

Aus dem Institut für Molekulare Infektionsbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker

**Identifizierung immunodominanter antigener Strukturen
von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)
mit Hilfe einer Expressionsgenbank**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Ronny Langenhan
aus Frauenfeld

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Professor Dr. med. Dr. h. c. A. Thiede

Koreferent: Professor Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 08.06.2005

Der Promovend ist Arzt

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	1
I. 1 Historischer Rückblick	1
I. 2 Klinik der Staphylokokkeninfektion	2
I. 3 Pathogenese von Staphylokokkeninfektionen	4
I. 4 Epidemiologie der Antibiotikaresistenz	7
I. 5 Molekulare Mechanismen der Resistenz	9
I. 6 Ziele der Arbeit	15
II Material	17
II. 1 Geräte	17
II. 2 Chemikalien	18
II. 3 Medien und Agarplatten	18
II. 4 Größenmarker für Agarosegele	20
II. 5 verwendete Oligonukleotide	20

III Methoden	23
III. 1 Isolierung von chromosomaler DNA aus dem MRSA-Stamm A 134	23
III. 1. 1 Isolierung durch Ethanol-fällung nach enzymatischer Lyse (TNEX-Methode)	23
III. 1. 2 DNA-Isolierung mittels NUCLEOBOND-Kit	23
III. 2 Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook <i>et al.</i>, 1989)	25
III. 3 DNA-Partialverdau mit der Restriktionsendonuklease <i>Sau3A I</i>	25
III. 4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA- Fragmenten (Sambrook <i>et al.</i>, 1989)	26
III. 5 Isolation von DNA aus Agarose (Geneclean-Kit, Dianova)	28
III. 6 Ligation von <i>Sau3A I</i> gespaltener chromosomaler DNA in den ZAP- Express-Vektor™	28
III. 7 Ausplattieren der verpackten Ligationsprodukte	29
III. 8 Plaque – Lifting	30
III. 9 Präadsorption der zu testenden Seren und Kontrolle mittels Dot Blot Test	31
III. 10 Screening der Nitrocellulosemembranen mit dem Patientenserum und dem Kontrollserum	32
III. 11 Isolierung des positiven Antikörpersignals	33

III. 12 Probe der positiven Plaques	34
III. 13 Helferphagen	34
III. 13. 1 Bestimmung des Titers des verwendeten Helferphagens	34
III. 13. 2 Amplifikation des Helferphagen	35
III. 13. 3 Einzelklonisierung mit Hilfe des Helferphagen	36
III. 14 Plasmidisolierung kleiner Maßstab (DNA-Reinigung über Diatomeenerde)	36
III. 15 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	38
III. 16 Sequenzierung der DNA-Inserts (ABI Prism 310 Genetic Analyser)	39
III. 16. 1 Vorbereitung der DNA-Proben	39
III. 16. 2 Aufreinigung des Reaktionsansatzes	40
III. 16. 3 Sequenzierung	40
III. 17 Datenbankanalyse	41

IV Ergebnisse	42
IV. 1 Erstellen einer Genbank von Methicillin-resistenten <i>S. aureus</i> mit Hilfe des ZAP-Express-Vektor-SystemsTM	42
IV. 1. 1 Isolierung chromosomaler DNA zur Herstellung der Genbank	43
IV. 2 Aufspüren immunodominanter Antigene mit Hilfe der Expressionsgenbank	45
IV. 2. 1 Präadsorption der zu testenden Seren und Kontrolle mittels Dot Blot Test	47
IV. 2. 2 Identifizierung und Amplifizierung positiver Klone	49
IV. 3 Charakterisierung immunpositiver Klone	52
IV. 3. 1 Charakterisierung der Insertelemente durch Gelelektrophorese	52
IV. 3. 2 Charakterisierung der Insertelemente durch DNA-Sequenzierung	54
IV. 3. 3 Charakterisierung der Insertelemente durch Homologievergleiche in Datenbanken	55
IV. 3. 3. 1 Klon I	55
IV. 3. 3. 2 Klon II	59
IV. 3. 3. 3 Klon III	61
IV. 3. 3. 4 Klon V	65

V Diskussion	70
V. 1 Herstellung einer MRSA-Genbank	72
V. 2 Screening der Genbank	74
V. 3 Sequenzierung	75
V. 3. 1 Phagenspezifische Genexpression während einer Infektion	75
V. 3. 2 Ein Cadmiumresistenzprotein als immundominantes Antigen	83
V. 3. 3 Pathogenitätsinseln als Mediatoren einer Immunreaktion	85
V. 3. 4 Protein A als immunologisches Analysewerkzeug oder Immundominantes Target ?	87
VI Zusammenfassung	92
VII Literaturverzeichnis	94
VIII Anhang	110
VIII. 1 Übersicht der Klonsequenzen	110
VIII. 1. 1 Klon I	110
VIII. 1. 2 Klon II	112
VIII. 1. 3 Klon III	113

VIII. 1. 4 Klon V 113

VIII. 2 Abkürzungen 116

Danksagung

Lebenslauf

I Einleitung

I. 1 Historischer Rückblick

Bereits im Jahre 1871 wurden Berichte über rundliche, kokkoide Elemente in Abszessen, in Eiter sowie im Blut von pyämischen Patienten erfasst. 1878 erkannte Robert Koch den Zusammenhang zwischen dem Aussehen verschiedener grampositiver Kokken und der von ihnen verursachten Krankheiten aufgrund seiner Untersuchungen zur "Ätiologie von Wundinfektionen". Im Jahre 1890 stellte der schottische Chirurg G. Ogston seine Arbeiten über Staphylokokken in einem berühmt gewordenen Vortrag vor. Aufgrund der traubenförmigen Anordnung der Kokken (Abb. 1), die er in verschiedenen Eiterungsprozessen stets in reichlichen Mengen nachweisen konnte, bezeichnete Ogston diese pyogenen Mikrokokken als Staphylokokken (von griech. *staphyle* = Traube) (Ogston, 1882).

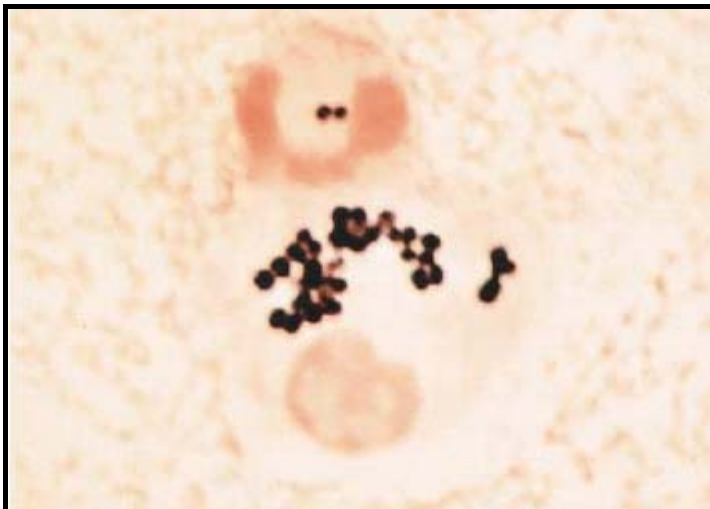


Abb. 1: Gramfärbung von *S. aureus* mit polymorphkernigen Leukozyten in einer Sputumprobe (aus Lowy, 1998).

Der Beweis für die Virulenz dieses Erregers wurde 1941 erbracht, als Skinner und Keefer über die steigende Mortalitätsrate berichteten, die mit einer *Staphylococcus aureus*-Sepsis verbunden war und zu jener Zeit im Boston City Hospital bei 82 % lag (Skinner und Keefer, 1941; Archer, 1998).

Mikroskopisch erscheinen Staphylokokken nach einer Gramfärbung als grampositive, meist in Haufen gelagerte, unbewegliche und nicht Sporen bildende Mikrokokken (siehe Abb. 1). Die meisten Staphylokokken sind natürliche Besiedler der Haut und

Schleimhäute von Säugetieren und Vögeln (Kloos und Lambe, 1991). Lange Zeit erfolgte die Klassifikation der ständig wachsenden Speziesvielfalt der Staphylokokken anhand der Pigmentierung. Danach war *S. aureus* die klassische pathogene Art, deren Kolonien goldgelb sind, und *S. albus*, die apathogene Form, mit charakteristischen weißen Kolonien. *S. aureus* läßt sich anhand der goldfarbenen Pigmentierung der Kolonien und der positiven Reaktion der Koagulase, des Mannitfermentations- und Desoxyribonukleastests differenzieren (lateinisch: *aureus* = golden). Die von Daranyi (1926) vorgeschlagene Einteilung der Staphylokokken in Plasmakoagulase-positive (*S. aureus*-Gruppe) und Plasmakoagulase-negative Arten konnte molekular-genetisch zwar nie untermauert werden, für die Praktikabilität und die klinische Relevanz in Bezug auf die Pathogenität stellte diese sich aber als vorteilhafter und verständlicher heraus. Hiernach korreliert die Pathogenität eines Stammes mehr mit der Fähigkeit zur Produktion von Koagulase als mit der zur Pigmentierung. Alle koagulasepositiven Staphylokokken humanen Ursprungs gehörten nun zur Gruppe des *S. aureus*. *S. aureus* selbst ist Mitglied der Familie der *Micrococcaceae*.

I. 2 Klinik der Staphylokokkeninfektion

Die größte pathogene und damit klinische Bedeutung kommt der koagulasepositiven Spezies *S. aureus* zu. Dies liegt zum einen an dem grossen Spektrum der lebensbedrohlichen Infektionen durch diesen Keim, zum anderen auch an seiner Fähigkeit, sich rasch den veränderten Umweltbedingungen anzupassen (Waldvogel, 2000). Die Stämme dieser Art sind an Menschen und Tiere adaptiert und können auch im umgebenden Milieu einige Zeit überleben. Das Spektrum der Infektionen, das durch *S. aureus* hervorgerufen wird, reicht von einfachen Infektionen der Haut, die sich meist selbst limitieren, bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen der inneren Organe (Crossley und Archer, 1997).

Diese Infektionen lassen sich in oberflächliche, invasive und Toxin-vermittelte Erkrankungen einteilen (Tab. 1). Die oberflächlichen und invasiven Infektionen können einer Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren zugeschrieben werden, deren Expression eine komplexe Regulation vorausgeht. Sowohl intra- als auch extrazelluläre Signale, die auf eine *S. aureus*-Bakterienzelle einwirken, haben auf diese Regulation großen Einfluss

(Chan und Foster, 1998; Lindsay und Foster, 1999; Novick, 2000; Balaban *et al.*, 2001; Novick, 2003). Daran sind, neben dem *agr* (accessory gene regulator)-System, verschiedene andere Regulationselemente wie das *sar* (staphylococcal accessory regulator)-System beteiligt, die gemeinsam ein komplexes Netzwerk bilden (McNamara und Iandolo, 1998; Fournier *et al.*, 2001; Novick, 2003; Cheung *et al.*, 2004).

Tab. 1: Infektionen und Syndrome, die durch *S. aureus* verursacht werden.

<u>Kutane Infektionen</u>	<u>Invasive Infektionen</u>
-Furunkel und Karbunkel	-Akute Endokarditis
-Impetigo bullosa	-Septische Arthritis
-Chirurgische Wundinfektionen	-Hämatogene Osteomyelitis
<u>Toxikonosen</u>	-Empyem
-Staphylococcal Scaled Skin Syndrom	-Septischer Schock
-Toxic Schock Syndrom	-Pyomyositis
-Gastroenteritis aufgrund verdorbener Lebensmittel	-Nierenabszess

Oberflächliche *S. aureus*-Erkrankungen

Eine häufige und typische *S. aureus*-Infektion ist der Furunkel, ein in der Haut von den Talgdrüsen oder Haarbälgen ausgehender Miniabszess. Mehrere konfluierende Furunkel werden als Karbunkel bezeichnet. Weitere häufige oberflächliche Prozesse, die durch *S. aureus* ausgelöst werden, sind die Pyodermie, meist als Mischinfektion mit *Streptococcus pyogenes* (Impetigo contagiosa) und Wundinfektionen (Tab. 1).

Invasive *S. aureus* -Erkrankungen

Abszesse, die oberflächlich vorkommen, können auch in allen Weichteilen und allen Organen auftreten. Empyeme durch *S. aureus* finden sich daher oft in Körperhöhlen,

z.B. Pleura und in Gelenken (Lowy, 1998). Neben der Sepsis durch *S. aureus* ist die Endokarditis eine weitere, oft letal verlaufende Erkrankung. Intravasal gelegene Katheter sind dabei oft die Eintrittspforte für die Erreger. Dabei stellen die meist vorgeschädigten infizierten Herzklappen den Focus für eine anschließende, möglicherweise foudroyant verlaufende Sepsis dar (Bassetti *et al.*, 2004). Die eitrige Parotitis und die Mastitis puerperalis als weitaus seltener vorkommende Infektionen sind pathognomonisch mit *S. aureus* verbunden. Ebenso die primäre hämatogene infantile Osteomyelitis wie auch die chronische sekundäre Osteomyelitis sind oft durch diesen Keim bedingt (Tab. 1).

Toxin-vermittelte *S. aureus*-Erkrankungen

Dabei kann der toxinproduzierende Infektionsherd unter Umständen inapparent bleiben oder die Toxinbildung kann, wie bei der enterotoxinbedingten Gastroenteritis überwiegend außerhalb des Patienten (in Lebensmitteln) stattfinden. Das Staphylococcal Scaled Skin Syndrom, eine vorwiegend bei Säuglingen (Morbus Ritter von Rittershain) und Kleinkindern auftretende Erkrankung, die abrupt mit generalisierten Erythem und Fieber beginnt, führt nach Stunden zu großflächigen Epidermolysen mit Blasenbildung. Pathogenetisch zugrunde liegt eine intradermale Spaltbildung mit nachfolgendem Ödem zwischen *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* als Folge der Zelldesintegration durch die Wirkung des Exfoliativ-Toxins. Das Toxic-Shock-Syndrom (TSS) wurde erstmals 1978 beschrieben. Die im Zusammenhang mit der Menstruation auftretende Form ist mit ca. 90 % wesentlich häufiger als das nichtmenstruelle TSS. Es ist ein symptomreiches klinisches Bild, da meistens mehrere Organe in ihrer Funktion bis hin zum völligen Versagen eingeschränkt werden (Lowy, 1998), (Tab. 1).

I. 3 Pathogenese von Staphylokokkeninfektionen

Die Schritte der Infektion durch *S. aureus* umfassen Kolonisation, Lokalinfektion, systemische Streuung (Bakteriämie) und/oder Sepsis, metastatische Absiedlung und die Toxinose. Durchschnittlich 30 % der gesunden Individuen sind symptomlose Träger von *S. aureus* (Eiff *et al.*, 2001). Der Keim ist als Kommensale der physiologischen Körper-

flora von Mensch und Tier anzusehen (Kloos und Lambe, 1991). *S. aureus* ist beim Menschen auf der Schleimhaut der vorderen Nasenhöhle, des Rachens, der Ausführungsgänge der Brustdrüse und in geringem Umfang auch im Darm angesiedelt.

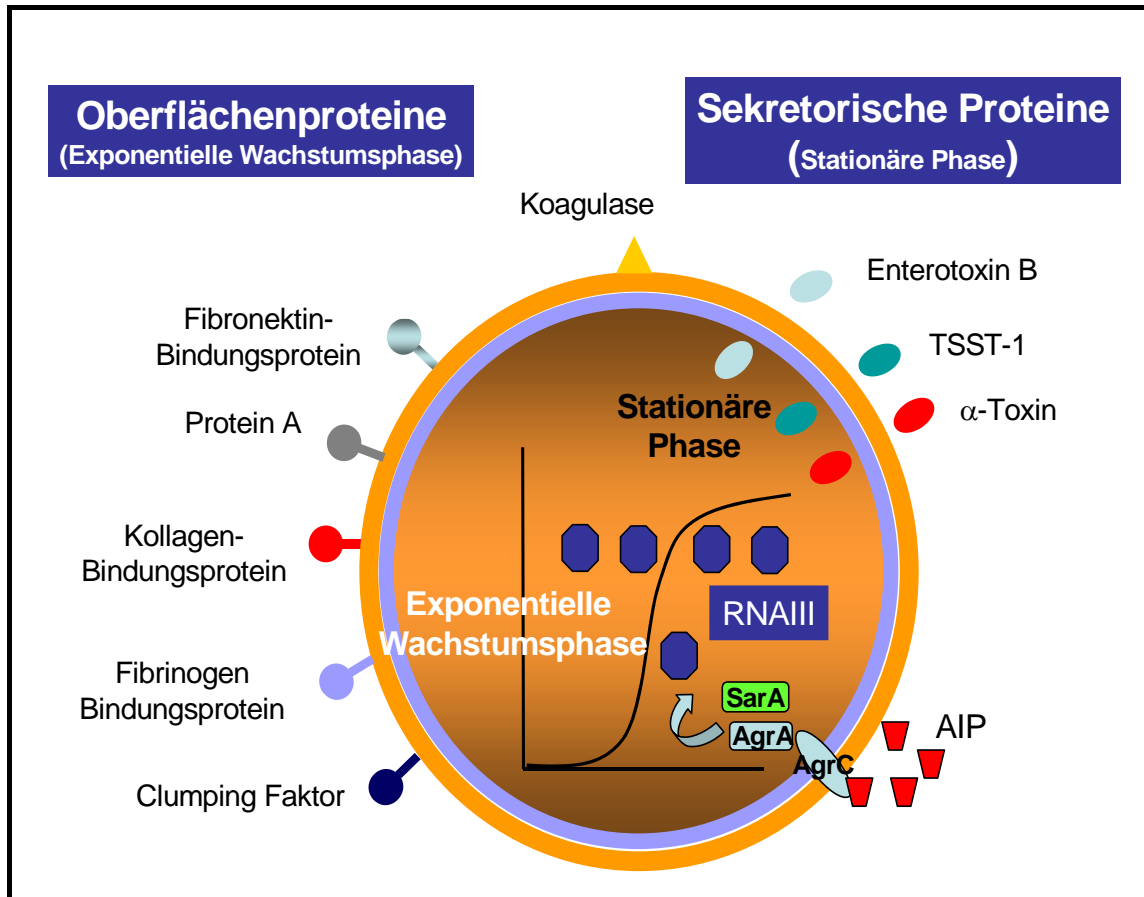


Abb. 2: Schematische Darstellung einer *S. aureus*-Bakterienzelle mit Oberflächen- und Sekretionsproteinen. Die Expression der jeweiligen Proteine ist dabei abhängig von der Phase des Bakterienzellzyklus. Aufgeführt sind ebenfalls die Regulationselemente des *agr* (accessory gene regulator)-Systems und *sar* (staphylococcal accessory regulator)-Systems.

Von der Hautoberfläche sind insbesondere die Perinealregion und die Achselhöhlen zu nennen. Die Erreger können Wochen bis Monate asymptomatisch auf den Schleimhäuten persistieren. Lokale Abszesse der Haut oder der Hautanhangsgebilde entstehen, wenn die Erreger in die Haut inokuliert werden, also die schützende Hautbarriere durchbrochen haben. Die Infektion kann lokal persistieren oder durch Zugang zum Gefäßsystem sich generalisierend ausbreiten. Einmal im Blut verteilt, können sich die Erreger in fast allen Organsystemen des Körpers absiedeln und zu einem septischen Schock führen. Ohne spezifische Therapie wäre hier die Mortalitätsrate extrem hoch.

Aufgrund der hämatogenen Streuung können eine Vielzahl von Staphylokokken-spezifischen Infektionen resultieren, z.B. Endokarditis, Osteomyelitis, Nierenkarbunkel, Septische Arthritis oder Epiduralabszesse. Bestimmte Faktoren wie Diabetes mellitus, i.v.-Katheter, Drogenmissbrauch und HIV-Infektion prädisponieren zu einer Infektion durch Staphylokokken (Malanoski *et al.*, 1995; Mathew *et al.*, 1995).

Die Ursache dafür, dass diese Organismen eine so große Vielfalt von pathogenen Prozessen und Infektionen verursachen können, liegt auch an der großen Anzahl von Virulenzfaktoren (Abb. 2 und Tab. 2). Spezifische Faktoren erlauben es dem Erreger in das umliegende Gewebe einzudringen, Abszess-bildende Prozesse in Gang zu setzen, septische Syndrome auszulösen und durch massive Freisetzung von Zytokinen toxische Syndrome zu erzeugen.

Tab. 2: Virulenzfaktoren von *S. aureus*.

<u>Oberflächenproteine</u>	<u>Toxine</u>
-Protein A	-TSST (toxic schock syndrom toxin)
-Teichonsäuren	-Enterotoxine (A-O)
-Bindungsproteine für Fibrinogen, Fibronektin, Laminin, Kollagen, Vitronektin und Thrombospondin	-Zytolytische Toxine (alpha, gamma) -Exfoliativtoxin (staphylococcus scaled skin syndrom)
<u>Gewebsinvasive Mechanismen</u>	
-Protease, Nuklease, Lipase	
-Hyaluronidase	
-Staphylokinase	
-Leukozidine und/oder gamma-Toxin	
-Fettsäure-metabolisierende Enzyme	

I. 4 Epidemiologie der Antibiotikaresistenz

Sowohl die Anzahl der nosokomialen Infektionen als auch die Resistenzen der bakteriellen Keime gegenüber den klassischen Chemotherapeutika zeigten in den letzten Jahren eine deutliche Zunahme. Von einer derartigen Resistenzentwicklung sind neben *Streptococcus pneumoniae* und *Mycobacterium tuberculosis* in erster Linie Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) betroffen. In einigen westeuropäischen Ländern (Frankreich, Spanien, Portugal) sind bereits über 30 % aller klinischen *S. aureus*-Isolate methicillinresistent. Einen Überblick über den Anteil von MRSA unter allen *S. aureus*-Stämmen weltweit gibt Abb. 3.

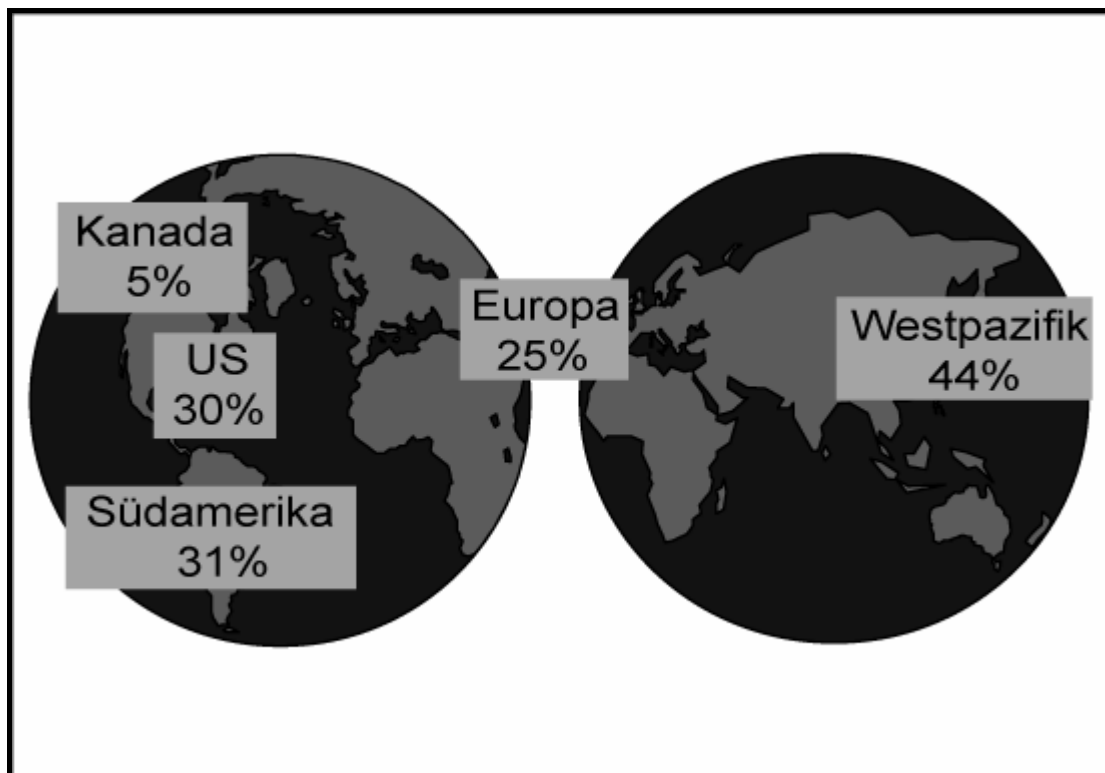


Abb. 3: Proportion der Methicillin-resistenten Stämme (MRSA) unter allen *S. aureus*-Stämmen, die eine Bakteriämie verursachen (aus Fluit *et al.*, 2001).

Der Inzidenzanstieg von mehrfach-resistenten Infektionserregern ist in erster Linie bedingt durch den vermehrten Einsatz von Antibiotika und der Anwendung von i.v.-Kathetern. Auch die Zunahme von immunsupprimierten Patienten und nicht zuletzt das rasante Tempo der Resistenzentwicklung der Staphylokokken und hier insbesondere der MRSA haben entscheidenden Einfluss auf diese Entwicklung (Hryniewicz, 1999).

MRSA wurden erstmals 1961 in England isoliert, kurz nach der Entwicklung des Methicillins, des ersten Penicillinase-resistenten, halbsynthetischen Penicillins (Jevons, 1961). Seitdem entwickelten sich MRSA zum weitverbreitetsten Erreger von nosokomialen Infektionen weltweit (Archer, 1998), und die Inzidenz ist in vielen Ländern weiter im Anstieg (Katayama *et al.*, 2000; Michel und Gutmann, 1997; Nicas *et al.*, 1997; Kuoda *et al.*, 2001). Auf chirurgischen Stationen kommt es durch diesen mehrfachresistenten Keim oftmals zu regelrechten Epidemien mit schweren Komplikationen, die im Wesentlichen vom Immunstatus des Patienten und der Virulenz des Erregers bestimmt werden. Dabei ist der Keim die häufigste Ursache von oberflächlichen und tiefen Wundinfektionen und einer der häufigsten Erreger bei Septikämien und Pneumonien, von welcher insbesondere die letzteren oft mit schlechten Prognosen einhergehen und mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden sind (Tab. 3). Besonders alarmierend ist dabei die Tatsache, dass die Infektionen durch MRSA-Stämme dramatisch an Zahl zugenommen haben (Witte und Klare, 2001). Bei Auftreten von schwerwiegenden Infektionen bis hin zur Sepsis durch MRSA zeigte sich in Untersuchungen eine Verdopplung der Letalitätsrate im Vergleich zu Fällen von schwerwiegenden Infektionen durch MSSA (Methicillin-sensible *S. aureus*), (Cosgrove *et al.*, 2003). Die Prävalenz von MRSA lag 2001 in Deutschland bei 21 % (Witte und Klare, 2001). Darüber hinaus besitzen MRSA häufig noch zusätzliche Resistenzdeterminanten. Solche sogenannten multiresistenten *S. aureus*-Stämme sind heute praktisch nur noch mit Glykopeptiden (Vancomycin, Teicoplanin) therapierbar. Seit 1992 wird in Deutschland eine überregionale Ausbreitung bestimmter MRSA-Klone zwischen Krankenhäusern beobachtet, die als Alarmsignal verstanden werden sollten.

Tab. 3: Anteil von MRSA an nosokomialen Infektionen (NI), Pneumonien, Sepsis und Harnwegsinfekten (HWI) auf deutschen Intensivstationen (aus Gastmeier *et al.*, 2002).

Erreger	alle NI	Pneumonie	Sepsis	HWI
MRSA: n= 219 <i>S. aureus</i> : n=1535	14,3 %	12,9 %	23,3 %	24,4 %

Die kürzlich immer öfter erscheinenden Berichte von Vancomycin-resistenten *S. aureus*-Stämmen lassen die Befürchtung wahr werden, dass in naher Zukunft Infektionen durch bestimmte *S. aureus*-Stämme durch eine traditionelle Chemotherapie nicht mehr zu behandeln sind (Tenover *et al.*, 2001). Die daraus resultierenden medizinischen, ökonomischen und sozialen Probleme wären nicht zu überschauen (Tab. 4)

Tab. 4: Postoperative Wundinfektion (WI) und Erregerspektrum in den USA
(aus Engemann *et al.*, 2003).

	Kleine WI (n=193)	MSSA-WI (n=165)	MRSA-WI (n=121)
Letalität (%)	2,1	6,7	20,7
Kosten (Mio. USD)	29 500	52 800	92 400

I. 5 Molekulare Mechanismen der Resistenz

Die Einführung antibiotisch wirksamer Substanzen in die Medizin ermöglichte eine erfolgreiche und eindrucksvolle Therapie vieler bakterieller Infektionserkrankungen, deren z.T. hohe Mortalitätsraten weltweit stark reduziert werden konnten. Gleichzeitig hat die breite medizinische wie außermedizinische Anwendung der Antibiotika neue Probleme geschaffen. Resistenzentwicklungen können mittlerweile in jeder Gruppe der pathogenen Bakterien beobachtet werden (Swartz, 1994). In zunehmendem Maße werden Krankheitserreger isoliert, die sich als unempfindlich gegenüber einem oder auch mehreren Antibiotika gleichzeitig erweisen. Diese Tatsache hat zur Folge, dass die Zahl der noch wirksamen Chemotherapeutika zur Bekämpfung einer Infektionskrankheit stark eingeschränkt wird. Diese Problematik zwingt den Therapeuten dazu, auf weniger verträgliche Mittel überzugehen, sofern die Therapie nicht gänzlich unmöglich wird. Ein bakterieller Infektionserreger gilt dann als resistent gegen ein antibakterielles Chemotherapeutikum, wenn dessen Konzentration am Infektionsort nicht ausreicht, um seine Vermehrung zu hemmen oder um ihn abzutöten.

Das Auftreten der Resistenz gegen Antibiotika kann dabei auf verschiedene Art und Weise erfolgen. Zum einen können sich **neuartige Resistenzmechanismen** entwickeln, wie es besonders im Zusammenhang mit dem Auftreten multiresistenter *Pseudomonas aeruginosa* deutlich wurde. Zum Beispiel erweiterte der Katecholaminporter, der eine wichtige Rolle bei der Eisenversorgung spielt, sein Substratspektrum durch verschiedene Mutationsschritte, sodass eine Vielzahl von kationischen Substanzen einschließlich antibakterieller Chemotherapeutika, wie z.B. β -Laktame, Fluoroquinolone und Chloramphenicol, hinzu gekommen sind (Poole, 1994, 2004).

Mutationen von Plasmid-kodierten β -Laktamasen sind ein weiterer Mechanismus der Antibiotikaresistenzentwicklung. Die Laktamasen TEM, SHV, OXA hydrolysieren normalerweise Penicillin, Aminopenicilline, Acylureidopenicilline sowie Cephalosporine der 1. und 2. Generation, nicht aber Cephalosporine der 3. Generation, wie Cefotaxim, Ceftazidim und Ceftriaxon (Bush *et al.*, 1995; Jacoby und Medeiros, 1991). Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch am Wirkungszentrum oder in dessen unmittelbarer Nähe führen, modifizieren diese Enzyme, sodass auch Cephalosporine der 3. Generation hydrolysiert werden (Bauernfeind *et al.*, 1993; Sanders und Sanders, 1988).

Vergleichbare Auswirkungen in Bezug auf die Resistenzentwicklung haben die **Inhibition der Aufnahme von Antibiotika in den periplasmatischen Raum** gramnegativer Bakterien durch die fehlende Synthese bestimmter Proteine der äußeren Membran, die eine Porinfunktion aufweisen. Dieser Mechanismus spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Resistenzentwicklung von *Pseudomonas aeruginosa* und von *Enterobacteriaceae*-Spezies gegen Carbapeneme und trägt gleichzeitig auch zu einer verminderten Empfindlichkeit gegen Chinolone bei (Nikaido, 1994).

Mutationen, die zur relativen Unempfindlichkeit der Wirkorte von Chinolonen führen, sind eine andere Variante für Resistenzentstehung. Chinolone hemmen die DNA-Gyrase und die Topoisomerase IV. Die Aufgabe dieser Enzyme liegt im Entknäulen und Verknäulen des DNA-Moleküls bei der Replikation. Ein Aminosäureaustausch in der A-Untereinheit der Gyrase setzt bereits deren Empfindlichkeit gegen Chinolone herab, mehrere aufeinanderfolgende Mutationen führen dann zur Resistenz

(Heisig *et al.*, 1993). Diese Resistenzmechanismen beruhen auf Mutationen, die an sich selten sind, aber bei jedem Erreger auftreten können. Ob ein Stamm, der von einer derartigen Mutation betroffen ist, aus einer riesigen Anzahl empfindlicher Stämme selektiert wird und sich ihnen gegenüber durchsetzt, hängt vor allem auch vom chemotherapeutischen Selektionsdruck ab, z.B. von den subinhibitorischen Chemotherapeutikakonzentrationen im Krankenhausmilieu.

Ein Beispiel für die **Übertragung bereits bekannter Resistenzmechanismen in „neue“ Erregerpopulationen** ist die Methicillinresistenz bei klonalen Gruppen von *S. aureus* und *S. epidermidis*, die bisher empfindlich waren. Der Erwerb des *mecA*-Gens, das für ein Penicillinbindeprotein (PBP) mit nur geringer Affinität für β -Laktam-Antibiotika kodiert, bedeutet für die Staphylokokkenstämme eine weitaus geringere Empfindlichkeit gegen die bisher bekannten β -Laktam-Antibiotika. Das *mecA*-Gen kodiert für das PBP 2a (auch bekannt als PBP 2'), ein induzierbares 76-kDa großes PBP. Dieses Protein ist verantwortlich für die Methicillinresistenz. Sowohl empfindliche als auch nicht empfindliche Stämme von *S. aureus* bilden die vier Haupt-PBP, PBP 1, 2, 3 und 4 mit einer molekularen Größe von 85, 81, 75 und 45 kDa (Georgopapadakou und Liu, 1980; Reynolds, 1988). PBP sind membrangebundene DD-Peptidasen, die sich aus Serinproteasen entwickelt haben, und deren biochemische Aktivität ähnlich der von Serinproteasen ist. Diese Enzyme katalysieren die Transpeptidasereaktionen, die die Peptidketten der bakteriellen Zellwand untereinander zum Peptidoglykan vernetzen (cross-linking). PBP 1, 2 und 3 haben hohe Affinität zu den β -Laktam-Antibiotika und sind deshalb essentiell für das Zellwachstum und das Überleben der empfindlichen Stämme. Binden β -Laktam-Antibiotika an diese PBP, bedeutet dies die Zerstörung der Zelle. In Methicillin-resistenten Stämmen, welche das PBP 2a aufweisen, besteht eine geringere Affinität zu diesen Antibiotika. Die oben angesprochenen wichtigen Funktionen der PBP für das Zellwachstum und das Überleben können diese *low-affinity-PBP* so in weitaus höheren Dosen von β -Laktam-Antibiotika ausführen, ohne dass dabei die Zelle abgetötet wird (de Jonge und Tomasz, 1993). PBP 2a, das *mecA*-Genprodukt, gehört zu den hochmolekularen Klasse B-PBP. Die Ursprünge von *mecA* sind bisher unklar. Eine *mecA*-Homologie zu 88 % der Aminosäuren zeigt sich zu dem *mecA*-Produkt in Methicillin-resistenten Staphylo-

kokken der Art *S. sciuri* (Wu *et al.*, 1996). Die *mecA*-Homologie in dieser Spezies ist zwar ubiquitär vorhanden, phänotypisch weisen diese Stämme aber eine Sensibilität gegenüber Methicillin auf. Diese und andere Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass *mecA* ursprünglich von koagulasenegativen Staphylokokken-Stämmen abstammte, wahrscheinlich von einem nahe verwandten Stamm von *S. sciuri* (Archer *et al.*, 1994; Hiramatsu, 1995). Alle MRSA-Stämme wären so klonale Nachkommen von einigen Stämmen, die alle *mecA*-positiv sind (Kreiswirth *et al.*, 1993). Wie das *mecA*-Gen in die MRSA-Stämme gelangt, ist bisher unklar. Transposition erscheint ein plausibler Mechanismus.

Kürzlich wurden sogenannte SCC*mec*-Elemente („staphylococcal chromosome cassette“), die mobile genetische Elemente darstellen, beschrieben. Dieses SCC*mec*-Element kommt als genomische Inselstruktur auf allen MRSA-Stämmen vor (Ito *et al.*, 2003). Das Element inseriert in das Genom von *S. aureus* an einer definierten Stelle, dem *orfX*, das ein unbekanntes Protein kodiert. Auf dem SCC*mec* Element befinden sich neben dem *mecA*, noch regulatorische Gene, die von β -Laktamase-Regulatoren abstammen, und die Rekombinasen *ccrA* und *ccrB*, die für den Transfer der Insel notwendig sind. Lange Zeit waren vier Typen von SCC*mec* beschrieben, wobei Typ I bis III bei Klinikisolaten gefunden wird und Typ IV ausschließlich bei MRSA-Stämmen außerhalb des Krankenhauses („community-acquired MRSA“) vorkommt (Katayama *et al.*, 2000). Kürzlich wurde ein fünfter Typ von SCC*mec*-Element vorgestellt, welcher auf dem Genom von einem weiteren „community-acquired MRSA“ in Australien gefunden wurde. Dieses Typ V-Element inseriert an derselben definierten Stelle im Genom wie die Typ I-IV SCC*mec*-Elemente. Allerdings ist dieses SCC*mec* ein kleines, ca. 28 kb grosses Element, das außer für die *mecA*-Resistenz für keine weiteren Antibiotikaresistenzen kodiert (Ito *et al.*, 2004).

Einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Oxacillin-Resistenzentwicklung von *S. aureus* in Deutschland gibt Abb. 4.

