*

aureus-Stämme schneller Biofilm an den Wänden eines Kultivierungsröhrchens als der Stamm *S. epidermidis* 569. Während es bis zur Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 569 14 Tage dauerte, brauchten die *S. aureus*-Stämme nur 5 Tage. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, daß die Biofilmbildung in *S. aureus* einer häufigen Phasenvariation unterliegt. Dadurch eröffnet sich wahrscheinlich für *S. aureus* die Möglichkeit, sich schneller auf wechselnde Umweltbedingungen anzupassen.

Der Stamm *S. aureus* 483, der in dieser Arbeit ausführlich getestet wurde, bildete zwei morphologische Koloniephänotypen auf BHI-Agarplatten aus. Die PFGE-Analyse ergab, daß diese phänotypischen Unterschiede auch mit Genom-Rearrangements einhergingen. In dieser Arbeit wurden die beiden Wildtypvarianten und die stark biofilmbildenden Varianten von *S. aureus* 483 phänotypisch und genetisch ausführlich untersucht.

Die Biofilmbildung der erzeugten varianten Stämme war sehr stabil. Weiterhin wurden die zwei Wildtypvarianten und verschiedene Varianten von *S. aureus* 483 getestet, ob sie die Fähigkeit besitzen, PIA zu produzieren, das von dem *ica*-Operon exprimiert wird. Wie im Immunoblot in Abb.27 (Kap. 5.4.6) gezeigt, produzierten nur die Biofilm-positiven Varianten PIA. Daraus ergibt sich, daß die Biofilmbildung bei den Varianten von *S. aureus* 483 durch das *ica*-Operon vermittelt wird. Daher ist davon auszugehen, daß das *ica*-Operon in *S. aureus* genau wie in *S. epidermidis* an der Biofilmbildung beteiligt ist und einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt. Gegenwärtig ist die biologische Funktion der variablen Expression des *ica*-Operons nicht bekannt. Es ist jedoch vorstellbar, daß sich dadurch *S. aureus* der gezielten Immunantwort des Wirtsorganismus entziehen kann.

Um den *ica*-Lokus näher zu untersuchen, wurden die Biofilm-negativen Wildtypvarianten sowie die Biofilm-positiven Varianten in Southern-Blots mit den *ica*-Genen hybridisiert. Es zeigte sich, daß kein Unterschied in der Gengröße feststellbar war. Daraus kann man schließen, daß keine IS-Elemente in das *ica*-Operon integriert sind, die den Biofilm-negativen Phänotyp der Wildtypvarianten erklären könnten. Es ist jedoch möglich, daß Punktmutationen oder kleinere Deletionen im *ica*-Operon vorliegen, so daß das *ica*-Operon nicht exprimiert wird. Weitere Ursachen könnten auch Mutationen in bisher unbekannt Genen sein, die an der Rregulation der Biofilmbildung beteiligt sind.

6.2.2.2. Der Einfluß von SigB auf die Biofilmbildung in *S. aureus* 483

Eine koordinierte Expression von Virulenzfaktoren ist eine wichtige Voraussetzung für die für die Etablierung einer Infektion. Die Expression von Virulenzgenen wird dabei durch komplexe

regulatorische Netzwerke gewährleistet (Projan *et al.*, 1997). Einige Regulatorgene wie das *agr*-, *sar*- und *sigB*-System sind für die Regulation von Virulenzfaktoren bei Staphylokokken bekannt. Um die Ursache für die schnelle Phasenvariation der Biofilmbildung in *S. aureus* 483 zu finden, wurden diese Regulatorgene untersucht. Die Analyse von Southern- und Northern- Blots ergab, daß das *agr*-System keinen regulatorischen Einfluß auf die Biofilmbildung in *S. aureus* 483 hat. Dagegen wurden auf dem Southern Blot mit der *sigB*-Sonde vier DNA-Größenshifts beobachtet. Die Northern Blot-Analyse mit der *asp23*-Sonde zeigte, daß dieses Gen nur bei der gelben Wildtypvariante von *S. aureus* 483 transkribiert wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, daß das SigB die Biofilmbildung bei *S. aureus* 483 wahrscheinlich reprimiert.

Um zu testen, ob das SigB eine Rolle für die Biofilmbildung in *S. aureus* 483 spielt, wurde in dieser Arbeit versucht, das *sigB*-Gen in einem SigB-negativen varianten Stamm (*S. aureus* 483-1(w)) zu komplementieren. Allerdings war das Experiment nicht erfolgreich. Obwohl nach dem Transformationsversuch biofilmbildungsfähige Stämme erhalten wurden, konnte aus diesen Stämmen keine Plasmid-DNA isoliert werden. Durch PFGE-Analyse und einen Biofilmtest wurde gezeigt, daß es sich dabei um revertante Stämme handelt, die durch einen unbekanntem Mechanismus der Phasenvariation ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung verloren hatten.

Obwohl die revertanten Stämme Biofilm-negativ sind, konnte keine Expression von SigB mittels Northern-Blot nachgewiesen werden (Tabelle 15). Das bedeutet, daß SigB für die Biofilmbildung in *S. aureus* 483 offenbar keine Rolle spielt und möglicherweise selbst einer sehr variablen Genexpression unterliegt.

Tabelle 15. Vergleich zwischen SigB-Expression und Biofilmbildung in *S. aureus* 483 Wildtypstämmen, Varianten und Revertanten.

	<i>S. aureus</i> 483(g)	<i>S. aureus</i> 483(w)	Varianten	Revertanten
SigB-Expression	+	-	-	-
Biofilmbildung	-	-	+	-

Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe (Rachid *et al* (2000b). Dort wurde mit Hilfe einer SigB-Deletionsmutante gezeigt, daß die *ica*-Transkription in Stamm *S. aureus* MA12 von der Expression des SigB abhängt.

Weiterhin wurde in einer anderen Untersuchung, in der verschiedene *S. aureus*-Stämme hinsichtlich ihrer Biofilmbildung und der SigB-Expression miteinander verglichen wurden, gezeigt, daß nur bei einem geringen Anteil der Stämme ein Zusammenhang zwischen SigB und der Biofilmbildung nachgewiesen werden kann (unveröffentlichte Untersuchung).

Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, daß in *S. aureus* 483 neben SigB noch weitere Faktoren für die Regulation der Biofilmbildung verantwortlich sind. Darüber hinaus ist es vorstellbar, daß innerhalb der verschiedenen *S. aureus* Stämme unterschiedliche Regulationsmechanismen vorliegen, wie es im Vergleich zwischen *S. epidermidis* und *S. aureus* ebenfalls postuliert wird (Knobloch *et al.*, 2001).

In einigen Studien wurde über die regulatorische Aktivität von SigB berichtet. Je nach Art des Virulenzgens kann SigB sowohl als positiver als auch als negativer Regulator agieren. In Tabelle 16 ist der Einfluß von SigB auf verschiedene Virulenzgene dargestellt.

Tabelle 16. Einfluß von SigB auf die Expression von verschiedenen Virulenzgenen.

Positive Regulation	Negative Regulation
Clumping factor (<i>S. aureus</i> WCUH29)	Clumping factor (<i>S. aureus</i> RN6390)
Coagulase (<i>S. aureus</i> WCUH29)	Coagulase (<i>S. aureus</i> RN6390)
<i>Asp23</i>	Cell Aggregation (nur bei <i>S. aureus</i> Neumann)
Catalase	Lipase
<i>MecA</i>	?-Hämolysin
	Transkription von <i>sarA</i>
	Thermonuklease (nur bei <i>S. aureus</i> Col)

Der Regulationsmechanismus von SigB kann unterschiedlich für ein bestimmtes Gen in verschiedenen Stämmen sein. Zum Beispiel wurde die Funktion des Clumping factors und der Coagulase durch die Aktivität des SigB bei *S. aureus* WCUH29 positiv und bei *S. aureus* RN6390 negativ reguliert (Cheung *et al.*, 1999, Nicholas *et al.*, 1999).

6.2.2.3. Mögliche Mechanismen der SigB-Expression in *S. aureus* 483

Es ist bekannt, daß das *sigB*-System von *S. aureus* aus vier ORFs (*rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und *sigB*) besteht (Wu *et al.*, 1996). Während *RsbW* ein Anti-Sigma-Faktor ist, der SigB negativ reguliert

(Miyazaki *et al.*, 1999), ist RsbV ein Anti-Anti-Sigma-Faktor, der SigB positiv reguliert (Dufour *et al.*, 1994). Es ist bekannt, daß *rsbU* in *B. subtilis* ein positives Regulatorgen für das SigB ist (Wise *et al.*, 1995). Der Stamm *S. aureus* 8325, in dem das *sigB*-System inaktiviert ist, enthält eine 11bp-Deletion im *rsbU*-Gen (Kullik *et al.*, 1998). Einen weiteren Hinweis für die Wirkungsweise von RsbU in *S. aureus* lieferte eine Studie, in der eine *rsbU*-Deletionsmutante, die kein SigB exprimiert, durch Komplementation mit dem *rsbU*-Gen wieder SigB positiv wird (Giachino *et al.*, 2001). Deswegen ist das *rsbU*-Gen als ein positiver Regulator für die SigB-Aktivität betrachtet worden.

