

Aus dem Institut für Infektionsmedizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Direktor: Prof. Dr. M. Aepfelbacher

**Untersuchung zur Methicillinresistenz bei sechs biofilm-negativen  
Tn917-Transposonmutanten des *S. epidermidis*-Stammes 1057**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
in dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Axel Sabottke

aus Hamburg

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 28.08.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: PD Dr. J. Knobloch  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. D. Mack  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J. Heeren

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.</b>	<b>Klassifikation der Staphylokokken .....</b>	<b>8</b>
2.1.1.	Koagulasepositive Staphylokokken .....	8
2.1.2.	Koagulasenegative Staphylokokken .....	9
<b>2.2.</b>	<b>Fremdkörperassoziierte Infektion durch <i>S. epidermidis</i> .....</b>	<b>10</b>
2.2.1.	Kolonialisierung von Fremdkörpern und Ausbildung von Biofilmen .....	10
	Unspezifische und spezifische Faktoren der primären Anbindung.	11
	Kolonialisierung von Polymerfremdkörpern – Phase II .....	12
<b>2.3.</b>	<b>Mukoidbildung .....</b>	<b>13</b>
<b>2.4.</b>	<b>Methicillinresistenz bei Staphylokokken .....</b>	<b>14</b>
2.4.1.	Aufbau des Mureins und Wirkweise von $\beta$ -Laktam-Antibiotika.....	14
2.4.2.	Grundlagen der Isoxazolyl - Penicillinresistenz. ....	15
2.4.3.	<i>mecA</i> - molekulargenetische Grundlage der PBP2'-Expression .....	16
2.4.4.	Regulation von <i>mecA</i> .....	17
2.4.5.	Expressionsvarianten der Methicillinresistenz.....	19
2.4.6.	Einfluss exogener Faktoren auf die Methicillinresistenz .....	20
2.4.7.	Spezifische Faktoren mit Einfluss auf die Methicillinresistenz.....	22
	$\beta$ -Laktamaseplasmid .....	22
	<i>chr</i> *-Mutationen.....	22
	<i>fem</i> -Faktoren .....	23
	<i>Flp</i> (fntAlike protein).....	25
	<i>llm</i> .....	26
	Autolyserate und <i>lytH</i> .....	26
	<i>agr</i> und <i>sar</i> .....	28
<b>3.</b>	<b>VORAUSSETZUNGEN DIESER ARBEIT .....</b>	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT: .....</b>	<b>32</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2.</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>33</b>
5.2.1.	Übersicht über die verwendeten Geräte .....	33
5.2.2.	Übersicht über verwendete Chemikalien .....	34
5.2.3.	Übersicht über verwendete Enzyme: .....	36
5.2.4.	Übersicht über verwendete Nährmedien und deren Bestandteile: ....	37

5.2.5.	Übersicht über verwendete Reagenzien .....	40
	Verwendete DNA- Sonden .....	42
5.2.6.	Für Transduktion verwendete Bakteriophagen: .....	43
5.2.7.	Bakterienstämme dieser Arbeit .....	43
5.2.8.	Lagerung der Stämme: .....	45
<b>5.3.</b>	<b>Methoden: .....</b>	<b>45</b>
5.3.1.	Resistenztestung mittels Agardiffusionstest .....	45
5.3.2.	Biofilmtestung:.....	45
5.3.3.	Mukoidtestung auf Purple Agar .....	46
5.3.4.	Mikrodilutionstest zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	47
5.3.5.	Koagglutinationstest zur Quantifizierung von PIA.....	48
	Extraktion von PIA .....	48
	<i>S. aureus</i> Cowan I-Präparation .....	48
	Herstellung eines Koagglutinationsreagenzes.....	49
	Koagglutinationstest.....	49
5.3.6.	Durchführung einer Transduktion mit Phage 71 .....	50
	Herstellung eines Phagenlysates .....	50
	Plaquetitration der erhaltenen Phagenlysate .....	51
	Transduktion auf den gewünschten Empfängerstamm .....	51
5.3.7.	Southern-Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden.....	52
	Präparation chromosomaler DNA.....	52
	Verdau der DNA mittels Restriktionsendonukleasen .....	53
	Elektrophoretische Auftrennung der verdauten DNA-Proben.....	54
	Southernblotting von DNA auf Nitrozellulosemembranen.....	54
	Southern-Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde.....	55
5.3.8.	Herstellung von spezifischen DNA-Sonden .....	56
5.3.9.	Pulsfeldgelelektrophorese .....	57
5.3.10.	Testung der Methicillinresistenz .....	58
	Populationsanalysen mittels oxacillinhaltigen Müller-Hinton- Agarplatten.....	58
	Testung auf Oxacillingradientenplatten .....	59
<b>6.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>60</b>
6.2.	Vorbemerkung .....	60
6.3.	Transduktion einer Klasse I Tn917-Insertion in verschiedene unabhängige <i>S. epidermidis</i> -Stämme .....	60
	Tabellen und Bildmaterial zu Kapitel 6.3 .....	62
6.4.	Charakterisierung des <i>S. epidermidis</i> -Stammes 1057wt.....	64
6.5.	Transduktion von sechs verschiedenen Tn917- Insertionslokalisationen in <i>S. epidermidis</i> 1057, 1457 und 8400	64
6.6.	Mukoidtestung der Klasse V und VI Transduktanten .....	66