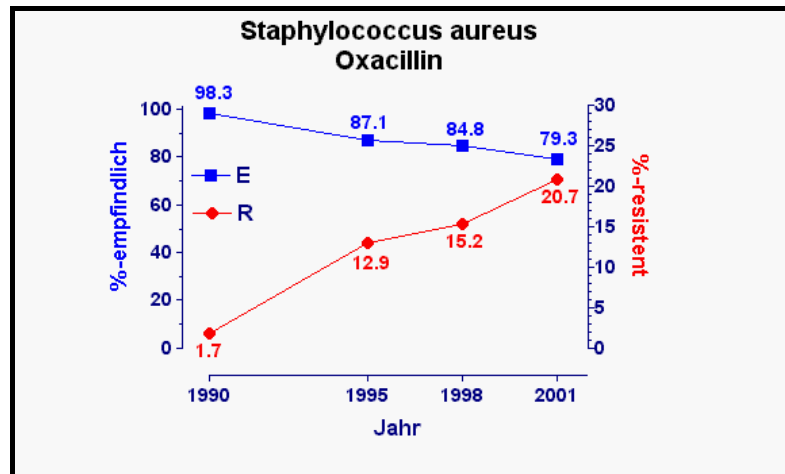


Abb. 4: Die Entwicklung der Oxacillinempfindlichkeit von *S. aureus* in den letzten 14 Jahren nach den Untersuchungen der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie: AG „Empfindlichkeitsprüfung und Resistenz“.

Durch aufeinanderfolgende Schritte der Resistenzentwicklung, sowohl durch Mutation als auch durch den Erwerb von Resistenzgenen, können Hospitalstämme entstehen, die gegen alle bisher zugelassenen antibakteriellen Chemotherapeutika resistent sind. Neben den Resistenzen, die auf Veränderungen des Wirkortes durch Mutation beruhen, sind in den meisten anderen Fällen **Resistenzgene auf Plasmiden und Transposons** lokalisiert, die sich zwischen anderen Stämmen, Spezies und sogar Genera vor allem durch **Konjugation** ausbreiten. Dabei ist das Ausmaß dieser Übertragung zwischen verschiedenartigen Bakterien erheblich größer als bisher angenommen wurde.

Von aktueller Bedeutung ist die Übertragung von Resistenzgenen zwischen Staphylokokken und Enterokokken. So wurden Gene für Hochresistenzen gegen Aminoglykoside und gegen die β -Laktamase sehr wahrscheinlich von Staphylokokken auf Enterokokken übertragen (Murray *et al.*, 1986; Kaufhold *et al.*, 1992). 1988 isolierte man den ersten *Enterococcus faecium*-Stamm mit verminderter Vancomycin-Empfindlichkeit (Leclercq *et al.*, 1988). VanA, die Resistenzdeterminante, die die Vancomycinresistenz bei Enterokokken vermittelt, sah man dann als potentiell übertragbar auf *S. aureus* an, dem man insgesamt ein erheblich höheres Maß an

Pathogenität zuschrieb als den Enterokokken (CDCP, 1997; HICPAC, 1995; Wenzel und Edmond, 1998). 1992 gelang dann die *in-vitro* Übertragung der Glykopeptidresistenz von Enterokokken auf *S. aureus* (Noble *et al.*, 1992). Bereits 1993 isolierte man schon zwei Vancomycin-intermediär-resistente MRSA-Stämme, als man eine gesamte Kultursammlung von 457 *S. aureus* Stämmen auf die Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin untersuchte. Diese beiden MRSA-Stämme, einer davon war der Stamm *S. aureus* 137-93, waren fähig Subpopulationen mit intermittierender Resistenz gegenüber Vancomycin zu bilden, das bis dahin als eine der „letzten Reserven“ in der Therapie von MRSA-Infektionen galt (Bierbaum *et al.*, 1999). 1997 isolierte man in Japan erstmalig einen *S. aureus*-Stamm mit reduzierter Vancomycinempfindlichkeit. (Hiramatsu *et al.*, 1997 ; Tenover *et al.*, 1998). Die genaue Klassifizierung der gegen Vancomycin weniger empfindlichen *S. aureus*-Stämme sorgte in den vergangenen Jahren für einige Verwirrung (Fridkin, 2001). Bei den bekannten Isolaten konnte man jedoch anfangs ein Vorliegen der Enterokokken-Resistenzgene *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD* und *vanE*, welche die Vancomycinresistenz von Enterokokken bedingen, nicht nachweisen. Die Vancomycinresistenz als Folge einer Konjugation der *vanA*-Gene von Enterokokken auf Staphylokokken war somit stark bezweifelt worden. Als wahrscheinlichsten Mechanismus der Resistenzentwicklung gegenüber Vancomycin war der erhöhte Zellwandumsatz, der zu einer Reduzierung der Quervernetzung der D-Alanyl-D-Alanin Seitenketten führt, angesehen worden. Diese veränderte Kettenstruktur ermöglicht es, dass Vancomycin vermehrt an der Außenseite der Zellwand binden muss und so an seinen üblichen Zielstrukturen nicht wirken kann (Sieradzki und Tomasz, 1999; Cui *et al.*, 2000; Hanaki *et al.*, 1998; Hiramatsu *et al.*, 1997). 2002 konnte in den USA dann erstmals ein *vanA*-positiver *S. aureus* (VRSA) isoliert werden (Chang *et al.*, 2003). Noch im selben Jahr isolierte man einen zweiten *vanA*-positiven *S. aureus* (VRSA)-Stamm in den USA (CDCP, 2002). Die Vancomycinresistenz des zweiten Stammes war jedoch geringer ausgeprägt, d.h. die MHK lag deutlich niedriger (16 -64 µg/ml) als bei dem ersten Stamm (Tenover *et al.*, 2004). Die Ursache für diese geringe MHK von Vancomycin ist bisher unbekannt. Wahrscheinlich hängt es mit der Expressionsstärke des *vanA*-Gens zusammen, das sich auf einem 120 kb großen Plasmid befindet (Firth und Skurray, 2000; Weigel *et al.*, 2003).

I. 6 Ziele der Arbeit

Die stetig ansteigende Zahl der gegen die geläufigen Antibiotikatherapien resistenten Bakterien macht es notwendig, neue Ziele für die Entwicklung antimikrobieller Therapien zu identifizieren und somit alternative Behandlungsstrategien zu entwickeln. Bislang wurden für die Therapien Substanzen eingesetzt, die entweder bakterizid oder bakteriostatisch sind. Damit sollten pathogene Bakterien aus dem infizierten Wirt eliminiert werden. Dabei handelt es sich um Substanzen, die nur in einige der bakteriellen Stoffwechselwege, wie Zellwandsynthese, Nukleinsäuremetabolismus oder Proteinsynthese eingreifen. In den letzten Jahren wurden neue Methoden zur Identifizierung von putativen Angriffsziele („Targets“) etabliert, welche die Suche nach neuen Therapieansätzen unterstützen. Die mittlerweile vollständige Sequenzierung zahlreicher Bakteriengenome (www.tigr.org) ermöglichte die Identifikation konservierter Gene durch subtraktive Genomanalyse, was ein entscheidender Schritt für die Entwicklung von Breitbandantibiotika war (Galperin und Koonin, 1999). Da jedoch auch hier im Verlauf mit dem Auftreten von Resistenzen zu rechnen ist, lohnt es sich nach neuen Behandlungsstrategien zu suchen. Die immunologische Antwort des menschlichen Körpers auf einen Infekt kann hier als Ausgangsmodell betrachtet werden.

Der Abwehrmechanismus des Körpers gegen *S. aureus* besteht zum einen in der zellulären Antwort, in erster Linie durch Granulozyten, zum anderen auch in der humoralen Reaktion. Ein Antikörpermangel oder ein Antikörperdefekt führt so zu einer Persistenz und Progredienz des Infektgeschehens (Lee *et al.*, 1993). Eine Möglichkeit der alternativen Therapie wäre neben der chemotherapeutischen Behandlung also die Entwicklung von immuntherapeutischen Ansätzen. Eine effektive Behandlung bakterieller Infektionen mit Antikörpern setzt jedoch potente antigene Bakterienzellstrukturen voraus, die entweder an der Bakterienzelloberfläche liegen oder von der Bakterienzelle sezerniert werden. Auch sollten diese Antigene bei allen Stämmen von *S. aureus* vorhanden sein (Vytvytska *et al.*, 2002). Entsprechende Studien mit diesem Therapieansatz wurden in den letzten Jahren veröffentlicht. Nilsson *et al.* (1998) stellte eine Arbeit vor, in der sowohl aktiv als auch passiv mit einem rekombinanten Fragment

eines Kollagen-Bindungsproteins von *S. aureus* geimpft wurde. Auch erfolgte schon eine Impfung gegen ein Fibronectin-Bindungsprotein von *S. aureus* um einer *S. aureus*-bedingten Mastitis bei Schafen vorzubeugen (Mamo *et al.*, 1995). Zwei aktuellere Arbeiten zu diesem Thema stammen aus den Jahren 2000 und 2002. In der Arbeit von Lorenz *et al.* (2000) wurden Patientenserum hinsichtlich ihrer *S. aureus*-spezifischen Reaktivität untersucht, um darüber die wichtigsten *in vivo* exprimierten und immunogen wirkenden Faktoren zu identifizieren. Dazu wurden Proteinfractionen von *S. aureus* über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend parallel mit Serum septischer Patienten und Normalserum inkubiert. Proteine, die nur mit den Patientenserum reagierte, wurden im Anschluss durch Proteinsequenzierung und Datenbanksuche analysiert. In der Studie von Etz *et al.* (2002) klonierte man sehr kurze DNA-Fragmente verschiedener *S. aureus*-Stämme in einen Expressionsvektor mit bekannten Oberflächenproteinen von *E. coli*. Die Genbanken wurden dann mittels Patientenserum nach einer *S. aureus*-Infektion nach immunodominanten Epitopen untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Patientenserum mit stattgehabter MRSA-Sepsis verwendet. Nach Herstellung einer Genbank von dem MRSA-Stamm A134 als ersten Schritt, erfolgte ein Screening der klonierten Proteinfragmente mit Hilfe eines Serum eines MRSA-Sepsis-Patienten im Vergleich zu einem Serum eines Nicht-MRSA-Sepsis-Patienten als Kontrolle. Das anschließende Sequenzieren der identifizierten, putativen immunodominanten Expressionsprodukte führte zur Beschreibung neuer möglicher Targetstrukturen für eine Immuntherapie von *S. aureus*-Infektionen. Da die während einer Sepsis freigesetzten intrazellulären und extrazellulären bakteriellen Produkte zu einer Induktion von spezifischen Antikörpern führen, ist die gewählte Versuchsanordnung eine Möglichkeit nach neuen immunodominanten Antigenstrukturen zu suchen. Die Herstellung eines spezifischen Antikörpers würde einen neuen Therapieansatz in der chemotherapeutischen Behandlung von MRSA-Infektionen darstellen. Die Identifizierung von immunodominanten Antigenen, die Beurteilung ihrer Spezifität und ihrer immunogenen Qualität ist daher die Voraussetzung bei der Herstellung eines solchen Antikörpers.

II Material

II.1 Geräte

Folgende Geräte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Analysewaage (Feinwaage)	Chyo JL-180
Autoklaven	Teknomara
Brutschrank	Memmert; Heraeus
Brutschrank	Memmert TV 40 b; Heraeus
Bunnsenbrenner	Fireboy eco
Cleanbench	Nunc
Computerprogramme	Microsoft office 2000; XP
DNA-und RNA-Gelkammer	BIO-RAD; Hartenstein; Roth
DNA-Sequenziergerät	MWG biotech 1.1-Cor DNA-Sequencer, Modell 4000 inclusive Software
Eismaschine	Scotsman AF-20
Frenchpress	SLM Aminco
Gefrierschrank - 20 ⁰ C	privileg senator
Gefrierschrank - 80 ⁰ C	Reveco
Gefriertruhe - 80 ⁰ C	Reveco
Geldokumentationssystem	Bio-Rad Gel Doc 2000
Grobwaage	Chyo
Grosszentrifugen	Beckman J2-HC, Sorvall RC-5B
Kühlschrank	Senator
Kühlzentrifugen	Heraeus Biofuge 13 R, Heraeus Megafuge 1.0 R
Magnetrührer	Janke und Kunkel, KMO 2
Mikropipetten	Gilson pipetman P20, P200, P1000
Mikrowelle	Philips M630
Mixer	Vortex Genie 2
Netzgerät	Consort E 455, Bio-Rad PowerPac 300
PCR-Gerät	biomed Thermocycler 60, Techne Progene
pH-Meter	WTW pH 523

NZY-Medium: 5 g NaCl
2 g MgSO₄ x 7H₂O
5 g Hefeextrakt
10 g NZamine (Caseine hydrolysat)
auf 1 Liter mit H₂O_{dest.} auffüllen, pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

NZY Agar Platten: 5 g NaCl
2 g MgSO₄ x 7 H₂O
5 g Hefeextrakt
10 g NZamine (Caseine hydrolysate)
15 g Agar
auf 1 Liter H₂O_{dest.} auffüllen, pH 7,5 einstellen und autoklavieren.

Nach dem Abkühlen auf ca. 45⁰C wird der Agar dann in eine 7,5 cm Petrischale gegossen.

LB Tetracyclin Agar: 10 g NaCl
10 g Tryptone
5 g Hefeextrakt
15 g Agar
auf 1 Liter mit H₂O_{dest.} auffüllen, pH 7,0 einstellen und autoklavieren.

Nach dem Abkühlen auf ca. 45⁰C wird dem Agar 12,5 µg/ml Tetracyclin hinzugegeben und dann in eine 7,5 cm Petrischale gegossen.

LB Kanamycin Agar: 10 g NaCl
10 g Tryptone
5 g Hefeextrakt
15 g Agar
auf 1 Liter mit H₂O_{dest.} auffüllen, pH 7,0 einstellen und autoklavieren.

Nach dem Abkühlen auf ca. 45°C wird dem Agar 50 mg Kanamycin hinzugesetzt und in eine 7,5 cm Petrischale gegossen.

II. 4 Größenmarker für Agarosegele

Um die Größe der in Agarose aufgetrennten Nukleinsäuren zu bestimmen, wurde der 1 kb-Leiter der Firma CibcoBRL verwendet.

1 kb-Leiter:

Fragment	Grösse in kb
1	12,216
2	11,198
3	10,180
4	9,162
5	8,144
6	7,126
7	6,108
8	5,090
9	4,072
10	3,054
11	2,036
12	1,636
13	1,018
14	0,517
15	0,396
16	0,344

II. 5 verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Die Primer in den einzelnen Sequenzierungsschritten erhielten für ihre Bezeichnung das Kürzel des CMV-Phagemid-Vektors und zusätzlich die Ziffer 1 oder 2, je nachdem von welcher Seite begonnen wurde das DNA-Insert zu sequenzieren. Die fortlaufende Nummerierung erklärt sich aus den voranschreitenden Sequenzierungsschritten. Die ausgewählten Primersequenzen ergaben sich jeweils aus den zuvor sequenzierten Abschnitten (primer-walking, Tab. 5 – Tab. 9). Die Bezeichnung der einzelnen gefundenen Klone ergibt sich aus der Versuchsanordnung. Das Ausplattieren der

gesamten Genbank umfasst ca. 50 Agarplatten und dementsprechend wurde auch dieselbe Anzahl an Blotmembranenpaare aufgelegt. Die Bezeichnung beginnt zu anfangs mit den Buchstaben des Alphabets und dann mit römischen Ziffern. Die 5 verschiedenen Klone befinden sich demnach auf den Platten oder Blotmembranen I, II, III, IV und V.

Tab. 5: Sequenzen der Startprimer T3 und T7

Primer	Länge	Sequenz 5' → 3'	Anealing-T.(°C)
CMV 1(T3)	20-mer	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	60
CMV 2(T7)	22-mer	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	55

Tab. 6: Für die Sequenzierungen von Klon I verwendete Oligonukleotide

Primer	Länge	Sequenz 5' → 3'	Anealing-T.(°C)
CMV 1a	22-mer	CGC TAC TCA CAG GTA TTG GAT G	55
CMV 1b	24-mer	GTA TCA TCA TGG AGG AGG CGA CGA	58
CMV 1c	23-mer	CTG GAC TGA CGG AAT CGA ACA AC	56
CMV 1d	22-mer	GAT GAA TCA CAA GTA GGT TGG C	52
CMV 1e	23-mer	CCA GTT GCA AGT GCA TGG AAA CG	56
CMV 1f	22-mer	GAT AAC AGG CAG GTA CTA CGG T	55
CMV 1g	24-mer	GTG TCG CCA CAA CAT GAA CTG AGA	56
CMV 2a	24-mer	GCA CAG TTG CCT TCG CAA CAC TTG	58
CMV 2b	22-mer	CAG TAG CTA ATG CTG TCT CAG T	54
CMV 2c	23-mer	CCA GCT CTG TTA AAC CTG CTA GA	55
CMV 2d	24 mer	GCA AGT GAA ATC AGC TAT TAC TGG	53
CMV 2e	24-mer	GGT TGA AGG TCA ACG TGT TAG AAC	55
CMV 2f	23-mer	CTC CAA CTA AGG TAG TAT CTA CG	54
CMV 2g	22-mer	GAG GTC ATC CAG ATA CCT TGA T	53

Tab. 7: Für die Sequenzierungen von Klon II verwendete Oligonukleotide

Primer	Länge	Sequenz 5' → 3'	Anealing-T.(°C)
CMV 1a	23-mer	CCG ATC ATT ATG GTT ATT GCG GC	55
CMV 2a	23-mer	CAC GAA ATT AGC ATC ATG CTA GC	55
CMV 2b	23-mer	CAG TAG ATG CAA GCA AGT GCT GG	57

Tab. 8: Für die Sequenzierungen von Klon III verwendete Oligonukleotide

Primer	Länge	Sequenz 5' → 3'	Anealing-T.(°C)
CMV 1a	23-mer	CGT GAC AGG TAA CCA ATG ATA TG	52
CMV 2a	22-mer	AGC TCA CAG AAT AAG TGT GAG T	52

Tab. 9: Für die Sequenzierungen von Klon V verwendete Oligonukleotide

Primer	Länge	Sequenz 5' → 3'	Anealing-T.(°C)
CMV 1a	23-mer	GTG CTA ACC TAT TGT CAG AAG CT	53
CMV 1b	23-mer	GGT AAA GAA GAC GGC AAC AAG CC	56
CMV 1c	23-mer	GGT GCA GCG TTA TTA GCT GGA CG	58
CMV 1d	23-mer	GTC ATT TGA ATC CAA GTG ACA AC	52
CMV 1e	24-mer	GCT ACA GTC AAA CCA CCG TAT GTC	57
CMV 1f	24-mer	CGA ACG GAC TCC AAG CAA AGA CAA	57
CMV 1g	24-mer	CAT CTA ATG TTG TAA CGC CTC CAC	55
CMV 1h	24-mer	CGC ACC TGC TGA TAC ACG CGC TGG	60
CMV 1i	24-mer	GTA ACA CTC CTA TAT GTG ACA GGC	60
CMV 2a	24-mer	GTG GTC TGA AAT GAT GTT ATG GTC	53
CMV 2b	22-mer	CAC TTC AGG CGC TTT ACA TGC C	56
CMV 2c	25-mer	CTT TAG CGA TCC AAC TCC TGC TAT C	57
CMV 2d	24-mer	CCG GGT TAC ATT TAT GGC AGT AAA	56

III Methoden

III. 1 Isolierung von chromosomaler DNA aus dem MRSA-Stamm A 134

III. 1. 1 Isolierung durch Ethanol-fällung nach enzymatischer Lyse (TNEX-Methode)

Die Zellen aus 1 ml Übernachtskultur werden geerntet und in 1 ml Puffer TNE gewaschen. Das Pellet wird in 270 µl TNEX aufgenommen, 30 µl Lysostaphin (2mg/ml) zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) zupipettiert und die Ansätze so lange bei 65°C verdaut, bis die Lösung klar ist. Die freigesetzte DNA wird nach Zugabe von 15 µl 5 M NaCl und 500 µl eiskaltem 100 % Ethanol unter vorsichtigem Schwenken gefällt und für 10 Minuten in der Kühlzentrifuge bei voller Geschwindigkeit abzentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit eiskaltem 80 % Ethanol gewaschen, für 20 Minuten luftgetrocknet und in 100 µl bidestiliertem Wasser (steril) aufgenommen.

TNE:

- 10 mM Tris
- 10 mM NaCl
- 10 mM EDTA
- pH 8

TNEX: 1 % Triton X-100 in TNE

III. 1. 2 DNA-Isolierung mittels NUCLEOBOND-Kit

Für die Isolierung wurde der NUCLEOBOND-Kit von der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Eine 20 ml umfassende Übernachtskultur des MRSA-Stammes A134 wird in einem 50 ml FALCON-Röhrchen bei 5000 rpm (rounds per minute) für 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wird verworfen. Das Bakteriensediment resuspendiert man in 4 ml G3-Puffer. Dazu gibt man 300 µl Lysostaphin (2 mg/ml) und inkubiert bei 37°C für 30 Minuten. Danach gibt man 100 µl

Proteinase K (20 mg/ml) hinzu und inkubiert erneut bei 37°C für 30 Minuten. Anschließend gibt man 1,2 ml G4-Puffer hinzu und vortext das Gemisch. Danach equilibriert man eine Filtersäule, indem man 2 ml N2-Puffer auf die Säule gibt und diese hindurchlaufen lässt. Zu dem zuvor gut vermischten Lysat gibt man dann ebenfalls 5 ml N2-Puffer und mischt dies mittels Vortexen für ca. 20 Sekunden. Dann schüttet man diese Suspension auf die vorher equilibrierte Säule und lässt diese Suspension ohne zusätzliche Druck-oder Zentrifugalkräfte durch den Filter laufen. Nach dem Durchlaufen wird die Säule gewaschen indem man dreimal 4 ml N3-Puffer über den Filter laufen lässt. Nach Abschluss des letzten Waschvorganges wird die DNA, die sich nun in dem Filter der Säule befindet, eluiert indem man 5 ml N5-Puffer auf die Säule gibt und die DNA-enhaltende Flüssigkeit dann unter der Säule in einem neuen 50 ml FALCON-Röhrchen aufnimmt. Dazu gibt man dann 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol, vermischt es gut und wartet bis der deutlich sichtbare weiße DNA-Faden ausgefallen ist. Diesen DNA-Faden fischt man dann mit Hilfe eines Glashakens ab und wäscht ihn dann mehrmals in 70 % Ethanol. Danach lässt man ihn für 1-2 Minuten trocknen und nimmt ihn zur Lösung in 200 µl TE-Puffer auf.

G3-Puffer: 50 mM EDTA
 50 mM Tris/HCl
 0,5 % Tween-20
 0,5 % Triton X-100, pH 8,0

Bevor der G3-Puffer verwendet wird, bringt man RNase A in einer Endkonzentration von 200 µg/ml darin in Lösung.

G4-Puffer: 3 M GuHCl
 20 % Tween-20, pH 5,5

N2-Puffer: 100 mM Tris/H₃PO₄
 15 % Ethanol
 900 mM KCl, pH 6,3

N3-Puffer:	100 mM Tris/H ₃ PO ₄ 15 % Ethanol 1150 mM KCl, pH 6,3
N5-Puffer:	100 mM Tris/H ₃ PO ₄ 15 % Ethanol 1000 mM KCl, pH 8,5
TE-Puffer:	10 mM Tris 1 mM EDTA, pH 8,0

III. 2 Konzentrationsbestimmung von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Für die Quantifizierung von Nukleinsäuren werden geeignete Verdünnungen in bidestiliertem Wasser photometrisch bei den Wellenlängen von $\lambda = 260$ nm und 280 nm in Quarzküvetten gegen bidestiliertes Wasser gemessen. Eine OD 260 von 1 entspricht 50 mg/ml doppelsträngiger DNA und 40 mg/ml einzelsträngiger DNA und RNA. Das Verhältnis von OD 260/OD 280 gibt die Reinheit der Nukleinsäurepräparation an. Der Wert soll optimalerweise zwischen 1,8 und 2 liegen.

III. 3 DNA-Partialverdau mit der Restriktionsendonuklease *Sau3A I*

Das Enzym *Sau3A I* und den dazugehörigen 10x Restriktions-Enzym-Puffer wurde von der Firma Amersham bezogen. Die zuvor isolierte chromosomale DNA aus dem MRSA-Stamm A134 hatte eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Der Verdauansatz von 1 ml umfasste 100 μg DNA (=100 μl), 800 μl H₂O_{dest.} und 100 μl 10x Restriktions-Enzym-Puffer. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. 40 μl wurden dann entnommen, 10 μl Stopplösung dazu gegeben und auf Eis gestellt. Zu den verbleibenden 960 μl aus dem Verdauansatz wurden 2,5 μl *Sau3A I* hinzugefügt (in 1:10-Verdünnung mit H₂O_{dest.}), gründlich resuspendiert und bei 37°C inkubiert. Nach 5, 10, 15, 20, 25, 35 und 60 Minuten wurden je 40 μl vom Verdauansatz entnommen, je 10 μl Stopplösung hinzugegeben und die Proben auf Eis gestellt. Zu den je 50 μl

abgestoppten Verdauproben wurden je 8 µl Laufpuffer gegeben und die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen.

Stopplösung: 10 mM Tris-Cl, pH 7,5
 20 % Glycerol
 0,1 % Natrium dodecyl Sulfat
 0,1 % Bromphenolblau

III. 4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten (Sambrook *et al.*, 1989)

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten. DNA-Moleküle unterschiedlicher Größen wandern unterschiedlich schnell durch das Gel. Zur Größenbestimmung der Fragmente werden DNA-Marker mit auf die Gele aufgetragen. Unterschiedliche Agarosekonzentrationen erlauben eine effiziente Auftrennung der DNA-Fragmente verschiedener Größenbereiche (Tab. 10).

Tab. 10: Entsprechend der Agarosekonzentration in der Gelelektrophorese lassen sich verschiedene Größenbereiche der DNA darin auftrennen.

% Agarose	Länge linearer DNA (kb)
0,360	5
0,620	1
0,710	0,8
0,970	0,5
1,260	0,4
1,540	0,2
2,030	0,1

Die entsprechende Menge Agarose wird zu 1 x TAE-Puffer, 0,5 x TBE- Puffer oder 1 x TPE-Puffer zugegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Nach dem Abkühlen auf 60°C wird die Agarose in eine entsprechende Gelgießkammer gegossen, in die an einem Ende ein Plastikamm mit Zähnen geeigneter Größe

eingesetzt wird. Nach dem Festwerden wird das Gel in eine Gelkammer überführt, mit dem entsprechenden Puffer knapp bedeckt und die mit Agarosegel-Ladepuffer versehenen Proben sowie der Marker aufgetragen. Das Gel läuft je nach Puffer und Größe der Kammer bei 80 bis 150 V (ca. 5 V/cm Elektrodenabstand). Nach dem Lauf wird das Gel in Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) gefärbt und unter UV-Licht begutachtet.

50 x TAE: 242 g/l Tris-Base
 57,1 ml/l Essigsäure 99,7 %
 100 ml/l EDTA (0,5 M, pH 8)

5 x TBE: 54 g/l Tris-Base
 27,5 g/l Borsäure
 20 ml/l EDTA (0,5 M, pH 8)

10 x TPE: 108 g/l Tris-Base
 15,5 ml/l 85 % Phosphorsäure
 40 ml/l EDTA (0,5 M, pH 8)

6 x Agarosegel-Ladepuffer: 0,25 % Bromphenolblau
 0,25 % Xylencyanol FF
 15 % Ficoll Typ 400 (Pharmacia)

Aufgrund der negativen Ladung können DNA-Fragmente in einem Agarosegel, an welches ein elektrisches Feld angelegt wird, entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Um die DNA-Lösung zu beschweren und damit das Auftragen zu erleichtern und um die Lauffront optisch zu markieren, werden die DNA-Proben vor dem Gelauftrag mit 0,2 Volumeneinheiten Laufpuffer versetzt. Die Agarosekonzentration beträgt 1% im 1 x TAE Laufpuffer. 100 ml Laufpuffer werden mit der entsprechenden Menge an Agarose versetzt, die Lösung in der Mikrowelle aufgeköcht und in die Gießvorrichtung gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wird der Gelkamm entfernt und das Gel in die vorbereitete Gelkammer gegeben. Die DNA-Fragmente

werden bei konstanter Spannung von 90 Volt für 2 Stunden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Nach beendeter Elektrophorese wird das Gel im Ethidiumbromidbad (10 mg/ml) für 20 Minuten gefärbt, mit Wasser abgespült und am UV-Transiluminator betrachtet oder mit der Geldokumentationsanlage fotografiert.

III. 5 Isolation von DNA aus Agarose (Geneclean-Kit, Dianova)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem TAE-Agarosegel wird der zu eluierende DNA-Bandenausschnitt unter UV-Licht bei niedrigster Einstellung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Man gibt dann 3 Volumen 5 M NaI hinzu und schmelzt das Agarosestück bei 50°C bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nun werden 8 µl Glasmilch zugegeben, der Ansatz gut gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert, sodass die DNA an die Glasmilch binden kann. Durch kurzes Zentrifugieren (10 sec) wird die Glasmilch sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl eiskaltem NEW WASH-Puffer unter gründlicher Resuspendierung versetzt. Dieser Waschvorgang wird noch zweimal wiederholt. Anschließend gibt man 8 µl H₂O_{dest.} zu dem Pellet, resuspendiert und inkubiert den Ansatz bei 50°C für 5 Minuten, damit sich die DNA wieder von der Glasmilch löst. In einem 1-minütigen Zentrifugationsschritt wird die DNA von der Glasmilch abgetrennt und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die Ausbeute zu erhöhen, kann der letzte Inkubationsschritt wiederholt werden.

III. 6 Ligation von *Sau3A* I-gespaltener chromosomaler DNA in den ZAP-Express-VektorTM

Die zuvor mit *Sau3A* I gespaltene chromosomale DNA wird danach in einen Vektor kloniert. Zur Ligation wurde der ZAP-Express-Predigested-Vektor-KitTM verwendet. Der ZAP-Express-VektorTM hat eine Länge von ca. 38,900 bp. Zur Ligation kann er DNA-Inserts bis zu einer Größe von 12 kb aufnehmen. Die Konzentration der zu ligierenden DNA-Fragmente sollte möglichst hoch sein. Die verwendete DNA hatte eine Konzentration von 120 µg/µl.

Ligationsansatz:	1,0 µl ZAP-Express-Vektor™
	5,0 µl (= 600 µg) DNA
	0,5 µl 10 x Ligasepuffer
	0,5 µl 10 mM rATP (pH 7,5)
	2 Units (=0,5 µl T4 DNA-Ligase)

Dieser Ansatz wird für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Von diesem Ansatz entnimmt man nun 5 µl und gibt sie zu einer Einheit des Verpackungsextraktes. Dann zentrifugiert man diesen Ansatz für 5 Sekunden, sodass sich alle festen Bestandteile am Boden des Eppendorf-Reaktionsgefäßes befinden. Es folgt eine Inkubation dieses Ansatzes für 90 Minuten bei 22°C. Man fügt 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform dazu und mixt vorsichtig. Dann zentrifugiert man die Zelltrümmer ab. Im Überstand befinden sich nun die verpackten Phagen mit den DNA-Inserts. Diese Gen-Bank in Form von verpackten Phagen ist bei 4°C zu lagern.

III. 7 Ausplattieren der verpackten Ligationsprodukte

Um die verpackte MRSA-Genbank sichtbar zu machen, werden *E. coli* XL-1-blue Bakterien mit den Insert-tragenden Phagen infiziert und ausplattiert. 150 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* XL-1-blue Bakterien in NZY-Medium inkubiert man bei 37°C im Schüttler mit 15 ml NZY-Medium und 150 µl Maltose 0,2 %-Zusatz für ca. 5,5 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0. Davon werden 3 ml bei 2000 rpm für 10 Minuten in einem entsprechend großen Röhrchen pelletiert, der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in sterilen 10 mM MgSO₄ bis auf eine OD₆₀₀ von 0,5 resuspendiert. Je 400 µl Bakteriensuspension werden nun mit je 1 µl, 5 µl und 10 µl der verpackten Genbank infiziert. Die Bakterien und die Phagen werden bei 37°C für 15 Minuten unter vorsichtigem Schütteln in einem Heizwasserbad inkubiert.

Zu diesen Ansätzen gibt man je:	8 ml NZY-Top Agar (48°C)
	15 µl 0,5 M IPTG
	50 µl X-Gal (250 mg/ml)

Durch einmaliges Schütteln werden die Suspensionen gut vermischt und dann zügig, bevor der Agar erhärtet, auf im 37°C-Brutschrank vorgewärmte NZY-Agarplatten ausgegossen. Diese Bakterien-Phagen Kultur wird dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation zeigen sich auf den Agarplatten die sogenannten Plaques in Form von kleinen runden Lysezonen auf dem Agarplattenüberzug. Dabei gibt die Farbe der Plaques Auskunft über den Erfolg der Ligation, der mit der Blau-Weiß-Selektionsmethode bestimmt werden kann.

III. 8 Plaque - Lifting

Die Nitrocellulosemembranen werden für 30 Minuten in IPTG (10 mM) eingeweicht und dann auf Whatman-3_{MM}-Papier luftgetrocknet. Zu beachten ist dabei, dass keine Verunreinigungen auf die Membranen gelangen. Nach dem Trocknen wird die Nitrocellulosemembran mit einer sterilen Pinzette vorsichtig auf die Plaque-tragende Agarplatte gelegt. Dann sollte man die Position der Membran auf der Agarplatte mit Hilfe einiger Nadelstiche markieren, um später genau die Positionen der Plaques auf der Agarplatte mit den ihnen entsprechenden gelifteten Plaqueanteilen auf der Membran vergleichen zu können. Die Agarplatte mit der aufgelegten Nitrocellulosemembran wird nun für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Membran wird nach dieser Zeit von der Agarplatte vorsichtig abgenommen, in eine mit PBS-Tween-Lösung gefüllte Petrischale gegeben und für 3 x 15 Minuten, zwischen denen man die PBS-Tween-Lösung erneuert, unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach legt man eine zweite Nitrocellulosemembran auf dieselbe Agarplatte und lässt diese dann erneut für 3 Stunden bei 37°C inkubieren. Die mit PBS-Tween-Lösung gesäuberte erste Nitrocellulosemembran wird dann in Blocking-Lösung gegeben und bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln für 1 Stunde inkubiert. Danach spült man erneut die Membran 3 x 5 Minuten in TBS-Tween-Lösung um sie von der überschüssigen Blocking-Lösung zu reinigen. Auf die gleiche Weise verfährt man mit der zweiten Membran. Auf diesem Weg erhält man für jede Agarplatte ein Membranenpaar.

III. 9 Präadsorption der zu testenden Seren und Kontrolle mittels Dot Blot Test

Das verwendete *E. coli*-Phagenlysat wurde von der Firma Stratagene (La Jolla, USA) bezogen. Das Serum des Patienten mit MRSA-Sepsis wurde durch Herrn Dr. Lorenz/Chirurgische Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt. Zur Vereinfachung der Wortwahl wird es in den nachfolgenden Abschnitten als Patientenserum bezeichnet. Das Serum der Person ohne MRSA-Sepsis wurde ebenfalls durch Herrn Dr. Lorenz zur Verfügung gestellt und wird in den nachfolgenden Abschnitten als Kontrollserum bezeichnet. Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um einen mit alkalischer Phosphatase konjugierten Kaninchen-Anti-Human-IgG Antikörper, welcher von der Firma Dako (Glostrup, Dänemark) bezogen wurde. Er wird in einer 1:2000-Verdünnung in TBS-Tween-Lösung aufgebracht. Als Farbsubstrat für die antikörpergekoppelte alkalische Phosphatase wird 66 µl NBT und 33 µl BCIP in 10 ml AP-Puffer verwendet.

Um bei dem späteren Screeningverfahren möglichst wenig Hintergrundreaktion zu haben, versucht man mit Hilfe einer Voradsorption der Seren die Hintergrundreaktionen, die auf Kreuzreaktivitäten beruhen, zu minimieren. Zu Hilfe nimmt man sich dabei ein *E. coli*-Phagenlysat, welches die zu Kreuzreaktionen führenden Bestandteile in sehr hoher Konzentration enthält. Mehrere Nitrocellulosemembranen werden mit dem *E. coli*-Phagenlysat inkubiert und so damit beschichtet. Danach bringt man die Seren in möglichst geringer Verdünnungsstufe auf die zuvor beschichteten Nitrocellulosemembranen und lässt diese zusammen für ca. 1 Stunde unter leichtem Schütteln inkubieren. Dadurch erreicht man, dass die Antikörper, die gegen *E. coli*- und Phagenbestandteile gerichtet sind an die Membranen binden und so aus dem Serum eliminiert werden können. Das *E. coli*-Phagenlysat wird nun in zu je einer Zehnerpotenz ansteigenden Verdünnung in Form eines Tropfens auf Whatman-3_{MM}-Papier aufgetragen (1:5; 1:50; 1:500). Drei solcher Dreierstreifen werden jeweils mit Seren verschiedenen Verdünnungsgrades (1:100; 1:200; 1:400) inkubiert und danach einem sekundären Antikörper (Kaninchen-anti-Human-IgG), welcher mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, hinzugegeben. Nach dem Zugeben von Detektorlösung lässt sich anhand der Intensität des Antikörpersignals die Dichte der verbleibenden kreuz-

reagierenden Antikörper im Serum qualitativ abschätzen. Durch die verschiedenen Verdünnungsstufen des *E. coli*-Phagenlysats und der Seren kann man so die geeignete Serumverdünnung für die weiteren Versuchsschritte bestimmen. Dieser Dot-Blot-Test wird sowohl vor als auch nach der Präadsorption des Serums durchgeführt, sodass die Eliminierung eines Großteils der kreuzreagierenden Antikörper verdeutlicht wird (Abb. 10).