Um die möglichen Mechanismen der SigB-Expression in *S. aureus* 483 zu untersuchen, wurde die Sequenz des *sigB*-Systems von dem *sigB*-transkribierenden Stamm *S. aureus* 483(g) und den drei nicht-*sigB*-transkribierenden Stämmen (*S. aureus* 483(w), 483-1(d) und 483-3) miteinander verglichen. In den Sequenzen des *rsbV*-Gens und *sigB*-Gens wurde kein Unterschied zwischen dem *sigB*-transkribierenden *S. aureus* 483(g) und nicht-*sigB*-transkribierenden Stämmen (*S. aureus* 483(w), 483-1(d) und 483-3) gefunden. Jedoch wurden in der *rsbU*-Sequenz in *S. aureus* 483(g) drei Punktmutationen gefunden. Davon lag eine Punktmutation im Stopcodon (s. Tabelle 12, Kap. 5.5.3.1). Da das um 14 Nukleotide verlängerte RsbU-Leseraster in *S. aureus* 483(g) keinen Einfluß auf die SigB-Expression hat und zudem die RsbU-Aminosäuresequenz des SigB-positiven Col-Stamms mit der der SigB-negativen varianten Stämmen übereinstimmt, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen dem mutierten RsbU und der SigB-Expression in *S. aureus* 483 getroffen werden.

In der *rsbW*-Sequenz von *S. aureus* 483(g) wurden dagegen zwei Punktmutationen gefunden, die möglicherweise einen Einfluß auf die SigB-Expression haben könnten. RsbW ist als negativer Regulator der SigB-Expression bekannt (Anti-Sigmafaktor). Daher ist es möglich, daß der Ausfall dieses Inhibitors zu einer konstitutiven SigB-Expression in *S. aureus* 483(g) führt. Die gelbe Koloniefarbe dieses Stammes spricht ebenfalls für eine gesteigerte SigB-Expression, da die Bildung des Karotinoids Staphyloxanthin durch SigB positiv reguliert wird (Giacchino *et al.*, 2001)

Es bleibt festzuhalten, daß sich durch den Sequenzvergleich allein keine eindeutige Aussage über die Funktionsfähigkeit der einzelnen Regulatorproteine treffen läßt. Um die Wirkungsweise der verschiedenen regulatorischen Gene auf SigB genauer zu charakterisieren, sollten weitere Studien Northern- und Western-Blotexperimente sowie gezielte Mutationen zum Inhalt haben. Dennoch legen die vorliegenden Daten nahe, daß das SigB-Gencluster mit seiner Umgebung offensichtlich

häufig Mutationen unterliegt, die möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Generierung unterschiedlicher *S. aureus*-Phänotypen spielen. Die Aufklärung der biologischen Bedeutung dieses Phänomens bildet dabei einen interessanten Forschungsgegenstand für künftige Untersuchungen.

- Allignet, J., S. Aubert, K. G. H. Dyke, and N. El Sohl.** 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**:712-718.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Meyers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Antelmann, H., S. Engelmann, R. Schmid, A. Sorokin, A. Lapidus, and M. Hecker.** 1997. Expression of Stress- and starvation-induced *dps/pexB*-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor σ^B in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**:7251-7256.
- Anwar, H., J. L. Strap, and J. W. Costerton.** 1992. Establishment of aging biofilms : possible mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1347-1351.
- Archer, G. L., and D. M. Niemeyer.** 1994a. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. *Trends Microbiol.* **2**:343-347.
- Archer, G. L., D. M. Niemeyer, J. A. Thanassi, and M. J. Pucci.** 1994b. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:447-454.
- Archer, G. L.** 1997. Polyclonal *Staphylococcus* endocarditis: response. *Clin. Infect. Dis.* **25**:72-73.
- 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**:2151-2156.
- 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**:676-679.
- Balwit, J. M., P. van Langevelde, J. M. Vann, and R. A. Proctor.** 1994. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persists within cultured endothelial cells. *J. Infect. Dis.* **170**:1033-1037.
- Baselga, R., I. De Albizu, M. 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**:4857-4862.
- Bayer, M. G., J. H. Heinrichs, and A. L. Cheung.** 1996. The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**:4563-4570.

- Benner, E. J., and F. H. Kayser.** 1968. Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **11**:741-744.
- Bik, E. M., R. D. Gouw, and F. R. Mooi.** 1996. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1453-1461.
- Blevins, J. S., A. F. Gillaspay, T. M. Rehtin, B. K. Hulburt, and M. S. Smeltzer.** 1999. The staphylococcal accessory regulator (*sar*) represses transcription of the *Staphylococcus aureus* collagen adhesion gene (*cna*) in an *agr*-independent manner. *Mol. Microbiol.* **33**:317-326.
- Bonafede, M., L. L. Carias, and L. B. Rice.** 1997. Enterococcal transposon Tn5384: Evolution of a composite transposon through cointegration of enterococcal and staphylococcal plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1854-1858.
- Brynstad, S., B. Synstad, and P. E. Granum.** 1997. The *Clostridium perfringens* enterotoxin gene is on a transposable element in type A human food poisoning strains. *Microbiology.* **143**:2109-2115.
- 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**:361-367.
- Chakrabarti, S. K., and T. K. Misra.** 2000. SarA represses *agr* operon expression in a purified in vitro *Staphylococcus aureus* transkription system. *J. Bacteriol.* **182**:5893-5897.
- Chambers, H. F.** 1997. Methicillin resistance in staphylococci : molecular and biochemical and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:781-791.
- Chan, P. F., S. J. Foster, E. Ingham, and M. O. Clements.** 1998. The *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor σ^B controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *J. Bacteriol.* **180**:6082-6089.
- Cheng, X., J. Nicolet, F. Poumarat, J. Regalla, F. Thiaucourt, and J. Frey.** 1995. Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a european clonal line distinct from african and australien strains. *Microbiology* **141**:3221-3228.
- Cheung, A. L., M. G. Bayer, and J. H. Heindrichs.** 1997. *sar* genetic determinants necessary for transcription of RNAII and RNAIII in the *agr* locus of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **179**:3963-3971.
- Cheung, A. L., Y. T. Chien, and A. S. Bayer.** 1999. Hyperproduction of alpha-hemolysin in *sigB* mutant is associated with elevated SarA expression in *Staphylococcus aureus*. 1999. *Infect. Immun.* **67**:1331-1337.

- Chien, Y. T., A. L. Cheung.** 1998a. Molecular interactions between two global regulators, *sar* and *agr*, in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **273**:2645-2652.
- Chien, Y. T., A. Manna, and A. L. Cheung.** 1998b. SarA level is a determinant of *agr* activation in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **30**:991-1001.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Binso, and E. H. Beachey.** 1982. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* **37**:318-326.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barret, D. M. Melton, and E. H. Beachey.** 1985. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* **22**:996-1006.
- 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.** 1990a. Colonial morphology of staphylococci on Memphis agar: phase variation of slime production, resistance to β -lactam antibiotics and virulence. *J. Infect. Dis.* **161**:1153-1169.
- Christensen, G. D., L. P. Baker, T. P. Mawhinney, L. M. Baddour, and W. A. Simpson.** 1990b. Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **58**:2906-2911.
- Cohen, M. L.** 1994. Emerging problems in antimicrobial resistance. *Ann. Int. Med.* **24**:454-456.
- Collins, C. M., and D. M. Gutman.** 1992. Insertional inactivation of an *Escherichia coli* urease gene by IS3411. *J. Bacteriol.* **174**:883-888.
- Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, and T. I. Ladd.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**:435-464.
- Cramton, S. H., 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**:5427-5433.
- Cui, L., H. Murakami, K. Kuwahara-Arai, H. Hanaki, and K. Hiramatsu.** 2000. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2276-2285.
- Deighton, M. A., J. Capstick, and R. Borland.** 1992a. A study of phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* using congo red agar. *Epidemiol. Infect.* **109** :423-432.

- 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** :2385-2390.
- Deora, R., T. Tseng, and T. K. Misra.** 1997. Alternative transcription factor σ^{SB} of *Staphylococcus aureus* : characterization and role in transcription of the global regulatory locus *sar*. *J. Bacteriol.* **179** :6355-6359.
- 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**:2580-2587.
- Doebbeling, B. N.** 1995. The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection and colonization. *J. Chemother.* **7 (Suppl. 3)**:99-103.
- Dorman, C. J.** 1991. DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect. Immun.* **59**:745-749.
- Dufour, A., and W. G. Haldenwang.** 1994. Interactions between a *Bacillus subtilis* anti- σ factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J. Bacteriol.* **176**:1813-1820.
- Dunne, W. M., E. O. Mason, and S. L. Kaplan.** 1993. Diffusion of rifampicin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2522-2526.
- Dyke, K., and P. Gregory.** 1997. Resist to beta-lactam antibiotics: resistance mediated by beta-lactamases, p. 139-157. *In* K. .B. Crossley and G. L. Archer (ed.), *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, Inc., New York, N. Y.
- von Eiff, C., C. Heilmann, R. A. Proctor, C. Woltz, G. Peters, and F. Götz.** 1997. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small colony variant which persists intracellularly. *J. Bacteriol.* **179**:4706-4712.
- Emori, T. G., and R. P. Gaines.** 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:428-442.
- Espersen, F., B. J. Wilkinson, B. Gahrn-Hansen, and V. T. Rosdahl.** 1990. Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. *APMIS.* **98**:471-478.
- Evans, R. C., and C. J. Holmes.** 1987. Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**:889-894.
- Farber, B. F., M. H. Kaplan, and A. G. Clogston.** 1990. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J. Infect. Dis.* **161**:37-40.

- Fetherston, J. D., and R. D. Perry.** 1994. The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pristinacin sensitivity and HMWP2. *Mol. Microbiol.* **13**:697-708.
- Foster, T. J., and M. Höök.** 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **12**:484-488.
- Franson, T. R., N. K. Sheth, H. D. Rose, and P. G. Sohnle.** 1984. Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters. *J. Clin. Microbiol.* **20**:500-505.
- 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**:877-880.
- Frogatt, J. W., J. L. Johnston, D. W. Galetto, and G. L. Archer.** 1989. Antimicrobial resistance in nosokomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:460-466.
- Galdbart, J. O., J. Allignet, H. S. Tung, C. Ryden, and N. El Solh.** 2000. Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J. Infect. Dis.* **182**:351-355.
- Garcia, M. I., A. Labigne, and C. Le Bouguenec.** 1994. Nucleotide sequence of the afimbrial-adhesin-encoding *afa-3* gene cluster and its translocation via flanking *IS1* insertion sequences. *J. Bacteriol.* **176**:7601-7613.
- Gerke, C., A. Kraft, R. Süßmuth, and O. Schweitzer.** 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* **273**:18586-18593.
- Gertz, S., S. Engelmann, R. Schmid, A. K. Ziebandt, K. Tischer, C. Scharf, J. Hacker, and M. Hecker.** 2000. Characterization of the sigma(B) regulon in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **182**:6983-6991.
- Giachino, P., S. Engelmann, and M. Bischoff.** 2001. Sigma (B) activity depends on RsbU in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **183**:1843-1852.
- Goudie, J. B., and R. B.** 1955. Goudie. Recurrent infection by a stable-dwarf-colony variant of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Pathol.* **8**:284-287.
- Gristina, A. G., R. A. Jennings, P. T. Naylor, Q. N. Myrvik, and L. X. Webb.** 1989. Comparative in vitro antibiotic resistance of surface colonizing coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:813-816.

- 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**:1089-1097.
- Hancock, R. E. W.** 1997. The role of fundamental research and biotechnology in finding solutions to the global problem of antibiotic resistance. *Clin. Infect. Dis.* **24**:148-150.
- Heilmann, C., C. Gerke, F. Perdreau-Remington, and F. Götz.** 1996a. Characterization of Tn 917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect. Immun.* **64**:277-282.
- Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, and N. Vanittanakom.** 1996b. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* **20**:1083-1091.
- Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Götz.** 1997. Evidence for autolysin-mediated attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* **24**:1013-1024.
- Heilmann, C., and F. Götz.** 1998. Further characterization of *Staphylococcus epidermidis* transposon mutants deficient in primary attachment or intercellular adhesion. *Zentralbl. Bakteriol.* **287**:69-83.
- Heinrichs, J. H., M. G. Bayer, and A. L. Cheung.** 1996. Characterization of the *sar* locus and its interaction with *agr* in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**:418-423.
- Hell, W., H. G. W. Meyer, and S. G. Gatermann.** 1998. Cloning of *aas*, a gene encoding a *Staphylococcus saprophyticus* surface protein with adhesive and autolytic properties. *Mol. Microbiol.* **29**:871-881.
- Helmann, J. D., and M. J. Chamberlin.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:839-872.
- Herbert, S., P. Barry, and R. P. Novick.** 2001. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**:1996-3003.
- Herrmann, M., P. E. Vaudaux, D. Pittet, and R. Auckenthaler.** 1988. Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. Infect. Dis.* **158**:693-701.
- Hiramatsu, K., K. Asada, E. Suzuki, K. Okonogi, and T. Yokota.** 1992. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett.* **298**:133-136.

- Hiramatsu, K., N. Konodo, and T. Ito.** 1996. Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA. *J. Infect. Chemother.* **2**:117-129.
- Hogt, A. H., J. Dankert, J. A. de Vries, and J. Feijen.** 1983. Adhesion of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *J. Gen. Microbiol.* **129**:1959-1968.
- Hogt, A. H., J. Dankert, and J. Feijen.** 1985. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J. Gen. Microbiol.* **131**:2485-2491.
- Hromockyj, A. E., S. C. Tucker, and T. Maurelli.** 1992. Temperature regulation of *Shigella* virulence: identification of the repressor gene *virR*, an analogue of *hns*, and partial complementation by tyrosyl transfer RNA (tRNA_{Tyr}). *Mol. Microbiol.* **6**:2113-2124.
- Ito, T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu.** 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1449-1458.
- Janzon, L., S. Lofdahl, and S. Arvidson.** 1989. Identification and nucleotide sequence of the delta-lysin gene, *hld*, adjacent to the accessory gene regulator (*agr*) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **219**:480-485.
- Ji, G., R. Beavis, and R. P. Novick.** 1995. Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc. Natl. Acad. sci. USA.* **92**:12055-12059.
- Ji, G., R. Beavis, and R. P. Novick.** 1997. Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science.* **276**:2027-2030.
- Kloos, W. E., and T. L. Bannerman.** 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:117-140.
- Knobloch, J. K., K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, and H. Feucht.** 2001. Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* **183**:2624-2633.
- Kornblum, J., B. Kreiswirth, S. J. Projan, H. Ross, and R. P. Novick.** 1990. *agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*. In *Molecular biology of the staphylococci*. Novick, R. P. (ed.). New York, NY: VCH Publishers, pp. 373-401.
- Kreiswirth, B. N., S. J. Projan, P. M. Schlievert, and R. P. Novick.** 1989. Toxic shock syndrome toxin 1 is encoded by a variable genetic element. *Rev. Infect. Dis.* **11**:83-88.
- Kruger, E., T. Msadek, and M. Hecker.** 1996. Alternative promoters direct stress-induced transcription of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon. *Mol. Microbiol.* **20**:713-723.

- Kuhl, S. A., P. A. Pattee, and J. N. Baldwin.** 1978. Chromosomal map location of the methicillin resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **135**:460-465.
- Kullik, I., and P. Giachino.** 1997. The alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus*: regulation of the *sigB* operon in response to growth phase and heat shock. Arch. Microbiol. **167**:151-159.
- Kullik, I., P. Giachino, and T. Fuchs.** 1998. Deletion of the alternative sigma factor σ^B in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. J. Bacteriol. **180**:4814-4820.
- Lamb, H. M., D. P. Figgitt, and D. Faulds.** 1999. Quinupristin/dalfopristin : a review of its use in the management of serious gram-positive infections. Drugs. **58(6)**:1061-1097.
- Van Langevelde, P., E. Ravensbergen, P. Grashof, H. Beekhuizen, P. H. P. Groeneveld, and J. T. van Dissel.** 1999. Antibiotic-induced cell wall fragments of *Staphylococcus aureus* increase endothelial chemokine secretion and adhesiveness for granulocytes. Antimicrob. Agents Chemother. **43**:2984-2989.
- Lina, G., S. Jarraud, G. Ji, T. Greenland, A. Pedraza, J. Etienne, R. P. Novick, and F. Vandenesch.** 1998. Transmembrane topology and histidine protein kinase activity of AgrC, the *agr* signal receptor in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **28**:655-662.
- 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. **95**:181-186.
- Lorian, V., Y. Esanu, L. Amaral.** 1994. Ultrastructure alterations of *Staphylococcus aureus* exposed to RP59500. J. Antimicrob. Chemother. **33**:625-628.
- Ludwicka, A., R. Locci, B. Jansen, G. Peters, and G. Pulverer.** 1983. Microbial colonization of prosthetic devices. V. Attachment of coagulase-negative staphylococci and slime production on chemically pure synthetic polymers. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B **177**:527-532.
- Ludwicka, A., G. Ulenbruck, G. Peters, P. N. Seng, E. D. Gray, J. Jeljaszewicz, and G. Pulverer.** 1984. Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. Zbl. Bakt. Hyg. A **258**:256-267.
- Ludwicka, A., L. M. Swiltaski, A. Lundin, G. Pulverer, and T. Wadström.** 1985. Bioluminescent assay for measurement of bacterial attachment to polystyrene. J. Microbiol. Methods **4**:169-177.