III. 10 Screening der Nitrocellulosemembranen mit dem Patientenserum und dem Kontrollserum

Die zuvor geblockten und gründlich gespülten Membranenpaare werden nun parallel einmal mit dem Patientenserum und mit dem Kontrollserum inkubiert. So kann man im direkten Vergleich sehen, welche Reaktionsunterschiede ein Plaque mit zwei verschiedenen Seren zeigt. Die zuvor präadsorbierten Seren werden in einer Verdünnung von 1:200 in Blocking-Lösung in einer Petrischale auf die Membranen gegeben und für 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die jeweiligen Antikörper enthaltenden Seren auf das nächste Membranenpaar gegeben und diese erneut für 1 Stunde inkubiert. Das nun mit den Seren inkubierte Membranenpaar wird gründlich mit TBS-Tween-Lösung gespült und dann mit einem sekundären Antikörper (Anti-Human) in einer 1:2000-Verdünnung in TBS-Tween-Lösung erneut für 1 Stunde inkubiert. Nach Entfernen des Anti-Human-Antikörpers werden die beiden Membranen wieder mit TBS-Tween-Lösung gespült. Danach gibt man je ca. 5 ml einer Detektorlösung auf die beiden Membranen und lässt diese bis zum Auftreten von optischen Signalen schütteln. Nach dem Erreichen der gewünschten Farbintensität der Plaques wird die Reaktion mit destilliertem Wasser abgestoppt. Aufgrund der Markierung der beiden Membranen auf den Agarplatten, lassen sich nun die optischen Signale den jeweiligen Plaques gut zuordnen.

Blocking Lösung:

1% BSA in TBS

Tris-Puffer Saline (TBS):

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)

150 mM NaCl

Tris-Puffer Saline und Tween 20 (TBST) :	TBS 0,05 % Tween 20
Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer):	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ pH 9,5

III. 11 Isolierung des positiven Antikörpersignals

Nachdem man ein positives Phagensignal auf der Blotmembran identifiziert hat, die mit dem Patientenserum inkubiert worden ist, wurde der dazu gehörige Plaque auf der Agarplatte identifiziert und mit Hilfe eines kleinen Kupferröhrchens (Durchmesser 4 mm) ausgestochen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl SM-Puffer gegeben. Dieses Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde dann für 12 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert, damit die Phagen aus dem Agarmaterial in die Pufferflüssigkeit diffundieren können. Der ausgestanzte Agarzylinder wurde dann vorsichtig aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß entfernt und verworfen. Zu den nun Phagen enthaltenden 500 µl SM-Puffer gibt man Chloroform in einer Konzentration von 5 % und lässt die Suspension dann für 15 Minuten bei leichtem Schütteln unter Raumtemperatur inkubieren. Anschließend wird das Eppendorf-Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert, um so die Zelltrümmer zu entfernen. Diese bilden in dem Eppendorf-Reaktionsgefäß das Sediment. Die überstehenden ca. 500 µl Flüssigkeit enthalten dann die Insert-tragenden, „positiven“ Phagen.

SM-Puffer:	5,8 g NaCl 50,0 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 2,0 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 5,0 ml 2% Gelatine Zusatz von H ₂ O _{dest.} auf 1 Liter
-------------------	--

III. 12 Probe der positiven Plaques

Um zu testen, ob es sich in dieser Phagenlösung auch um Phagen handelt, die ein identisches DNA-Insert tragen, das für das positive Signal verantwortlich ist, wurden erneut *E. coli* XL 1-blue Zellen mit diesen Phagen infiziert, auf NZY-Agarplatten ausplattiert und in einer Übernachtskultur bei 37°C inkubiert. Mit der bereits beschriebenen Prozedur wurden die Plaques dann mittels Nitrocellulosemembran geliftet, gewaschen und mit der Blocking-Lösung versetzt. Bei dieser Kontrolle wurde aber nur eine zweigeteilte Membran auf die Agarplatte gelegt und dann je mit dem gleichen zuvor verwendeten Patientenserum und Kontrollserum erneut inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass man die richtige Menge an Phagen dem 400 µl Bakterienansatz zusetzt, um dann auch sicher jeden einzelnen Plaque sowohl auf der Agarplatte als auch auf der Membran eindeutig identifizieren zu können.

III. 13 Helferphagen

Die Funktion der Helferphagen, speziell des ExAssist™-Helferphagen, besteht darin, den pBK-CMV phagemid Vektor vom ZAP-Express-Vektor™ heraus zuschneiden, den man sich als Insert-tragende Kassette vorstellen muss. Der verwendete ExAssist™-Helferphage wurde von der Firma Stratagene (La Jolla, USA) bezogen.

III. 13. 1 Bestimmung des Titers des verwendeten Helferphagens

Je 1 µl einer 10^{-4} - 10^{-7} -Verdünnung des Helferphagen in TE-Puffer wird mit 200 µl *E. coli* XL 1-blue MRF' Zellen (OD 600 = 1,0) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Leichtes Schütteln begünstigt dabei das Anhaften der Phagen an die Bakterienzellen. Zu diesen Ansätzen gibt man dann je 3 ml von auf 48°C abgekühlten NZY-Agar und gießt die Suspension nach kurzem Schütteln auf eine NZY-Agarplatte aus und inkubiert diese bei 37°C für 12 Stunden. Um nun den Phagentiter zu bestimmen (pfu/ml) zählt man jeweils die Plaques auf den 4 Agarplatten mit den verschiedenen Verdünnungsstufen aus und setzt die Anzahl der Plaques und die jeweilige Verdünnung in folgende Formel ein:

$$\frac{\text{Anzahl der Plaques (pfu)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{ausplattiertes Phagenvolumen (\mu l)}} \times 1000 \mu\text{l/ml}$$

Ergebnis:	Verdünnung 10^{-4} : ca. 5000 Plaques
	Verdünnung 10^{-5} : ca. 500 Plaques
	Verdünnung 10^{-6} : ca. 50 Plaques
	Verdünnung 10^{-7} : ca. 5 Plaques

Demnach hat die Phagenlösung einen Titer von 50×10^9 pfu/ml.

III. 13. 2 Amplifikation des Helferphagen

Eine *E. coli* XL 1-blue MRF' Bakterienkolonie wird in 10 ml 2 x YT broth Medium bis zu einer $OD_{600} = 0,3$ bei 37°C herangezogen. Eine $OD_{600} = 0,3$ entspricht dabei ca. $2,5 \times 10^8$ Zellen/ml. Zu 1 ml dieser Bakterienkultur gibt man nun im Verhältnis 1:20 die Phagensuspension hinzu, d.h. $20 \times 2,5 \times 10^8 = 5 \times 10^9$ Phagen. Dies entspricht 100 μl der Ausgangsphagenlösung. Dieses 1,1 ml Bakterien-Phagen-Gemisch wird nun für 8 Stunden bei 37°C inkubiert und dann für 15 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend der Bakterienniederschlag mittels Zentrifugation sedimentiert. Im Überstand befinden sich nun die amplifizierten Helferphagen. Dazu gibt man in einer Konzentration von 7 % (v/v) DMSO hinzu und lagert es bei -80°C .

2xYT broth Medium:	10 g NaCl
	10 g Hefeextract
	16 g Tryptone
	Zusatz von $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 1 Liter; Abgleich auf pH 7,5;
	Autoklavieren

III. 13. 3 Einzelklonisierung mit Hilfe des Helferphagen

Mit Hilfe des Helferphagen wird der das DNA-Insert tragende pBk-CMV PHAGEMID VEKTOR aus dem ZAP-Express-VektorTM herausgeschnitten. Die den positiven Phagen enthaltende Suspension wird wie folgt angelegt.

200 µl *E. coli* XL-blue MRF⁺ Zellen (OD₆₀₀ = 1,0)

250 µl positive Phagenlösung

1 µl ExAssistTM-Helferphage

Dies wird in einem Falconröhrchen 2059 für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach gibt man ca. 3 ml NZY-broth Medium hinzu und inkubiert dies für 3 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nach diesen 3 Stunden wird das Röhrchen für 20 Minuten auf 70°C erhitzt und nachfolgend für 15 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthält den aus dem ZAP-Express-VektorTM herausgeschnittenen DNA-Insert tragenden pBk-CMV PHAGEMID VEKTOR. Um die PHAGEMID VEKTOREN auszuplattieren gibt man zu 200 µl *E. coli* XLOLR Zellen (OD₆₀₀ = 1,0) 100 µl der PHAGEMID VEKTOR-Lösung und inkubiert dies für 15 Minuten bei 37°C. Dazu gibt man erneut 300 µl NZY broth Medium und inkubiert dies für 45 Minuten bei 37°C. Diese Zellmischung gibt man auf eine vorgewärmte LB-Kanamycin Agarplatte und inkubiert diese dann bei 37°C für 12 Stunden. Die Bakterienkolonien, die dann auf der Agarplatte erscheinen, enthalten den pBk-CMV PHAGEMID VEKTOR mit dem klonierten DNA-Insert.

III. 14 Plasmidisolierung, kleiner Maßstab (DNA-Reinigung über Diatomeenerde)

2 ml einer unter Selektionsdruck angezogenen Übernachtskultur von *E. coli* XL-blue MRF⁺ Zellen werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das verbleibende Bakteriensediment wird in 150 µl Puffer I resuspendiert und in Lösung gebracht und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Puffer II, was zur Lyse der Bakterienzellen führt, wird der Ansatz erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Diese

Mischung wird mehrmals sehr vorsichtig geschwenkt, um zu vermeiden, dass sich chromosomale DNA aus dem Zelllysat löst. Die Lösung sollte jetzt klar sein. Durch Hinzufügen von 150 µl Puffer III werden Proteine und die chromosomale DNA gefällt. Dieser Ansatz wird unter mehrmaligem vorsichtigen Schwenken ca. 2 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wird nun für 5 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge) und der klare Überstand in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit bereits vorgelegten 900 µl Puffer L6 und 50 µl aufgeschlämmter Diatomeenerde überführt. Dieses Reaktionsgemisch wird vorsichtig geschüttelt und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit bindet die Plasmid-DNA an die Diatomeenerde. Das Aufschlammungsgemisch wird in eine Spritze gefüllt, die auf einer speziellen Fritte steckt. Durch das Anlegen eines Vakuums wird das Reaktionsgemisch durch die Fritte gesaugt wobei die Diatomeenerde mit der daran haftenden Plasmid-DNA am Filter aufgeschichtet wird. Der Filterkuchen wird anschließend mit 2 ml Wasch-Lösung unter Sog gespült. Die Fritte wird dann auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und 1 Minute bei 14000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach Aufstecken auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß erfolgt die Elution der DNA aus dem Filterkuchen durch Zugabe von 50 µl H₂O_{dest.} und 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wird 1 Minute bei 14000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. In der dann angesammelten Flüssigkeit in dem Eppendorf-Reaktionsgefäß befindet sich die Plasmid-DNA des jeweiligen Klons.

Puffer 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_{dest.}

Puffer II: 0,2 N NaOH
 1 % SDS
 ad 200 ml H₂O_{dest.}

Puffer III: 3 M NaAcetat; pH 8,0
 ad 200 ml H₂O_{dest.}

Puffer L6:	100 ml 0,1 M Tris-HCl; pH 6,4 8,8 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0 13,2 ml H ₂ O _{dest.} 2,6 ml Triton X 100 120 Guanidin (SCN ⁻ -Salz)
Diatomeenerde:	10 g Diatomeenerde 50 ml H ₂ O _{dest.} 0,5 ml HCl (konz.)
Wasch-Lösung:	10 ml 5 M NaCl 5 ml 1 M Tris-HCl; pH 7,5 2,5 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0 + 250 ml H ₂ O _{dest.} und 250 ml Ethanol (100%)

III. 15 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Ein 20 µl Spaltansatz setzt sich aus 2 µl One-Phor-All-Puffer, 8 µl gelöster Plasmid-DNA sowie 1 µl eines Restriktionsenzym und je 1 µl von 2 Restriktionsenzymen zusammen. Die beiden Ansätze werden dann mit H₂O_{dest.} auf 20 µl aufgefüllt. Zu beachten ist dabei, dass die Menge an zugegebenem Enzym 10 % des Gesamtansatzes nicht überschreitet. Die Spaltungsdauer beträgt in der Regel 2 Stunden. Sie erfolgt bei 37°C. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Spaltprodukte mit der schon beschriebenen Agarosegelelektrophorese. Zusammen mit dem Größenmarker erfolgt das Auftragen der Spaltansätze in einem 1 %-Agarosegel. 2 Spuren werden mit der Plasmid-DNA eines Klons besetzt. In der ersten Spur läuft der Restriktionsenzymverdau mit nur einem Enzym, die Spur 2 zeigt den Restriktionsenzymverdau mit 2 Enzymen des gleichen Klons. Bei dem ersten Enzym handelt es sich um *Pst*I, bei dem zweiten Enzym handelt es sich um *Hind*III (Abb. 14).

III. 16 Sequenzierung der DNA-Inserts (ABI Prism 310 Genetic Analyser)

Mit Hilfe der DNA-Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge einer DNA-Probe bestimmt. Die Sequenzierreaktion erfolgt nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die Methode beruht auf der Herstellung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge und deren anschließender elektrophoretischer Auftrennung. Für die Sequenzier-PCR wird ein Premix verwendet, der bereits die DNA-Polymerase (Ampli Taq), die vier verschiedenen Desoxynukleotide und die jeweiligen 3'-fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthält. Die DNA-Synthese erfolgt durch die Verlängerung kurzer Oligonukleotid-Primer mittels DNA-Polymerase. Durch den zufälligen Einbau der 3'-fluoreszenzmarkierten ddNTP's kommt es zum Abbruch der DNA-Syntheseketten, da ihnen ein 3'-Hydroxylende fehlt, um die nächste Phosphodiesterbindung zu knüpfen. Die Proben werden im Autosampler plaziert. Jede Probe wird über eine Kapillare mit einer positiven Elektrode (Kathode) in Kontakt gebracht. Die Glaskapillare ist auf der einen Seite mit einem Polymer gefüllt. Die negative Elektrode (Anode) auf der anderen Seite der Kapillare ist in einem Puffer eingetaucht. Ein Teil der Probe gelangt in die Kapillare wenn Strom von der Kathode zur Anode fließt (Elektroinjektion). Gelangen die Nukleotide in ein Detektorfeld, dann regt ein Laser die fluoreszenzmarkierten ddNTPs an. Das emittierte Licht wird von einer CCD-Kamera gesammelt. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden mit Hilfe des Computers ausgewertet und so die Nukleotidsequenzen bestimmt.

III. 16. 1 Vorbereitung der DNA-Proben

Plasmid-DNA wird mit Ethanol gefällt. PCR-Proben werden über den PCR-Purifikations-Kit von Qiagen gereinigt.

Sequenzier-PCR:

Plasmid-DNA 0,1-0,5 µg

Premix 4µl

Primer 50 pmol

H₂O_{dest.} ad 10 µl

Thermocycler-Protokoll (25 Zyklen)

2 Minuten 96°C

25 Zyklen:	30 Sekunden	96°C	Denaturierung
	15 Sekunden	45-60°C	Annealing
	4 Minuten	60°C	Extension

III. 16. 2 Aufreinigung des Reaktionsansatzes**Ethanolfällung bei Raumtemperatur**

Zum Reaktionsansatz wird 90 µl H₂O_{dest.}, 10 µl 3 M NaAcetat, pH 4,6 und 250 µl 100% Ethanol gegeben. Dann wird der Ansatz für 15 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Ethanol wird entfernt. Das Sediment wird mit 250 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach 5 minütigem Zentrifugieren wird das Sediment für 5 Minuten in der Speed-Vac getrocknet.

Probenauftrag

Der getrocknete Reaktionsansatz wird in 25 µl TSR aufgenommen. Die Proben werden für 2 Minuten bei 90°C denaturiert und dann in den Sequenzierer gegeben.

III. 16. 3 Sequenzierung

Der Anfang der Sequenzierungskette erfolgt bei allen 4 Klonen mit denselben Standardprimern, T3-Primer und T7-Primer (Sequenzen siehe Tab. 5), die jeweils die Insertstellen des pBK-CMV phagemid Vektor flankieren.

Mit einem Sequenzierungsgang kann man von beiden Seiten des Inserts einen Abschnitt von 300 bis 500 bp sequenzieren. Für die nachfolgende Sequenzierung wird am 3'-Ende des erhaltenen Sequenzabschnittes eine neue Basensequenzfolge mit einer Länge von 22-24 bp und einem möglichst ausgeglichenen Verhältnis der 4 Basen bestimmt. Dieser jeweilige Abschnitt wird dann als neuer Primer für die weiteren Sequenzierungsgänge

verwendet (primer walking, Abb. 16). Durch diese Methode erreicht man pro Sequenzierungsgang ein Voranschreiten von ca. 600-1000 bp. Man fährt solange nach dieser Methode fort, bis man mit Hilfe der Datenbank, in die man die erhaltenen Sequenzen nach jedem Sequenzierungsgang eingibt, ein sicheres Überlappen der von beiden Seiten des Inserts erhaltenen Sequenzreihen erkennen kann.

III. 17 Datenbankanalyse

Mit Hilfe der verfügbaren Datenbanken im Internet erfolgte dann die Analyse der Sequenzen auf vorhandene bekannte Homologien. Dabei wurde mit den NCBI-Datenbanken mit der Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> gearbeitet. Die dabei gefundenen Homologien zu bereits bekannten Proteinen sind im Ergebnisteil dieser Arbeit ausführlicher besprochen.

IV Ergebnisse

IV. 1 Erstellen einer Genbank von Methicillin-resistenten *S. aureus* mit Hilfe des ZAP-Express-Vektor-Systems™

Die Arbeiten zur Erstellung einer Expressionsgenbank bildeten den ersten Abschnitt dieser Arbeit. Sie war die Voraussetzung für das spätere Aufspüren von immunodominanten Antigenen mit Hilfe von Patientenserum. Um ein späteres effizientes Arbeiten mit der Genbank zu ermöglichen, war die Wahl der Methode zur Erstellung der Genbank von großer Bedeutung. Die geeignetste Form für unsere Zwecke war eine Bakteriophagen-Genbank. Die DNA-Genbanken, die mit Hilfe von λ -Bakteriophagen, wie λ gt11, λ ZAP oder λ ORF8, hergestellt wurden, haben den Vorteil, dass diese Vektoren eine Kopie des *E. coli lacZ*-Gens tragen und so die Verifikation einer gelungenen Klonierung / Ligation in den Vektor optisch leicht bestätigen können. Der verwendete ZAP-Express-Vektor™ hat eine Größe von 38,9 kb (Abb. 5). Mit diesem Vektor ist es möglich, sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Zellen Genprodukte zu exprimieren.

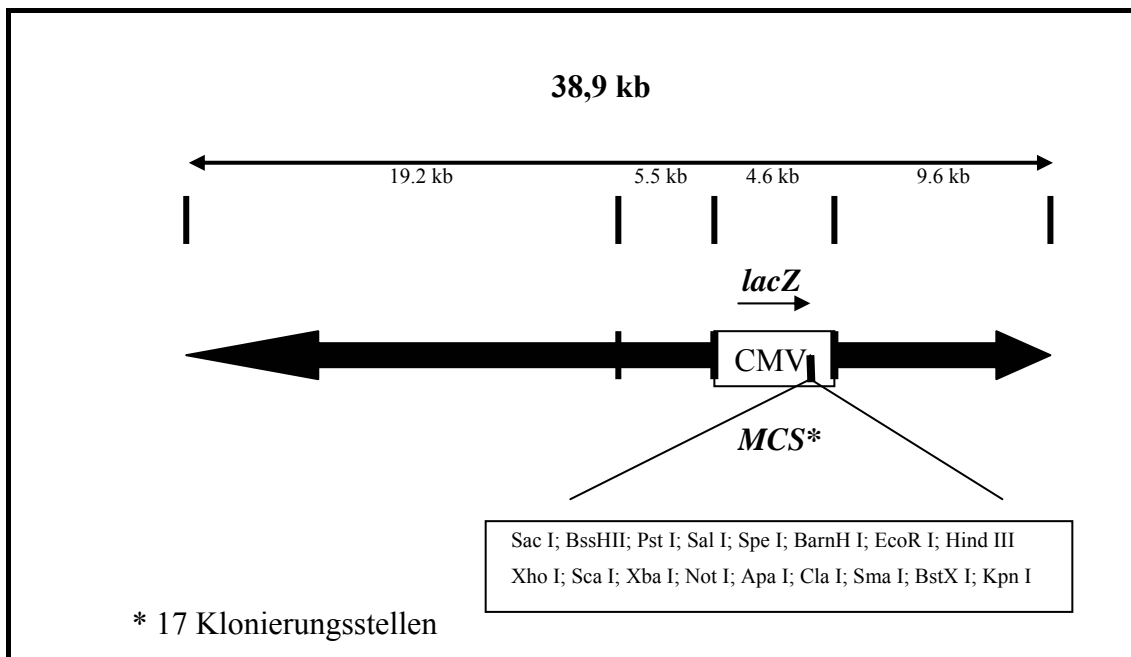


Abb. 5: Physische Karte des ZAP-Express-Vektors™

Der Vektor hat eine „Multiple Cloning Site“ (MCS) mit 17 Klonierungsstellen, welche DNA-Fragmente bis zu 12 kb aufnehmen können. Die Klonierungsstellen sind *Bss*HII, *Pst*I, *Apa*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sca*I, *Cla*I, *Bst*X, *Kpn*I, *Not*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Spe*I, *Xba*I und *Xho*I. Die in den ZAP-Express-VektorTM ligierten DNA-Inserts lassen sich dann in Form des pBK-CMV phagemid Vektors, der eine Kanamycinresistenz trägt, weiter bearbeiten. Die klonierten Fragmente können durch Sequenzierung und Sequenzhomologievergleiche identifiziert werden. Exprimierte Genprodukte lassen sich durch geeignete Antikörper nachweisen. Die MCS des pBK-CMV phagemid Vektors werden von T3- und T7-Promotoren flankiert (Abb. 6). Zudem gibt es 5 verschiedene Primer-Erkennungsstellen für die DNA-Sequenzierung. Die *lac*-Operator Region erlaubt die kontrollierte Expression klonierter Fragmente durch IPTG-Gabe und nachfolgend die Detektion der Fusionsproteine mittels Westernblots.

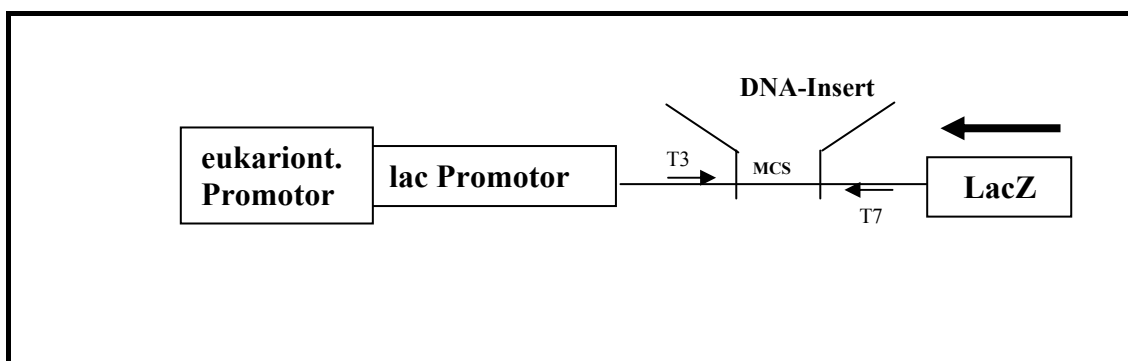


Abb. 6: Schematische Darstellung des Insertionsortes klonierter Fragmente im ZAP-Express-VektorTM. Die Multiple-Cloning-Site (MCS) wird von den T3- und T7-Promotoren flankiert. Die *lac*-Operator Region erlaubt die kontrollierte Expression klonierter Fragmente.

IV. 1. 1 Isolierung chromosomaler DNA zur Herstellung der Genbank

Voraussetzung für die Herstellung einer Genbank, die das komplette *S. aureus*-Genom enthält, ist die Isolierung ausreichender Mengen an genomischer DNA in einer hohen Qualität. Es zeigte sich zunächst, dass mittels Ethanolfällung nach enzymatischer Lyse (TNEX-Methode) eine zu geringe Menge an DNA gewonnen werden konnte. Außerdem war die isolierte DNA von ungenügender Qualität und Reinheit. Alternativ wurde genomische DNA mit Hilfe von Affinitätssäulen isoliert. Dazu wurde der NUCLEOBOND-KitTM (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Damit

konnte DNA in ausreichender Konzentration und Reinheit für die Herstellung der Genbank isoliert werden. Mit der Filtersäulenmethode wurde DNA in einer Konzentration von 1 µg/µl isoliert. Die zur Ligation eingesetzte *Sau3A* I-verdaute DNA sollte laut Hersteller des ZAP-Express-Kits mindestens eine Konzentration von 1 µg/µl haben, um eine effektive Ligation zu ermöglichen.

Der Restriktionsenzymverdau der isolierten DNA, der die DNA in die geeignete Fragmentlänge zerschneidet, bedurfte ebenfalls mehrere Optimierungsschritte. Es zeigte sich, dass nicht nur die Menge der zum Verdau eingesetzten DNA und die Enzyme wichtig waren, sondern auch die Zeit des Restriktionsenzymverdaus eine große Rolle für den Erhalt einer ausreichenden Menge an DNA-Inserts der gewünschten Länge spielte. Die genomische DNA wurde zwischen 5 und 60 Minuten mit *Sau3A* I verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen. Wie in Abb. 7 zu erkennen ist, zeigte sich, dass der 20-Minuten-Verdau die größte Dichte an DNA-Fragmenten im Bereich der gewünschten DNA-Länge zwischen 4000 und 8000 bp ergab.

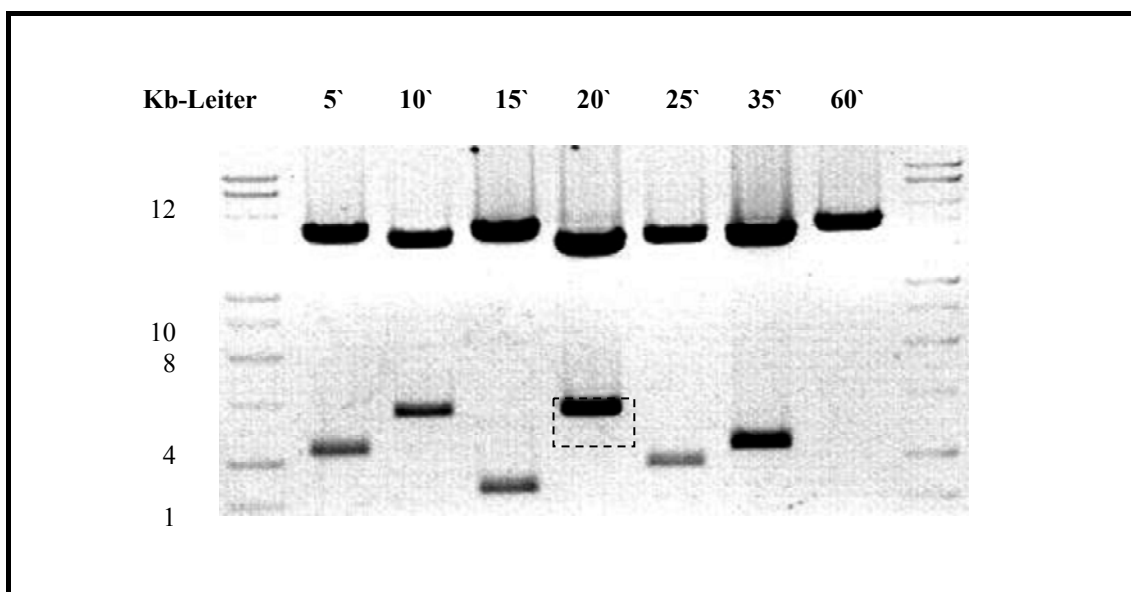


Abb. 7: Photodokumentation eines Restriktionsenzymverdaus chromosomaler *S. aureus*-DNA mit *Sau3A* I. Deutlich zeigt sich die größte Dichte im Bereich zwischen 4000 bis 8000 bp in der 20-Minutenspur. Angedeutet ist auch der DNA-Bandenbereich, der dann unter UV-Licht ausgeschnitten wurde. Die darin enthaltene DNA wurde dann mittels GeneClean-Kit isoliert.

Mit der isolierten genomischen DNA vom MRSA-Stamm A134 wurde eine Genbank erstellt, welche einen Umfang von ca. 10000 Klonen aufwies. Die Auswahl des Stammes erfolgte dabei in Anlehnung an die Arbeiten von Lorenz *et al.* (2000). Wenn man davon ausgeht, dass das Genom von *S. aureus* etwa 2,8 Mbp umfasst, sind theoretisch 1000 DNA-Fragmente mit einer Grösse von 3000 bp nötig um die gesamte Erbinformation des Bakteriums in einer Genbank abzudecken. In den Vektor, der Inserts bis zu einer Grösse von 1 – 12 000 bp aufnehmen kann, wurden DNA-Inserts einer Grösse von 4 bis maximal 8 kbp ligiert. Bei dieser Größe wären rein rechnerisch nur etwa 400 bis 800 Klone nötig, um das gesamte Genom des MRSA-Stammes A134 einmal abzudecken. Zur statistischen Absicherung ist es aber nötig eine mehrfache Abdeckung zu erhalten, da einzelne Fragmente häufiger ligiert vorliegen als andere. Daher sollte eine mindestens 8-fache Abdeckung angestrebt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine 12-fache Abdeckung erreicht. Die Insertgröße von 4 kbp – 8 kbp wurde gewählt, da bei einer solchen Größe eine Sequenzierung durch „primer-walking“ gut durchführbar ist und die Expression der Mehrzahl der möglichen Antigene wahrscheinlich ist. Die hergestellte Genbank umfasst ca. 10000 Klone. Die Insert-tragenden Phagen wurden in 500 µl SM-Puffer aufgenommen und können in dieser Form über mehrere Jahre gelagert werden. Insert-tragende Phagen wurden nach Infektion mit *E. coli* XL-1-blue Zellen als Plaques sichtbar gemacht.

IV. 2 Aufspüren immunodominanter Antigene mit Hilfe der Expressionsgenbank

Um immunodominante Antigene aufzuspüren, wurden die exprimierten *S. aureus*-Proteine mit Patientenserum inkubiert. Als Vergleichsserum diente ein Serum von einem gesunden Spender, der keine klinische Anamnese einer *S. aureus*-Infektion aufwies. Zunächst wurde das System optimiert. Insert-tragende lytische Phagen wurden mit Hilfe von *E. coli* XL-1-blue Zellen auf Agarplatten als Plaques erkennbar. Nach Auflegen einer Nitrocellulose-Membran wurden die exprimierten Proteine an diese fest gebunden und konnten nachfolgend in einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht werden. Die zu Beginn gewählte Methode der Lumineszenz-basierten Detektion (ECL-SubstratTM, Amersham-Pharmacia, Freiburg) zur Erkennung der positiv reagierenden Plaques war nicht geeignet, da aufgrund der Unebenheiten der Agarplatte

eine starke Hintergrundreaktion auftrat. Dadurch konnten die eigentlich gesuchten Signale überdeckt werden. Im Weiteren wurde für die Antikörperreaktion ein mit der Alkalischen Phosphatase gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Mit dieser Form der Signaldarstellung war es möglich, distinkte Spots zu erkennen und damit eine Positiv/Negativ-Entscheidung zu treffen (siehe Abb. 8 und Abb. 9).

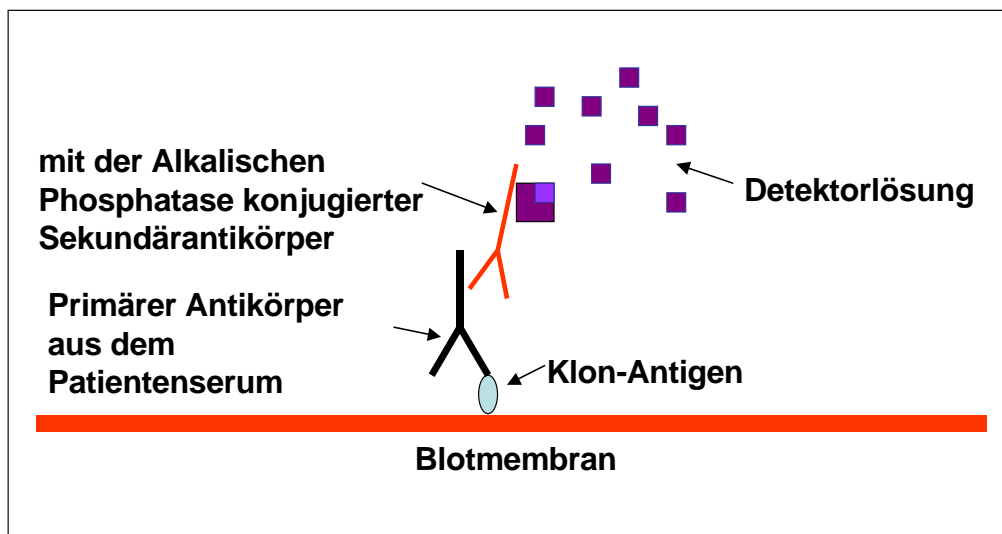


Abb. 8: Modelldarstellung der Antigen-Antikörperreaktion zum Nachweis immunodominanter Antigene mit Hilfe einer Expressionsgenbank.

Es war dabei sehr wichtig, nicht zu viele Plaques auf einer Agarplatte zu platzieren, damit eine genaue Trennung der einzelnen Plaques noch möglich war. Durch die Inkubation der Agarplatten mit verschiedenen Mengen an verpackten Phagenmaterial (1, 5, 10 μ l) und der dadurch erhaltenen Plaqueanzahl, ließ sich für das weitere Vorgehen die geeignete Menge feststellen, mit der man die gesamte Genbank analysieren konnte. In unserem Fall zeigte sich, dass bei einer Infektion mit 10 μ l des verpackten Phagenmaterials ca. 200, gut voneinander trennbare, Plaques auf einer Agarplatte erkennbar waren. Die 10000 Plaques umfassende Genbank war somit gut aufzuarbeiten.

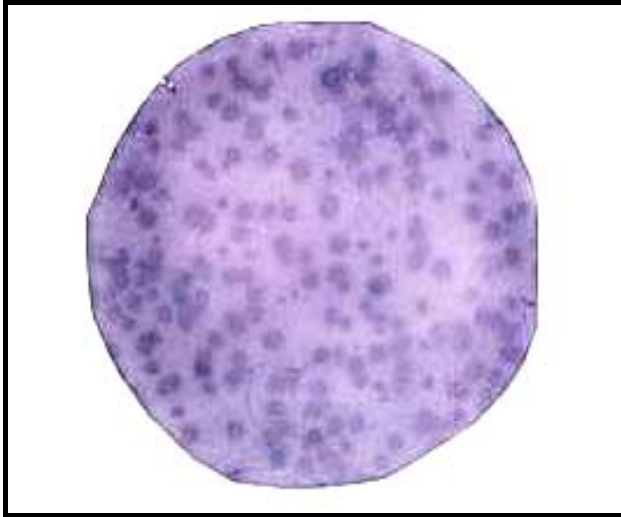


Abb. 9: Reaktion von exprimierten Proteinen der Genbank mit Patientenserum. Zu erkennen sind Proteine in Phagen-Plaques auf einer Nitrozellulosemembran, die durch eine spezifische Antigen-Antikörperreaktion sichtbar gemacht wurden.

IV. 2. 1 Präadsorption der zu testenden Seren und Kontrolle mittels Dot Blot Test

In Abb. 9 sieht man deutlich, dass nahezu jeder Plaque durch die Reaktion mit den Patientenserum stark angefärbt wird. Um eine eindeutige Identifizierung reaktiver Plaques zu erhalten, wurden die verwendeten Seren vorab präadsorbiert. Dadurch wurden kreuzreagierende Antikörper, die für die starke Hintergrundreaktion verantwortlich sind, herausgefiltert. Präadsorbiert wurde mit einem *E. coli*- Phagenlysat, welches außer den spezifischen Inserts alle Bestandteile des Reaktionsansatzes, die möglicherweise zu Kreuzreaktionen führen, enthielt. Die eingesetzten Nitrocellulosemembranen wurden mehrfach mit dem *E. coli*-Phagenlysat inkubiert und die Effektivität dieser Prozedur wurde jeweils mittels Dot-Blot-Analysen überprüft. Dazu wurden Kreuzverdünnungsreihen angelegt. Das Phagenlysat wurde jeweils in den Konzentrationen 1:5; 1:50 und 1:500 mit den Serumverdünnungsstufen 1:100, 1:200 und 1:400 versetzt (Abb. 10). Die Reaktionsstärke war das Maß für ein optimales Verhältnis zwischen Phagenlysatverdünnung und Serumverdünnung. Mit Hilfe dieser Experimente wurden die optimalen Verdünnungsstufen für das Phagenlysat mit 1:5 und für die Seren (Patienten- und Kontrollserum) mit 1:200 bestimmt. Diese Verdünnungsstufen wurden dann für alle nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt.