- Ludwig, W., and K.H. Schleifer.** 1994. Bacterial phylogeny based on 16 S and 23 S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev.* **15**:155-173.
- Lyon, B. R., M. T. Gillespie, and R. A. Skurray.** 1987. Detection and characterization of IS256, an insertion sequence in *staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:3031-3038.
- Mack, D., M. Haeder, N. Siemssen, and R. Laufs.** 1996a. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J. Infect. Dis.* **174**:881-884.
- Mack, D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, and A. Schwarzkopf.** 1994a. Charakterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm-production: genetic identification of a hexosamine containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun.* **62**:3244-3253.
- Mack, D., N. Siemssen, and R. Laufs.** 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic adherent *Staphylococcus epidermidis* evidence for functional relation to intercellular adherence. *Infect Immun.* **60**:2048-2057.
- Mack, D., N. Siemssen, and R. Laufs.** 1994b. Identification of a cell cluster associated antigen specific for plastic adherent *Staphylococcus epidermidis* which is functional related to intercellular adhesion. *Zentralbl. Bakteriolog. suppl.* **26**:411-413.
- Mack, D., W. Fischer, Krokotsch, and K. Leopold.** 1996b. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear $\beta(1-6)$ -linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* **178**:175-183.
- Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:725-774.
- Manna, A., M. G. Bayer, and A. L. Cheung.** 1998. Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **180**:3828-3836.
- Manna, A., and A. L. Cheung.** 2001. Characterization of *sarR*, a modulator of *sar* expression in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**:885-896.
- 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**:1535-1546.
- McKevitt, A. I., G. L. Bjornson, C. A. Mauracher, and D. W. Scheifele.** 1990. Amino acid sequence of a deltalike toxin from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **58**:1473-1475.
- Mempel, M., H. Feucht, W. Ziebuhr, M. Endres, R. Laufs, and L. Grüter.** 1994. Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1251-1255.

- Miyazaki, E., J. M. Chen, C. Ko, and W. Bishai.** 1999. The *Staphylococcus aureus* *rsbW* (*orf159*) gene encodes an anti-sigma factor of SigB. *J. Bacteriol.* **181**:2846-2851.
- Morfelddt, E., I. Panova-sapudjieva, B. Gustafsson, and S. Arvidson.** 1996a. Detection of the response regulator AgrA in the cytosolic fraction of *staphylococcus aureus* by monoclonal antibodies. *FEMS. Microbiol. Lett.* **143**:195-201.
- Morfelddt, E., K. Tegmark, and S. Arvidson.** 1996b. Transkriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **21**:1227-1237.
- Morvan, A., S. Aubert, S. 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**:1415-1423.
- Muller, E., S. Takeda, D. A. Goldmann, and G. B. Pier.** 1991. Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect. Immun.* **59**:3323-3326.
- Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. rev.* **63** :174-229.
- Nicholas, R. O., T. Li, D. McDevitt, A. Marra, S. Socoloski, P. L. Demarsh, and D. R. Gentry.** 1999. Isolation and characterization of a *sigB* deletion mutant of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **67**:3667-3669.
- Nilsson, M., L. Frykberg, J. I. Flock, L. Pei, M. Lindberg, and B. Guss.** 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**:2666-2673.
- Novick, R. P., S. J. Prijan, J. Kornblum, B. Kreiswirth, F. Vandenesch, and S. Moghazed.** 1995. The *agr* P2 operon : an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen Genet.* **248**:446-458.
- Ohlsen, K., K. P. Koller, and J. Hacker.** 1997. Analysis of expression of the alpha-toxin gene (*hla*) of *Staphylococcus aureus* by using a chromosomally encoded *hla::lacZ* gene fusion. *Infect. Immun.* **65**:3606-3614.
- Ohlsen, K., W. Ziebuhr, K. P. Koller, W. Hell, T. A. Wichelhaus, and J. Hacker.** 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on a alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2817-2823.

- Ohta, T., K. Saito, M. Kuroda, K. Honda, H. Hirata, and H. Hayashi.** 1994. Molecular cloning of two new heat shock genes related to the *hsp70* genes in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **176**:4779-4783.
- Otto, M., R. Sussmuth, G. Jung, and F. Götz.** 1998. Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system. *FEBS. Lett.* **424**:89-94.
- Pascual, A., A. Fleer, N. A. C. Westerdaal, and J. Verhoef.** 1986. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters in vitro. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **5**:518-522.
- Paulsen, I. T., N. Firth, and R. A. Skurray.** 1997. Resistance to antimicrobial agents other than β -lactams, p. 175-212. In K. B. Crossley and G. L. Gordon (ed.), *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York, N. Y.
- Pei, L., M. Palma, M. Nilsson, B. Guss, and J. I. Flock.** 1999. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **67**:4525-4530.
- Peng, H. L., R. P. Novick, B. Kreiswirth, J. Kornblum, and P. Schlievert.** 1988. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**:4365-4372.
- Peschel, A., C. Vuong, M. Otto, and F. Götz.** 2000. The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. **44**:2845-2847.
- Peters, G., F. Schumacher-Perdreau, B. Jansen, and M. Bey.** 1987. Biology of *S. epidermidis* extracellular slime. *Zbl. Bakt. Suppl.* **16**:15-31.
- Pfaller, M. A., and L. A. Herwaldt.** 1988. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**:281-299.
- Proctor, A.** 1994. Microbial pathogenic factors: small colony variants. In: Bisno AL Waldvogel FA, eds. *Infections associated with indwelling medical devices*. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 77-90.
- Proctor, R. A., P. van Langevelde, M. Kristjanson, J. N. Maslow, and R. D. Arbeit.** 1995. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **20**:95-102.
- Projan, S. J., and R. P. Novick.** 1997. The molecular basis of pathogenicity, p. 55-81. In K. B. Crossley and G. L. Archer (ed.), *The staphylococci in human diseases*. Churchill Livingstone, New York, N. Y.
- Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker, and W. Ziebuhr.** 2000a. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on the polysaccharide intercellular adhesin (PIA)

- expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3357-3363.
- Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker, and W. Ziebuhr.** 2000b. Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J. Bacteriol.* **182**:6824-6826.
- Rice, L. B., and L. L. Carias.** 1998. Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis* CX19. *J. Bacteriol.* **180**:714-721.
- Rice, L. B., L. L. Carias, and S. 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**:1147-1153.
- Rice, L. B., and S. H. Marshall.** 1994. Insertions of IS256-like element flanking the chromosomal beta-lactamase gene of *Enterococcus faecalis* CX19. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:693-701.
- Robertson, B. D., and T. F. Meyer.** 1992. Genetic variation in pathogenic bacteria. *Trends Genet.* **8**:422-427.
- 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**:3039-3052.
- Rouch, D. A., L. J. Messerotti, L. S. L. Loo, C. A. Jackson, and R. A. Skurray.** 1989. Trimethoprim resistance transposon Tn4003 from *Staphylococcus aureus* encodes genes for a dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase flanked by three copies of IS257. *Mol. Microbiol.* **3**(2):161-175.
- Rupp, M. E., and G. L. Archer.** 1994. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* **19**:231-245.
- Rupp, M. E., and K. E. Hamer.** 1998. Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**:155-161.
- Scharf, C., S. Riethdorf, H. Ernst, S. Engelmann, U. Volker, and M. Hecker.** 1998. Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **180**:1869-1877.
- Schwalbe, R. S., W. J. Ritz, P. R. Verma, E. A. Barranco, and P. H. Gilligan.** 1990. Selection for vancomycin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *J. Infect. Dis.* **161**:4551.

- Shenkman, B., E. Rubinstein, A. L. Cheung, G. E. Brill, R. Dardik, I. Tamarin, N. Savion, and D. Varon.** 2001. Adherence properties of *Staphylococcus aureus* under static and flow conditions: roles of *agr* and *sar* loci, platelets, and plasma ligands. *Infect. Immun.* **69**:4473-4478.
- Schumacher-Perdreau, F., C. Heilmann, G. Peters, F. Götz, and G. Pulverer.** 1994. Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**:71-78.
- Schwalbe, R. S., J. T. Stapleton, and P. H. Gilligan.** 1987. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N. Engl. J. Med.* **316**:927-931.
- Small, P. M., and J. D. A. van Embden.** 1994. Molecular epidemiology of tuberculosis, p. 569-582. *In* B. R. Bloom (ed.), *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Stanley, J., N. Baquar, and E. J. Threlfall.** 1993. Genotypes and phylogenetic relationships of *Salmonella typhimurium* are defined by molecular fingerprinting of IS200 and IS6 rrn loci. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1134-1140.
- Steckelberg, J. M., M. R. Keating, M. S. Rous, and W. R. Wilson.** 1989. Lack of extracellular slime effect on treatment outcome of *Staphylococcus epidermidis* experimental endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.* **23**:117-121.
- Steinbrecher, E., D. Sohr, A. Nassauer, F. Daschner, H. Rüden, and P. Gastmeier.** 2000. Die häufigsten Erreger bei Intensivpatienten mit nosokomialen Infektionen. *Chemother. J.* **5**:179-183.
- Stewart, G. T., and R. J. Holt.** 1963. Evolution of natural resistance to the newer penicillin. *Br. Med. J.* **1**:308-311.
- Tegmark, K., A. Karlson, and S. Arvidson.** 2000. Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **37**:398-409.
- Tesch, W., C. Ryffel, A. Strässle, F. H. Kayser, and B. Berger-Bächi.** 1990. Evidence of a novel staphylococcal *mec*-encoded element (*mecR*) controlling expression of penicillin-binding protein 2'. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1703-1706.
- Timmerman, C. P., A. Fleer, J. M. Besnier, L. DeGraaf, F. Cremers, and J. Verhoef.** 1991. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect. Immun.* **59**:4187-4192.
- Tobe, T., S. Nagai, N. Okada, B. Adler, M. Yoshikawa, and C. Sasakawa.** 1991. Temperature regulated expression of invasion genes in *Shigella flexneri* is controlled through

the transcriptional activation of the *virB* gene on the large plasmid. *Mol. Microbiol.* **5**:887-893.

Ubukata, K., R. Nonoguchi, M. D. Song, M. Matsubishi, and M. Kono. 1990. Homology of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus simulans* to that of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:170-172.

Uhlen, M., B. Guss, B. Nilsson, S. Gatenbeck, L. Philipson, and M. Lindberg. 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A, a gene evolved through multiple duplications. *J. Biol. Chem.* **259**:1695-1702.

Vaudaux, P., D. Pittet, A. Haerberli, and E. Hugger. 1989. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen of fibrin. *J. Biol. Chem.* **264**:865-875.

Veach, L. A., M. A. Pfaller, M. Barrett, F. P. Koontz, and R. P. Wenzel. 1990. Vancomycin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* causing colonization and bloodstream infection. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2064-2068.

Vesga, O., J. M. Vann, D. Brar, and R. A. Proctor. 1996. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J. Infect. Dis.* **173**:739-742.

Völker, U., A. Dufour, and W. G. Haldenwang. 1995a. The *Bacillus subtilis* *rsbU* gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of σ^B . *J. Bacteriol.* **177**:114-122.

Völker, U., A. Völker, B. Maul, M. Hecker, A. Dufour, and W. G. Haldenwang. 1995b. Separate mechanisms activate σ^B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J. Bacteriol.* **177**:3771-3780.

Völker, U., S. Engelmann, B. Maul, S. Riethdorf, A. Völker, R. Schmid, H. Mach, and M. Hecker. 1994. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**:741-752.

Von Blohn, C., B. Kempf, R. M. Kappes, and E. Bremer. 1997. Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol. Microbiol.* **25**:175-187.

Vuong, C., F. Götz, and M. Otto. 2000a. Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **68**:1048-1053.

Vuong, C., H. L. Saenz, F. Götz, and M. Otto. 2000b. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* **182**:1688-1693.

Watson, D. L. 1989. Expression of a pseudocapsule by *Staphylococcus aureus*: influence of cultural conditions and relevance to mastitis. *Res. Vet. Sci.* **47**:152-157.

- van Wijngaerden, E., W. E. Peetermans, S. van Lierde, and J. van Eldere.** 1997. Polyclonal *Staphylococcus* endocarditis. Clin. Infect. Dis. **25**:69-71.
- Williams, I., W. A. Venables, D. Lloyd, F. Paul, and I. Crichley.** 1997. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. Microbiol. **143**:2407-2413.
- Wise, A. A., and C. W. Price.** 1995. Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor sigmaB in response to environmental signals. J. Bacteriol. **177**:123-133.
- Wong, S. S.** 1999. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance (In Process Citation). Clin. Infect. Dis. **29(4)**:760-767.
- Wu, S., H. de Lencastre, and A. Tomasz.** 1996. Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing. J. Bacteriol. **178**:6036-6042.
- Yang, X., C. M. Kang, M. S. Brody, and C. W. Price.** 1996. Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. Genes Dev. **10**:2265-2275.
- York, M. K., L. Gibbs, F. Chehab, and G. F. Brooks.** 1996. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol. **34**:249-253.
- Ziebuhr, W., C. Heilmann, F. Götz, P. Meyer, K. Wilms, E. Straube, and J. Hacker.** 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. Infect. Immun. **65**:890-896.
- Ziebuhr, W., V. Krimmer, S. Rachid, I. Löbner, 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**:345-356.
- Ziebuhr, W., K. Dietrich, M. Trautmann, and M. Wilhelm.** 2000a. Chromosomal rearrangements affecting biofilm production and antibiotic resistance in a *Staphylococcus epidermidis* strain causing shunt-associated ventriculitis. Int. J. Med. Microbiol. **290**:115-120.
- Ziebuhr, W., I. Löbner, 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**:151-157.

8.1. Stammsammlung

Stammsammlung *S. epidermidis*-Hautisolate (Würzburg)

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
736	<i>S.epidermidis</i>	S1	CLA	-	-	-	+				s	s	s	s	r	s	s	s
737	<i>S.epidermidis</i>	S2	DOR	-	+	-	+	ja	ja	ja	s	s	s	s	s	s	s	s
738	<i>S.epidermidis</i>	S3	ISA	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
739	<i>S.epidermidis</i>	S4	KUP	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
740	<i>S.epidermidis</i>	S6	ZHA	-	+	-	+				s	r	r	r	r	s	s	s
741	<i>S.epidermidi</i>	S7	SYB	-	+	-	+	ja	ja	nein	s	s	s	r	r	s	s	s
742	<i>S.epidermidis</i>	S8	JOA	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
743	<i>S.epidermidis</i>	S9	ANI	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
744	<i>S.epidermidis</i>	S10	SON	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
745	<i>S.epidermidis</i>	S11	SEO	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
746	<i>S.epidermidis</i>	S12	GAB	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
747	<i>S.epidermidis</i>	S13	FRA	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
748	<i>S.epidermidis</i>	S14	DAG	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
749	<i>S.epidermidis</i>	S15	UDO	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
750	<i>S.epidermidis</i>	S16	UDO	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
751	<i>S.epidermidis</i>	S17	CAR	-	+	-	+	ja	ja	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
753	<i>S.epidermidis</i>	S19	ROL	-	+	-	+	ja	ja	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
754	<i>S.epidermidis</i>	S20	ANO	-	-	-	+				s	s	r	r	r	s	s	s
755	<i>S.epidermidis</i>	S21	ANO	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
756	<i>S.epidermidis</i>	S22	ANO	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
757	<i>S.epidermidis</i>	S23	ANO	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
758	<i>S.epidermidis</i>	S24	ANO	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
760	<i>S.epidermidis</i>	S27	EUC	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
763	<i>S.epidermidis</i>	S30	EUH	-	-	-	+				s	s	r	r	r	s	s	s
764	<i>S.epidermidis</i>	S32	HYO	-	-	-	-				s	s	s	s	s	r	s	s
765	<i>S.epidermidis</i>	S33	DON	-	-	+	+				s	s	r	r	s	s	s	r
767	<i>S.epidermidis</i>	S35	MEE	-	+	+	+	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	r
768	<i>S.epidermidis</i>	S36	CHA	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
769	<i>S.epidermidis</i>	S37	HAY	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
771	<i>S.epidermidis</i>	S39	JON	-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
772	<i>S.epidermidis</i>	S40	SUN	-	+	+	+	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	r
774	<i>S.epidermidis</i>	S42	BAE	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
775	<i>S.epidermidis</i>	S43	YEO	-	-	+	-				s	s	s	r	s	s	s	r
776	<i>S.epidermidis</i>	S44	HYO	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
777	<i>S.epidermidis</i>	S45	EUY	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
778	<i>S.epidermidis</i>	S47	EUS	-	-	+	+				s	r	s	r	s	s	s	r
779	<i>S.epidermidis</i>	S48	JEO	-	-	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s
781	<i>S.epidermidis</i>	S50	JES	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
783	<i>S.epidermidis</i>	S52	KUM	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
788	<i>S.epidermidis</i>	S57	JEM	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
789	<i>S.epidermidis</i>	S58	JAE	-	-	-	+				s	s	r	s	s	s	s	s
790	<i>S.epidermidis</i>	S60	KAR	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	r	s	s	s	s	s
791	<i>S.epidermidis</i>	S61	ANJ	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
792	<i>S.epidermidis</i>	S62	WIL	+	+	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
793	<i>S.epidermidis</i>	S63	KAT	-	+	-	+	ja	ja	ja	s	s	s	s	r	s	s	s
796	<i>S.epidermidis</i>	S66	HIL	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
797	<i>S.epidermidis</i>	S67	RON	-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
798	<i>S.epidermidis</i>	S68	STE	-	-	-	+				s	s	r	r	r	s	s	s
799	<i>S.epidermidis</i>	S69	SYL	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	r	r	s	s	s	s
800	<i>S.epidermidis</i>	S70	PET	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
801	<i>S.epidermidis</i>	S71	GAB	-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
802	<i>S.epidermidis</i>	S72	GAR	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
803	<i>S.epidermidis</i>	S73	SON	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
805	<i>S.epidermidis</i>	S75	USH	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
806	<i>S.epidermidis</i>	S76	ULI	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
808	<i>S.epidermidis</i>	S78	GAB	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
811	<i>S.epidermidis</i>	S81	UTE	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
813	<i>S.epidermidis</i>	S83	KYU	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s