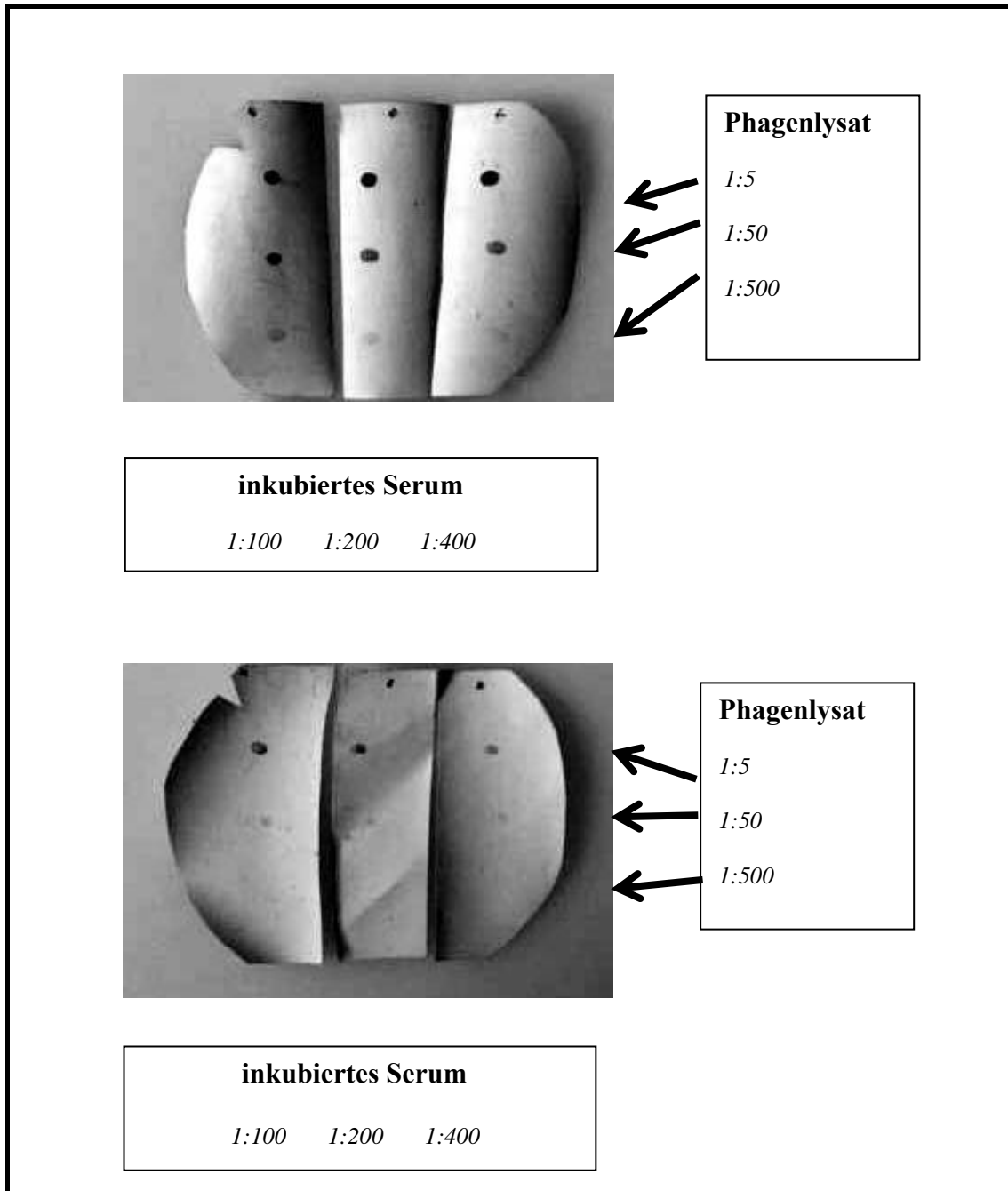


Abb. 10: Dot Blot-Test vor Präadsorption des Serums (oben) und nach Präadsorption des Serums (unten).

In Abb. 11 ist die Reaktion des Patientenserums gegen exprimierte Proteine der Genbank vor und nach Präadsorption dargestellt. Nach Präadsorption war eine deutlich geringere Hintergrundfärbung sichtbar. Nun war eine Identifizierung von *S. aureus*-Proteinen möglich, die spezifisch mit dem Patientenserum reagierten und somit als immunodominante Antigene während einer Infektion exprimiert wurden. Die Darstellung in Abb. 11 zeigt das Signal des Klons I (siehe Abschnitt IV. 3. 3. 1). Die

Klone II bis V zeigten ebenfalls eine deutliche Differenz zwischen der Signalstärke und der Hintergrundfärbung nach Reaktion mit präadsorbiertem und nicht-präadsorbiertem Serum.

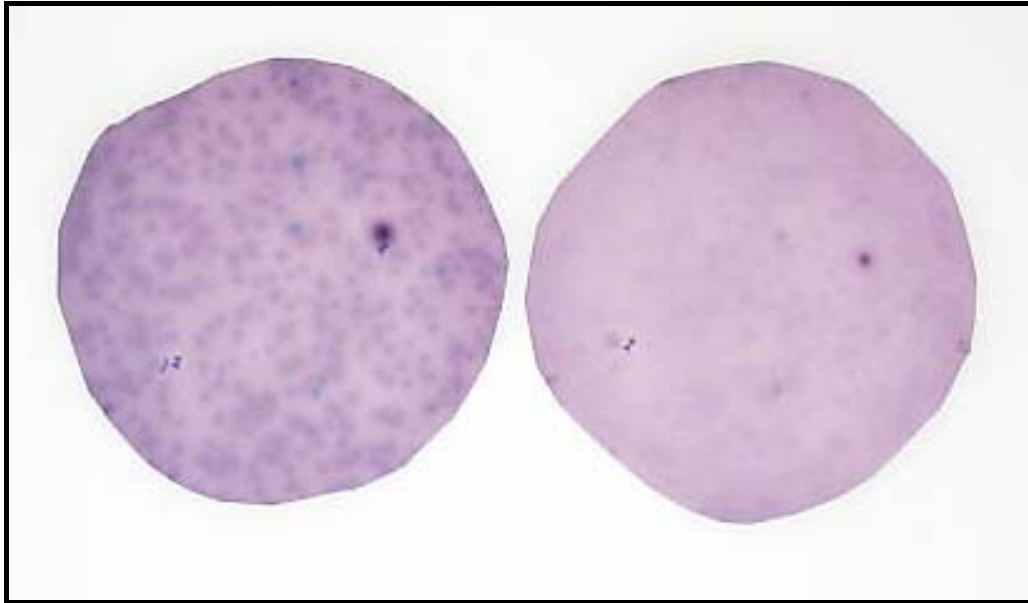


Abb. 11: Gegenüberstellung der Reaktionsmuster vor (links) und nach (rechts) Präadsorption mit *E. coli*-Phagenlysat. Die Blotmembranen wurden nach Adsorption der auf den Agarplatten sichtbaren Plaques mit einem Patientenserum inkubiert. Anschließend wurden die exprimierten Proteine durch einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nach Substratzugabe angefärbt.

IV. 2. 2 Identifizierung und Amplifizierung positiver Klone

Nachdem die Methoden zur Identifizierung immunodominanter Antigene in der Expressionsgenbank optimiert waren, wurde die gesamte Genbank unter diesen Bedingungen getestet. Dabei konnten fünf Plaques identifiziert werden, die eine starke Reaktion mit dem Patientenserum zeigten, jedoch nur sehr schwach mit dem Kontrollserum reagierten. Diese fünf Plaques wurden nachfolgend ausgestochen und zur erneuten Infektion mit *E. coli* XL-1-blue Zellen eingesetzt. Dadurch sollte eine Homogenität der Insert-tragenden Phagenpartikel innerhalb eines Klon erhalten werden. Diese Prozedur wurde mehrfach wiederholt, bis alle Plaques auf einer Platte gleichmäßig mit dem Patientenserum reagierten, dagegen das Kontrollserum keine Reaktion zeigte (Abb. 12). Die fünf identifizierten Plaques mussten dann zur weiteren Charakterisierung in ein Vektorsystem umgewandelt werden. Dies erfolgte mit Hilfe

von Helferphagen, die spezifische Exzisionsstellen erkennen, den ausgeschnittenen Strang zirkularisieren und in ein Plasmid überführen (Abb. 13). Diese Plasmide können aus den Bakterienzellen isoliert werden. Anschließend kann durch ein Restriktionsverdau die Insertgröße bestimmt werden und das Insert kann durch Sequenzierung charakterisiert werden.

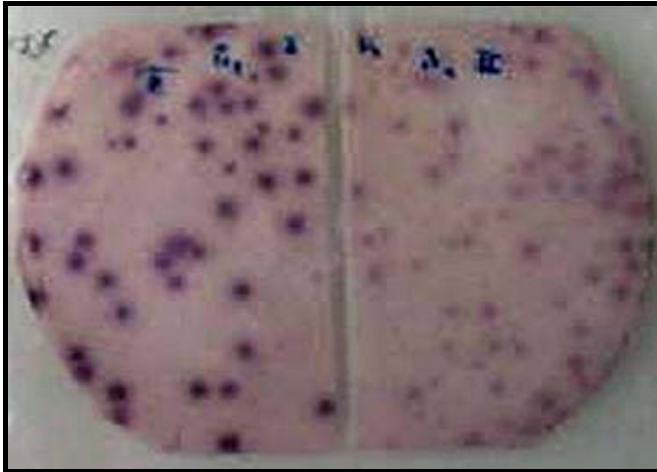


Abb. 12: Reaktion exprimierter Proteine mit Patientenserum (links) und Kontrollserum (rechts). Eine Nitrocellulosemembran wurde geteilt und anschließend getrennt mit Patientenserum (links) und Kontrollserum (rechts) inkubiert. Die gebundenen Proteine auf beiden Hälften der Nitrocellulosemembran stammen aus Plaques eines positiv reagierenden Klon, der zuvor aus einer Agarplatte ausgestochen wurde.

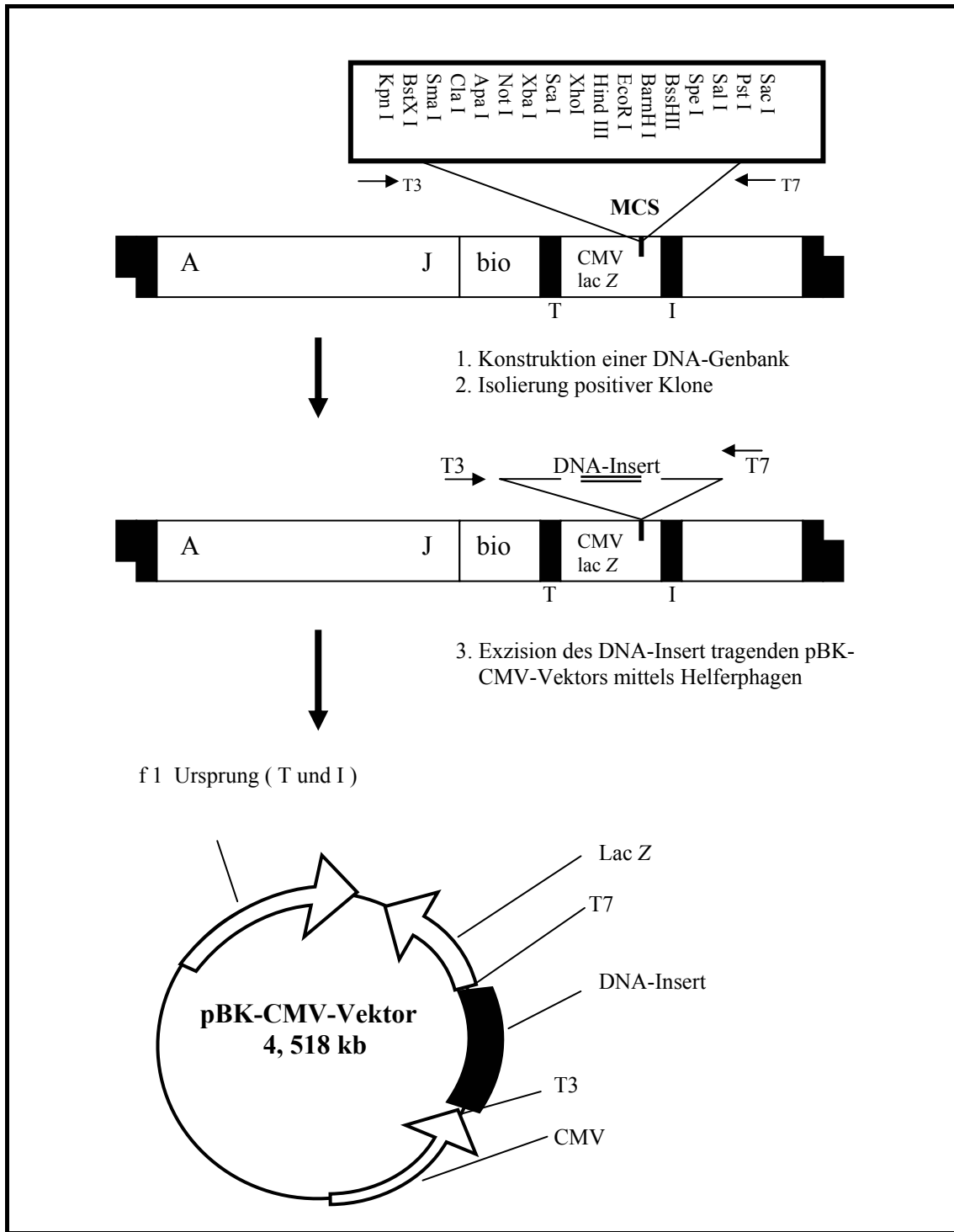


Abb. 13: Schematische Darstellung der Einzelklonisierung mit Hilfe des Helferphagen. Die Exzisionsstellen I (Initiator) und T (Terminator) werden von Proteinen des Helferphagen erkannt. Der ausgeschnittene Strang wird zirkularisiert und von Helferphagenproteinen verpackt. Der Helferphage infiziert anschließend *E. coli*-Zellen, in denen die klonierten Inserts exprimiert werden. Nach Lyse der Bakterienzellen infolge der Phageninfektion sind die exprimierten Proteine in den Plaques zu finden. Die Proteine werden dann auf Nitrozellulosemembranen immobilisiert und einer weiteren Analyse zugeführt.

IV. 3 Charakterisierung immunpositiver Klone

IV. 3. 1 Charakterisierung der Insertelemente durch Gelelektrophorese

Nach Überführung der fünf positiven Klone in eine Vektorform wurde die Plasmid-DNA isoliert, das Insert durch Restriktionsverdau herausgespalten und die Größe durch Gelelektrophorese bestimmt (Abb. 14).

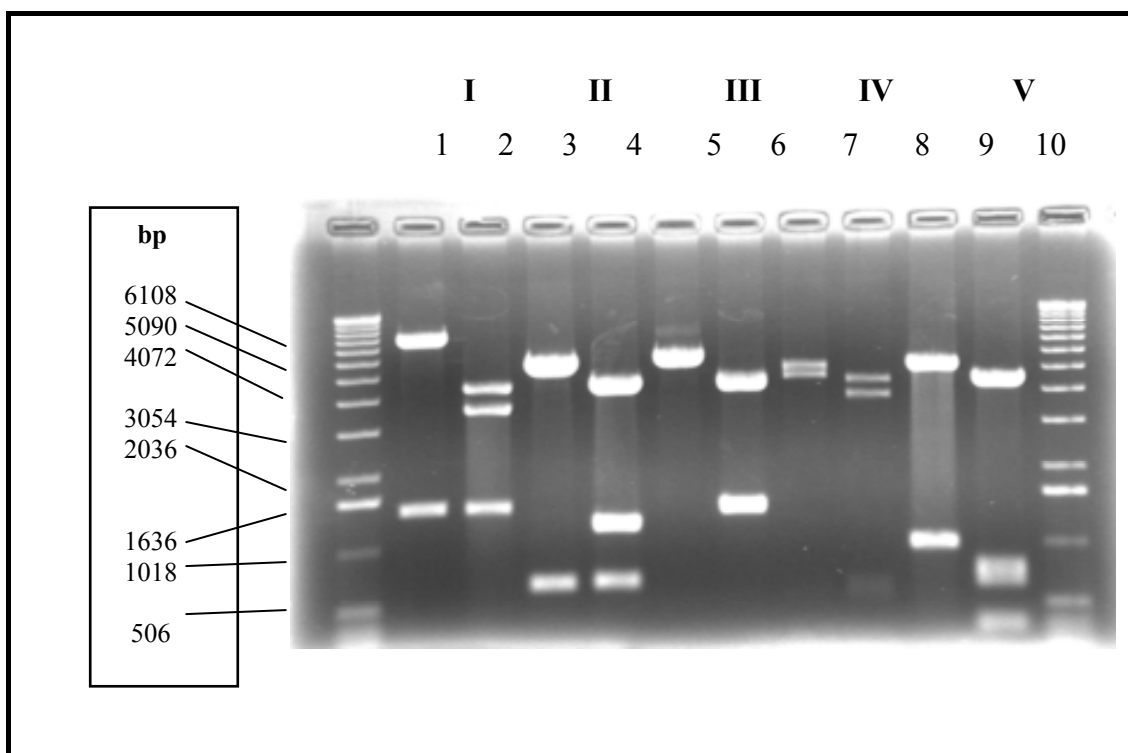


Abb. 14: Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA der fünf positiven Klone nach Zirkularisierung durch den Helferphagen und Infektion von *E. coli*-Zellen. In Spur 1, 3, 5, 7 und 9 wurde ein *Pst*I-Verdau und in den Spuren 2, 4, 6, 8 und 10 ein *Pst*I/*Hind*III-Doppelverdau auf das Gel aufgetragen. In der ersten und letzten Spur ist ein Größenmarker erkennbar.

In Abb. 14 ist das Muster des Restriktionsverdaus der Inserts dargestellt. Die linke Spur des jeweiligen Klons zeigt einen *Pst*I-Verdau und die rechte Spur einen *Pst*I/*Hind*III-Doppelverdau. In dem pBKphagemid Vektor ist jeweils eine *Pst*I- und *Hind*III-Schnittstelle. Wenn in dem klonierten Insert keine weiteren *Pst*I und *Hind*III-Schnittstellen vorhanden sind, würde durch eine *Pst*I-Spaltung eine Linearisierung des Vektors erfolgen. Durch den *Pst*I/*Hind*III-Verdau wird das Insert herausgespalten, da die Inserts in die *Bam*HI-Schnittstelle kloniert wurden und *Hind*III upstream von *Bam*HI und *Pst*I

downstream von *Bam*HI liegt (Abb. 15). Klon I enthält ein Insert mit einer Größe von ca. 5400 bp. In dem Insert befindet sich eine *Pst*I-Schnittstelle, daher sind in Spur 1 zwei Banden und in Spur 2 drei Banden zu erkennen. Klon II enthält ein Insert von ca. 2000 bp. In dem Insert befindet sich eine *Pst*I-Schnittstelle, daher sind in Spur 3 zwei Banden und in Spur 4 drei Banden zu erkennen. Klon III enthält ein Insert mit einer Größe von ca. 1500 bp. Im Insert befindet sich hier jedoch keine *Pst*I-Schnittstelle, somit ist in Spur 5 nur der linearisierte Vektor und in Spur 6 zwei Banden zu erkennen. Klon IV enthält ein Insert mit einer Größe von ca. 3500 bp. In dem Insert befindet sich eine *Pst*I-Schnittstelle, daher sind in Spur 7 zwei Banden und in Spur 8 drei Banden zu erkennen. Klon V enthält ein Insert mit einer Größe von ca. 5300 bp. In dem Insert befindet sich eine *Pst*I-Schnittstelle, daher sind in Spur 9 zwei Banden und in Spur 10 drei Banden zu erkennen. In Spur 2, 4, 6, 8, 10 ist der pBK-CMV phagemid-Vektor als ca. 4,5 kb Bande zu erkennen (jeweils die obere Bande in Abb. 14).

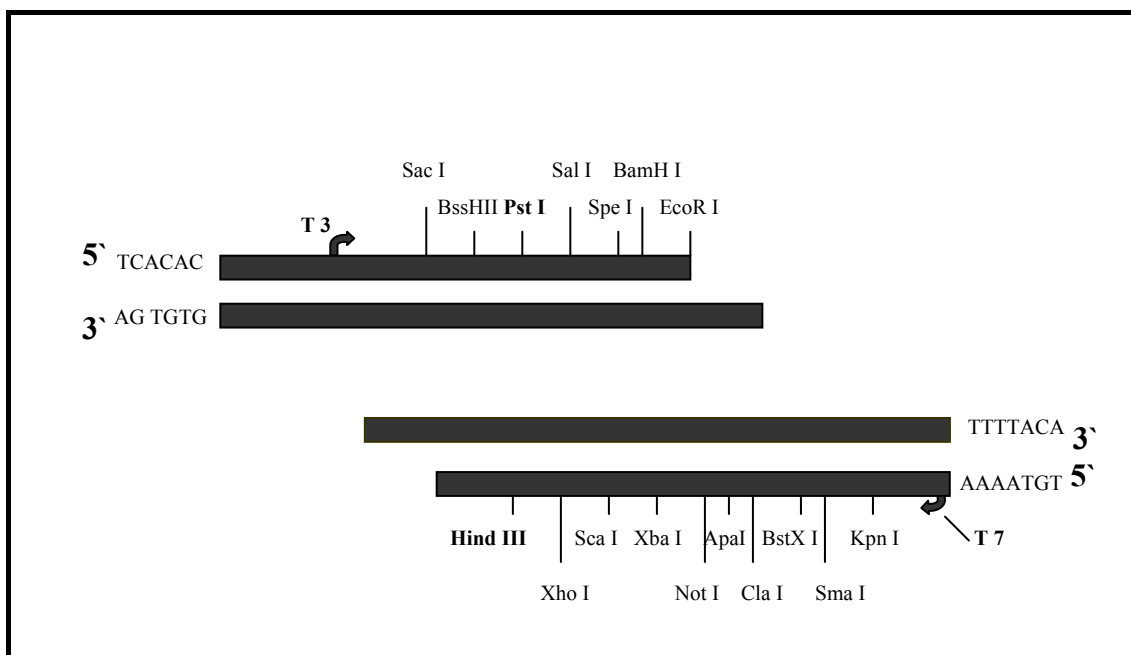


Abb. 15: Schematische Darstellung der *Multi Cloning Site* des pBK-CMV Vektors. Die Inserts wurden in die *Bam*HI-Schnittstelle kloniert. *Hind*III liegt upstream von *Bam*HI und *Pst*I liegt downstream von *Bam*HI.

IV. 3. 2 Charakterisierung der Insertelemente durch DNA-Sequenzierung

Nachdem gezeigt wurde, dass alle fünf mit den Patientenseren positiv reagierenden Klone ein Insert enthielten (Abb. 14), wurde die DNA-Sequenz bestimmt und durch Homologievergleiche in Datenbanken charakterisiert. Da im pBK-phagemid-Vektor Erkennungssequenzen für den T3- und T7-Primer die MCS flankieren, wurde zunächst mit Hilfe dieser Primer die Sequenzierung begonnen. Mit einem Sequenzierungsgang erhielt man jeweils von beiden Seiten des Inserts einen Abschnitt von 300 bis 500 bp. Die nachfolgende Sequenzierung erfolgte dann auf die Art, dass man einen neuen Primer aus dem jeweils zuvor gefundenen Abschnitt bestimmte (Methode des „primer-walkings“). Durch diese Methode erreichte man pro Sequenzierungsgang ein Voranschreiten von ca. 600-1000 bp. Man fuhr solange nach dieser Methode fort, bis man mit Hilfe der Datenbank, in die man die erhaltenen Sequenzen nach jedem Sequenzierungsgang eingab, ein sicheres Überlappen der von beiden Seiten des Inserts erhaltenen Sequenzreihen erkennen konnte (siehe Abb. 16).

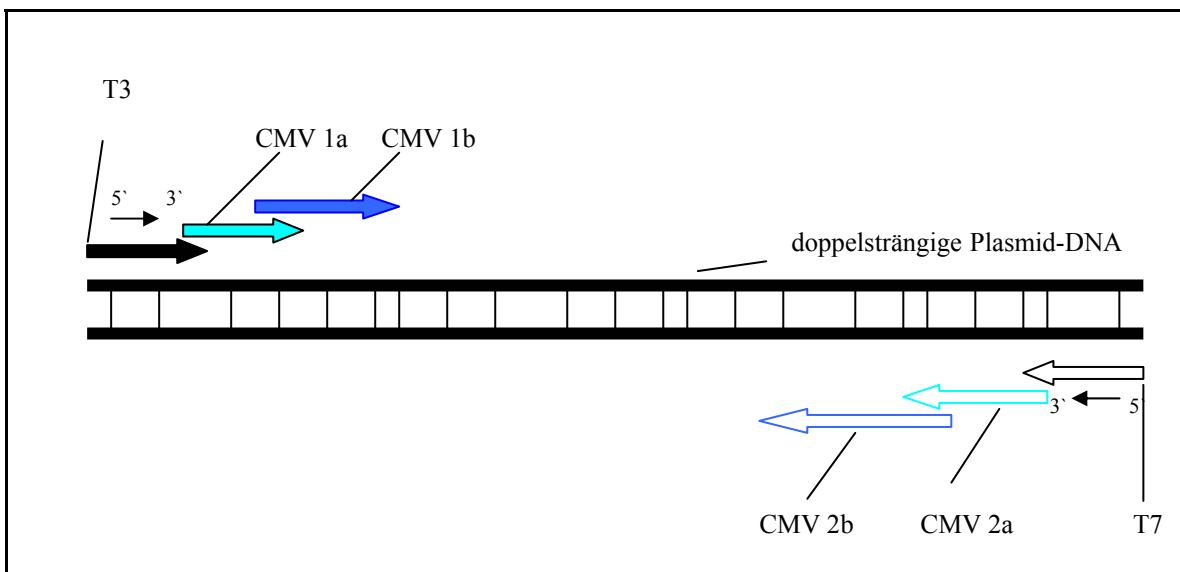


Abb. 16: Schematische Darstellung der schrittweisen Sequenzierung der Insert-DNA (Methode des „primer-walkings“). Zunächst wurde mit den T3- und T7-Primern das Insert ansequenziert und dann im Weiteren aus den identifizierten DNA-Sequenzen neue Primer ausgewählt (CMV1a, 1b, 2a, 2b bezeichnen neu ausgewählte Primer für den Sequenzierungsgang).

Die Sequenzierung der fünf Klone ergab Inserts einer Länge von 1545 bp bis 5387 bp. In Tab. 11 sind die sequenzierten Insertgrößen aufgeführt.

Tab. 11: Übersicht über die durch Sequenzierung bestimmte Länge der fünf Klone.

Klon	I	II	III	IV	V
Länge in bp	5387	2044	1545	3482	5286

IV. 3. 3 Charakterisierung der Insertelemente durch Homologievergleiche in Datenbanken

In den kommenden Abschnitten erfolgt die ausführliche Darstellung der identifizierten Sequenzhomologien der einzelnen Klone. Jeder Klon wird in Form eines Balkendiagrammes schematisch dargestellt, anhand dessen sich die Lokalisation der gefundenen Homologien ablesen lässt. In der dazugehörigen Tabelle findet man die genaue Bezeichnung des jeweiligen Proteins, den genauen Abschnitt der Homologie der Datenbanksequenz und den Homologiebereich auf dem jeweiligen Klon. Klon IV zeigte nach Homologievergleich mit den Datenbanken keine signifikanten Homologien, weshalb auf eine weitere Darstellung der Sequenz dieses Klons verzichtet wurde.

IV. 3. 3. 1 Klon I

Die Sequenzierung von Klon I, der das intensivste Signal zeigte, ergab eine Länge von 5387 bp. Nach Datenbankvergleichen konnten mehrere Sequenzhomologien zu verschiedenen bekannten *S. aureus*-Proteinen gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Abb.17 und Tab. 12 dargestellt.

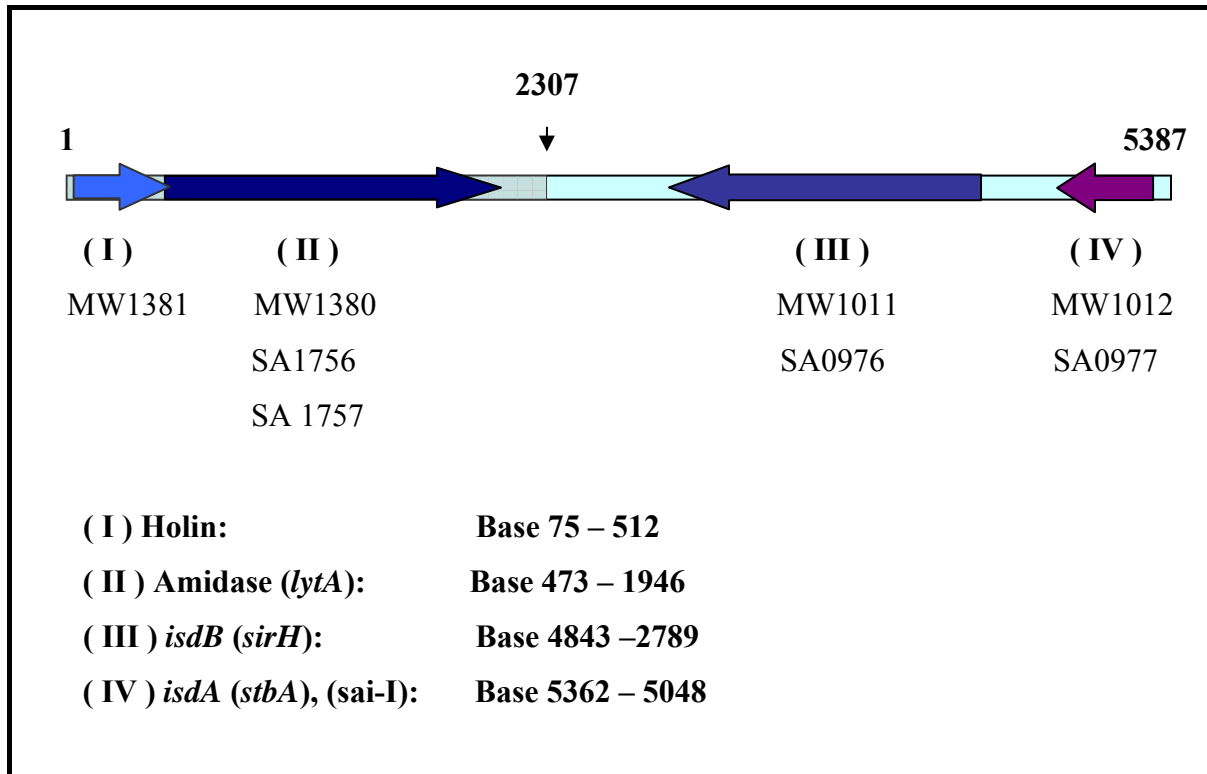


Abb. 17: Schematische Darstellung der Sequenzhomologien im Klon I. Die Bezeichnung der Homologien orientiert sich nach der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_form.map). Der Sequenzabschnitt 1-2307 umfasst phagenspezifische DNA. Die Nummerierung unter denen die Gene bei den einzelnen *S. aureus*-Stämmen angegeben werden sind aufgeführt.

Von Base 1 bis 2307 handelt es sich im Klon I um phagenspezifische Sequenzen. Im DNA-Bereich von Base 2308 bis 2788 sind in der Datenbank keine Homologien zu bekannten Proteinen vorhanden. Anzunehmen ist daher, dass es sich bei diesen 480 bp um spezifische Sequenzen von dem *S. aureus*-Stamm A134 handelt. Die kodierende Sequenz für das Holin umfasst 437 bp. Das Holin ist ein Enzym, das Poren in die bakterielle Zellwand einführt. Auf dem Klon I beginnt die Homologie an Position 75 und endet mit der Base 512 (siehe Abb. 17). Da es sich bei den ersten 2307 bp von Klon I um phagenspezifische DNA handelt, ist die Sequenz vom Holin auch auf verschiedenen Phagen zu finden. In unserem Fall zeigt sich die Sequenz auf dem Bakteriophagen 80 α (Accession-Nr. U72397), dessen Sequenzierung und Analyse erstmals 1996 erfolgte (Bon *et al.*, 1997) und auf dem Bakteriophagen phi 11 Holin (Accession-Nr. L34781). Die entsprechenden Lokalisationen auf den Phagen sind aus Tab. 12 ersichtlich.

Tab. 12: Homologien innerhalb der Insertsequenz in Klon I (5387 bp).

	Name	CDS (bp-Länge)	Homologie zu Datenbanksequenzen	Homologiebereich in Klon I (bp)
I	Holin	437	Bakteriophage 80α (653-2699), (CDS bp 677-1114) (Accession-Nr. U72397) Bakteriophage phi 11Holin (653-1152), (CDS bp 677-1114) (Accession-Nr. L34781) S. aureus-Phage phi 11 (40478-43456), (CDS bp 40478-42525) (Accession-Nr. AF424781)	75 – 512
II	Amidase <i>lytA</i>	1475	Bakteriophage 80α (653-2699), (CDS bp1095-2540) (Accession-Nr. U72397) S. aureus- Peptidoglykan Hydrolasegen (1-1894), (CDS bp 290-1735) (Accession-Nr. M76714)	473 – 1946
III	<i>isdB (sirH)</i>	1939	S. aureus subsp. aureus MW2 (200420-202943), (CDS bp 200488-202425) (Accession-Nr. AP004825) S. aureus putative iron-regulated cellwall-anchored protein SirH (4586-7120), (CDS bp 5094-7052) (Accession-Nr. AY061874)	4843 – 2789
IV	<i>isdA</i> <i>(stbA)</i> <i>(sai-1)</i>	1054 (1066)	S. aureus subsp. aureus MW2 (200420-202943), (CDS bp202628-203680) (Accession-Nr. AP004825) S. aureus putative transferrin-binding protein StbA (4586-7120), (CDS bp 3828-4892) (Accession-Nr. AY061874) S. aureus sai-1-Gen von 29-kDa Zell- Oberflächenprotein (1096-1567), (CDS bp 338-1402) (Accession-Nr. AB042826)	5362 - 5048

Der zweite Orf, welcher für eine Amidase kodiert, ist auf dem Klon I von Base 473 bis 1946 lokalisiert und hat somit eine Länge von 1475 bp (siehe Abb. 17). Die kodierende Sequenz für dieses Protein liegt downstream der Gensequenz des Holins. Die ersten 39 bp der Amidase überlappen mit den letzten 39 bp Basen des Holins (Abb.17). Es

handelt sich auch hier um phagenspezifische Sequenzen, in diesem Fall wieder von dem Bakteriophagen 80 α (Accession-Nr. U72397), von Base 1095 bis 2540 (siehe Tab. 12). Auf dem Bakteriophagen phi 11-Sequenzabschnitt, auf dem das Holin liegt (Accession-Nr. L34781), ist eine solche Sequenz nicht zu finden. Eine Analyse der kodierenden Sequenz für die Amidase mittels NCBI-Datenbank ergab, dass die Amidase auf dem Bakteriophagen 80 α und die Peptidoglykanhydrolase *lytA* eine identische Nukleotidsequenz besitzen. Die AS-Sequenz, die durch die Nukleotidsequenzfolge der Amidase und der Peptidoglykanhydrolase bestimmt wird, ergibt ein Protein mit 481 AS. Die C-terminale Sequenz zeigt eine signifikante Homologie zur C-terminalen Sequenz des Lysostaphins von *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus* (Wang *et al.*, 1991).

In gegenläufiger Anordnung zu den beiden oben genannten Sequenzen wurden zwei weitere Homologien zu bekannten *S. aureus*-Proteinen gefunden. Der 1939 bp große kodierende Sequenzabschnitt von *isdB* auf dem *S. aureus*-Stamm MW2 liegt im Basenbereich 2789 bis 4843 der Sequenz von Klon I (Abb. 17). Dieser Bereich auf dem Klon I umfasst 2056 bp und ist somit um 116 bp länger als die kodierende Sequenz vom *S. aureus*-Stamm MW2 (Accession-Nr. AP004825). Aus der Datenbankanalyse geht hervor, dass IsdB in *S. aureus* MW2 mit der kodierenden Sequenz von Base 200488 bis 202425 (Accession-Nr. AP004825) und SirH mit der kodierenden Sequenz von Base 5094 bis 7052 (Accession-Nr. AY061874) identisch sind.

Auf dem Gegenstrang im Klon I konnte ein weiteres Gen identifiziert werden, das Homologien zu *isdA* von *S. aureus* besitzt. Die 1054 bp umfassende kodierende Sequenz von IsdA ist in dem *S. aureus*-Stamm MW2 (Accession-Nr. AP004825) im Bereich der Basen 202628 bis 203680 lokalisiert. Von diesem Abschnitt ist aber nur ein 317 bp großes Teilfragment auf dem klonierten Insert zu finden. Dies entspricht der Basenposition 5048 bis 5362 auf dem Insert und der Basenposition 202628 bis 202945 der Sequenz vom *S. aureus*-Stamm MW2. Die Datenbankanalyse zeigt, dass es sich bei dem *isdA* auf dem *S. aureus*-Stamm MW2, dem *stbA* und dem *sai-1* um identische Sequenzabschnitte handelt. Das durch *sai-1* kodierte 29 kDa große Oberflächenprotein wurde erstmals im Jahre 2000 in dem Genom des Stammes Cowan I entdeckt und analysiert (Sakata *et al.*, 2000). Die Identifizierung und die Analyse erfolgte in der

Arbeit von Taylor und Heinrichs (2002). Der Klon I zeigt im Bereich von Base 1096 bis Base 1567 der Proteingensequenz Homologien zum *sai-I*-Gen, was den Basenbereich von Base 4880 bis 5343 der Klonsequenz entspricht. Somit ist auch hier *isdA* nur als ein Teilfragment von 307 bp Länge auf dem Insert zu finden. Wahrscheinlich kodiert es für ein Transferrin-bindendes Protein.

Durch die Sequenzierung wurde deutlich, dass im Genom des klinischen Isolates A134 phagenspezifische Sequenzen in der Nähe des *isd*-Genclusters liegen. Da dies in den Referenzstämmen MW2 und N315 nicht der Fall ist, liegt die Vermutung nahe, dass ein Bakteriophage upstream des *isdA*-Gens in das Genom des Stammes A134 inserierte. Die Sequenzanalysen sind jedoch nicht ausreichend, um abschließend zu beurteilen, gegen welches der vier putativen Insertelemente das Patientenserum reagierte.