Stammsammlung *S. epidermidis*-Hautisolate (Ulm)

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
817	<i>S.epidermidis</i>	U2	-	-	+	+				s	s	r	r	r	r	s	r
818	<i>S.epidermidis</i>	U3	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
819	<i>S.epidermidis</i>	U4	+	+	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
820	<i>S.epidermidis</i>	U5	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
821	<i>S.epidermidis</i>	U6	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
824	<i>S.epidermidis</i>	U10	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
825	<i>S.epidermidis</i>	U12	-	-	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s
826	<i>S.epidermidis</i>	U13	-	-	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s
827	<i>S.epidermidis</i>	U14	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
828	<i>S.epidermidis</i>	U15	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
829	<i>S.epidermidis</i>	U16	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
830	<i>S.epidermidis</i>	U17b	+	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
832	<i>S.epidermidis</i>	U21b	-	-	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s
833	<i>S.epidermidis</i>	U23	-	-	-	+				s	s	r	r	r	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
834	<i>S.epidermidis</i>	U26	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
835	<i>S.epidermidis</i>	U27	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
836	<i>S.epidermidis</i>	U28	+	+	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s
837	<i>S.epidermidis</i>	U29	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
839	<i>S.epidermidis</i>	U32	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
840	<i>S.epidermidis</i>	U33	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
841	<i>S.epidermidis</i>	U34	+	+	-	+				s	s	s	r	r	s	r	s
842	<i>S.epidermidis</i>	U35	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
843	<i>S.epidermidis</i>	U36	-	-	-	+				s	s	r	s	r	r	s	s
845	<i>S.epidermidis</i>	U38a	-	+	-	+	nein	ja	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
846	<i>S.epidermidis</i>	U41	+	+	-	+				s	s	r	r	r	s	s	s
847	<i>S.epidermidis</i>	U43	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
848	<i>S.epidermidis</i>	U45	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
849	<i>S.epidermidis</i>	U46	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
851	<i>S.epidermidis</i>	U49	+	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
852	<i>S.epidermidis</i>	U51	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
853	<i>S.epidermidis</i>	U52	-	-	-	+				s	s	r	r	r	s	s	s
854	<i>S.epidermidis</i>	U53	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
855	<i>S.epidermidis</i>	U55	+	+	-	+				s	s	r	r	r	s	s	s
856	<i>S.epidermidis</i>	U58	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
857	<i>S.epidermidis</i>	U59	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
858	<i>S.epidermidis</i>	U60	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
859	<i>S.epidermidis</i>	U61	-	+	-	+	nein	nein	nein	-	s	s	s	s	-	-	-
860	<i>S.epidermidis</i>	U62	-	-	-	+				s	-	-	-	-	s	s	s
861	<i>S.epidermidis</i>	U65	-	-	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s
862	<i>S.epidermidis</i>	U67	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
863	<i>S.epidermidis</i>	U68	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
864	<i>S.epidermidis</i>	U69	-	-	-	+				s	r	s	r	s	s	s	s
865	<i>S.epidermidis</i>	U70	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
866	<i>S.epidermidis</i>	U72	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
867	<i>S.epidermidis</i>	U74	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
868	<i>S.epidermidis</i>	U75	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
869	<i>S.epidermidis</i>	U76	-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
870	<i>S.epidermidis</i>	U77	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
872	<i>S.epidermidis</i>	U80	-	-	-	+				s	s	s	r	r	s	s	s
874	<i>S.epidermidis</i>	U82	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
875	<i>S.epidermidis</i>	U83	+	+	-	+				s	s	s	r	r	s	r	s
876	<i>S.epidermidis</i>	U84	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
877	<i>S.epidermidis</i>	U85	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
878	<i>S.epidermidis</i>	U89	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
880	<i>S.epidermidis</i>	U92	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
881	<i>S.epidermidis</i>	U93	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
882	<i>S.epidermidis</i>	U96	-	+	-	+	ja	nein	nein	s	s	s	r	r	s	s	s
884	<i>S.epidermidis</i>	U99	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
886	<i>S.epidermidis</i>	U102	-	-	-	+				-	-	-	-	-	-	-	-
887	<i>S.epidermidis</i>	U105	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
888	<i>S.epidermidis</i>	U106	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
889	<i>S.epidermidis</i>	U107	-	-	-	+				s	s	-	r	s	s	s	s
891	<i>S.epidermidis</i>	U110	-	-	-	+				-	-	-	-	-	-	-	-

Stammsammlung *S. epidermidis*-Harnwegs isolate (Straubing)

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	<i>ica</i> - Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
558	<i>S.epidermidis</i>	293	WIC	+	+	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s
559	<i>S.epidermidis</i>	162	SCH	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
560	<i>S.epidermidis</i>	296	KER	-	+	-	+	ja	ja	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
561	<i>S.epidermidis</i>	225	OBE	-	+	+	+	ja	ja	nein	s	s	r	r	s	r	s	r
562	<i>S.epidermidis</i>	242	HIL	+	+	+	+				s	s	r	r	s	r	s	r
563	<i>S.epidermidis</i>	621	SOM	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
564	<i>S.epidermidis</i>	1	BIE	-	+	-	+	nein	nein	ja	s	s	s	r	s	s	s	s
565	<i>S.epidermidis</i>	591	SIN	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
566	<i>S.epidermidis</i>	84	LOR	-	-	+	+				s	s	r	r	s	s	s	r
567	<i>S.epidermidis</i>	705	GRI	-	+	+	+	ja	ja	ja	s	s	s	r	s	s	s	s
568	<i>S.epidermidis</i>	44	SCH	-	n.d.	n.d.	n.d.				s	s	s	r	s	s	s	s
569	<i>S.epidermidis</i>	96	ZIE	-	+	+	+				s	s	r	r	s	s	s	s
570	<i>S.epidermidis</i>	288	TUT	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen								
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN	
571	<i>S.epidermidis</i>	567	FUC	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s	s
572	<i>S.epidermidis</i>	671	WIE	-	-	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s	s
573	<i>S.epidermidis</i>	316	BOS	+	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s	s
574	<i>S.epidermidis</i>	1117	HIN	+	+	n.d.	+				s	s	s	r	s	s	s	s	s
575	<i>S.epidermidis</i>	245	PAU	-	-	+	+				s	s	s	s	s	s	s	s	s
576	<i>S.epidermidis</i>	642	MEI	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s	s
577	<i>S.epidermidis</i>	244	MUT	+	+	+	+				s	s	s	r	r	s	r	r	
578	<i>S.epidermidis</i>	708	HAS	+	+	+	+				s	s	s	r	s	s	s	s	s
579	<i>S.epidermidis</i>	243	MUT	-	-	n.d.	+				s	s	s	r	r	s	r	s	
580	<i>S.epidermidis</i>	127	STR	-	-	n.d.	+				s	s	s	r	s	s	s	s	s
582	<i>S.epidermidis</i>	239	NIK	-	-	-	+				s	s	r	s	s	s	s	s	s
583	<i>S.epidermidis</i>	222	PAI	-	-	n.d.	+				s	s	r	r	s	s	s	s	s
584	<i>S.epidermidis</i>	194	WUT	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s	s
585	<i>S.epidermidis</i>	354	PIL	-	+	+	+	nein	nein	nein	s	r	r	r	r	s	r	r	
586	<i>S.epidermidis</i>	287	BRE	+	+	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s	s
587	<i>S.epidermidis</i>	192	PYK	-	+	+	+	ja	ja	ja	s	r	s	r	r	r	r	r	

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen								
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN	
588	<i>S.epidermidis</i>	179	OST	-	-	-	-				s	s	s	s	s	s	s	s	s
589	<i>S.epidermidis</i>	1015	TRU	-	+	+	+	ja	ja	nein	s	r	r	r	s	r	s	s	r
590	<i>S.epidermidis</i>	1003	ART	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s	s
591	<i>S.epidermidis</i>	438	HAC	+	+	+	+				s	r	r	r	s	s	s	s	r
592	<i>S.epidermidis</i>	218	JON	+	+	+	+				s	s	r	r	r	r	s	s	r
593	<i>S.epidermidis</i>	1047	BIE	-	-	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s	s
594	<i>S.epidermidis</i>	435	GEI	-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s	s
595	<i>S.epidermidis</i>	424	HEL	-	+	+	+	nein	ja	nein	s	r	s	r	r	r	r	r	r
596	<i>S.epidermidis</i>	1090	KEN	-	-	n.d.	+				s	s	s	r	s	s	s	s	s
597	<i>S.epidermidis</i>	464	KRI	-	-	n.d.	+				s	s	r	r	s	s	s	s	s
598	<i>S.epidermidis</i>	91	WÜR	+	+	+	+				s	s	s	r	s	s	s	s	r
599	<i>S.epidermidis</i>	1078	FAI	+	-	-	+				s	s	r	r	r	s	r	s	s

Stammsammlung *S. epidermidis*-Blutkulturisolate

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
422	<i>S.epidermidis</i>	K40		+	+	+	+				s	r	s	r	r	s	r	r
423	<i>S.epidermidis</i>	M23		-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
428	<i>S.epidermidis</i>	M29		+	+	+	+				s	r	s	r	s	s	s	r
432	<i>S.epidermidis</i>	M36		-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
434	<i>S.epidermidis</i>	K20		+	+	+	+				s	r	r	r	s	r	s	r
437	<i>S.epidermidis</i>	K13		+	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
206	<i>S.epidermidis</i>	621	NAU	-	+	+	+	nein	nein	ja	s	r	r	r	r	s	r	r
208	<i>S.epidermidis</i>	726	LOR	-	+	+	+	ja	ja	ja	s	r	s	r	s	s	s	r
209	<i>S.epidermidis</i>	742	STE	-	-	+	+				s	r	r	r	r	r	r	r
213	<i>S.epidermidis</i>	859	TRI	+	+	+	+				s	r	r	r	r	s	s	r
215	<i>S.epidermidis</i>	912	MEI	+	+	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
217	<i>S.epidermidis</i>	988	BER	-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
218	<i>S.epidermidis</i>	1105	BRÄ	+	+	-	+				s	r	r	r	r	s	r	s
225	<i>S.epidermidis</i>	1407	ZEN	+	+	-	+				s	r	s	r	r	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
226	<i>S.epidermidis</i>	1430	STR	+	+	+	+				s	r	r	r	s	r	s	r
227	<i>S.epidermidis</i>	1458	MUL	-	+	+	+	ja	nein	ja	s	r	r	r	s	s	s	r
229	<i>S.epidermidis</i>	3804	BOR	+	+	+	+				s	r	s	r	r	s	r	r
230	<i>S.epidermidis</i>	1557	NOE	-	-	+	+				s	r	r	r	r	s	r	r
231	<i>S.epidermidis</i>	1535	TOS	-	+	+	+	ja	nein	ja	s	r	r	r	r	s	r	r
232	<i>S.epidermidis</i>	1784	KRU	+	+	+	+				s	r	s	r	s	s	s	r
307	<i>S.epidermidis</i>	1945		+	+	+	+				s	s	r	r	s	s	s	r
308	<i>S.epidermidis</i>	2001		-	+	+	+	ja	nein	nein	s	r	r	r	r	r	r	r
309	<i>S.epidermidis</i>	2071		-	+	-	+	ja	ja	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
310	<i>S.epidermidis</i>	2004		+	+	+	+				s	r	r	r	r	s	r	r
311	<i>S.epidermidis</i>	2082		+	+	-	+				s	s	r	r	r	s	s	s
313	<i>S.epidermidis</i>	2174		+	+	+	+				s	r	s	r	r	s	r	r
314	<i>S.epidermidis</i>	2294		+	+	+	+				s	s	s	r	r	r	r	r
315	<i>S.epidermidis</i>	2271		-	-	-	-				s	s	s	s	s	s	s	s
317	<i>S.epidermidis</i>			+	+	+	+				s	r	r	r	s	r	r	r
319	<i>S.epidermidis</i>	2444		-	+	+	+	ja	nein	ja	s	r	r	r	r	s	s	r

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
320	<i>S.epidermidis</i>	2529		-	-	-	+				s	s	s	r	s	r	s	s
322	<i>S.epidermidis</i>	2667		+	+	+	+				s	s	r	s	s	s	s	s
323-1	<i>S.epidermidis</i>	2697		-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
323-2	<i>S.epidermidis</i>			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.				s	s	s	r	s	s	s	s
324	<i>S.epidermidis</i>	2822		-	+	+	+	ja	ja	ja	s	r	s	r	s	s	s	r
326	<i>S.epidermidis</i>	2903		+	+	+	+				s	r	s	r	r	s	r	r
327	<i>S.epidermidis</i>	2972		-	+	+	+				s	s	s	s	s	s	s	s
328	<i>S.epidermidis</i>	2996		-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
329	<i>S.epidermidis</i>	2992		-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
330	<i>S.epidermidis</i>	3024		-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
332	<i>S.epidermidis</i>	3063		-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
334	<i>S.epidermidis</i>	3228		-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
335	<i>S.epidermidis</i>	3289		-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
337	<i>S.epidermidis</i>	3315		-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
338	<i>S.epidermidis</i>	3357		-	-	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s
340	<i>S.epidermidis</i>	3377		-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
341	<i>S.epidermidis</i>	3375		-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
345	<i>S.epidermidis</i>	3516		-	-	-	+				s	s	s	s	s	s	s	s
346	<i>S.epidermidis</i>	3514		-	-	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
348	<i>S.epidermidis</i>	3409		-	-	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
207	<i>S.epidermidis</i>	277	LEH	+	+	+	+				s	r	r	r	r	s	s	r

Stammsammlung *S. aureus* -Hautisolate

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
761	<i>S.aureus</i>	S28	HYU	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	r	r	s	s	s	s
780	<i>S.aureus</i>	S49	KIL	+	+	-	-	nein	nein	ja	s	s	s	r	s	s	s	s
782	<i>S.aureus</i>	S51	KEE	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
784	<i>S.aureus</i>	S53	HYS	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
785	<i>S.aureus</i>	S54	MIR	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
786	<i>S.aureus</i>	S55	MUN	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
787	<i>S.aureus</i>	S56	HYE	-	+	-	-	ja	ja	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
794	<i>S.aureus</i>	S64	SHW	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	s	r	s	s	s
795	<i>S.aureus</i>	S65	CHR	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	s	r	r	r	s	s
804	<i>S.aureus</i>	S74	PET	-	+	-	-	ja	ja	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
807	<i>S.aureus</i>	S77	BRI	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
809	<i>S.aureus</i>	S79	THO	-	+	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
810	<i>S.aureus</i>	S80	ANJ	-	+	-	-				s	s	s	s	s	s	s	s
812	<i>S.aureus</i>	S82	YAN	-	+	-	-				s	s	r	r	r	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Init.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
								Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
844	<i>S.aureus</i>	U37		-	+	-	+				s	s	s	s	r	s	s	s
871	<i>S.aureus</i>	U78		-	+	-	-				s	s	s	s	s	s	s	s
873	<i>S.aureus</i>	U81a		-	+	-	-				s	s	s	s	s	s	s	s
890	<i>S.aureus</i>	U109		-	+	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-

Stammsammlung *S. aureus*-Klinische Isolate (Wernigerode, Straubing)

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
463	<i>S.aureus</i>	256/92	-	+	-	+	ja	ja	nein	s	s	r	r	s	s	s	s
464	<i>S.aureus</i>	512/92	-	+	-	+	ja	ja	nein	s	r	s	r	s	s	s	s
465	<i>S.aureus</i>	464/92	-	+	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
466	<i>S.aureus</i>	372/92	-	+	-	+	nein	nein	ja	s	s	s	r	s	s	s	s
467	<i>S.aureus</i>	363/92	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
468	<i>S.aureus</i>	352/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
469	<i>S.aureus</i>	293/92	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
470	<i>S.aureus</i>	263/92	-	+	-	-				s	s	r	r	s	s	s	s
471	<i>S.aureus</i>	243/92	-	+	-	+				s	s	s	r	s	s	s	s
472	<i>S.aureus</i>	236/92	-	+	-	+				s	s	r	r	r	s	s	s
473	<i>S.aureus</i>	513/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
474	<i>S.aureus</i>	505/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
475	<i>S.aureus</i>	500/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
476	<i>S.aureus</i>	490/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
477	<i>S.aureus</i>	475/92	-	+	-	-	ja	ja	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
478	<i>S.aureus</i>	390/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
479	<i>S.aureus</i>	389/92	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
480	<i>S.aureus</i>	383/92	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
481	<i>S.aureus</i>	320/92	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
482	<i>S.aureus</i>	292/92	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
483	<i>S.aureus</i>	501/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
484	<i>S.aureus</i>	493/93	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	r	r	r	s	s	s
485	<i>S.aureus</i>	477/92	-	+	-	-	nein	ja	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
486	<i>S.aureus</i>	440/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
487	<i>S.aureus</i>	360/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
488	<i>S.aureus</i>	303/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
489	<i>S.aureus</i>	239/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
490	<i>S.aureus</i>	216/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	r	r	r	s	s	s
491	<i>S.aureus</i>	207/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
492	<i>S.aureus</i>	199/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	r	r	r	r	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
493	<i>S.aureus</i>	484/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
494	<i>S.aureus</i>	433/92	-	+	-	-				s	s	r	r	s	s	s	s
495	<i>S.aureus</i>	367/92	-	+	-	-				s	s	r	r	s	s	s	s
496	<i>S.aureus</i>	358/92	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
497	<i>S.aureus</i>	251/94	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
498	<i>S.aureus</i>	276/94	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
499	<i>S.aureus</i>	282/94	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
500	<i>S.aureus</i>	306/94	-	+	-	-				s	s	s	s	s	s	s	s
501	<i>S.aureus</i>	313/94	-	+	-	-				s	s	s	s	s	s	s	s
502	<i>S.aureus</i>	299/95	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	r	r	r	s	s	s
503	<i>S.aureus</i>	300/95	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	r	r	r	s	s	s
504	<i>S.aureus</i>	301/95	-	+	+	+	nein	nein	nein	s	r	r	r	r	s	r	r
505	<i>S.aureus</i>	302/95	-	+	+	+	nein	ja	nein	s	r	r	r	r	s	r	r
506	<i>S.aureus</i>	303/95	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	r	s	r	s	r	r
507	<i>S.aureus</i>	322/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	r	r	s	s	s	s
508	<i>S.aureus</i>	310/92	-	+	-	-	nein	ja	ja	s	s	s	r	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
509	<i>S.aureus</i>	309/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
510	<i>S.aureus</i>	301/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
511	<i>S.aureus</i>	296/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
512	<i>S.aureus</i>	253/92	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	r	r	s	s	s	s
513	<i>S.aureus</i>	1150/93	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	r	s	r	s	s	s	s
514	<i>S.aureus</i>	1583/93	-	+	-	-				s	r	s	r	r	s	r	r
515	<i>S.aureus</i>	134/93	-	+	+	+				s	r	r	r	r	s	r	r
516	<i>S.aureus</i>	1000/93	-	+	+	n.d.				s	r	r	r	r	r	s	r
517	<i>S.aureus</i>	994/93	-	+	+	n.d.				s	r	r	r	r	s	r	r
518	<i>S.aureus</i>	635/93	-	+	+	n.d.				s	r	r	r	r	s	r	r
519	<i>S.aureus</i>	74/96	-	+	+	n.d.				s	r	r	r	r	s	r	r
520	<i>S.aureus</i>	15/96	-	+	+	n.d.				s	r	r	r	s	s	s	r
521	<i>S.aureus</i>	16/96	-	+	+	n.d.				s	r	s	r	r	r	r	r
522	<i>S.aureus</i>	169/96	-	+	+	n.d.				s	r	r	r	r	s	r	r
523	<i>S.aureus</i>	171/96	-	+	+	n.d.				s	s	r	r	r	s	s	r
524	<i>S.aureus</i>	51/96	-	+	+	n.d.				s	r	r	r	r	s	s	r