IV. 3. 3. 2 Klon II

Die Sequenzierung von Klon II ergab eine Insertlänge von 2044 bp. Die identifizierten Sequenzen zeigen Übereinstimmungen zum *cadA*-Gen und zu einer putativen Transposase, die Gemeinsamkeiten mit verschiedenen bekannten Transposasen (z.B. IS431, IS256) aufweist. Die homologen Bereiche des Klons II zu den in den Datenbanken vorliegenden Eintragungen werden schematisch in Abb. 18 und Tab. 13 dargestellt.

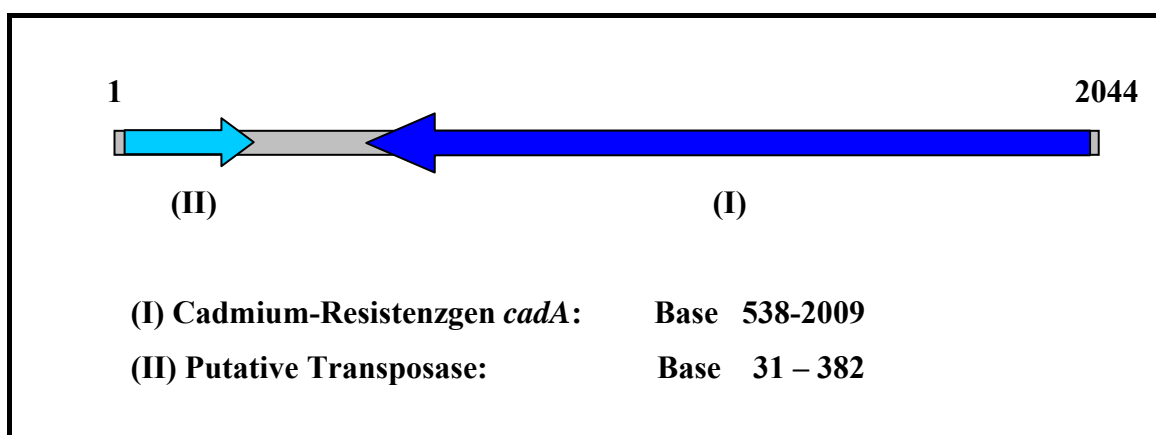


Abb. 18: Schematische Darstellung der Sequenzhomologien im Klon II. Die Bezeichnung der Homologien orientiert sich nach der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_form.map).

Tab. 13: Homologien innerhalb der Insertsequenz in Klon II (2044 bp).

	Name	CDS (bp-Länge)	Homologie zu Datenbanksequenzen	Homologiebereich in Klon II (bp)
I	<i>cadA</i> - Resistenzgen	2183	Plasmid pI258 (<i>S. aureus</i>) Cadmium Resistenzgen (<i>cadA</i>) (bp 1856–3532), (CDS 1064-3247) (Accession-Nr. J04551)	538-2009
II	Putative Transposase	676	Transposon IS431 (<i>S. aureus</i>- Penicillinase Plasmid pI524) (bp 491-841), (CDS 86-760) (Accession-Nr. M18437) <i>S. aureus</i>-Plasmid pSH6-DNA der Insertionssequenz von IS256 (bp 2157-2485), (CDS 1752-2426) (Accession-Nr. X53951)	31 – 382 31 - 359

Von Base 538 bis Base 2009 zeigt sich eine Homologie zur kodierenden Sequenz der Cadmiumresistenzdeterminante CadA, die sich beispielsweise auf dem *S. aureus*-Plasmid pI258 (Accession-Nr. J04551) befindet. Die kodierende Sequenz *cadA* hat eine Länge von 2183 bp, auf dem *S. aureus*-Plasmid pI258 entspricht das den Basenpositionen 1064-3247. Der homologe Bereich auf dem Insert umfasst einen 1473 bp großen Abschnitt (Base 538 bis 2009 des Inserts) und entspricht dem Bereich von Base 1856 bis 3247 der Datenbanksequenz (Accession-Nr. J04551). Die ersten 793 bp der kodierenden Sequenz von *cadA* auf dem Plasmid sind auf der Klonsequenz nicht vorhanden. Die Basen 3248 bis 3532 des Plasmids stimmen zwar ebenso mit der Klonsequenz überein, eine relevante Funktion ist diesem Abschnitt aber nicht zuzuschreiben. Von Base 31-382 (359) ist eine Homologie zur kodierenden Sequenz einer Transposase zu erkennen, die auch auf dem Transposon IS431 (Accession-Nr. M18437) und auf dem *S. aureus*-Plasmid pSH6 (Accession-Nr. X53951) lokalisiert ist. Die kodierende Sequenz für diese Transposase hat eine Länge von 676 bp, auf dem Transposon IS431 entspricht dies den Basenpositionen 86-760, auf dem *S. aureus*-Plasmid pSH6 den Basenpositionen 1752-2426. Der homologe Bereich des Inserts von Klon II zu dem Transposon IS431 (Accession-Nr. M18437) umfasst einen 352 bp großen DNA-Abschnitt, der der Basenposition 491 bis 841 auf dem Transposon entspricht. Die ersten 406 bp der kodierenden Sequenz sind somit auf dem Insert nicht vorhanden. Dagegen umfasst der homologe Bereich des Inserts von Klon II zu dem *S. aureus*-

Plasmid pSH6 (Accession-Nr. X53951) einen 330 bp großen DNA-Abschnitt, der der Basenposition 2157-2485 auf dem *S. aureus*-Plasmid pSH6 entspricht. Auch hier liegen die ersten 406 bp der kodierenden Sequenz nicht auf dem Insert.

Die Analyse der Gensequenzen des Inserts im Klon II verdeutlicht, dass die Reaktion des Patientenserums gegen Genprodukte eines vermutlich in das Genom des Stammes A134 inserierten Plasmides, das eine Cadmiumresistenzdeterminante (*cadA*) trägt, gerichtet ist. Ob die Antikörper CadA oder das Transposasefragment erkennen, wurde nicht weiter untersucht.

IV. 3. 3. 3 Klon III

Die Sequenzierung des Inserts von Klon III ergab eine Länge von 1545 bp. Nach Datenbankvergleichen konnten Sequenzhomologien zu Abschnitten des *S. aureus*-Transposon Tn557 (Accession-Nr. U93688) und zur *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 (Accession-Nr. AF410775) gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 und Tab. 14 schematisch dargestellt.

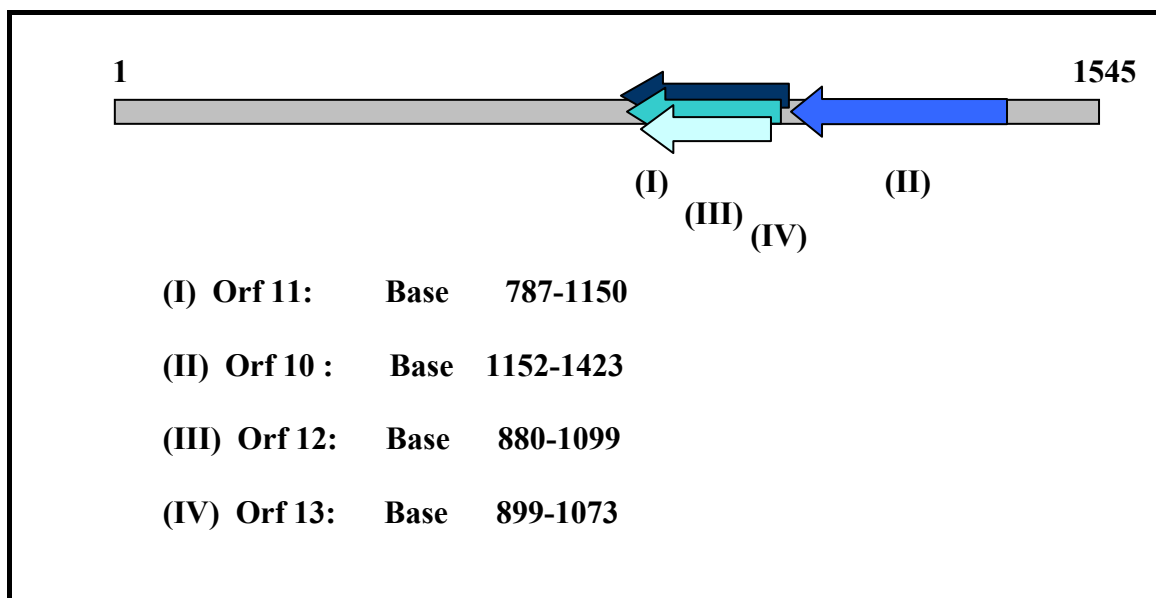


Abb. 19: Schematische Darstellung der Sequenzhomologien im Klon III. Die Bezeichnung der Homologien orientiert sich nach der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_form.map).

Das *S. aureus*-Transposon Tn557 (Accession-Nr. U93688) trägt die kodierenden Sequenzen für das Toxic Shock Syndrom Toxin I (*tst*), eine Terminase (*ter*), das Staphylokokken-Enterotoxin Q (*entQ*), das Staphylokokken-Enterotoxin K (*entK*), eine Integrase (*int*) und für weitere 21 putative Proteine (Orfs) (Lindsay *et al.*, 1998).

Die *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 (Accession-Nr. AF410775) trägt die kodierenden Sequenzen für verschiedene Staphylokokken-Enterotoxine (*seb*, *seq*, *sek*), für ein Integrase-ähnliches Protein und für 19 weitere putative Proteine (Orfs). Homologien der Insertsequenz zu kodierenden Sequenzabschnitten dieser beiden in der Datenbank abgelegten mobilen Elemente bestehen jeweils für die Orfs 10 und 11. Die kodierenden Nukleotide der Orfs 12 und 13 des *S. aureus*-Transposon Tn557 (Accession-Nr. U93688) sind ebenfalls auf dem Insert lokalisiert (Abb. 19).

Tab. 14: Homologien innerhalb der Insertsequenz in Klon III (1545 bp).

	Name	CDS (bp-Länge)	Homologie zu Datenbanksequenzen	Homologiebereich in Klon III (bp)
I	Orf 11	396	<i>S. aureus</i> -Transposon Tn557 (7312-6623), (CDS 7006-7401) (Accession-Nr. U93688)	787-1150
		365	<i>S. aureus</i> -Pathogenitätsinsel 3 (6850-7517), (CDS 7211-7573) (Accession-Nr. AF410775)	
II	Orf 10	294	<i>S. aureus</i> -Transposon Tn557 (7312-6623), (CDS 6720-7013) (Accession-Nr. U93688)	1152-1423
		285	<i>S. aureus</i> -Pathogenitätsinsel 3 (6850-7517), (CDS 6925-7209) (Accession-Nr. AF410775)	
III	Orf 12	252	<i>S. aureus</i> -Transposon Tn557 (7312-6623), (CDS 7057-7308) (Accession-Nr. U93688)	880-1099
IV	Orf 13	208	<i>S. aureus</i> -Transposon Tn557 (7312-6623), (CDS 7083-7289) (Accession-Nr. U93688)	899-1073

Orf 10 vom *S. aureus*-Transposon Tn557 (Accession-Nr. U93688) mit der kodierenden Sequenz von Base 6720-7013 (294 bp) und Orf 10 der *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 (Accession-Nr. AF410775) mit der kodierenden Sequenz von Base 6925-7209 (285 bp) sind jeweils bis zur Basenposition 285 der kodierenden Sequenz identisch. Die

kodierende Sequenz für Orf 10 sowohl des *S. aureus*-Transposon Tn557 als auch der *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 ist komplett auf dem Insert vorhanden (Tab. 14 und Abb. 20/21). Ähnlich verhält es sich mit dem Orf 11. Orf 11 vom *S. aureus*-Transposon Tn557 (Accession-Nr. U93688) mit der kodierenden Sequenz von Base 7006-7401 (396 bp) und Orf 11 der *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 (Accession-Nr. AF410775) mit der kodierenden Sequenz von Base 7211-7573 (365 bp) sind jeweils bis zur Basenposition 365 der kodierenden Sequenz identisch. Der homologe Bereich innerhalb der Insertsequenz zum Orf 11 umfasst die Basen 787-1150 (365 bp). Auf dem Insert des Klons III sind somit ca. 80% der kodierenden Sequenz von Orf 11 des *S. aureus*-Transposon Tn557 vorhanden. Es fehlen hier die C-terminalen 89 Nukleotide. Die kodierende Sequenz für Orf 11 der *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 ist komplett auf dem Insert vorhanden (Tab. 14 und Abb. 20/21).

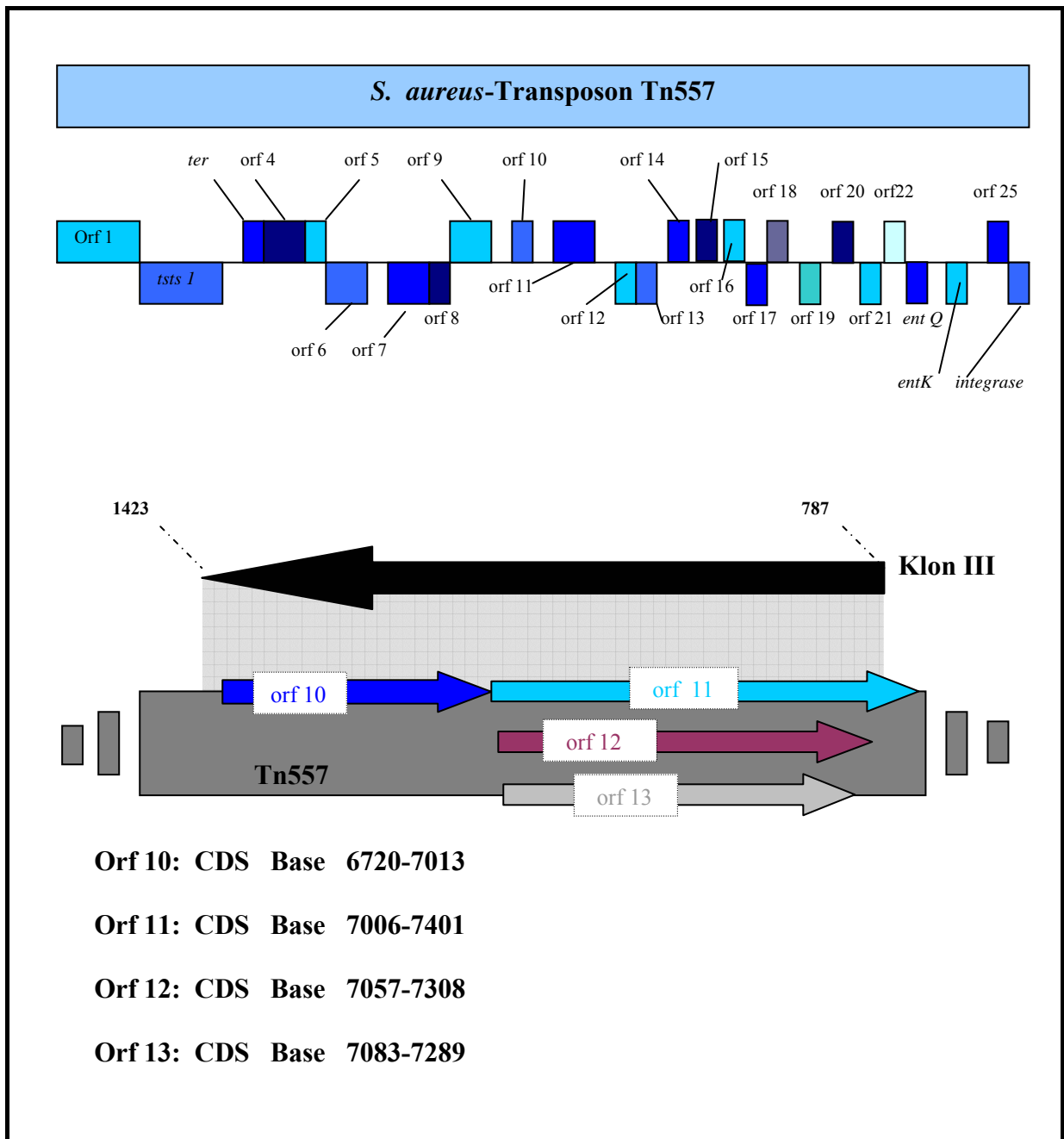


Abb. 20: Schematische Darstellung der homologen Bereiche des Inserts in Klon III und der kodierenden Genabschnitte (CDS) von *S. aureus*-Transposon Tn557 (Accession-Nr. U93688), die auf dem Insert gefunden werden. Im oberen Teil der Abbildung ist die genomische Organisation des kompletten Tn557 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist der homologe Bereich zwischen Klon III (schwarzer Pfeil) mit dem entsprechenden Basenbereich und dem *S. aureus*-Transposon Tn557 (dunkelgrauer Balken) mit den Orfs dargestellt.

Die beiden auf dem *S. aureus*-Transposon Tn557 liegenden Orf 12, mit der kodierenden Sequenz von Base 7057-7308 (252 bp), und Orf 13, mit der kodierenden Sequenz von Base 7083-7289 (208 bp) sind ebenfalls komplett auf der Insertsequenz von Klon III vorhanden. Wie aus Abb. 20 und Tab. 14 ersichtlich haben die Orfs 11-13 auf dem *S.*

aureus-Transposon Tn557 nahezu identische kodierende Sequenzabschnitte im Nukleotidbereich 7006 bis 7401 der Datenbanksequenz.

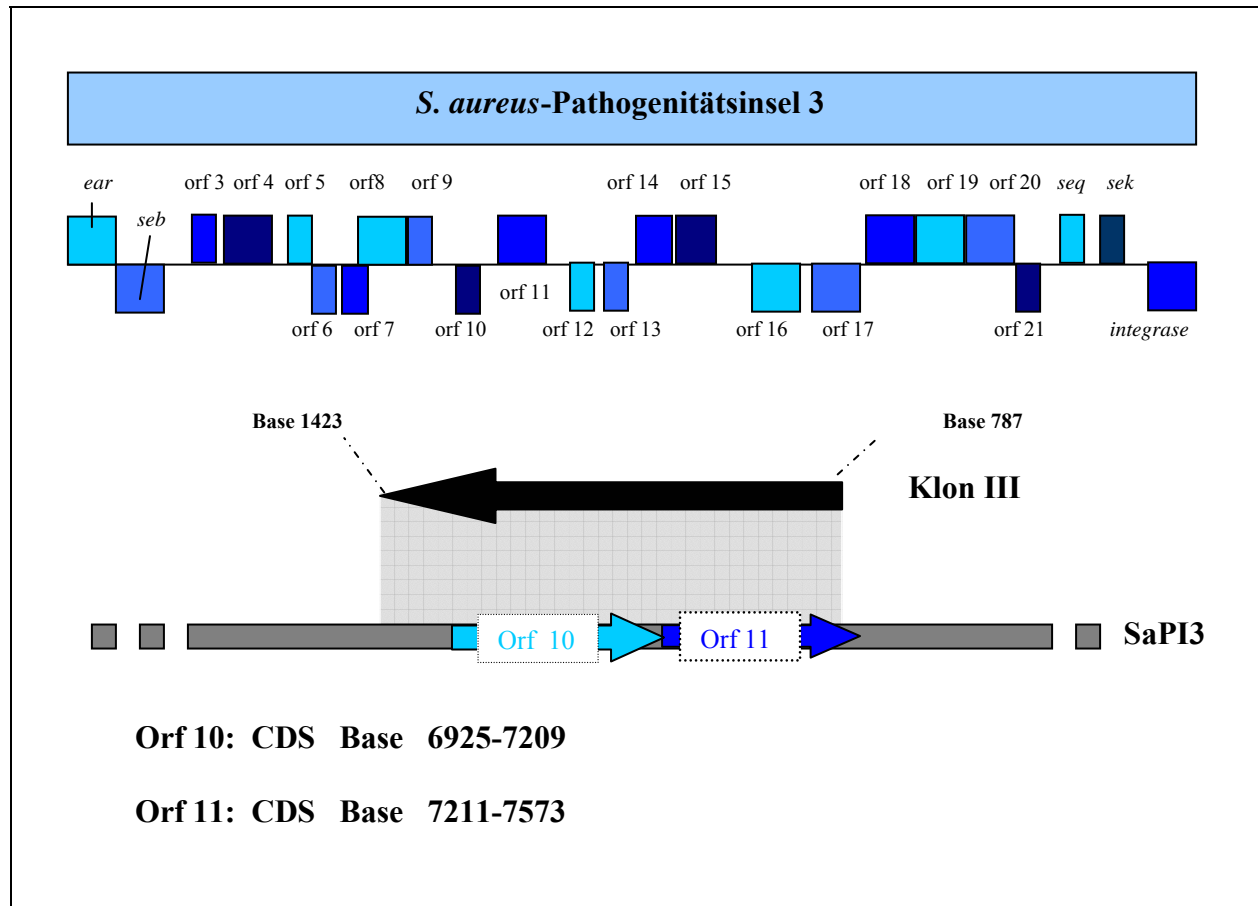


Abb. 21: Schematische Darstellung der homologen Bereiche des Inserts in Klon III und der kodierenden Genabschnitte (CDS) von der *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 (SaPI3) aus der Datenbank (Accession-Nr. AF410775), die auf dem Insert gefunden werden. Im oberen Teil der Abbildung ist die genomische Organisation der SaPI3 dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung ist der homologe Bereich zwischen Klon III (schwarzer Pfeil) mit dem entsprechenden Basenbereich und der *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 (SaPI3) (dunkelgrauer Balken) mit den Orfs dargestellt.

IV. 3. 3. 4 Klon V

Die Sequenzierung von Klon V ergab eine Insertgröße von 5286 bp. Es zeigen sich insgesamt vier signifikante Homologien zu in der Datenbank abgelegten Sequenzen, die in Abb. 22 und Tab. 15 schematisch aufgearbeitet sind.

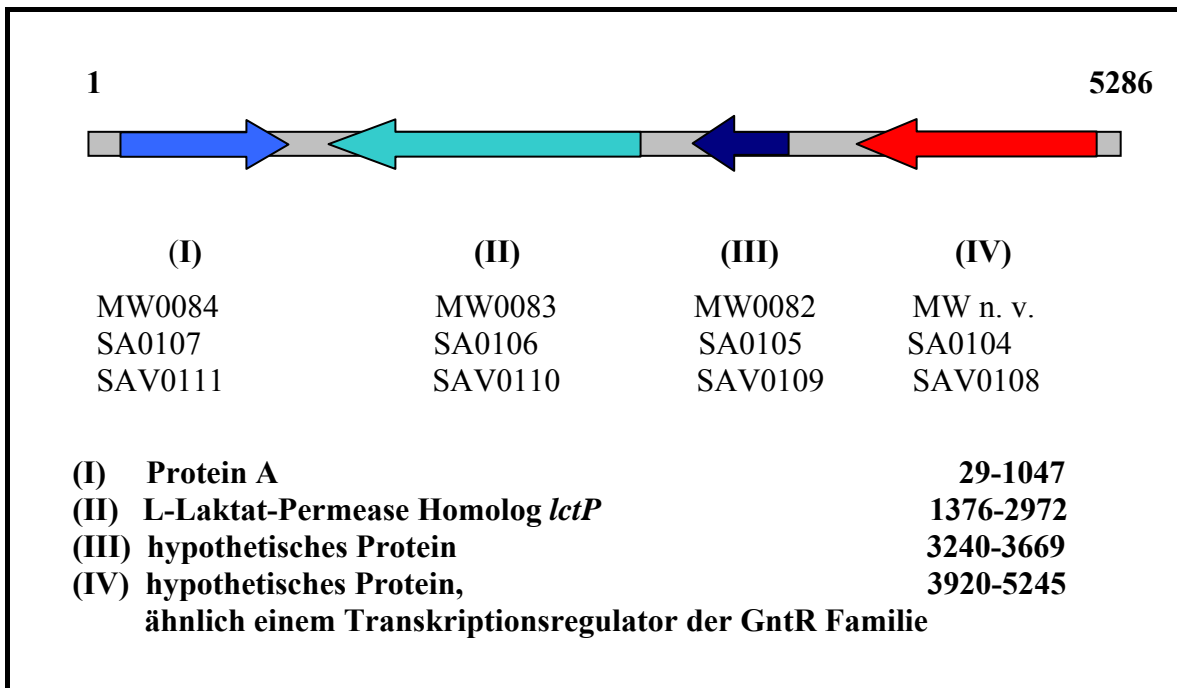


Abb. 22: Schematische Darstellung der Sequenzhomologien im Klon V. Die Bezeichnung der Homologien orientiert sich nach der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_form.map). Die Nummerierung, unter denen die Gene bei den einzelnen *S. aureus*-Stämmen angegeben werden, sind aufgeführt.

Das Insert trägt vier kodierende Sequenzen, die homolog sind zu dem Protein A, einem Immunglobulin G-bindenden Oberflächenprotein, zu einer Laktat-Permease (LctP), einem hypothetischen Protein und zu einem Transkriptionsregulator aus der GntR-Familie. Die Anordnung dieser vier Orfs entspricht genau der Anordnung in den sequenzierten *S. aureus*-Stämmen N315 und Mu50.

Die kodierende Sequenz des Protein A weist eine Länge von 1354 bp auf. Das Protein A ist in zahlreichen Datenbankeinträgen unter verschiedenen Accession-Nr. zu finden (siehe Tab. 15). Diese Heterogenität in Bezug auf die Länge und Struktur der kodierenden Sequenz in verschiedenen Stämmen wurde in früheren Arbeiten ausführlich erörtert (Brigido *et al.*, 1991). Der homologe Bereich innerhalb der Insertsequenz umfasst die Basen 29-1047 (1020 bp). Demnach sind auf dem Insert des Klons V ca. 80% der kodierenden Sequenz vorhanden. Es fehlen N-terminal die Signalsequenz und 20 Nukleotide.

Tab. 15: Homologien innerhalb der Insertsequenz in Klon V (5286 bp).

	Name	CDS (bp-Länge)	Homologie zu Datenbanksequenzen	Homologiebereich in Klon V (bp)
I	Protein A	1354	<p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315 (123661-118455), (CDS 122649-124001) (Accession-Nr. AP003129)</p> <p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50 (123626-118420), (CDS 122614-123966) (Accession-Nr. AP003358)</p> <p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 (100667-96691), (CDS 99529-101007) (Accession-Nr. AP004822)</p> <p><i>S. aureus</i> spa-Gen von Protein A (854-2504), (CDS 692-2056) (Accession-Nr. X61307)</p> <p><i>S. aureus</i> Protein A (249-1678), (CDS 92-1510) (Accession-Nr. U54636)</p> <p><i>S. aureus</i> Protein A (SPA) (855-2252), (CDS 698-2224) (Accession-Nr. M18264)</p>	29-1047
II	L-Laktat-Permease Homolog lctP	1594	<p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315 (123661-118455), (CDS 120728-122320) (Accession-Nr. AP003129)</p> <p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50 (123626-118420), (CDS 120693-122285) (Accession-Nr. AP003358)</p> <p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 (100667-96691), (CDS 97608-99200) (Accession-Nr. AP004822)</p>	1376-2972
III	Hypothetisches Protein	475	<p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315 (123661-118455), (CDS 119993-120466) (Accession-Nr. AP003129)</p> <p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50 (123626-118420), (CDS 119958-120431) (Accession-Nr. AP003358)</p> <p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 (100667-96691), (CDS 96873-97346) (Accession-Nr. AP004822)</p>	3240-3669

IV	Hypothetisches Protein, GntR-Familie	1330	<p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315 (123661-118455), (CDS 118475-119803) (Accession-Nr. AP003129)</p> <p><i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50 (123626-118420), (CDS 118440-119768) (Accession-Nr. AP003358)</p>	3920-5245
-----------	---	-------------	---	------------------

Der Bereich von Base 1376 bis Base 2972 der Insertsequenz des Klons V ist homolog zur kodierenden Sequenz der L-Laktat-Permease LctP, die ebenfalls im Genom der drei sequenzierten *S. aureus*-Stämme N315, MW2 und Mu50 zu finden ist (Tab. 15). Die kodierende Nukleotidsequenz dieses Enzyms hat eine Länge von 1594 bp. Eine Übereinstimmung dieser kodierenden DNA-Sequenzfolge mit der Sequenz des Klon V-Inserts ergibt sich von Base 1376-2972 der Insertsequenz. Wie aus den Angaben in Tab. 15 ersichtlich wird, ist die kodierende Nukleotidsequenz für dieses Protein komplett innerhalb der Insertsequenz von Klon V zu finden. Im Bereich der Basen 3240-3669 zeigt sich eine Homologie zu einem hypothetischen Protein, das ebenfalls auf den drei *S. aureus*-Stämmen N315, MW2 und Mu50 zu finden ist (Tab. 15). Dessen kodierende Basensequenzlänge von 475 bp findet im Sequenzabschnitt 3240-3669 des Klon V-Inserts seine Homologie. Auch hier ist der gesamte Orf auf dem Insert lokalisiert.

Der vierte Orf auf dem Insert besitzt Homologien zu einem Transkriptionsregulator aus der GntR-Familie. Homologien wurden zwischen den Basen 3920 bis 5245 der Insertsequenz und den Sequenzbereichen der *S. aureus*-Stämme N315 und Mu50 gefunden (Abb.22, Tab.15). Der gesamte kodierende Bereich dieses hypothetischen Proteins ist auf dem Insert lokalisiert.

Die in dem Insert des Klons V identifizierten putativen Proteine sind ebenfalls in dieser Anordnung in dem Genom der sequenzierten *S. aureus*-Stämme N315 und Mu50 zu finden. Auf dem Stamm *S. aureus* subsp. *aureus* MW2 (Accession-Nr. AP004822) ist die Anordnung der kodierenden Sequenzen von Protein A, der Laktat-Permease und dem hypothetischen Protein identisch mit der Sequenz die auch auf dem Insert zu finden ist. Der Transkriptionsregulator aus der GntR-Familie ist in nachfolgender Position in diesem Stamm nicht zu finden. Im Unterschied zum *S. aureus*-Stamm N315 und Mu50

folgt im *S. aureus* subsp. *aureus* MW2-Stamm die kodierende Sequenz für ein 67 kDa großes Myosin-kreuzreagierendes Streptokokkenantigen (MW0081), die jedoch nicht mehr auf dem Insert von Klon V vorhanden ist. Gegen welches der vier Proteine die Antikörperreaktion des Patientenserums gerichtet ist, wurde nicht untersucht.

V Diskussion

Infektionskrankheiten sind immer noch die häufigste Todesursache weltweit (Hellenbrand, 2003). Im Jahre 1997 war etwa ein Drittel aller weltweit registrierten Todesfälle durch Infektionskrankheiten bedingt (WHO, 1998). Die Bekämpfung gestaltet sich zunehmend schwieriger, nicht zuletzt durch das Auftreten von immer neuen multiresistenten Erregern, z.B. Enterokokken, Mykobakterien, Klebsiellen und Staphylokokken. Alternativen zu einer Antibiotikabehandlung sind daher dringend notwendig und rücken zunehmend in das Zentrum der Öffentlichkeit und von aktuellen Forschungsprojekten. Eine vielversprechende Möglichkeit stellt die Entwicklung von spezifischen Immuntherapien dar. Defekte der humoralen Immunantwort wie beispielsweise ein Antikörpermangel unterstützen die Infektanfälligkeit und Progredienz von bestehenden Infektionen durch MRSA (Lee *et al.*, 1993). Aus diesem Grund kann die Gabe von Antikörpern oder die aktive Immunisierung einen Schutz vor Infektionen geben. Ein Beispiel dafür ist die Impfung mit einem rekombinanten Kollagen-Adhäsion von *S. aureus* oder die Übertragung von spezifischen Antikörpern gegen dieses Adhäsion. Im Tierversuch konnte man so eine letale Sepsis bei Mäusen vermeiden (Nilsson *et al.*, 1998). Auf dieselbe Art und Weise ließ sich durch die aktive Immunisierung von Rindern mit rekombinanten Fibronectin-bindenden Protein eine schützende Immunantwort zur Vermeidung einer Mastitis induzieren (Mamo *et al.*, 1995).

Protektive Antikörper gegen Staphylokokkenantigene wirken hauptsächlich über drei Mechanismen: Blockade der Adhäsion, Opsonisierung und Phagozytose und die Neutralisation von Toxinen. Dabei wirken die Antikörper, die gegen die auf der Zelloberfläche lokalisierten Adhäsine gerichtet sind, auf doppeltem Weg. Zum einen induzieren sie die Phagozytose, zum anderen heben sie die Adhäsion der Bakterien an fremden Gewebe auf (Flock, 1999). Eine gute Wirkung solcher Antikörper in der breiten Anwendung setzt folglich eine Präsenz dieser immunodominanten Antigene in möglichst vielen Stämmen voraus. Die Identifikation solcher Epitope ist damit der Grundbaustein der Entwicklung von spezifischen Antikörpern. Den therapeutischen Nutzen von Antikörpern suchte man schon vor mehr als einem Jahrhundert, als man zuerst Mäuse mit infektiösem Material infizierte und so die Synthese von spezifischen

Antikörpern stimulierte. Die Hoffnung bestand damals darin, Patienten auf die selbe Art und Weise mit „bösem“ Serum zu infizieren und so eine Abwehrreaktion des Körpers zu provozieren. Dies war aber ineffektiv und nahm oftmals einen tragischen Verlauf für den Patienten (Trisha Gura, 2002). Derzeit sind ca. 400 monoklonale Antikörper weltweit in klinischen Tests zur Bekämpfung von Krebs, Autoimmunerkrankungen und Infektionskrankheiten. Auch in der Transplantationsmedizin haben sie eine bisher nicht zu ersetzende Position erlangt. Bisher wurden 11 monoklonale Antikörper von der US FOOD and Drug Administration (FDA) zugelassen, z.B. Orthoclone OKT 3 (Johnson & Johnson), ReoPro (Eli Lilly) und Zevalin (IDEC Pharmaceuticals) (Trisha Gura, 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollten immunodominante Strukturen identifiziert werden, welche in vivo während einer MRSA-Sepsis exprimiert werden. Um wirkungsvolle Antikörper herstellen zu können, ist es nötig geeignete Antigene zu identifizieren, die erregerspezifisch sein sollten und nicht mit wirtseigenen Strukturen kreuzreagieren. Bakterielle Infektionen von Patienten mit Hypo- oder Agammaglobulinämie werden meist durch *S. aureus* verursacht, sie sind aber häufig auch bei Patienten mit Dysfunktionen der neutrophilen Granulozyten (Agranulozytose, Panzytopenie). Dies lässt schon die Bedeutung der humoralen Immunantwort in der Auseinandersetzung des Körpers mit der Infektion erkennen (Etz *et al.*, 2002). Eine lohnende Strategie scheint somit die Entwicklung *S. aureus*-spezifischer Antiseren zu sein. Von besonderem Wert wäre der Einsatz eines humanen monoklonalen Antikörpers, der gegen spezifische Epitope von *S. aureus* gerichtet ist. Ein derartiger Antikörper könnte auch bei immunsupprimierten Patienten supportiv die Behandlung mit Antibiotika begleiten. Um *S. aureus*-spezifische therapeutische Antikörper herstellen zu können, ist es notwendig geeignete Antigenstrukturen zu identifizieren. Dieses Ziel kann durch verschiedene Versuchsansätze erreicht werden. In einer Arbeit von Lorenz *et al.* (2000) wurden Patientenserum hinsichtlich ihrer *S. aureus*-spezifischen Reaktivität untersucht, um darüber die wichtigsten in vivo exprimierten und immunogen wirkenden Faktoren zu identifizieren. Dazu wurden Proteinfractionen von *S. aureus* über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend parallel mit Serum septischer Patienten und Normalserum inkubiert. Proteine, die nur mit den Patientenserum reagierten wurden im Anschluss durch N-terminale Proteinsequenzierung und Datenbanksuche analysiert. Dabei wurden vier

immunodominante Antigene identifiziert, davon zeigten zwei keine Homologie zu bekannten Proteinen. Diese wurden als „immunodominant staphylococcal antigen A“ (IsaA) und „immunodominant staphylococcal antigen B“ (IsaB) bezeichnet. Weiterhin reagierten das „major cold shock protein A“ CspA und das Phosphocarrierprotein Hpr mit den Patientenseren. Besonderes Interesse erlangte das als IsaA bezeichnete Antigen, da dieses von allen bisher untersuchten *S. aureus*-Stämmen exprimiert wird und eines der vorherrschenden extrazellulären Proteine ist. Beinahe alle bislang untersuchten Patientenseren zeigten eine positive Reaktion gegen das IsaA, so dass man davon ausgehen kann, dass dieses Protein während einer Infektion von großer Bedeutung ist (Lorenz *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun über einen alternativen Ansatz nach immunodominanten Antigenen gesucht werden. Dazu sollten genomische Fragmente von *S. aureus* in einen Expressionsvektor kloniert werden. Die auf diesen Fragmenten kodierten Proteine können über die Zugabe eines externen Induktors kontrolliert exprimiert werden. Potentiell immunodominante Antigene sollten dann, analog zur Arbeit von Lorenz *et al.* (2000), über die Reaktivität mit spezifischen Patientenseren identifiziert werden. Da die komplette Genomsequenz von *S. aureus* bekannt ist, konnte über eine DNA-Sequenzierung der klonierten Fragmente und einen anschließenden Homologievergleich in den Datenbanken das interessierende Fragment identifiziert werden. Der Unterschied zur Arbeit von Lorenz *et al.* (2000) bestand somit in der Sequenzierung von klonierten DNA-Fragmenten nach heterologer Expression und nicht in der direkten Proteinsequenzierung.

Vorraussetzung für die Identifizierung möglichst zahlreicher, potentiell immunogener Antigenstrukturen war zunächst die Klonierung der gesamten Erbinformation von *S. aureus* in einen geeigneten Expressionsvektor.