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
525	<i>S.aureus</i>	1879/95	-	+	+	n.d.				s	r	r	r	s	s	s	r
526	<i>S.aureus</i>	1883/95	-	+	+	n.d.				s	r	r	r	r	s	r	r
527	<i>S.aureus</i>	1886/95	-	+	+	n.d.				s	r	s	r	r	s	s	r
528	<i>S.aureus</i>	1784/95	-	+	-	n.d.				s	r	r	r	r	s	r	r
529	<i>S.aureus</i>	1446/95	-	+	-	n.d.	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
530	<i>S.aureus</i>	1313/95	-	+	-	n.d.	ja	ja	nein	s	r	r	r	r	s	r	s
531	<i>S.aureus</i>	73	-	+	-	-	ja	ja	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
532	<i>S.aureus</i>	586	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
533	<i>S.aureus</i>	83	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
534	<i>S.aureus</i>	367	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	r	s	s
535	<i>S.aureus</i>	37	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
536	<i>S.aureus</i>	648	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
537	<i>S.aureus</i>	678	-	+	+	+	nein	ja	nein	s	s	r	r	r	s	s	r
538	<i>S.aureus</i>	315	-	+	+	+				s	r	r	r	r	r	s	r
539	<i>S.aureus</i>	636	-	+	+	+	nein	ja	nein	s	s	r	s	r	r	s	r
540	<i>S.aureus</i>	306	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	ica- Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
541	<i>S.aureus</i>	543	-	+	-	-	nein	ja	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
542	<i>S.aureus</i>	704	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
543	<i>S.aureus</i>	612	-	+	-	-	ja	ja	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
544	<i>S.aureus</i>	596	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	r	s	s	s	s
545	<i>S.aureus</i>	248	-	+	-	-	ja	ja	ja	s	s	s	r	s	s	s	s
546	<i>S.aureus</i>	161	-	+	+	+	ja	nein	nein	s	r	r	r	r	s	s	r
547	<i>S.aureus</i>	243	-	+	-	-	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
548	<i>S.aureus</i>	1038	-	+	+	-	nein	nein	nein	s	s	r	s	r	r	s	r
549	<i>S.aureus</i>	114	-	+	-	+	nein	nein	nein	s	s	s	s	s	s	s	s
550	<i>S.aureus</i>	266	-	+	+	-	ja	nein	nein	s	s	r	r	r	s	s	r
551	<i>S.aureus</i>	203	-	+	-	-				s	s	s	r	s	s	s	s
552	<i>S.aureus</i>	568	-	+	-	-				s	s	r	s	r	r	s	r
553	<i>S.aureus</i>	685	-	+	-	-				s	s	s	s	s	s	s	s
554	<i>S.aureus</i>	1113	-	+	-	-				s	s	r	s	s	s	s	s
555	<i>S.aureus</i>	458	-	+	-	-				s	s	r	s	s	s	s	s
556	<i>S.aureus</i>	1052	-	+	+	-				s	r	r	r	r	r	s	r

Lfd.N. (WÜ)	Pathogen	Isol. No.	Bio- film	<i>ica</i> - Operon	IS256	IS257	Biofilminduktion durch			Resistenz gegen							
							Syn- ercid	Tetra- cyclin	NaCl	VA	OX	TE	P	E	C	DA	CN
557	<i>S.aureus</i>	1056	-	+	-	+				s	s	r	r	s	s	s	s

8.2. Abkürzungen

<i>agr</i>	accessory gene regulator
Ap/Ap ^r	Ampicillin/Ampicillinresistenz
BHI	Brain Heart Infusion Broth
bp	Basenpaare
Cm/Cm ^r	Chloramphenicol/Chloramphenicolresistenz
CN	Gentamicin
DA	Clindamycin
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
E	Erythromycin
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde
Hla	a-Toxin
<i>ica</i>	intercellular adhesin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani Broth
M	Molar
mg	Milligramm
MH	Müller-Hinton Broth
min	Minute
ml	Mililiter

mM	Millimolar
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino) Propan Sulfoninsäure
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
OX	Oxacillin
P	PenicillinG
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>sar</i>	staphylococcal accessory regulator
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SSC	Standard Salin Citrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tetracyclin
TPE	Tris-Phosphat-EDTA
TSB	Tryptic Soyabean Broth
ÜN	Übernacht
ÜNK	Übernachtskultur
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VA	Vancomycin
W	Watt
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucoside
μ g	Mikrogramm

8.3. Publikationen und Tagungsbeiträge

8.3.1. Publikationen

1. Rachid, S., S. -H. Cho, K. Ohlsen, J. Hacker, and W. Ziebuhr. 2000. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: The possible involvement of the alternative transcription factor sigB. *Adv. Exp. Med. Biol.* **485**:159-166.
2. Cho, S. -H., K. Naber, J. Hacker, and W. Ziebuhr. 2001. Isolation of a spontaneous biofilm-negative *ica*::IS256 insertion mutant in a *Staphylococcus epidermidis* strain obtained from a urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* Submitted.
3. Cho, S. -H., J. Hacker, and W. Ziebuhr. 2001. Comparison of the distribution of insertion sequence element IS256 and intercellular adhesion (*ica*) gene cluster between clinical and saprophytic isolates in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. In preparation.

8.3.2. Tagungsbeiträge

1. Rachid, S., K. Ohlsen, S. -H. Cho, J. Hacker, and W. Ziebuhr. Influence of antibiotics, environmental factors and internal regulatory signals on the polysaccharide intercellular adhesin (PIA) expression in biofilm forming *Staphylococcus epidermidis*. FEMS symposium "Genes and proteins underlying"- Basic aspects and applications. Pécs, Hungary, September 16-19, 1999.
2. Cho, S. -H., J. Hacker, and W. Ziebuhr. Detection and characterization of phase variation of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by the naturally occurring insertion sequence element IS256 in *S. epidermidis* 569. International meeting 2001, The Microbiological Society of Korea. May 11, 2001.

8.4. Lebenslauf

Name: Seung-Hak Cho
Geburtsdatum: 28. 01. 1965
Geburtsort: Seoul in Süd-Korea

Ausbildung

1972-1978 Grundschule Noryang-Jin in Seoul
1978-1982 Mittelschule Han-Gang in Seoul
1982-1985 Oberschule Sang-Mun in Seoul

Studium

1985-1989 Landwirtschaftstudium an der Kon-Kuk Universität in Seoul (Bachelor)
1992-1995 Landwirtschaftstudium an der Kon-Kuk Universität in Seoul (Master)
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Chang-Sul Yang
Thema „A new selective medium for isolation of soil Actinomycetes“
1995-1996 Deutschsprachkurs in Osnabrück

Seit März 1997 Anfertigung der Dissertation am Institut für Molekulare
Infektionsbiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof.
Dr. J. Hacker

Wehrdienst

1989-1992 Wehrdienst in Won-Ju