V. 1 Herstellung einer MRSA-Genbank

Die Gewinnung von chromosomaler DNA in ausreichender Menge und Qualität war die Grundvoraussetzung zur Konstruktion der Genbank. Die Isolierung genomischer DNA durch Ethanol-fällung nach enzymatischer Lyse (TNEX-Methode) ergab zunächst keine

ausreichenden DNA-Mengen. Daher wurden kommerziell erhältliche Filtersäulen eingesetzt, die große Mengen DNA binden können und diese dann über Anionenaustauschprozesse wieder abgelöst werden. Dadurch ist ein hoher Reinheitsgrad der DNA garantiert. Als Stamm für die Herstellung der Genbank wurde das klinische MRSA Isolat A134 ausgewählt. Dieser Stamm wurde von einem Sepsispatienten in der Würzburger Universitätsklinik isoliert. Proteinfractionen von diesem Stamm reagierten mit verschiedenen Patientenseren (Lorenz *et al.*, 2000).

Um möglichst das gesamte Genom von *S. aureus*, welches etwa 2,8 Mbp umfasst, in einer Genbank präsent zu haben, sind theoretisch 1000 DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 3000 bp nötig. Der verwendete Expressionsvektor kann Fragmente bis zu 12000 bp aufnehmen. Der Partialverdau der genomischen DNA wurde so optimiert, dass der überwiegende Anteil der Fragmente in einem Größenbereich von 4000 bis 8000 bp vorlag. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass möglichst die Mehrzahl der *S. aureus*-Proteine in ihrer kompletten Größe in dem Expressionsvektor kloniert vorliegen. Die Auswertung der Sequenzierungen der reaktiven Klone zeigte dann aber deutlich, dass auch kürzere Fragmente kloniert wurden. Klon III enthielt z.B. ein nur 1545 bp großes Insert. Da bei einem Partialverdau immer ein sehr heterogenes DNA-Gemisch entsteht und die gelelektrophoretische Auftrennung nicht immer eine exakte Größenordnung zulässt, sind kleinere Fragmente, zumal diese sich leichter klonieren lassen, relativ häufig in Genbanken vertreten. Die Auswahl der idealen Insertgröße für eine Expressionsgenbank erfolgt daher auch eher empirisch. Kleinere Fragmente lassen sich einfacher klonieren, verlieren aber unter Umständen ihre typische Antigenität. Größere Fragmente sollten intakte Proteine kodieren, die nach Expression und korrekter Faltung auch mit spezifischen Antikörpern reagieren. Dass auch sehr kleine Fragmente ihre epitopspezifische Antigenität behalten, zeigte eine jüngere Arbeit von Etz *et al.* (2002). Dort wurden Fragmente mit einer Größe von 50 – 250 bp in Expressionsvektoren mit den Oberflächenproteinen LamB und FhuA „in frame“ fusioniert. Da kleinere Peptide besser exprimiert werden als Gesamtproteine, führt ein solcher Ansatz zur Expression von mehr antigenen Peptidfragmenten als bei der Expression des gesamten Proteins. Das ist auch ein Grund warum bei Etz *et al.* (2002) mehr

immunodominante Antigene identifiziert werden konnten als in der vorliegenden Arbeit.

V. 2 Screening der Genbank

Das Erkennen von immunogenen *S. aureus*-Proteinen durch Antikörper humaner Seren ist ein sicherer Beweis dafür, dass diese Antigene während einer Infektion exprimiert worden sind. Wird die Immunantwort eines Patienten mit einer akuten *S. aureus*-Infektion mit der antigenspezifischen Reaktion des Serums vor der Infektion oder eines gesunden Spenders verglichen, können über die Antigenspezifität der reagierenden Antikörper Pathogenitätsfaktoren von *S. aureus* identifiziert werden (Etz *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Serumprobe eines klinisch infizierten Patienten verwendet und als Kontrolle das Serum eines gesunden, klinisch nicht-infizierten Erwachsenen. Dieses Kontrollserum wurde für das initiale Screening ausgewählt, da ein Nullserum des Patienten vor der Infektion durch *S. aureus* nicht zur Verfügung stand. Nahezu die gleiche Versuchsanordnung wurde in der Arbeit von Etz *et al.* (2002) gewählt. Eine Erweiterung der Testreihe in dieser Arbeit über den klinisch infizierten und klinisch gesunden Patienten hinaus, erfolgte durch den Einsatz einer Negativkontrolle. Dieses Serum wurde von Säuglingen im Alter von 6-24 Monaten entnommen, die aufgrund einer nichtinfektiösen Erkrankung hospitalisiert waren. Bei der Auswahl der eingesetzten Seren galt es ein besonders reaktives Serum von einem Patienten mit dem klinischen Bild einer Sepsis, einem Serum einer Kontrollperson ohne klinische Zeichen einer *S. aureus*-Infektion gegenüber zu stellen. Die mittels des Immuserums primär identifizierten antigenen Strukturen sollten dann später mit weiteren Kontroll- und Immuseren charakterisiert werden. Die ersten Vorversuchsreihen zeigten schnell, dass die initial gewählte Methode der Lumineszenz-detektierten Erkennung der positiv reagierenden Plaques nicht geeignet war. Aufgrund der Unebenheiten der Agarplattenoberfläche zeigten sich starke Hintergrundreaktionen durch das Anhaften des Färbematerials am Untergrund, welche nicht AK-bedingt waren. Mit dieser Methode lief man Gefahr, potentiell positive Signale durch die Hintergrundreaktionen zu maskieren. Die Anwendung alkalischer Phosphatase-konjugierter Antikörper zeigte besser auswertbare Ergebnisse. Mit dieser Form der

Signaldarstellung war es möglich, ein weitaus genaueres Erkennen und damit eine genauere Isolierung der positiven Signale zu erreichen. Dabei zeigte sich, dass die Präadsorption die Qualität der Signale deutlich verbessert. Durch die Präadsorption konnte man den Großteil der kreuzreagierenden Antikörper aus den verwendeten Seren eliminieren und so die Signale eindeutig bestimmten Klonen zuordnen (siehe Material und Methoden).

V. 3 Sequenzierung

Insgesamt wurden durch das Serum-Screening fünf Klone gefunden, die ein deutliches Signal mit dem Immunserum im Vergleich zu dem Kontrollserum zeigten. Bei den reagierenden Proteinen handelt es sich überwiegend um Oberflächen- und Sekretionsprodukte von *S. aureus*. Durch die Homologievergleiche der identifizierten Klonsequenzen mit verschiedenen Datenbankeinträgen konnte eine Vielzahl der Gensequenzen *S. aureus*-Proteinen zugeordnet werden. Jedoch befanden sich auch unbekannte Gensequenzen auf den reagierenden Klonfragmenten. Die in den Tabellen im Ergebniskapitel aufgeführten Homologien der einzelnen Klone sind die mit den höchsten Sequenzhomologien. Sehr kurze Homologien oder schwer interpretierbare Übereinstimmungen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

V. 3. 1 Phagenspezifische Genexpression während einer Infektion

Klon I zeigte das intensivste Signal im Immunoblotting mit dem Patientenserum. Um die hier kodierten immunodominanten Proteine zu identifizieren, welche für die starke Antikörperproduktion verantwortlich waren, wurden alle größeren Sequenzabschnitte mit Homologien zu putativen Proteinen näher analysiert. Auf dem Insert konnten Homologien zu Genabschnitten der Amidase *lytA*, einer Mureinhydrolase, zum Holin, einem Enzym, das Poren in die bakterielle Zellmembran einführt und zu zwei weiteren Orfs, welche zum *isd*-Gencluster gehören, das in erster Linie für Proteine der bakteriellen Eisenverwertung kodiert, gefunden werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Sequenzabschnitte mit Homologien der positiv reagierenden Klone nicht weiter subkloniert. Daher ist letztendlich eine Zuordnung der positiven

Immunreaktion zu einem definierten Epitop oder Antigen nicht möglich. Dies gilt für alle positiv reagierenden Klone.

Wie im Ergebnisteil ausführlich beschrieben, handelt es sich bei den Basen 1-2307 von Klon I um phagenspezifische DNA und somit sind homologe Sequenzen des Holins und von *lytA* auch auf verschiedenen Phagen zu finden. *LytA*, mit dem Genprodukt Amidase, einer Peptidoglykan-Hydrolase, hat eine kodierende Sequenz von 1475 bp. Diese ist in zwei verschiedenen Datenbankeinträgen, vom Bakteriophagen 80 α (Accession-Nr. U72397) und der *S. aureus*-spezifischen Peptidoglykan-Hydrolase (Accession-Nr. M76714), zu finden. Das Genprodukt von *lytA* gehört zu den Mureinhydrolasen, einer einzigartigen Enzymfamilie, deren Mitglieder die Strukturen der bakteriellen Zellwand spalten können. Diese Ezymgruppe spielt eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen, z.B. während des Zellwachstums und der Zellteilung, während der Tochterzellabtrennung und Wiederverwertung der Zellwandbestandteile (Archibald *et al.*, 1993; Perkins, 1980; Shockman und Holtje, 1994; Holtje und Tuomanen, 1991; Shockman und Barrett, 1983). Die Funktionen dieser Enzyme sind daher ambivalent, da sie sowohl eine wichtig Rolle für die Pathogenität dieser Bakterien als auch für die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika spielen (Holtje und Tuomanen, 1991). Biochemische Analysen der Peptidoglykanhydrolase zeigen, dass diese Enzyme hydrolytische Aktivitäten aufweisen, die spezifisch für verschiedene Strukturkomponenten des Mureins sind, so z.B. die *N*-Acetylmuramidase, *N*-Acetylglucosaminidase, *N*-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase und Endo-Transglycosidase, die vermutlich eine bestimmte Rolle in der Biosynthese der bakteriellen Zellwand spielen (Shockman und Holtje, 1994; Holtje und Tuomanen, 1991; Ward und Williamson, 1985). Die Hochregulation der Transkription und die Überexpression von *LytA* während einer Infektion passt somit gut zu den oben genannten Funktionen dieser Enzyme im Bakterienzellzyklus. Eine vermehrte Zellteilung, das Zellwandwachstum und die verstärkte Wiederverwertung der Zellwandbestandteile sind Vorgänge während eines septischen Geschehens. Da die *lytA*-Gensequenz komplett auf dem Insert vorhanden ist, sollte die komplette Amidase mit allen immunogenen Epitopen nach Induktion exprimiert werden, gegen die dann Antikörper im Patientenserum reagieren könnten. Die Amidase wäre somit, sowohl wegen ihrer physiologischen Funktion als

auch wegen dem Vorhandensein der kompletten Sequenz im Insert, ein Target, gegen das eine spezifische Reaktion des Patientenserums mit hoher Wahrscheinlichkeit gerichtet sein könnte.

Die Peptidoglykan-Hydrolasen, die zu einer Zerstörung der Zellwand und so zu einer Zellyse führen, werden auch als Autolysine bezeichnet. Die Expression und die Aktivität dieser Enzyme werden streng kontrolliert. Posttranskriptional wird die Aktivität der Mureinhydrolasen durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. Substratveränderungen, selektiven Substrattransport, Interaktionen mit Lipoteichonsäuren und kationischen Peptiden und dem Einfluss von proteolytischen Enzymen moduliert (Holtje und Tuomanen, 1991; Shockman und Holtje, 1994; Ward und Williamson, 1985). Stellt man sich hier erneut die Frage nach dem Schädigungsmuster der Bakterienzelle auf den Wirtsorganismus, lässt sich auch eine Endotoxin-ähnliche Schockreaktion diskutieren. Wie in der Einleitung tabellarisch aufgeführt, verfügt *S. aureus* über verschiedene Pathogenitätsfaktoren, die zellwandgebunden, intrazellulär und sekretorisch vorliegen. Eine Bakterienzellyse durch die Peptidoglykanhydrolase bedeutet somit ein massives Anschwemmen von Zellwandbestandteilen mit Endotoxin-ähnlicher Wirkung, die eine septische Reaktion des Körpers hervorrufen. Bekannt ist ebenfalls, dass die Freisetzung von bakteriellen Peptidoglykanbestandteilen ein starker Stimulus für immunkompetente Zellen ist, die über die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine maßgeblich den Verlauf einer Sepsis bestimmen. Diesen Betrachtungen folgend lässt sich die immunogene Wirkung der Peptidoglykanhydrolase als Teil eines septischen Geschehens verstehen. Die Amidase, ein 481 Aminosäuren umfassendes Protein, zeigt auch C-terminal eine signifikante Homologie zur C-terminalen Sequenz des Lysostaphins von *Staphylococcus simulans* biovar *staphylo-lyticus* (Wang *et al.*, 1991). Die Funktion von Lysostaphin besteht in der Abwehr von konkurrierenden Staphylokokken.

Neben den möglichen „Aggressorfunktionen“ dieser Enzyme ist deren Struktur und Anordnung auf genetischer Ebene interessant. LytA ist Bestandteil vieler Bakteriophagen. Die höchste Homologie des klonierten Fragmentes besteht zu *lytA* des Bakteriophagen 80 α . Auch andere Bakteriophagen, wie der Bakteriophage phi 11 oder

phi N315, die zum Teil eine hohe Homologie untereinander aufweisen, besitzen Peptidoglykan hydrolysierende Enzyme. Bakteriophagen gelten als mobile genetische Elemente, die an der Ausbreitung und Weitergabe von Pathogenitätsfaktoren in *S. aureus* beteiligt sind. Der Bakteriophage phi 11 wurde erstmals als ein Prophage im *S. aureus*-Stamm NCTC 8325 entdeckt und ist auf genetischer Ebene sehr gut untersucht (Novick, 1967). Dieser dient bei den genomischen Untersuchungen der Phagen häufig als Modell. Auf dem Phagen phi 11 wurde upstream der *lytA*-Sequenz eine 1,1 kbp große Region typisiert, auf der drei Orfs in gleicher Orientierung wie *lytA* liegen. Orf 3 ist 437 bp lang und überlappt mit der nachfolgenden *lytA*-Sequenz um 18 Nukleotide (Lickimini *et al.*, 1995). Auf dem Insert von Klon I überlappen die ersten 39 bp von *lytA* mit den letzten 39 bp der Holinsequenz. Wie Orf 3 hat auch das Holin auf dem Insert I eine CDS-Länge von 437 bp. Somit liegt eine identische und konstante Anordnung des Holins und von *lytA* auf verschiedenen Bakteriophagen vor.

Mureinhydrolasen können in 2 Gruppen eingeteilt werden. Zu der einen gehören die Autolysine, z.B. die *S. aureus* N-Acetylmuramyl-L-Alanin Amidase (Atl). Autolysine werden aus dem Zytoplasma ausgeschieden und verdauen das Murein an spezifischen Bindungsstellen während des Zellzyklus (Ramadurai und Jayaswal, 1997). Die Bakteriophagen-kodierten Mureinhydrolasen werden dagegen als Endolysine bezeichnet. Diese werden über die Holine, die in die zytoplasmatische Membran integriert sind, nach außen geschleust. Die Endolysine verdauen unspezifisch das Murein, um die Bakteriophagen während der lytischen Phase aus dem Zytoplasma der Bakterienzelle zu entlassen (Young, 1992). Da auf dem Insert diese beiden phagenkodierten Proteine in der oben beschriebenen Anordnung vorliegen, ist wohl davon auszugehen, dass es sich bei LytA um ein Endolysin handelt. Ob durch die Infektion der lysogene Phage in den lytischen Zyklus eingetreten ist und welche Relevanz diese Prozesse für den Verlauf der Infektion haben, ist bislang allerdings nicht untersucht worden. Die möglicherweise starke Reaktion des Patientenserums mit der Peptidoglykan-Hydrolase LytA, die als phagenspezifischer Bestandteil im Chromosom des *S. aureus*-Stammes A134 anzusehen ist, könnte aber auf eine starke Expression dieses Enzyms während der Infektion hinweisen.

Das Holin ist ein Enzym, das Poren in die bakterielle Zellwand einführt. Es hat eine kodierende Sequenz von 437 bp. Dieses phagenkodierte Membranprotein hat eine Länge von 145 AS. Die Sequenz ist in drei verschiedenen Datenbankeinträgen, dem Bakteriophagen 80 α (Accession-Nr. U72397), dem Bakteriophagen phi 11 Holin (Accession-Nr. L34781) und dem *S. aureus*-Phagen phi 11 (Accession-Nr. AF424781) zu finden. Der kodierende Sequenzbereich für das Holin ist bei allen drei genannten Phagen auf der Insertsequenz von Klon I komplett vorhanden. Der Prototyp dieser Proteinfamilie ist das λ -S-Protein (Reader und Siminovitch, 1971; Garrett und Young, 1982; Garrett *et al.*, 1981; Young und Bläsi, 1995). Am Beispiel des λ -S-Proteins konnte gezeigt werden, dass es bei der Infektion einer Bakterienzelle durch einen Bakteriophagen während der späten Genexpressionsphase zu einer Anreicherung vom λ -S-Protein in der inneren Membran der Bakterienzellhülle kommt. Obwohl wenig über die genaue Struktur dieser Holin-Proteine bekannt ist, gibt es indirekte Hinweise, dass sie allein für die Porenbildung in der inneren Membran verantwortlich sind. Bisher konnten keine Bakterienstämme und keine Mutanten isoliert werden, die gegen eine Holin-vermittelte Lyse resistent waren (Young, 2002). Die Natur dieser Membranlöcher ist somit nicht ganz klar. Jegliche Versuche diese Läsionen der inneren Membran in dünnen, elektronenmikroskopisch untersuchten Schnitten zu visualisieren zeigten keinen Erfolg (Reader und Siminovitch, 1971; Young, 2002).

Ein weiterer Aspekt, den es zu untersuchen gilt, ist die Regulation der Expression des Holins. Die Endolysinaktivität verschiedener Peptidoglykan-verdauender Enzyme kommt nur zustande, wenn es diesen ermöglicht wird, durch die Zellmembran an das Murein heran zu kommen. Dieses Durchdringen der Zellmembran durch die Holinproteine sollte einer Regulation unterliegen. Die Peptidoglykanhydrolyse setzt ein, wenn der Aktivitätsgrad des Endolysin-Systems den des Peptidoglykansynthesystems übersteigt. Die Frage ist nun inwieweit die Bakterienzellyse auch durch die Holinaktivität beeinflusst wird. Bisher wurden aber dazu keine genaueren Untersuchungen unternommen. Es ist möglich, dass die Antikörper im Patientenserum auch gegen das Holin gerichtet sind. Da das Holin und die Amidase in der beschriebenen Form gekoppelt in Bakteriophagen-Genomen vorkommen, ist das Vorhandensein in verschiedenen anderen *S. aureus*-Stämmen wahrscheinlich. Lohnenswert erscheint

daher eine genauere Analyse der lytischen Aktivität von Bakteriophagen während einer septischen Infektion. Interessant erscheint die Hypothese, wonach die lytische Aktivität von *S. aureus*-Phagen während einer Infektion den Verlauf einer *S. aureus*-Sepsis maßgeblich beeinflusst. Die Vollständigkeit der kodierenden Sequenzabschnitte auf dem Insert von Klon I und die deutliche Reaktion verstärken den Verdacht der immunogenen Wirkung dieser beiden Proteine während eines septischen Geschehens. Gegen welche der beiden Proteine die Antikörperbildung gerichtet ist, bleibt weiter zu untersuchen. Auch ist zu bemerken, dass in der Arbeit von Etz *et al.* (2002) diese Proteine nicht gefunden wurden. Gleichwohl muss man bemerken, dass der MRSA-Stamm A134 in jener Arbeit nicht verwendet wurde. Somit ist auch nicht klar, ob die dort verwendeten MRSA-Stämme in ihrem Genom diese phagenkodierte Genabschnitte überhaupt tragen.

Wie oben erwähnt, wurden auch zwei Orfs aus dem *isd*-Gencluster im Klon I-Insert ansequenziert. Dabei handelt es sich um *isdA* und *isdB*. Isd steht für „iron-regulated surface determinant“. Eisen ist für das Bakterium ein lebenswichtiges Element. Der *isd*-Genlocus in Staphylokokken kodiert für Proteine, die für die Eisenbindung und für den Eisentransport in das Zytoplasma verantwortlich sind. Wenn man Staphylokokken mit Proteinase K versetzt, werden nur IsdB und Teilfragmente von IsdA von diesem Enzym verdaut, entfernt man dagegen zuvor die Zellwand mit Lysostaphin, so kann die Proteinase K nun auch alle anderen Proteine des Isd-Lokus aufspalten. Somit ist klar, dass IsdB und ein Fragment des IsdA oberflächliche und zellwandgebundene Bakterienproteine sind, wohingegen die restlichen Proteine dieser Gruppe in der Zellwand oder im Zytoplasma lokalisiert sind (Skaar, 2003). IsdB fungiert dabei als Hämoglobinbindungsrezeptor. IsdB besitzt eine NH₂-terminale Domäne, die bei den anderen Isd-Proteinen nicht vorhanden ist, obwohl die drei Hämoglobin-bindenden Proteine IsdA, IsdB und IsdC auch noch weitere Hämoglobin-bindende Untereinheiten haben, die nahezu identische Basensequenzen aufweisen. Die Expression dieser Proteine ist dabei abhängig vom Eisengehalt. Dafür enthalten alle drei Transkriptionseinheiten des *isd*-Genlocus eine sogenannte *fur box* (Abb. 23). Diese Eisenaufnahme-Repressionssequenz (ferric uptake repressor-Fur) steuert die Transkription entsprechend der Eisenkonzentration (Horsburgh *et al.*, 2001; Escolar *et al.*, 1999). Die Konzentration

von freiem Eisen beim Menschen ist sehr niedrig (10^{-18} M) (Ratledge und Dover, 2000). Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Expression dieser Gene während einer Infektion sehr hoch ist und während des Wachstums auf normalen Nährböden mit Eisenzusatz geringer ausfällt.

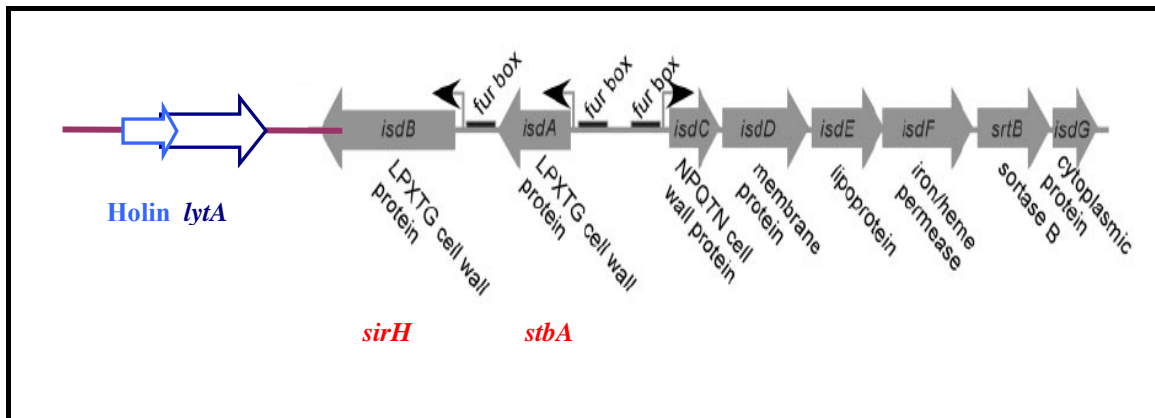


Abb. 23: Physische Anordnung des *isd*-Genlokus von *S. aureus*. Dieser kodiert für Oberflächenproteine, Lipoproteine, Membrantransporter und zytoplasmatische Proteine. Alle drei *isd* Transkriptionseinheiten enthalten eine „*fur box*“, welche entsprechend der Eisenkonzentration im umgebenden Medium die Transkription regelt. Die Gene *isdA* (*stbA*) und *isdB* (*sirH*) kodieren für Zellwand gebundene Eisenregulationsproteine (Taylor und Heinrichs, 2002). Die auf dem Insert von Klon I gefundenen Orfs *lytA* und *Holin* befinden sich downstream von *sirH* (*isdB*). (Abbildung modifiziert nach Skaar, 2003).

Da sowohl in der Zellwand als auch intrazellulär ein solches Eisen verwertendes System vorliegt, muss die Bedeutung des Eisens und deren Verwertung genauer betrachtet werden. Es wird vermutet, dass der Eisenbedarf von *S. aureus* während einer Infektion in erster Linie durch das Hämoglobin gebundene Eisen gedeckt wird. Die kodierende Sequenz von IsdB ist komplett auf dem Insert von Klon I vorhanden. Das könnte ein Hinweis auf die deutliche Überexpression dieses Proteins während einer Infektion sein. Nachdem das Hämoglobin vom IsdB an die Bakterienzellwand gebunden worden ist, wird ihm das Häm durch IsdA und IsdB entzogen. Auch die nahezu komplette Sequenz von IsdA ist auf dem Insert von Klon I vorhanden. Der Transfer des Häm-gebundenen Eisens über die Zellmembran erfolgt mit Hilfe des IsdC und der Transport bis in das Zytoplasma durch weitere Bakterienzellmembran gebundene Translokationsfaktoren (IsdD, IsdE, IsdF). IsdG, ein zytoplasmatisches Bindungsprotein für Häm, ist dann wahrscheinlich an der Herausspaltung des Eisens aus dem Häm beteiligt (Skaar, 2003). Der *isd*-Lokus von *S. aureus* ist somit für den Eisenbedarf essentiell, obgleich parallel noch andere Oberflächenproteine und ABC-Transporter in ähnlicher Weise an der

Eisenaufnahme beteiligt sind. Die Fähigkeit der Eisengewinnung ist während einer Infektion wichtig für das Überleben der Staphylokokken. Im Vergleich zu gram-negativen Spezies ist bisher nur wenig über die Eisengewinnungsmechanismen der grampositiven Bakterien während einer Infektion bekannt. Die Expression und die Detektion der beiden Isd-Proteine zeigt aber die Ähnlichkeit der Eisengewinnung in beiden Bakteriengruppen. Es wurde bereits ein Transferrin-bindendes Protein, welches an die Zellwand gebunden ist, identifiziert. Dieses StbA-Protein (staphylococcal transferrin-binding protein A) zeigt keinerlei Ähnlichkeiten mit bereits bekannten bakteriellen Transferrin-bindenden Proteinen (Taylor und Heinrichs, 2002). StbA ist identisch mit den in dieser Arbeit identifizierten Sai-1- und IsdA-Proteinen. Auch die oben genannte Arbeitsgruppe (Taylor und Heinrichs, 2002) charakterisierte dieses Protein als ein Zellwand-verankertes Peptid, dessen Expression durch die extrazelluläre freie Eisenkonzentration reguliert wird. Das *stbA*-Gen ist innerhalb eines ca. 7 kb großen Genclusters auf dem Staphylokokkengenom zu finden, welches insgesamt 6 Eisenregulationsgene aufweist. Unmittelbar downstream der *stbA*-Region ist ein weiteres durch die extrazelluläre Eisenkonzentration reguliertes Gen lokalisiert. Dessen Expressionsprodukt zeigt ebenfalls keinerlei Verwandtschaft mit bereits typisierten eisenbindenden Proteinen. Dieses Protein wird in der Arbeit von Taylor und Heinrichs (2002) als SirH bezeichnet. Durch Datenbankvergleiche konnten wir die Übereinstimmung zu dem auf Klon I lokalisierten *isdB* (Abb. 23) zeigen. Upstream von *stbA* befindet sich ein Operon mit vier Genen (*sirD-sirG*), deren Expression auch durch die extrazelluläre Eisenkonzentration reguliert wird. Im Gegensatz zu *isdA* (*stbA*, *sai-1*) und *isdB* (*sirH*) weisen diese aber deutliche Verwandtschaft zu bereits bekannten Eisen-transportproteinen (ABC-Transporter) auf (Taylor und Heinrichs, 2002). Dieses Genoperon ist nicht auf dem Insert von Klon I vorhanden. Dafür lassen sich zwei Gründe aufführen. Zum einen ist die *isdA*-Sequenz auf dem Insert von Klon I randständig. Das Operon kann somit beim Enzymverdau abgetrennt worden sein. Eine stattfindende Überexpression von *sirD-sirG* kann man somit nur vermuten. Die zweite zu diskutierende Möglichkeit ist, dass dieses Operon bei der Eisenverwertung keine tragende Rolle spielt. In der vergleichbaren Arbeit von Etz *et al.* (2002) konnten diese Proteine nicht als immunodominant identifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auf dem Insert von Klon I vier potentielle immunodominante Proteine lokalisiert sind. Die Beziehung zueinander ist nochmals in Abb. 23 schematisch dargestellt. Gegen welche der exprimierten Proteine auf dem Insert die Immunreaktion gerichtet ist, wurde nicht untersucht und bleibt somit offen für zukünftige Arbeiten. Interessanterweise scheint in dem von uns untersuchten Stamm A134 wahrscheinlich ein Bakteriophage in das *isd*-Gencluster inseriert zu sein. Mögliche Funktionen der Amidase und des Holins während des Infektgeschehens wurden oben ausführlich diskutiert. Ein vermehrter Bakterienzellumsatz hat eine Verminderung des zur Verfügung stehenden freien Eisens zur Folge. Dies wäre der adäquate Stimulus für die Überexpression des *isd*-Genclusters. Somit lässt sich eine gegenseitige Beeinflussung dieser Genabschnitte postulieren. Ob der Bakteriophage und sein lytischer Aktivitätsgrad für die Expression des *isd*-Genclusters essentiell ist, wurde bisher noch in keiner weiteren Studie herausgearbeitet und muss auch im Rahmen dieser Arbeit leider unbeantwortet bleiben.

V. 3. 2 Ein Cadmiumresistenzprotein als immundominantes Antigen

Die Sequenzierung des Inserts in dem zweiten Klon mit einem positiven Signal im Immunoblot ergab Homologien zu Cadmiumresistenzdeterminanten und einer putativen Transposase. Es gibt mindestens zwei verschiedene Cd^{2+} -Resistenzdeterminanten in *S. aureus*, die beide auf Plasmiden lokalisiert sind. Das Cadmiumresistenzsystem von *S. aureus*-Plasmid pI258, *cadA*, wurde erstmals von Novick und Roth identifiziert und später dann durch Deletionsanalyse kartiert (Novick und Roth, 1968; Novick *et al.*, 1979). Das CadA-System verleiht resistenten Zellen eine ca. 100-mal größere Toleranz gegenüber Cd^{2+} -Ionen als Zellen, die dieses System nicht besitzen. Der Mechanismus des zweiten bekannten Systems, dem CadB-System, ist bisher noch nicht richtig verstanden worden.

Die Aufnahme von Cadmium in die Zelle wird durch ein chromosomal kodiertes Mg^{2+} -abhängiges Transportsystem vermittelt. Der Zustrom der Kationen in die Zelle ist abhängig vom Membranpotential. Eine Akkumulation der Cd^{2+} -Ionen im Zellinneren führt zum Abbruch der Zellatmung. Die Cadmiumresistenz, welche aus der Expression

des *cadA*-Genes resultiert, ist bedingt durch eine reduzierte Nettoaufnahme von Cd^{2+} -Ionen (Tynecka *et al.*, 1981). Die resistenten Zellen pumpen energieabhängig die sich in der Zelle akkumulierenden Kationen im Austausch gegen jeweils zwei Protonen zügig wieder nach außen (Lederberg, 2000). Das *cadA*-Operon vom *S. aureus*-Plasmid pI258 hat zwei Gene, *cadC*, welches für den Transkriptionsrepressor des *cadA*-Promotors kodiert und *cadA*, welches für das CadA-Protein, eine P-Typ-ATPase, kodiert (Nucifora *et al.*, 1989; Endo und Silver, 1995). Die Transkriptionsprodukte beider Gene sind essentiell für die maximale Ausbildung der Resistenz. CadA, ein 727 Aminosäuren großes Membranpolypeptid, gehört zur Familie der P-Typ ATPasen, einer Proteingruppe, die einen Teil des Substrattransports über biologische Membranen katalysieren. Der Terminus „P-Typ“ bezieht sich auf das Vorhandensein eines Phosphoenzyms im Reaktionszyklus des ATPase-Enzyms (Axelsen und Palmgen, 1998).

Homologien zu *cadA* wurden ebenfalls in Plasmiden und im Chromosom von zahlreichen anderen Organismen, wie *Synechocystis sp.* Stamm PCC 6803 und im Genom von *Arabidopsis thaliana* und *Pseudomonas aeruginosa* gefunden (Axelsen und Palmgen, 1998; Rensing *et al.*, 1999). CadC reguliert die Transkription des *cadA*-Gens. Das Protein gehört zu einer Familie von regulatorischen DNA-Bindungsproteinen, zu denen z.B. auch ArsR, das Regulatorprotein für die Arsenresistenz, zählt. Obwohl CadC eine wichtige Rolle im Cadmiumresistenzsystem spielt, ist es jedoch nicht zwingend notwendig, im selben Plasmid wie *cadA* lokalisiert zu sein. Dies zeigt sich am Plasmid pI258 (Accession-Nr. J04551), auf dem sich *cadA* (vom Klon II-Insert) befindet. Es hat eine Länge von 3533 bp und weist einen Orf für ein bisher unbekanntes Protein und einen weiteren Orf für *cadA* auf. CadC ist nicht auf diesem Plasmid vorhanden, somit muss die Regulation der *cadA*-Expression von einem anderen Ort des Genomes, z.B. einem weiteren mobilen Element erfolgen. CadC reagiert schon auf minimalste Konzentrationsänderungen des toxischen Kations und steigert die Transkription von *cadA*, was dann zu einer niedrigeren Nettoaufnahme des Cd^{2+} -Ions führt. Der Orf 1 des Plasmides ist nicht auf dem Insert von Klon II vorhanden. Somit ist eine Antikörperreaktion gegen diese Geneinheit nicht möglich. Die Transposase, die in gegenläufiger Richtung zum *cadA*-Orf angeordnet ist, ist nur zu ca. 50% (350 bp) auf dem Insert von Klon II vorhanden. Demnach ist eine gegen die CadA-Determinante

gerichtete Immunreaktion des Patientenserums wahrscheinlich. Das *cadA*-Gen ist auf einem mobilen genetischen Element lokalisiert. Interessanterweise sind auch zwei der vier putativen immunodominanten Antigene des Klon I als phagenspezifische Faktoren potentiell mobil. Dies unterstreicht die Expression mobiler genetischer Elemente während einer *S. aureus*-Infektion. Ob eine gegen Antigene auf mobilen Elementen gerichtete Immunreaktion den Verlauf einer Infektion positiv beeinflusst ist jedoch nicht bekannt.

V. 3. 3 Pathogenitätsinseln als Mediatoren einer Immunreaktion

Anteile der im Serum vorhandenen Antikörper reagierten gegen Elemente auf dem DNA-Insert von Klon III, die Homologien zu den Genabschnitten Orf 10 und 11 der *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 (Accession-Nr. AF410775) und zu den Genabschnitten Orf 10 bis 13 des Transposon Tn557 (Accession-Nr. U93688) aufweisen. Sowohl die kodierende Sequenz von Orf 10 auf der Pathogenitätsinsel (PI) und auf dem Transposon, als auch die kodierende Sequenz von Orf 11 auf der Pathogenitätsinsel und auf dem Transposon sind identisch. Dabei stellte sich heraus, dass die kodierenden Sequenzen der Orfs 10 und 11 der Pathogenitätsinsel, und die Orfs 10 bis 13 des Transposons nahezu komplett auf dem Insert von Klon III vorhanden sind. Die Funktionen dieser Orfs sind bisher nicht bekannt. Die *S. aureus*-Pathogenitätsinsel 3 (Accession-Nr. AF410775) weist 24 Orfs auf und hat eine Länge von 15,9 kb. Die Nukleotidsequenz dieser Pathogenitätsinsel wird flankiert von je 17 bp langen „repeats“. Identische „repeats“ finden sich im Genom in der Nähe der *att*-Seite (5'-TTATTTAGCAGGATAA-3'). Pathogenitätsinseln sind größere DNA-Regionen, die Gene von Virulenzfaktoren und mobilen Elementen tragen. Typische Merkmale von Pathogenitätsinseln sind ein veränderter GC-Gehalt im Vergleich zum restlichen Genom, die Insertion in der Nähe von tRNA-Genen und das Vorhandensein von Mobilitätsfaktoren, welche für die horizontale Ausbreitung von Bedeutung sind. Pathogenitätsinseln sind nicht essentiell für das Überleben einer Zelle (Hacker *et al.*, 1997, 2003; Dobrindt *et al.*, 2004). Insgesamt weist diese Pathogenitätsinsel eine große Übereinstimmung mit anderen bekannten Pathogenitätsinseln auf, speziell mit der Staphylokokken-Pathogenitätsinsel 1 (SaPI1) und der Staphylokokken-Pathogenitäts-

insel SaPI₁ (Yarwood *et al.*, 2002). Die SaPI₁ trägt das *tst*-Gen und war die erste beschriebene Pathogenitätsinsel, deren Mobilität experimentell nachgewiesen werden konnte. Die Mobilität dieser Pathogenitätsinseln ist für die weite Verbreitung des *tst*-Elements bei klinischen Isolaten von *S. aureus* verantwortlich (Novick, 2003). Obwohl die SaPI₁ und SaPI₃ sehr nahe verwandt sind und große Homologien untereinander besitzen, tragen beide jeweils ein anderes Superantigen. Während auf der SaPI₁ das TSST-1 kodiert wird, findet man auf der SaPI₃ das Enterotoxin B-Gen. Interessanterweise schließen sich beide Superantigene gegenseitig aus. Es konnte bislang kein Stamm isoliert werden, der beide Superantigene trägt (Yarwood *et al.*, 2002). Drei der 24 Orfs, die auf der SaPI₃ zu finden sind, kodieren für Enterotoxine (B, K, Q). Ebenfalls weist die SaPI₃ eine typische Anordnung aus zwei Transkriptionsblöcken auf. Der erste Block mit den Orfs 2-18, einschliesslich *seb*, wird vom Gegenstrang kodiert, der zweite Block, Orf 19-24, vom „Leading“-Strang. Orf 1 (*sapi3_1* = *ear*), ebenfalls auf dem „Leading“-Strang, kodiert für ein Protein, das der β -Laktamase ähnlich ist. Obwohl die genaue Funktion dieses Proteins bisher unbekannt ist, lassen verschiedene Eigenschaften eine wichtige Funktion im „Lebenszyklus“ von *S. aureus* vermuten. Die Position und das vermutete Genprodukt sind in drei Pathogenitätsinseln, SaPI₁, SaPI₃ und SaPI₄, enthalten. Es zeigt eine identische Signalsequenz zum *tst*-Orf und wird vom *S. aureus*-Stamm RN4282 in großen Mengen gebildet (Yarwood *et al.*, 2002).

Ebenfalls zeigte sich ein ca. 900 bp umfassender Nukleotidabschnitt nahe der *att*-Region mit einer ca. 95-prozentigen Übereinstimmung zu einer Sequenz auf dem Bakteriophagen 80 α nahe der kodierenden Amidasesequenz *lytA*. Diese Region auf der SaPI₁ kodiert jedoch für kein bisher bekanntes Protein. Sonstige Übereinstimmungen zum Bakteriophagen 80 α auf genomischer Ebene sind bisher aber nicht bekannt. Dieser Basenbereich ist nicht auf dem Insert von Klon III vorhanden. Es ist aber durchaus denkbar, dass sich im DNA-Bereich downstream des Inserts dieser 900 bp umfassende Nukleotidabschnitt auf der Bakterien-DNA des Stammes A134 befindet, da man ja auch davon ausgeht, dass das ca. 1500 bp große Insert von Klon III zufällig durch den DNA-Partialverdau in dieser Länge aus dem Bakterienzellgenom herausgeschnitten wurde. Wie schon bei der Diskussion von Klon I erwähnt, ist wahrscheinlich der Bakteriophage 80 α oder ein verwandter Bakteriophage in das Bakterienzellgenom des *S. aureus*-

Stammes A134 inseriert. Die Hypothese, dass die lytische Aktivität von *S. aureus*-Phagen während einer Infektion maßgeblich den Verlauf einer *S. aureus*-Sepsis beeinflussen kann, ist eine interessante Hypothese, die es weiter zu untersuchen gilt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass während des Infektionsgeschehens Gene von mobilen genetischen Elementen exprimiert werden und einer Immunreaktion zugänglich sind. Die Bedeutung dieser Prozesse für den Infektionsverlauf sind unbekannt, es gibt allerdings neuere Arbeiten, die eine erhöhte Transpositionsaktivität in klinischen Isolaten während einer Infektion beschreiben (Wolz *et al.*, 2002). Verschiedene Daten deuten auf eine enge Verwandtschaft zwischen Pathogenitätsinseln von *S. aureus* und Bakteriophagen hin. Das *tst*-Element bei TSST-1 positiven Bakterienstämmen auf der SaPII kann von Bakteriophagen wie dem Bakteriophagen 80 α herausgeschnitten, zirkularisiert und in andere Zellen transduziert werden (Lindsay *et al.*, 1998). Diese Mobilität der Pathogenitätsinseln und somit auch der dort kodierten pathogenen genetischen Elemente ist ein charakteristisches Merkmal von *S. aureus* und kann als wichtiges evolutionäres Werkzeug bei der Variabilität und damit auch Pathogenität des Organismus bezeichnet werden.

V. 3. 4 Protein A als immunologisches Analysewerkzeug oder immunodominantes Target ?

Die Sequenzierung des Inserts von Klon V, der beim Screenen der Patientenserum ebenfalls ein deutlich sichtbares Signal zeigte, ergab Übereinstimmungen mit Datenbanksequenzen von Protein A, einer Laktat-Permease und zwei hypothetischen Proteinen mit bisher nicht bekannter, oder nicht untersuchter Funktion. Eines der beiden hypothetischen Proteine ist wahrscheinlich ein Transkriptionsregulator aus der GntR-Familie. Die Anordnung der Orfs auf dem Insert entspricht exakt der Anordnung der homologen Gene in den drei *S. aureus*-Stämmen N315, Mu50 und MW2. Die Sequenzhomologien zu Protein A zeigen sich verschiedenartig. Protein A (SpA) von *S. aureus* wurde in 90-99% der Biotyp A-Stämme identifiziert (Brigido *et al.*, 1991). Es ist ein Zellwandbestandteil mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Die Sequenzanalyse des Gens von Protein A (*spa*) zeigt zwei funktionell verschiedene Regionen in dem Proteinmolekül (Sjödahl, 1977). Der NH₂-terminale Anteil besteht aus vier fort-

laufenden homologen IgG-Bindungseinheiten, welche jede ein Molekulargewicht von 7 kDa aufweist. Die COOH-terminale Domäne mit einem Molekulargewicht von 15 kDa ist kovalent mit dem Peptidoglykan verbunden, besitzt aber keine IgG-Bindungs-fähigkeit (Archer, 1998). Da Protein A an das F_C-Fragment von Immunglobulinen bindet, wird es häufig für immunologische Analysetechniken verwendet (Deisenhofer, 1981). Während des Bakterienzellzyklus wird Protein A vorwiegend während der exponentiellen Phase gebildet (Gao und Stewart, 2004). Der Großteil des Proteins ist an Zellwandstrukturen gebunden, aber während der stationären Phase erfolgt auch ein Anstieg des ungebundenen Proteinanteils aufgrund der Zellaulyse (Movitz, 1976). Die Bildung von extrazellulärem Protein A ist in Methicillin-resistenten Stämmen von *S. aureus* oft erhöht (Winblad und Ericson, 1973). Protein A spielt auch eine wichtige Rolle als Virulenzfaktor bei Infektionen durch *S. aureus* (Hogevik *et al.*, 1998). Darüber hinaus wird es für die Charakterisierung von Produkten bei der Immunpräzipitation verwendet (Forsgren, 1972). Aufgründessen wurde es auch in diversen Therapieversuchen von malignen Erkrankungen und Immunkomplexerkrankungen probatorisch eingesetzt (Bansal *et al.*, 1978). Als Virulenzfaktor hat Protein A durch seine „umgekehrte“ Immunglobulinbindung eine immunsuppressive Wirkung, da es so die opsonierende Funktion der Antikörper ausschaltet (Foster und McDevitt, 1994). Eine verstärkte Synthese von Protein A findet während der exponentiellen Phase des Bakterienwachstums statt (Movitz, 1974; Gao und Stewart, 2004). Somit kann man davon ausgehen, dass während einer Bakteriämie oder eines septischen Verlaufes einer *S. aureus*-Infektion eine massive Bildung und ein Einbau von Protein A in die Bakterienzellwand statt-findet. Die dadurch bedingte „Antikörperinaktivierung“ trägt zum oben beschriebenen immunsuppressiven Effekt bei. Die andere, wohl bisher nur theoretisch behandelte Möglichkeit, ist die der immunogenen Potenz durch ein solches Überangebot an Protein A. Welche Struktur oder Untereinheit dafür verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht ausgemacht werden. Durch das grobe Screening in der vorliegenden Arbeit lässt sich eine solche Differenzierung zwischen Antikörperbindung am F_C-Fragment oder am F_{ab}-Fragment durch Protein A nicht nachweisen. Dazu müsste man das Protein A in einzelne Fragmente subklonieren, exprimieren und erneut mit den Patientenserum reagieren lassen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Untersuchung aufgetretene positive Reaktion von Klon V am

wahrscheinlichsten der Antikörperbindung am F_C-Fragment durch Protein A zuzuschreiben ist. Die Infektverstärkung bzw. Immunsuppression von Protein A durch die starke Antikörper-bindung hat somit eine „Antikörper-konsumierende“ Wirkung. Der suppressive Einfluss dieses „Leerfischens“ des Serums könnte die Abwehrlage des Sepsispatienten beeinflussen.

Als weitere Homologie findet sich auf der Insertsequenz von Klon V die kodierende Sequenz der L-Laktat-Permease LctP, die auch in den drei *S. aureus*-Stämmen N315, MW2 und Mu50 vorhanden ist. Nähere Untersuchungen zu diesem Enzym wurden unter anderem mit *Bacillus subtilis* durchgeführt (Cruz *et al.*, 2000). Die Funktion dieses Enzyms liegt im anaeroben Stoffwechsel der Bakterien, bei dem das Laktat durch das Permeaseenzym über die Bakterienzellhüllen transportiert wird. Dass dieses Enzym sowohl bei den oben genannten drei Stämmen als auch auf dem *S. aureus*-Stamm A134 vorhanden ist, spricht für die Konstanz im Genom bei vielen MRSA-Stämmen. Hier könnte man sich nun erneut über die Funktion der L-Laktat-Permease seine potentielle vermehrte Expression herleiten. Während einer Sepsis kommt es zu einem massiven Anschwemmen von Stoffwechselmetaboliten, z.B. dem Laktat, die sowohl von den Bakterien als auch vom Wirtsorganismus gebildet werden. Da sie für viele Bakterien als Energielieferant im anaeroben Stoffwechsel dienen, werden sie mittels solcher Fermentationsproteine über die Bakterienzellhüllen transportiert. Eine vermehrte Expression dieses Proteins kann so zu einer gesteigerten Antikörperbildung führen. Jedoch müsste man auch hier, um diesen Gedanken weiter zu verfolgen, eine Subklonierung dieses Enzyms mit seiner kodierenden Sequenz vornehmen und dann erneut mit dem Serum eine immunogene Wirkung bestätigen.

Auf den vier in dieser Arbeit identifizierten Klonen zeigen sich Homologien zu potentiell immunodominanten Antigenen, die teilweise in ihrer Struktur schon bekannt waren, z.T. auch bisher in ihrer Funktion noch unbekannt sind. Diese als hypothetische Proteine bezeichneten Antigene wurden bisher noch keiner genaueren Analyse zugeführt. Viele dieser Antigene sind auf mobilen Elementen lokalisiert. Gegen welche dieser Targets sich das Serum richtet, konnte in diesem Rahmen nicht nachgewiesen

werde. Die Subklonierung dieser Zielstrukturen mit ihren kodierenden Sequenzen wäre hier der nächste Schritt für die weitere Charakterisierung.

Auffallend ist auch, dass die in unseren Untersuchungen gefunden potentiell immunogenen Strukturen in vergleichbaren Studien nicht identifiziert werden konnten. In den Studien von Etz *et al.* (2002) und Vytvytska *et al.* (2002) konnten keine der Proteine aus unserer Arbeit gefunden werden. Das IsaA-Protein (Lorenz *et al.*, 2000) konnte dagegen in beiden Arbeiten nachgewiesen werden. Dies kann auch auf die verschiedenen Versuchsansätze in den diversen Arbeiten zurückgeführt werden. Vytvytska *et al.* (2002) untersuchten ca. 100 Patientenserum nach einer *S. aureus*-Infektion auf vorhandene Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Antikörpern aus nur einem Patientenserum mit einer MRSA-Sepsis gearbeitet. In der Arbeit von Etz *et al.* (2002) wurde eine Sammlung von insgesamt 150 Patientenserum aus drei Patientenkollektiven auf enthaltene Antikörper analysiert, zum einen von Patienten mit einer MRSA-Infektion oder Sepsis, zum anderen von klinisch gesunden Patienten und von Säuglingen. Daraus ist von vornherein ein viel größerer Antikörperpool mit einem weitaus breiteren Spektrum der dazu gehörigen Antigene vorhanden. Auch arbeitete die Gruppe um Vytvytska *et al.* (2002) mit einem anderen MRSA-Stamm. Sie versuchten mit dem *S. aureus*-Stamm COL unter verschiedenen Wachstumsbedingungen die Expression einer möglichst großen Anzahl von bakteriellen Antigenen zu steigern, um so die immunogene Wirkung möglichst vieler Antigene mittels der Seren zu testen.

Die Identifikation von immunodominanten Antigenen findet auch bei anderen Bakterienspezies und bei Erkrankungen nicht-infektiöser Genese statt. Kimmel *et al.*, (2000) stellten eine Arbeit mit vergleichbarem Ansatz vor, welche, wie die anderen Arbeiten zu diesem Thema, zum einen zur Entwicklung von spezifischen Antikörpern beitrugen, zum anderen aber auch zu einer Verbesserung der diagnostischen Techniken führten. Mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese konnten hier insgesamt 29 Proteine eines *H. pylori* Stammes identifiziert werden, die spezifisch mit Seren reagierten, die von Patienten mit einer *H. pylori* bedingten Magen-Darm-Pathogenese stammten. In einer weiteren Arbeit konnten Tumor-Antigene vom Nierenzellkarzinom

identifiziert werden (Klade *et al.*, 2001). Dies bestätigt sowohl das diagnostische als auch therapeutische Potential dieser Methode.

VI Zusammenfassung

Infektionen durch MRSA können aufgrund der zunehmenden Therapieresistenz der Erreger ernsthafte Verläufe zeigen. Daher ist die Entwicklung alternativer Behandlungsstrategien ein Ziel der aktuellen Infektionsforschung. Ein vielversprechender Ansatz liegt in der Verwendung pathogenspezifischer, monoklonaler Antikörper gegen immunodominante Antigene der Erreger. Durch die Fortschritte in der Genomforschung der vergangenen Jahre ist nun die Analyse der Gesamtheit der Pathogenitätsfaktoren eines bakteriellen Erregers möglich. Durch eine funktionelle Genomanalyse mit Hilfe immunologischer Detektionssysteme können antigene Bakterienzellstrukturen identifiziert werden. Daraus abgeleitete Targetstrukturen sollen die Grundlage bilden für die Entwicklung spezifischer humaner Antikörper, die in alternativen Therapieansätzen zusätzlich zur antimikrobiellen Chemotherapie zukünftig an Bedeutung gewinnen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expressionsgenbank eines MRSA-Stammes hergestellt und mittels Patientenserum nach immunodominanten Antigenen gesucht. Die aus einem Partialverdau der genomischen DNA gewonnenen Fragmente wurden in einen Expressionsvektor kloniert. Die so hergestellte Genbank des ausgewählten MRSA-Stammes A134 umfasst ca. 10000 Klone. Ein vergleichendes Screening der Genbank erfolgte mit dem Serum eines Patienten mit einer MRSA-Sepsis und mit dem Serum einer negativen Kontrollperson. Die DNA-Inserts der immunoreaktiven Klone wurden sequenziert und durch Datenbankvergleiche identifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass der gewählte Ansatz geeignet ist, um immunodominante Antigene, die während einer Sepsis exprimiert werden, zu identifizieren. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen putativen immunodominanten Antigenstrukturen umfassen ein Holin, die Amidase LytA, Faktoren des *isd*-Genclusters, der für die Cadmiumresistenz wichtige Transporter CadA, unbekannte Proteine der Staphylokokken-Pathogenitätsinsel SaPI3 und Protein A. Interessanterweise wurden durch den methodischen Ansatz vorwiegend Proteine auf mobilen genetischen Elementen identifiziert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass während einer *S.*

aureus-Infektion nicht nur Gene für das Wachstum der Zellen und Virulenzfaktoren wie Toxine und Adhäsine, sondern auch mobile Elemente exprimiert werden. Die Bedeutung dieser Prozesse für das Infektionsgeschehen ist allerdings bislang unbekannt und zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit diese Elemente für die Pathogenese von Bedeutung sind. Die in dieser Arbeit identifizierten Antigene müssen auch in zukünftigen Arbeiten durch Subklonierung weiter charakterisiert werden. Eine weitere interessante Beobachtung ist die Identifizierung eines Bakteriophagen, der in das *isd*-Gencluster inserierte, das für die Aufnahme von Eisen eine Bedeutung besitzt. Inwieweit durch die Insertion des Phagens die Eisenaufnahme in dem klinischen Isolat gestört wird, müssen zukünftige Studien zeigen.

Die positive Reaktion des Patientenserums mit dem Protein A ist am wahrscheinlichsten auf die Antikörperbindung am F_C-Fragment zurückzuführen. Es ist jedoch auch möglich, dass während der Infektion verstärkt Protein A gebildet wird, das durch die Bindung von Antikörpern am Fc-Teil eine immunsuppressive Wirkung durch die Neutralisierung opsonisierender und Toxin-inaktivierender Antikörper besitzt.

Durch die Sequenzierung und Datenbankanalyse der positiven Klone konnte ein erster Überblick über immunodominante Antigene von *S. aureus* erhalten werden. Da auf den Insertelementen meist mehrere putative Antigene kodiert sind, müssen in zukünftigen Arbeiten die identifizierten Insertelemente subkloniert und damit weiter charakterisiert werden. Dadurch sollte es möglich sein, die immunogenen Strukturen zu erkennen und diese für die Entwicklung monoklonaler Antikörper zu nutzen.

VII Literaturverzeichnis

Archer GL. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. Clin.Infect. Dis. **26**: 1179–1181.

Archer GL., Niemeyer DM., Thanassi JA., Pucci MJ. 1994. Dissemination among *staphylococci* of DNA sequences associated with methicillin resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **38(3)**: 447-54.

Archibald AR., Hancock IC., Harword. CR. 1993. Cell wall structure, synthesis, and turnover. p.381-410. In A.L.Sonenshein, J.A.Hoch and R.Losick(ed.). *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Axelsen KB., Palmgren MG. 1998. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. J. Mol. Evol. **46**: 84-101.

Balaban N., Goldkorn T., Gov Y., Hirshberg M., Koyfman N., Matthews HR., Nhan RT., Singh B., Uziel O. 2001. Regulation of *Staphylococcus aureus* pathogenesis via target of RNAIII-activating Protein (TRAP). J Biol Chem. **276(4)**: 2658-67.

Bansal SC., Bansal BR., Thomas HL., Siegel PD., Rhoads JE. Jr., Cooper DR., Terman DS., Mark R. 1978. Ex vivo removal of serum IgG in a patient with colon carcinoma: some biochemical, immunological and histological observations. Cancer. **42**: 1-18.

Bassetti M., Di Biagio A., Del Bono V., Cenderello G., Bassetti D. 2004. Successful treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis with linezolid. Int J Antimicrob Agents. **24(1)**: 83-4.

Bauernfeind A., Rosenthal E., Eberlein E., Holley M., Schweighart S. 1993. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. Infection. **21(1)**: 18-22.

Bierbaum G., Fuchs K., Lenz W., Szekat C., Sahl HG. 1999. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **18(10)**: 691-6.

Bon JB., Mani N., Jayaswal RK. 1997. Molecular analysis of lytic genes of bacteriophage 80 alpha of *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol.* **43(7)**: 612-6.

Brigido MM., Barardi CR., Bonjardin C., Santos CLS., Junqueira ML., Brentani RR. 1991. Nucleotide sequence of a variant protein A of *S. aureus* suggests molecular heterogeneity among strains. *Journal of Basic Microbiol.* **31**: 337-345.

Bush K., Jacoby GA., Medeiros AA. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39(6)**: 1211-33.

Centers for Disease Control and Prevention. 1997. Interim guidelines for prevention and control of staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **46**: 626–635.

Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* – Pennsylvania. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **51**: 902.

Chan PF., Foster SJ. 1998. Role of SarA in virulence determinant production and environmental signal transduction in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **180(23)**: 6232-41.

Chang S., Sievert D. M., Hageman J. C., Boulton M. L., Tenover F. C., Downes FP., Shah S., Rudrik JT., Pupp GR., Brown WJ., Cardo D., Fridkin SK. and Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1342–1347.

Cheung AL., Bayer AS., Zhang G., Gresham H., Xiong YQ. 2004. Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunol Med Microbiol. **40(1)**: 1-9.

Cosgrove SE., Sakoulas G., Perencevich EN., Schwaber MJ., Karchmer AW., Carmeli Y. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. **36(1)**: 53-9.

Crossley K. B., Archer G. L. 1997. The *Staphylococci* in Human Disease, Churchill Livingstone, New York, pp. 331–582.

Cruz RH., Hoffmann T., Marino M., Nedjari H., Presecan-Siedel E., Dreesen O., Glaser P., Jahn D. 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. J Bacteriol. **182(11)**: 3072-80.

Cui L., Murakami H., Kuwahara-Arai K., Hanaki H., Hiramatsu K. 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.

Daranyi V. (1926)

de Jonge BLM., Tomasz A. 1993. Abnormal peptidoglycan produced in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of methicillin: functional role for penicillin-binding protein 2A in cell wall synthesis. Antimicrob. Agents Chemother. **37**: 342–346.

Deisenhofer J. 1981. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. Biochemistry. **20(9)**: 2361-70.

- Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U., Hacker J.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* **2(5)**: 414-424.
- Eiff C., Becker K., Machka K., Stammer H., Peters G.** 2001. Nasal Carriage as a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia *New Engl. J. Med.* **344**: 11–16.
- Endo G.(†), Silver S.** 1995. CadC, the Transcriptional Regulatory Protein of the Cadmium Resistance System of *S. aureus* Plasmid pI258. *J Bacteriol.* **177**: 4437–4441.
- Engemann JJ., Carmeli Y., Cosgrove SE., Fowler VG., Bronstein MZ., Trivette SL., Briggs JP., Sexton DJ., Kaye KS.** 2003. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clin Infect Dis.* **36(5)**: 592-8.
- Escolar L., Perez-Martin J., De Lorenzo V.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol.* **181**: 6223.
- Etz H., Minh DB., Henics T., Dryla A., Winkler B., Triska C., Boyd AP., Sollner J., Schmidt W., von Ahsen U., Buschle M., Gill SR., Kolonay J., Khalak H., Fraser CM., von Gabain A., Nagy E., Meinke A.** 2002. Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(10)**: 6573-8.
- Firth N., Skurray RA.** 2000. Genetics: accessory elements and genetic exchange, p. 326–338. In Fischetti VA., Novick RP., Ferretti JJ., Portnoy DA., and Rood JE. (ed.), *Gram-positive pathogens*. ASM Press, Washington, D.C.
- Flock JI.** 1999. Extracellular-matrix-binding proteins as targets for the prevention of *Staphylococcus aureus* infections. *Mol. Med. Today.* **5**: 532–537.

Fluit AC., Schmitz FJ., Verhoef J. 2001. Frequency of Isolation of Pathogens from Bloodstream, Nosocomial Pneumonia, Skin and Soft Tissue, and Urinary Tract Infections Occurring in European Patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **20**: 188-191.

Forsgren A. 1972. Pathogenicity of *Staphylococcus aureus* mutants in general and local infections. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.Sect.B.* **80**: 564-570.

Foster TJ., McDevitt D. 1994. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. *FEMS Microbiol Lett.* **118(3)**: 199-205.

Fournier B., Klier A., Rapoport G. 2001. The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* **41(1)**: 247-61.

Fridkin SK. 2001. Vancomycin-Intermediate and –Resistant *Staphylococcus aureus*: What the Infectious Disease Specialist Needs to Know. *Clinical Infectious Diseases.* **32**: 108–15.

Galperin MY., Koonin EV. 1999. Searching for drug targets in microbial genomes. *Curr Opin Biotechnol.* **10(6)**: 571-8.

Gao J., Stewart GC. 2004. Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) promoter. *J Bacteriol.* **(12)**: 3738-48.

Garrett J., Fusselmann R., Hise J., Chiou L., Smith-Grillo D., Schulz R., Young R. 1981. Cell lysis by induction of cloned lambda lysis genes. *Mol. Gen. Genet.* **182**: 326-331.

Garrett J., Young R. 1982. Lethal action of bacteriophage lambda S gene. *J. Virology.* **44**: 886-892.

Gastmeier P., Sohr D., Geffers C., Nassauer A., Dettenkofer M., Ruden H. 2002. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in German intensive care units. *Infection*. **30(4)**: 198-202.

Georgopapadakou NH., Liu FY. 1980. Binding of β -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemotherapie*. **29**: 333-336.

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

Hacker J., Hentschel U., Dobrindt U. 2003. Prokaryotic chromosomes and disease. *Science*. **301(5634)**: 790-3.

Hanaki H., Kuwahara-Arai K., Boyle-Vavra S., Daum RS., Labischinski H., Hiramatsu K. 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob. Chemother*. **42**: 199-209.

Heisig P., Schedletzky H., Falkenstein-PH. 1993. Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **37**: 696-701.

Hellenbrand W. 2003. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert-Koch-Institut. Statistisches Bundesamt. **Heft 18**.

Hiramatsu K. 1995. Molecular evolution of MRSA. *Microbiol-Immunol*. **39(8)**: 531-43.

Hiramatsu K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T., Tenover FC. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob. Chemother. **40**: 135–136.

Hogevik H, Soderquist B, Tung HS, Olaison L, Westberg A, Ryden C, Tarkowski A, Andersson R. 1998. Virulence factors of *Staphylococcus aureus* strains causing infective endocarditis--a comparison with strains from skin infections. APMIS. **106**: 901-908.

Holtje JV., Tuomanen EI. 1991. The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections. J. Gen. Microbiol. **137**: 441-454.

Horsburgh M., Ingham E., Foster SJ. 2001. In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. J Bacteriol. **183**: 468.

Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. 1995. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **16**: 105–113.

Hryniewicz W. 1999. Epidemiology of MRSA. Infection. **2**: 13–16.

Ito T., Ma X X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K. 2004. Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC*. Antimicrob. Agents Chemother. **48(7)**: 2637-51.

Ito T., Okuma K., Ma XX., Yuzawa H., Hiramatsu K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat. **6(1)**: 41-52.

Jacoby GA., Medeiros AA. 1991. More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35(9)**: 1697-704.

Jevons MP. 1961. "Celbenin"-resistant staphylococci". *Br. Med. J.* **1**: 124-125.

Katayama Y., ITO T., Hiramatsu K. 2000. "A new Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*". *Antimicrob. Agents Chemother.* **p.1549-1555**.

Kaufhold A., Podbielski A., Horaud T., Ferrieri P. 1992. Identical genes confer high-level resistance to gentamicin upon *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36(6)**: 1215-8.

Kimmel B., Bosserhoff A., Frank R., Gross R., Goebel W., Beier D. 2000. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and Evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infection and Immunity.* **68**: 915-920.

Klade CS., Voss T., Krystek E., Ahorn H. 2001. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics.* **1**: 890–898.

Kloos WE., Lambe DW. Jr. 1991. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th Edition. **p. 222-237**.

Kreiswirth B., Kornblum J., Arbeit RD., Eisner W., Maslow JN., McGeer A., Low DE., Novick RP. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science.* **259(5092)**: 227-30.

Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi NK., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H., Hiramatsu K. 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. **357(9264)**: 1225-40.

Leclercq R., Derlot E., Duval J., Courvalin P. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**: 157–161.

Lederberg J. 2000. *Encyclopedia of Microbiology*. Second Edition. Academic Press.

Lee AH., Levinson, AI., Schumacher HR. Jr. 1993. Hypogammaglobulinemia and rheumatic disease. *Semin. Arthritis Rheum.* **22**: 252-264.

Lindsay JA., Foster SJ. 1999. Interactive regulatory pathways control virulence determinant production and stability in response to environmental conditions in *Staphylococcus aureus*. *Mol Gen Genet.* **262(2)**: 323-31.

Lindsay, Ruzin, Hope, Kurepina, Novick. 1998. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *S. aureus*. *Molecular Microbiology.* **29(2)**: 527-543.

Lorenz U., Ohlsen K., Karch H., Hecker M., Thiede A., Hacker J. 2000. Human antibody response during sepsis against targets expressed by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **29(2)**: 145-153.

Lowy F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**: 520–532.

Malanoski GJ., Samore MH., Pefanis A., Karchmer AW. 1995. *Staphylococcus aureus* catheter-associated bacteremia. Minimal effective therapy and in-unusual infectious complications associated with arterial sheath catheters- fections. Arch Intern Med. **155**: 1161–6.

Mamo W., Jonsson P., Muller H. P. 1995. Opsonization of *Staphylococcus aureus* with a fibronectin-binding protein antiserum induces protection in mice. Microb. Pathog. **19**: 49–55.

Mathew J., Addai T., Anand A., Morrobel A., Maheshwari P., Freels S. 1995. Clinical features, site of involvement, bacteriologic findings, and outcome of infective endocarditis in intravenous drug users. Arch Intern Med. **155**: 1641–8.

McNamara PJ., Iandolo JJ. 1998. Genetic instability of the global regulator agr explains the phenotype of the xpr mutation in *Staphylococcus aureus* KSI9051. J Bacteriol. **180(10)**: 2609-15.

Michel M., Gutmann L. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. Lancet. **349(9069)**: 1901-6.

Movitz J. 1974. A study on the biosynthesis of protein A in *Staphylococcus aureus*. J.Biochem. **48**: 131-136.

Movitz J. 1976. Formation of extracellular protein A by *Staphylococcus aureus*. Eur.J.Biochem. **68**: 291-299.

Murray BE., Mederski SB.; Foster SK., Brunton JL., Harford P. 1986. In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggest a staphylococcal origin. J-Clin-Invest. **77(1)**: 289-93.

Nicas TI., Zeckel ML., Braun DK. 1997. Beyond vancomycin: new therapies to meet the challenge of glycopeptide resistance. *Trends Microbiol.* **5(6)**: 240-9.

Nikaido H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* **264**: 382-388.

Nilsson I., Patti J. M., Bremell T., Höök M., Tarkowski A. 1998. Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. *J. Clin. Invest.* **10**: 2640–2649.

Noble WC., Virani Z., Cree RG. 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* **72**: 195–8.

Novick RP. 1967. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *S. aureus*. *Virology.* **33**: 155-166.

Novick RP. 2000. Sortase: the surface protein anchoring transpeptidase and the LPXTG motif. *Trends Microbiol.* **8(4)**: 148-51.

Novick RP. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol.* **48(6)**: 1429-49.

Novick RP. 2003. Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid.* **49(2)**: 93-105.

Novick RP., Murphy E., Gryczan TJ., Baron E., Edelman I. 1979. Penicillinase plasmids of *S. aureus*: restriction-deletion maps. *Plasmid.* **2**: 109–129.

Novick RP., Roth C. 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *S. aureus*. *J Bacteriol.* **95**:1335–1342.

Nucifora G., Chu L., Misra T. K., Silver S. 1989. Cadmium resistance from *S. aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**: 3544-3548.

Ogston A. 1882. *Micrococcus poisoning*. J Anat. **17**: 24-58.

Perkins HR. 1980. The bacterial autolysins. **p.437-456**. In H.J.Rogers, H.R.Perkins, and J.B.Ward(ed.). Microbial cell walls. Chapman and Hall, London, United Kingdom.

Poole K. 1994. Bacterial multidrug resistance--emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. **34(4)**: 453-6. Review.

Poole K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. **10(1)**: 12-26.

Ramadurai L., Jayaswal RK. 1997. Molecular cloning, sequencing, and expression of *lytM*, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **179**: 3625–3631.

Ratledge C., Dover L. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **54**: 881.

Reader RW., Siminovitch L. 1971. Lysis defective mutants of bacteriophage lambda: on the role of the S function in lysis. Virology. **43**: 623-637.

Rensing C., Ghosh M., Rosen BP. 1999. Families of Soft-Metal-Ion-Transporting ATPases. J Bacteriol. **181**: 5891-5897.

Reynolds PE. 1988. The essential nature of staphylococcal penicillin-binding proteins. In P. Actor, L. Daneo-Moore, M.L.Higgins, M.R.Salton, and G.D.Shockman (ed.), Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function. American Society for Microbiology, Washington, D.C. **p. 343-351**.

Sakata N., Wadstrom T., Yamazaki K., Mukai T. 2000. Staphylococcal cell wall-anchored surface protein. Veröffentlichung in der Datenbank.

Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N. Y.

Sanders WE. Jr., Sanders CC. 1988. Inducible beta-lactamases: clinical and epidemiologic implications for use of newer cephalosporins. *Rev-Infect-Dis.* **10(4):** 830-8.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74:** 5463-5467.

Shockman GD., Barrett JF. 1983. Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **37:** 501-527.

Shockman GD., Holtje JV. 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. **p.131-166.** In J.-M.Ghuysen and R.Hakenbeck(ed.). *Bacterial cell wall.* **Vol.27.** Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands.

Sieradzki K., Tomasz A. 1999. Gradual alterations in cell wall structure and metabolism in vancomycin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* **181:** 7566–70.

Sjödahl J. 1977. Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding. *Eur. J. Biochem.* **73(2):** 343-51.

Sjödahl J. 1977. Structural studies on the four repetitive Fc-binding regions in protein A from *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.* **78(2):** 471-9.

Skaar EP. 2003. Passage of Heme-Iron Across the Envelope of *Staphylococcus aureus*. SCIENCE. Vol. **299**.

Skinner D, Keefer CS. 1941. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. Arch Intern Med. **68**: 851–75.

Swartz MN. 1994. Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. Proc Natl Acad Sci U S A. **91(7)**: 2420-7.

Taylor JM., Heinrichs DE. 2002. Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. Molecular Microbiology **43(6)**: 1603–1614.

Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, O'Hara CM, McAllister SK, Clark NC, Hiramatsu K. 1998. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol. **36(4)**: 1020-7.

Tenover FC., Biddle JW., Lancaster MV. 2001. Emerg. Infect. Dis. **7**: 327–332.

Tenover FC., Weigel LM., Appelbaum PC., McDougal LK., Chaitram J., McAllister S., Clark N., Killgore G., O'Hara CM., Jevitt L., Patel JB., Bozdogan B. 2004. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient in Pennsylvania. Antimicrob. Agents Chemother. **48(1)**: 275-80.

Trisha Gura. 2002. Nature. Vol. **417**: 584 – 586.

Tynecka Z., Gos Z., Zajac J. 1981. Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *S. aureus*. J Bacteriol. **147**: 313–319.

Vytvytska O., Nagy E., Bluggel M., Meyer HE., Kurzbauer R., Huber LA., Klade CS. 2002. Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis. *Proteomics*. **2**: 580–590.

Waldvogel FA. 2000. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In Principles and practice of infectious diseases. G.L. Mandell, J.E. Bennett, and R. Dolin, editors. Churchill Livingstone. Philadelphia, Pennsylvania, USA. **p. 2069–2092.**

Wang X., Wilkinson BJ., Jayaswal RK. 1991. Sequence analysis of a *S. aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. *Gene*. **102(1)**: 105-9.

Ward JB., Williamson R. 1985. Bacterial autolysins: specificity and function, **p. 159-166.** In C. Nombela (ed.), Microbial cell wall synthesis and autolysis. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

Weigel LM., Clewell DB., Gill SR., Clark NC., McDougal LK., Flannagan SE., Kolonay JF., Shetty J., Killgore GE., Tenover FC. 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*. **302(5650)**: 1569-71.

Wenzel RP., Edmond MB. 1998. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 245–251.

WHO. 1998. The World Health Report 1998 - Life in the 21st century. A vision for all. Geneva

Winblad S., Ericson C. 1973. Sensitized sheep red cells as a reactant for *Staphylococcus aureus* protein A. Methodology and epidemiology with special reference to weakly reacting methicillin-resistant strains. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.* **81**: 150-156.

Witte W., Klare I. 2001. Multizentrische Studien der P-E-G für Chemotherapie. Hyg Med. **25**: 347.

Wolz C., Goerke C., Landmann R., Zimmerli W., Fluckiger U. 2002. Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. Infect Immun. **70(6)**: 2758-62.

Wu S., Piscitelli C., Delencastre H., Tomasz A. 1996. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. Microb. Drug Resistance. **2**: 435-441.

Yarwood JM., McCormick JK., Paustian ML., Orwin PM., Kapur V., Schlievert PM. 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. J Biol Chem. **277(15)**: 13138-47.

Young R. 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. Microbiol. Rev. **56**: 430-481.

Young R. 2002. Bacteriophage holins: deadly diversity. J Mol Microbiol Biotechnol. **4(1)**: 21-36.

Young R., Bläsi U. 1995. Holins: form and function in bacteriophage. FEMS Microbiology Reviews. **17**: 191-205.

VIII Anhang

VIII. 1 Übersicht der Klonsequenzen

VIII. 1. 1 Klon I

1	TTCNCTCCNT	NACCTTGTA	ATTTTAACGC	TAATTTTTAG	TCGTTTTTTT
51	ATTTTGGATA	AAAGGAGCAA	ACAAATGGAT	ATTAACCTGGA	AATGAGATT
101	CAAAAACAAA	GCAGTACTAA	CTGGTTTAGT	TGGAGCATTG	TTGCTATTTA
151	TCAAGCAAAT	TACAGACTTA	TTCGGATTAG	ATTTATCAAC	TCAATTAAT
201	CAAGCTAGCG	CGATTATAGG	TGCTATTCTC	ACGCTGCTCA	CAGGTATTGG
251	TGTTATTACT	GATCCAACGT	CAAAGGCGT	CTCAGATTCA	TCTATAGCAC
301	AGACATATCA	AGCGCCTAGA	GATAGTAGCA	AAGAAGAACA	ACAGGTTACT
351	TGGA AACAT	CTCAAGACAG	TAATTTAACG	CCAGAATTAA	NGTACAAAAG
401	CACCGAAAGA	ATATGATACA	TCACAGCCTG	TTTACAGGAC	GCCTCTAACG
451	ATGTTGGTNT	TTTGACGNTA	GAATGANTAT	CATCATGGAG	GAGGCGACGA
501	TGCAAGCAAA	ATTAACTAAA	AAAGAGTTTA	TAGAATGGTT	GAAAACCTTCT
551	GAGGGAAAAC	AATTCAATGT	GGACTTATGG	TATGGATTTT	AATGCTTTGA
601	TTATGCCAAT	GCTGGTTGGA	AAGTTTTGTT	TGGATTACTT	CTAAAAGGTT
651	TAGGTGCAAA	AGATATACCA	TTTGCAAACA	ATTTTGATGG	ACTAGCTACT
701	GTATACCAAA	ATACACCGGA	CTTCTTAGCA	CAACCTGGCG	ACATGGTGGT
751	ATTCGGTAGC	AACTACGGTG	CTGGATATGG	TCACGTTGCA	TGGGTAATTG
801	AAGCAACTTT	AGATTACATC	ATTGTATATG	AGCAGAATTG	GCTAGGCGGT
851	GGCTGGACTG	ACGGAATCGA	ACAACCCGGC	TGGGGTTGGG	AAAAAGTTAC
901	AAGACGACAA	CATGCTTTGA	TTTCCCTATG	TGGTTTATCC	GTCCGAATTT
951	TAAAAGTGAG	ACAGCGCCAC	GATCAGTTCA	ATCTCCTACA	CAAGCACCTA
1001	AAAAAGAAAC	AGCTAAGCCA	CAACCTAAAG	CAGTAGAACT	TAAAATCATC
1051	AAAGATGTGG	TTAAAGGTTA	TGACCTACCT	AAGCGTGGTA	GTAACCCTAA
1101	AGGTATAGTT	ATACACAACG	ACGCAGGAAG	CAAAGGGGCG	ACTGCTGAAG
1151	CATATCGTAA	CGGATTAGTA	AATGCACCTT	TATCAAGATT	AGAAGCGGGC
1201	ATTGCCGCAT	AGTTACGTAT	CAGGCAACAC	AGTTTGCCAA	GCCTTAGATG
1251	AATCACAAGT	AGGTTGGCAT	ACCGCTAATC	AAATAGGTAA	TAAAATATTA
1301	TTACGGTATT	GAAGTTGTCA	ATAATGGGCG	CAGATAACGC	GACATTTCTA
1351	AAAATGAAC	AGGCAACTTT	CCAAGAATGC	GCTAGATTGT	TGAAAAAATG
1401	GGGATTACCA	GCAAACAGAA	ATACAATCAG	ATTGCACAAT	GAATTTACTT
1451	CAACATCATG	CCCTCATAGA	AGTTCCGTTT	TACACTACTT	GGTTTTGACC
1501	CAGTAACTCG	CGGTCTATTG	CCAGAAGACA	AGCGGTTGCA	ACTTAAAGAC
1551	TACTTTATCA	AGCAGATTAG	GGCGTACATG	GATGGTAAAA	TACCGGTTGC
1601	CACTGTCTCT	AATGAGTCAA	GCGTTCAAG	TAATACAGTT	AAACCAGTTG
1651	CAAGTGCATG	GAAACGTAAT	AAATATGGTA	CTTACTACAT	GGAAGAAAAG
1701	TGCTAGGATT	CACAAACGGC	AATCAACCAA	TCCAGTAAGA	AAAGTGGGGC
1751	CATTCTTATC	TTGTCCAGTG	GGTTATCAGT	TCCAACCTGG	TGGATATTGT
1801	GATTATACAG	AAGTGATGTT	ACAAGATGGT	CATGTTTGGG	TAGGATATAC
1851	ATGGGAGGGG	CAACGTTATT	ACTTGCCTAT	TAGAACATGG	AATGGTTCTG
1901	CCCCACCTAA	TCAGATATTA	GGTGA CTTAT	GGGGAGAAAT	CAGTTAGAAT
1951	GACATAGTCA	TGTCTATTTA	AGCAGGTGCG	TTACATACCT	GCTTTCTATT
2001	TACATTTAAA	GATAAAATGT	GCTATTATTT	TACTAGA ACT	TTTTAACATT
2051	TCTCTCAAGA	TTTAAATGTA	GATAACAGGC	AGGTACTACG	G TACTTGCCT
2101	ATTTTTTATG	TTATAATGTA	ATTACATTAC	CAGTAACCAA	TCTGGCTTAA
2151	AACCCATTTT	CGGTAGCCAA	TCCGGCTATG	CAGAGGACTT	ACTTGCCTAA
2201	AGTAGTAAGA	AGCTGACTGC	ATATTTAAAC	CACCCATACT	AGTTGCTGGG

2251	TGGTTTTTAT	GTTATAATAT	AAATGTGAAA	TGGTCATTCT	TGAAATGACT
2301	CGGTTCGCATN	ACAAAAATAG	NAGCACANGA	CATGWATAAT	AAAGTGTNGC
2351	GGCCAACGAA	CAATGNAACN	TGTAGNAATT	NCGAWAATGN	ACGTTGGCTG
2401	ACGNANAAGA	ACAAGACNNA	NANACGCKMT	GTGTTNCCAT	GATACGGGAG
2451	TRGGTGTNTG	ATGTGNAGTG	NGTTTNNCNG	AAKTTANNGG	ATAACAGACN
2501	ATAGANCTGT	CNNGTAGGAT	NAGCNAANGN	GTTNAGSCGT	AAANNGARAT
2551	TCTNAAAGCA	GTATGTMGNT	AAGTAMKTNN	GANGTACCTT	GNCTNAGTAT
2601	ANACCGGTAT	CTTANACCGA	TANGANNCNG	AGTTATTTTT	ATACCASAGC
2651	AACCANACAA	AAACCACACC	ACCTATTAAT	TTAGGAGTGT	GGWTGTTTTT
2701	TGTTGRAAGT	GTGTATCAAG	GTATCTGGAT	GACCTCATTC	GCCANTTRAA
2751	ATTTGTTAAT	TTAATAATTN	AAATATAAAG	ACGATTTATT	AGTTTTTACG
2801	TTTTCTAGGT	AATACGAATG	CAWCGATGCT	ACTTAAAGCT	AGTAATGCCA
2851	TTAATGGTAA	TGTCATATCT	TTATTTGATT	CTTCACCAST	TTGTGGTAAAT
2901	GATTTTGCTT	TATTTTNCTW	GYGTATTTTT	ATTCGTTTTN	GCGCTTTSK
2951	TGTGTCCATC	ATTTTGTGTT	TTATAATNGN	TTTGCTTATT	TGWAATTGTG
3001	AGGCTACTAT	TCTTTTKFTC	TTCSNNNTNA	GNAACCTGTC	TNGTAAGNTT
3051	CAANNNAAC	ATCTTNTNAT	GTTGNTNTTT	CTGAGCTAAK	TTCNASTTCG
3101	NTNGGNTTCT	TGCAACMCTT	NNTTGAGTCG	CTNAKATACN	TMCCCTTCNT
3151	NCAGTTGGCT	AGTTGTAATA	CYTRATYCTR	CTTNNNNCNA	CMTTNTAAGT
3201	CCTGRYYTR	TANNGCNAGG	CTNNGTTTNT	KTCTTTAYTC	TGACNTNTTN
3251	NCACTASWTG	CGTCATTATT	CTTYTTCATA	CTNACGTCNT	KGTAATNTCG
3301	TKATCTNGN	TCATCNTNNT	CTTTSGCTTG	AGTACTTGWT	WCAAATTGAT
3351	RANCTATNAC	TTTTANCTCA	ACAGGTGATG	GTGTTGGTTT	GCTAGGCGTA
3401	GCTGGAGTAG	CTTCCTTCTT	AGCTGAGTTA	TCTTGTTGTT	CTTTTTTGTT
3451	AGATTTATCG	GTATTGGCTT	TTGTAAATGC	TTCTTTATCA	ACGATTCTGA
3501	CATGGTATTG	TCCATCGATA	ATCAATCGTT	TTTACGTGAA	CTTTAACGAT
3551	AGCATCATAT	AGAGTTTTAC	CTTCAACATA	TGGGAAAATA	ATTGTTCTAG
3601	TATTATTTTT	AGCATCTTTG	CTTATAGTTC	TAACACGTTG	ACCTTCAACC
3651	ATGAAATCTT	TCCAGTAATC	GTCATTAGTA	GTTTCCATGA	CCATATATTT
3701	TTTGCCGTTA	AGCATACTTG	TTTTAATAGG	GTGTTTAAAC	AAAGTATCCA
3751	TCATAGATTC	GTTATTCTCA	ACACTTTCAA	TAAACAACAT	ATTTTGTATC
3801	TTGTAAATCA	GTCATTTTTT	CATTTGTTGG	TTGNACATTT	TGGAATCCA
3851	GTAATAGCTG	ATTTCACTTG	CTCATCTAAA	GCTTTCCTTG	TATCCTCTAA
3901	TTTCTTCTTG	TACTCAGCCT	TTAATTTTTT	AGGAAGTTTA	TCTTGAATTT
3951	TATTTAATTC	ATAAACTTGT	CTTCTAGTGT	TTTTCGCTTT	TTTATATGGC
4001	GCTAATAATT	TTTCAGCTTT	ATAATCTTCT	TCAGTTTTGA	ATTTATCTGC
4051	ACTGTTATAA	ATTGGTTGTG	CGAATTCAT	TAATGTGTAA	TCNGTATTTT
4101	TCTTACTTTG	TTATTGAAGT	GAGTTGAACT	TACAATTTTA	ACGGCTTTTG
4151	TTCCATTTGA	AACAGAGAAG	CGAATGTAAG	CGTAATCTTT	AACAGTATCG
4201	TATGATACTA	ATTTAATTGG	CAACTTTTTG	TCACCTTCAT	AAACTTCAA
4251	TTTTCTCCAA	AATTGACCNN	ATTGAATCCT	NATTCAATTT	CGGTTTTTGA
4301	ATCAGTGAAA	ATAACTCTAG	CAGGTTTAAAC	AGAGCTGGCA	TAATGATAAA
4351	ATTGTTGCTC	GACCATTTTC	TTTTTTCATT	TCAAAATCAA	TTGGACGAGA
4401	GTTTGGTGCG	CTATGATCTT	TATCTTTTAT	TGCAGGGTTT	TTAATCAGCT
4451	TCTCTAAGTT	CCTGATTCAA	AATAGGATAT	GTATTGTTAG	TGGCTTTTGC
4501	TGCTGGTTTTA	ACTGCTTTTTG	TTTCCTTAGG	GGCTTNAACT	TCTTTAACTT
4551	CTTAGCTTCT	TTTGTTTCNA	GAAGTAGGGG	CCTCAACTTC	CTTTATTAGA
4601	TACTGAGACA	GCATTAGCTA	CTGGTTTAGT	TTCTGGAGCT	TTTTCAGATG
4651	TTGTTGTTGG	ACTTGCAACT	GCTTCAGTTT	TTGGTTGTGC	TTCTGTATTT
4701	GTACCACCTG	TTTCTTCAGC	TGCTGCTTGT	GCTTCGCCAT	TTGACATTAA
4751	TAATAAAAGT	GTAATAATCG	CTACAGATGC	AACGCCTAGT	GATGACTTTC
4801	TAATTGAATA	AAATGATTTA	AATTCTTTTT	GCTGTTTGTT	CATATTGTAG
4851	AAACAACCTC	TAATTGTATA	TTATCAACTG	ATAATCATT	TCAATTGATT

4901	ACTTGTATTG	TACATTGAAA	TGGTAGTTAA	TTGCAACATT	ATTTTATAAA
4951	AAAATAACCT	ATGTTATAGA	TTATGAAATA	TCTATGACAT	AGGTTAAATA
5001	AAATTTAAAA	TAAAAAATAT	ATTAAGTTAT	GAGTGTGACG	ATGATTCTAT
5051	TTAGATTCTT	TTCTTTTGAA	AAGTAATAAG	GATAATGAAC	CTAAAAGGGC
5101	AAGTGTTCG	AAGGCAACTG	TGCTAATAAA	GTTATCAACT	GAAGTTAAAC
5151	CAGTTTNTGG	TAATTCCTTA	GCTTTAGATG	CTTGT CNTAG	GCGTTTCAGT
5201	TATGTTTTGT	AACTTTGTTA	GTTTGTGTG	ATTTATTATC	ACTTACAGCT
5251	TGATTGTTGC	TTTCAGATTT	CGCTGTTGCA	ACATCTTTAA	CAGGTGTTTG
5301	AACTTTANTT	TGTTCTTGAG	CAGNNTGTGC	TGTTTTAACT	GTAGAGCAGT
5351	TTGGTTTTAG	TTGAANCAAA	GAATNGNCAN	NNAAACG	

VIII. 1. 2 Klon II

1	CGTTTTTNNNT	TCCNANNCTT	TGNNTCAGGC	CCTTCAACGA	AGGTAGCAAT
51	GGCTAAAGTA	ATTAANGCTT	TTAAACTTAA	ACCNGACTGT	CATTGTACAT
101	CGAAATATCT	CGAATAACCT	CATCTGAGCA	AGATCACCGT	CATATTAAG
151	TAAGAAAGAC	AAGGCATCAA	AGTATCAATA	CAGCAAAGAA	TACTTTAAAA
201	GGTATTGAAT	GTATTTACAC	TCTATATAAA	AAGAACCGCA	GGTCTCTTCA
251	GTATCTACGG	ATTTTCGCCA	TGCCACGAAA	TTAGCATCAT	GCTAGCAAGT
301	TAAGCGAACA	CTGACATGAT	AAATTAGTGG	TTAGCTTATT	TTTCTTTGCA
351	ACAGAACCAG	AATTAATATA	ACGAGATATC	AATTCCTGTT	GCTACATATA
401	CCGCAGCTGC	TGTAAGTATC	GTTGCGATCA	TTTTTCCATC	TCCAATATTT
451	TATATTTTAG	GGGTAGGACT	TTTCTTCAAA	TTGAAAAGCC	CCCCTTGAAT
501	TGCGCACAGC	GTGACCTTAC	TATTCTGTTT	TCTACCTATT	TATCCTTAC
551	TCTCATCAGT	CGTAAACTAT	TTAATGCTAC	CAAAATAGTA	GCTCCCATAT
601	CGGAAAGAAT	CGCTATCCAA	AGGGTTAACC	ATCCCGGGAT	AACTAATAGT
651	AAGGCAATTA	TTTTAATTCC	GATAGCAAAA	GTGATGTTAG	CTTTAATGAT
701	ATTTAAAGTT	TTTCGACTGA	GTCTTACTGC	AAATGGAAGC	TTACTTAAAT
751	CATCTCCCAT	TAATGCAATA	TCAGCTGTTT	CAATTGCAGT	ATCCGTTCCA
801	GCACCGCNCC	AGGAGGTTGC	TNANATTCCA	NGACNGAGGG	NNTWGAGTCG
851	CAGCNTACGN	NACCGTGCNT	GGANGCATCA	KTARSGCAAC	ANGGTS GGCT
901	GCCNAATCAG	TAGGCYGACA	GTTAGTSGAT	ASTCCGATTG	CNAKAGTTTT
951	TGTANATATA	ATCTAATTKA	TCCWGTGGCG	AYCAATTCAN	GACTGAATAY
1001	CANGAAACNG	CCTACCATGT	GTACCTGATT	GCATNTTGCA	GTACCTTGAT
1051	TATCGACCTG	KCAGCATANA	TTGTTTG CYA	TGATGACCTA	NACGNTGATG
1101	AAGGTTTTTG	AATYACATTT	TWACYTGKTT	CACNGAACCT	CATCATGCAG
1151	ACGGCAATTA	ACGCCNGAGA	AATTGTTTTT	TCCGTTGCCA	ATTAATCATG
1201	GCTGTTTTTC	MTTGGTTTTG	TAGGAWGTTT	GCASATTGTT	TTCAAACCCA
1251	AGGSGTAAAA	TCGGAAAGCA	TTTAATTCCT	TGAAAAGTTT	TGGGCTTCCA
1301	ATATAGTAAG	TAGTTCCGTT	TACAATCCCT	TTTATACCTC	GCCAGTAAT
1351	CGAAGTGAAT	TCTTCCACTT	GTACATTAGA	ATAAGGGATA	WTATCTTGCT
1401	CTGCCTTTTT	CAWTATTGCT	GAAGCAAGTG	GATGTTGTGG	AACGATATTC
1451	TAAAGCTGTA	AATGGATAGA	AGAATAGCTC	TTTTTCTTCC	ACTTGGTCAT
1501	TTAATACTTC	AAAATCTGTT	ACCACTNGGT	ACACCTTTTG	TCAGTGTTCC
1551	TGTTTTATCA	AATGCGATTG	CCTTAATGGC	TCCTAATTCT	TCTAGATAGA
1601	CACCGCCTTT	AATCAACACA	CCTTTTTTAG	CTGCATTTCC	AATTGCCGAG
1651	ACAATCGAGA	TTGGAGTAGA	AATAACTAAT	GCACACGGAC	ATCCA ACTAC
1701	AAGTACCGCT	AATCCTTGAT	AAACCCAAGT	ATCCCAACTT	CCACCAAAGA
1751	ATAAAGGTGG	AACGACTGCA	ACGAGCGCCG	CAATAACCAT	AATGATCGGC
1801	GTATAATATT	TCGCAAATTT	ATCTACGAAT	GCNTGCGCTG	GAGCGCGCTC
1851	CCCTTG TGCT	TCCTCAACCA	GATGAATAAT	CTTGGAGATA	GTTGTATCCT
1901	CTACGTATTT	GGTGATTTTT	ACTTCAAGTA	GTCCCTCTTC	GTTAAGCGTA

1951	CCTGCAAATA	CTTCATCATC	TACCGTTTTG	GCAACAGGGA	CAGATTCTCC
2001	TGTTATAGCA	GCCGGGTTNC	NGCAAACCCT	TTTNCNNTTA	TAGA

VIII. 1.3 Klon III

1	GNTNNTNTAC	GAATCTTTGG	ACCATGTTAT	TGAACAAATT	GATAACACCG
51	CATAATATGT	CAGCCTTACT	TAATTTAGCT	TTAAAAGGTT	TAAAAAGAAC
101	ATTAGAAAAT	AACGAGATTA	TCGAACCGAA	AATTGCTAGA	AAGACAAAAG
151	AGGAATATCA	ATTTGAGAAT	AATCCAGTTT	TGCAGTTCAT	AGAAGATGCG
201	ACAGACAAGG	ATTATAGACA	ATTGCCAGTA	GTAGAAGGGC	GTAATACTGA
251	TAAAGCATA	GAAATATATC	AAATATGGTG	TGTGAATAAC	GGTTATCATC
301	ATCTTAATAA	ATTGCMATTN	CTTTYTAAAG	NAATTTGGCG	AAANATTGGT
351	TNATATAAAC	CAGGTTACGC	GTATTATTTT	NAAGAGTAGN	NNAAGRAMCA
401	AAGTNAAAA	GATTTTATTA	AAAAAGGAAA	ACACCCATAA	ATATAYAYGA
451	TGGTTGATGG	TAGCATATTG	ANAAAAGCTC	ACAGANATAA	GKGTGAGTAA
501	ATTTATATAA	GTGTGGAGAT	TACAAACATT	AATATATCCA	TACTTCNAAA
551	GGTTTTCTCA	CACCTCACAN	CTTTATTTTA	ACTTTAAAAC	AGATAMATCG
601	TTATATAGRA	TTAYATACTT	GTTCAATWAC	KYAAKTATC	TCGTNGAGGT
651	GTCNGAGAAC	TNANGTWGTN	ANCACTTGMT	AGTTANAGCG	TTTNCAGNTC
701	ATTGCCNNGT	AATGTGTGAG	AANNARAGTW	MTATMCTAGC	AGNGGTTTTCT
751	GAAATGTANC	AATAGTATAG	AAGCGCAGAG	TTTAGTAWWT	WATATTATAA
801	AACAATGCTG	NCTACATCAT	TTGTAGAAAT	MGAAACCAGT	GCAGGATAKA
851	CNACGCNCCT	NTGAYTACTA	ACNNGNCAAG	GAGCATAACSC	CWGTNCAGTG
901	AATAGATAAY	ANYGTGTATN	TGGCACGGGT	NGGAGATAAA	CTTAGCATTT
951	NATTACAGTA	WGTGATCNAT	AGTGAAYGAT	GGATGCTGAT	AGAAATGAAT
1001	ANATGTGAAT	GTCAAGKAKT	TAWGAWARCY	GATGRTAANA	GTGGCTTATA
1051	TTTCCCTATT	KTAAAGTCAS	AYGATGNTAG	ACACNACTCA	TCAYTGGTTA
1101	TCCTGGTCAN	CKTTTACTAT	TAGNCTAASA	AAGMAAYGGA	GTGTGTTTTAA
1151	AGKGARTGAA	MWACWTAATA	WWWTMWTAG	ACTTTGGTAS	TAAACACTTC
1201	TTGATTCAAA	CYGTARCMGG	TTNAAAGATA	CCCTTACTTT	ATTNNGAAT
1251	ATCGAAAGGG	AGACGAAATA	AAGTATTTCC	CAATAGAACT	TGCTACGGTA
1301	GTAAAAGCAT	TAAACATTGA	TTTACATGAC	AGTGATACTG	TTTCAAATTA
1351	TGAGAATGGG	CCAAAATTTG	ATATTAATAA	ATTGAACCTC	TATACAGGTG
1401	ACATGGACCA	AATAGGAGAT	GAATAAAATG	AATATAGAAA	TTATCGCAAA
1451	TCAATTTGTA	ACAAGAGCAG	GCACGTTATT	AAGGTACTAC	ACTGGATTAT
1501	TAGAACATAG	AAAGTCAACC	GTATTGNTNN	NNNNNGANNA	NAAAC

VIII. 1.4 Klon V

1	GTTTATCTTN	CNTANTGNAA	ACTTGAACCTG	CCTAACTTAA	ACGAAGCGCA
51	ACGTAACGGC	TTCATTCAAA	GTCTTAAAGA	CGACCCAAGC	CAAAGCACTA
101	ATGTTTTTAGG	TGAAGCTAAA	AAATTAACCG	AATCTCAAGC	ACCGAAAGCT
151	GATAACAATT	TCAACAAAGA	ACAACAAAAT	GCTTTCTATG	AAATCTTGAA
201	TATGCCTAAC	TTAAACGAAG	AACANCGCAA	TGGTTTCATC	CAAAGCTTAA
251	AAGATGACCC	AAGCCAAAGT	GCTAACCTAT	TGTCAGAAGC	TAAAAAGTTA
301	AATGAATCTC	AAGCACCGAA	AGCGGATAAC	AAATTCAACA	AAGAACAACA

351	AAATGCTTTC	TATGAAATTT	TACATTTACC	TAActTAACT	GAAGAACAAC
401	GTAACGGCTT	CATCCAAAGC	CTTAAAGACG	ATCCTTCAGT	GAGCAAAGAA
451	ATTTTAGCAG	AAGCTAAAAA	GCTAAACNGA	TGCTCAAGCA	CCAAAAGAGG
501	AAGTCAACAA	AAAACCTGGT	AAAGAAGACG	GCAACAAAAA	ACCTGGTAAA
551	GAAGACGGCA	ACAAGCCTGG	TAAAGAAGAC	AACAAAAAAC	CTGGTAAAGA
601	AGACGGCAAC	AAGCCTGGTA	AAGAAGACAA	CAACAAACCT	GGCAAAGAAG
651	ACGGCAACAA	GCCTGGTAAA	GAAGACANCA	ACANGCCTGG	TAAAGAAGAC
701	GGNATCAAGC	CTGGTAAAGA	AGACGGCAAC	AAGCCTGGTA	AAGAAGACGG
751	CAGCGGAGTA	CATGTCGTTA	TACCTGGTGA	TACAGTAAAT	GACATTGCAA
801	AAGCAGACGG	CACTACTGCT	GACAAAATTG	CTGCAGATAA	CAAATTAGCT
851	GATAAAAACA	TGATCAGAAC	CTGGTCAAGA	ACTTGTGTGT	GATAAGAAGC
901	ACCCAGCAAA	CCATGCACCA	TGCTAACAAA	GCTCAAGCAT	TACCAGAAAC
951	TGGTGAAGAA	AATCCATTCA	TCGGTACAAC	TGTATTTGGT	GGATTATCAT
1001	TAGCCTTAGG	TGCAGCGTTA	TTAGCTGGAC	GTCGTCGAGA	ACTATAAAAA
1051	CAAACAATAC	ACAACGATAG	ATATCATTTT	ATCCAACCAA	TTTTAACTTA
1101	TATACGTTGA	TTAACACATT	CTTATTTGAA	ATGATAAGAA	TCATCTAAAT
1151	GCACGAGCAA	CATCTTTTGT	TGCTCAGTGC	ATTTTTTATT	TTACTTACTT
1201	TTCTAAACAA	CTTCTGAAAC	GCCTCAACAC	TTTCTACTCT	GATTACATAT
1251	ACNGACATTT	TTAGACATTA	AAAAATCGAA	CTAGACAAGA	TGCTCATTGC
1301	ATTTTCGTACT	AGTTTCGATT	ATGAATAATT	AGATTTAAAA	TGTCATTTGA
1351	ATCCAAGTGA	CAACATTATT	TATATTTAGA	ATATTAACGT	TAGTTAAACG
1401	TCCAACACAA	ATAAAGGCAA	CAAATATAAT	ACTGTATTTT	AACGTCATTT
1451	TTAATAATGC	AGATTCTTCA	CCAACTTTTT	TAACAGCTGC	AGTCGCAATG
1501	GCAATTGATT	GTGGTGAAT	AAGTTTCGCT	GCTACACCAC	CTGCAGTGTT
1551	AGCTGCCACA	AGTAATGAAC	CGCTTGTTGA	AATTTGTTGT	GCCACTGTCT
1601	CTTGAATAGG	TGCGAATAAA	GTATTGTTAT	TTACAACCTGA	ACCAGTCATA
1651	AACACACCAA	TCCAACCTAA	TACTGGAGAG	AATAATGGGA	AAATTGCTCC
1701	CGCTTTAGCA	ATACCTTGTC	CAATTGCTAC	AGTCAAACCA	CCGTATGTCA
1751	TAACTTTAGG	CAATAGCTAG	GGATAGCTTG	AAATTGTAAG	GATCGGTAAC
1801	CTAATTCTTT	AATTGCTTCG	ACCAATAAAG	CACCTGCACT	TTTCCATTTT
1851	AACTTCGTAA	TTAAAATTGT	AATAATTACT	GTTAATAAAA	TCGCTGTCCC
1901	AGTTGCACCA	ATTAAATCGA	GACGCAACGC	AATTCCTTTA	GGCGATAAAT
1951	CACTCACAGT	ATTTGGAATT	GGCAATTTTA	TTACTAAACT	TTCAAGTGCA
2001	CCTCCAGGTT	GGAATAAATT	TTTGAAGAAT	GGTGCCTCC	ATACTAATAC
2051	AAAGGCAGTT	AAAATTACGA	ACGGACTCCA	AGCAAAGACA	ATTTCTTTAG
2101	GCGTTCGTTT	TTGAATTTTA	TGTTTCAGACG	CTTCCAATCT	GAAAATGTTT
2151	CNTCGGTTTA	AATTTACGAC	AAACAAATGC	TAACACCACC	ATTGTTGCT
2201	AGTGATGGAA	TAATGTCTGC	TAGTTCCTGGA	CCATGGAATA	TTGTTAATAA
2251	TAATTCGTAA	TCCAGTATAT	GTACCACTCA	CTGTTAAAAT	GANTTNTAAA
2301	ATTTCTTTAA	TACCTTTCAT	ACCATCTACA	ATGAATACNA	AAACAAATGG
2351	AATAATAAAG	TTTAAAATTT	GGNAGTGTTA	ATGCTGNNGTA	TCTCNCAACA
2401	TCTAATGTTG	TAACGCCTCC	ACTTAAGTTA	AACGTATCAA	TAATACTAAC
2451	TGGTAAACCA	TTGACCAAAG	GCACCCGCCG	CACCATTAGC	AATTAACAT
2501	AACATCGCTG	CTTTTAATGG	TTCAAATCCA	AGTTGAATTA	ATAACTGTC
2551	ACAAATCGCA	ATTGGCACAC	CAAATNCCTG	CTGCACCTTC	TAAAAATGCG
2601	TTGAAACAAA	ATCCAATTAA	TAATAGTTGG	ATTCTTTGGT	CCTCTGAAAT
2651	ACTTGCAATA	CTATCTTGAA	TAATAGAAAA	TTGTCCTGTT	TTAATAGAAA
2701	CTTTATATAA	CCAAACTGCC	ATTA AAAACGA	TATATCCTAT	TGGGAAAATA
2751	CCGGCAACAA	CGCCTTCTGT	AATCGCACCT	GCTGATACAC	GCGCTGGTAA
2801	TTCAAATACA	AATAAAGCCA	CAATCAATGT	AACAACCAA	GTTGTCAATG
2851	CTGCATAAAT	GCCTTTCATT	TTAAAAACGG	TTAAGCATAA	TAAAAATAAA
2901	ATAATAGGTA	CTGCTGCAAC	TAAGGCTAGA	TAATCCAACA	TTATCGAATG
2951	GATTTACAGT	AAGTAGTGTC	ATAATGACTC	CCTCTCTTTA	TATAAATAT

3001	TTATCATTCT	GATTAATCTA	CAACCTATTT	CAACTTATAT	TTTGCCGATG
3051	ATCACATATT	TAAAATGTAA	CACTCCTATA	TGTGACAGGC	AATCGAATTT
3101	TTACAAAAAG	TTCACAAAAT	ATACACAATA	TTTAACTATA	ATAAATAATA
3151	TATCATTTTA	ATTATAAATA	CTAGCATATT	ATTTATAATA	ATAYCAGGAA
3201	TCCCGCTTCA	AAAAAATGCA	TCAATGACAG	TTTATATTTT	TATTGAGAAT
3251	CTCTCATTTT	GTGAATTGTA	GGAAAGTAAAA	CAAAATATGA	CAAGCGGTTA
3301	AACCCAATGA	TAATGATAAA	TATCATATTA	AACCATAGTA	AATTTAATTG
3351	ATGATGGTGT	TGTATTTGCC	AAATTTCTAA	TACTGTGAAG	ATAGACATAT
3401	AGCTCATAAT	CTCTAAATTT	AACGTACTTA	AAAATAATTT	AATCGCTCGA
3451	ATTTCACGTG	GTGTATGATT	ATAATGTGAC	CATTTGGCAA	ATCGTTCATA
3501	GTATCTACCT	GCAATGAAAA	ATATAAGCCA	AATCACTATA	AATGCGCTAT
3551	TTATCCAAAA	GCAGTACCCA	TTTATCAGCA	AAGTTATCAG	CATCCCCTGC
3601	TAAATTATAG	TGAATAGGTA	CTTTTGGTTG	GTAATTCTTG	AATAGGTCAC
3651	TACTGTATAG	CACATCATAA	GCCTAAGNTA	AATAAGNTAN	GACCTTAATA
3701	TTGGTAAAAAG	ACCCTGATTT	TANGACCNAT	TCTATCGCCT	CTTTCCTTAC
3751	ATTTTATGTA	TAACACTCTG	CCTATTTTAC	CTTTTAATTA	CATTACCCCA
3801	AACGATTAAG	CAATATGTAA	TGATACTATA	ATTGCGTCAG	GAGTATCCGC
3851	TTGTTAAATG	TGCATAGCTT	ATATTTAGCT	GTTTAACATG	CCACATAATG
3901	ATTCGAATTA	TTGTTTTAAT	TAAACCTTTT	TCACATATGT	ATAAATTTTA
3951	TAGAGCGCAT	GCTTAATAAT	TTTCATTTGA	TTCAAAGGCA	AAAGATAGCC
4001	TTATACTCTT	TTCTTTACTG	CCATAAATGT	AACCCGGATT	GATTAATATT
4051	TTTTCTTTAC	TTAACAATTC	GTAAAATAAA	TATTTAATAT	CTATATCTAT
4101	TTTAAAGACT	AACCATACAA	AATAACCTCC	ACTTGGAACC	TCCAATGTG
4151	CTATATCCTT	AAATAAATTA	TTGAGGATGT	TTAACATAAA	GTCTCGTTTA
4201	TCTTTTAAAA	CATACCTTAA	CTTTACTAAG	TGTTTATCAT	AAGACTTATT
4251	TTTCAACATC	TCATATACAA	CCATTTGTGA	CAAAATACTG	GATCCATAGT
4301	CAATTTGCAT	TCTTACATCT	GCCAATTGCT	CTATTATTTT	TTCAGAAGCA
4351	ACAATCCAAC	CTATTCTTAT	TGCTGGTGCA	ATCGTTTTGA	AAAACCTGTT
4401	ATATGATACT	TTTCCCAATT	TATCATAAGT	TTTGATAGCA	GGAGTTGGAT
4451	CGCTAAAGAA	AATATCTCTA	AAGATATCAT	CTTCAATGAT	AGGAATATTA
4501	TGTCTTTCGC	TATAAGTAAT	TATATTTTTC	TTTTGCTCAT	TCGTTAAAGA
4551	ACGACCTGTC	GGGTTATTAA	ACCTAGGTTT	TATATAAATC	GCTTTATTTT
4601	TAAAATTAAT	AAATCTATCA	ATGATGGTAT	TAATTTTCATT	AATTTGATTA
4651	TAAGGAACAT	CAATATGTCT	AAAATTC AAT	TGCTCAAAAA	CATTTGTAGA
4701	GGAATATATG	ATGGTGTATT	NCCAAATTAT	TATGGCATCT	NGACCTTAAA
4751	GTACCCAATA	GATAAAAGTT	GAATGGCATG	TAAAGCGCCT	GAAGTGATCA
4801	TTNCATTTTC	TCTACCNACA	TTTATAACCAT	GCTTTGACAT	TCGTTACATC
4851	AGATAATATC	TCTTNACTTG	ATATAACCAT	AGCCATTATT	ATAACCAAAA
4901	GATAAGTCTT	CTAATATGAC	TGGCTGTATT	AGACATGGCN	TTTTTCAATT
4951	GAATATGTGG	CATTGGCGAT	ATACCCAATT	CACCTTTNCT	TATATGTATA
5001	TNNNAATNAT	CTGTNGCANT	TTTATTAATT	AATTGCACCG	TATACTGACT
5051	TATTTGTTGA	GAGGACCATA	ACATCATTTT	AGACCACTTA	TTTGTAATAT
5101	GTGCTTCATT	CAAATAGTCA	TTAACATATG	TTCCACTCCC	CACTTTAGTA
5151	TAGATAAATC	CTTCAGCCTC	TAATAACTCA	ATACTTTTAA	TAATCGTCAC
5201	TCTATTTACG	TTGTATTGAT	CGCCAACCTGC	CTCTGGGAGG	TATCTCANTC
5251	CANNAAACCA	ANCCCCTGGN	TNTTTTNTANC	NNGCAC	

VIII. 2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
c	centi (hundertstel, 10^{-2})
°C	Grad Celsius
CDS	kodierende Sequenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
g	Gramm, Erdbeschleunigung
h	Stunde
H ₂ O _{bidest.}	bidestilliertes Wasser
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
HWI	Harnwegsinfekt
IgG, IgM	Immunglobulin G, M
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
Isd	iron-regulated surface determinant
i. v.	intravenös
k	kilo (tausend, 10^3)
kb	kilo-Basen
kD	kilo-Daltons
l	Liter
λ	Wellenlänge
LB	Luria Bertani Broth
m	Meter; milli (tausendstel, 10^{-3})
M	molar, mega (millionen, 10^6)
μ	mikro (millionstel, 10^{-6})

MIC	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MRSA	Methicillin-resistente <i>S. aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensible <i>S. aureus</i>
n	nano (milliardstel, 10^{-9})
NI	nosokomiale Infektionen
Nr.	Nummer/Nummern
n.v.	nicht vorhanden
OD, OD600	optische Dichte, OD bei der Wellenlänge $\lambda = 600 \text{ nm}$
ORF	open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Pathogenitätsinsel
PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
tRNA	transfer-RNA
WI	Wundinfektion

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. A. Thiede und Herrn Dr. med. U. Lorenz für die interessante Themenstellung und für die Begleitung während dieses Projektes bedanken. Für die Überlassung des Arbeitsplatzes in seinem Institut sowie für seine freundliche Führung bedanke ich mich ebenfalls rechts herzlich bei Herrn Professor Dr. Dr. h. c. mult. J. Hacker

Besonders möchte ich die hervorragende Betreuung, Unterstützung und unermüdliche Hilfsbereitschaft von Herrn Dr. Knut Ohlsen herausheben. Er stand mir sowohl während der praktischen Phase im Labor als auch in der nicht minder intensiven Zeit des Niederschreibens meiner Ergebnisse stets mit Rat und Tat zur Seite. Außerdem gilt auch meinen Laborkollegen, vor allem Wilma, Uli, Schwan und Ted Dank für anregende Diskussionen und die freundschaftliche Hilfe und Zusammenarbeit. Den vielen hilfsbereiten Kollegen des Instituts, die ich hier nicht angeführt habe, danke ich ebenfalls. Für die Korrekturlesung dieser Arbeit am Ende möchte ich mich bei meinem Kollegen Michael Krömer aus Frauenfeld bedanken.

Für die ununterbrochene Aufmunterung und Unterstützung während der schriftlichen Phase dieser Arbeit danke ich ebenfalls Nadia Derungs aus Lachen.

Besonderen Dank schulde ich nicht zuletzt auch meinen Eltern, ohne die mein Medizinstudium und diese Promotion nicht möglich gewesen wären.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ronny Langenhan
Anschrift	Thundorferstrasse 115, CH-8500 Frauenfeld
Geburtsdatum	27.9.1974
Geburtsort	Hildburghausen/ Thüringen
Konfession	evangelisch
Familienstand	ledig

Schul Ausbildung

09/1981-10/1989 Polytechnische Oberschule Ilmenau/ Thüringen
10/1989-08/1991 Realschule Osterburken/ Baden Würtemberg
09/1991-06/1994 Gymnasium Osterburken
06/1994 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1995-11/2001 Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg
09/1997 Ärztliche Vorprüfung
08/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2000-10/2001 Praktisches Jahr:
 1. Tertial: Chirurgie, Kantonales Spital Herisau, Schweiz
 2. Tertial: Innere Medizin, Universitätsspital Malta
 3. Tertial: Orthopädie, König-Ludwig-Haus, Universität Würzburg
11/2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Erfahrung

01/2002 – 09/2003 Assistenzarzt Chirurgische Klinik Spital Lachen/Schweiz (AiP-Zeit)

seit 10/2003 Assistenzarzt Klinik für Orthopädie und Traumatologie Kantonsspital

Frauenfeld/Schweiz

Frauenfeld, im Dezember 2004