<b>6.7.</b>	<b>PIA-Expression von <i>S. epidermidis</i> 1057 und korrespondierenden Transduktanten</b> .....	<b>66</b>
	Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 6.5 und 6.6 .....	68
<b>6.8.</b>	<b>Charakterisierung der M12–Transduktanten</b> .....	<b>76</b>
	Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 6.8 .....	77
<b>6.9.</b>	<b>Methicillinresistenz der verschiedenen <i>S. epidermidis</i> 1057 Transposonmutanten</b> .....	<b>78</b>
6.9.1.	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration .....	78
6.9.2.	Populationsanalysen von <i>S. epidermidis</i> 1057 und korrespondierenden Transduktanten auf MH-Agarplatten mit definierten, variierenden Oxacillinkonzentrationen.....	79
6.9.3.	Untersuchung von <i>S. epidermidis</i> 1057 und korrespondierenden Transduktanten auf Oxacillingradientenplatten .....	81
	Grafiken und Tabellen zu Kapitel 6.9.2 und 6.9.3 .....	82
	Klasse III Mutante 1057M15 .....	85
	Klasse IV Mutante 1057M17 .....	86
	Klasse V Transduktante 1057M16.....	87
	Klasse VI Transduktante 1057M20 .....	88
	Klasse II Mutante 1057M12 .....	89
<b>7.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>90</b>
<b>7.2.</b>	<b>Ergebnisse der MHK-Testung</b> .....	<b>91</b>
<b>7.3.</b>	<b><i>IcaADBC</i> und <i>mecA</i>: Existenz gemeinsamer regulativer Faktoren</b> .....	<b>91</b>
<b>7.4.</b>	<b>Klasse I Transduktanten 1057M10 und M13: Insertion in <i>icaA</i></b> <b>92</b>	
<b>7.5.</b>	<b>Klasse II Mutante M12: Tn917-Insertion in <i>purR</i>-Gene</b> .....	<b>95</b>
	<i>purR</i> und <i>yabj</i> .....	95
7.5.2.	Diskussion der verschiedenen Phasenvarianten von 1057M12 .....	97
7.5.3.	Diskussion der Reduktion der Methicillinresistenz bei 1057M12....	98
<b>7.6.</b>	<b>Klasse III Transduktante 1057M15: Tn917-Insertion in Gen <i>rsbU</i></b> .....	<b>100</b>
7.6.1.	Der alternative Sigmafaktor $\sigma^B$ .....	101
7.6.2.	Struktur des $\sigma^B$ -Operons bei <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> und <i>S. epidermidis</i> .....	102
7.6.3.	Regulationsmechanismen des $\sigma^B$ -Operons .....	103
7.6.4.	Tn917-Insertion in <i>rsbU</i> führt zu einer Reduktion der Methicillinresistenz .....	105
7.6.5.	Tn917-Insertion in <i>rsbU</i> führt zu einem biofilmmnegativen Phänotyp .....	106
<b>7.7.</b>	<b>Klasse IV Transduktante 1057M17: Expression einer homogenen Methicillinresistenz durch Tn917-Insertion</b> .....	<b>107</b>

7.8.	<b>Klasse IV und V Transduktanten: 1057M16 und M20 Insertion in <i>glcA</i> und <i>glcT</i>.....</b>	<b>110</b>
8.	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>111</b>
9.	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>112</b>
10.	<b>DANKSAGUNGEN/WIDMUNGEN .....</b>	<b>134</b>
11.	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>135</b>
12.	<b>EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>136</b>

## 1. Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 1:** Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
<i>AAP</i>	Englisch: Accumulation associated Protein
<i>Agr</i>	Englisch: Accessory gene regulator
<i>Aux</i>	Englisch: Auxiliary factors
<i>Mrp</i>	multiple repeat polypeptide
B.	Bacillus
BBL	Fa. Beckton Dickinson, Cockeysville, Ma./USA
C	Celsius
<i>Ccr</i>	cassette chromosome recombinase
CFU	Englisch : Colony forming units = Kolonie bildende Einheiten
CFU/ml	Englisch: Colony forming units /milliliter
def.	definiert(en)
Dest.	destilliert
dH <sub>2</sub> O	destilliertes H <sub>2</sub> O
DIN	Deutsches Institut für Normen
DNA	Desoxyribonukleinsäure(englisch: desoxyribonucleic acid)
ELISA	Englisch: Enzyme-linked immunosorbent assay
Fbe	Fibrinogen bindendes Protein (Englisch: fibrinogen binding enzyme)
<i>Fem</i>	factors essential for methicillin resistance
Ica	interzelluläre Adhäsion (englisch: intercellular adhesion)
IS256	Insertionselement 256
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
MHK	minimale Hemmkonzentration
min.	Minute(n)
ml.	Milliliter
MRSA	methicillinresistenter <i>S. aureus</i> -Stamm

MRSE	methicillinresistenter <i>S. epidermidis</i> -Stamm
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
Nm	Nanometer
OD <sub>578</sub>	optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 578 nm
Orf	Englisch: Open reading frame
Oxoid	Fa. Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, England
PBP	Penicillin bindendes Protein (Englisch = penicillin-binding protein)
PBP2'	PBP2a: Das durch <i>mecA</i> kodierte Penicillin bindende Protein
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)
PFU/ml	Englisch: Plaque forming unit per milliliter
PIA	interzelluläres Polysaccharid-Adhäsion (Englisch: polysaccharide intercellular adhesin)
PRPP	5-Ribosyl-1-pyrophosphat
PS/A	kapsuläres Polysaccharid/Adhäsion (Englisch: Capsular polysaccharide adhesin)
RNA	Ribonukleinsäure (Englisch: Ribonucleic acid)
Rpm	Rounds per minute
<i>Rsb</i>	Englisch: Regulation of sigma
S.	Staphylococcus
<i>Sar</i>	staphylococcal accessory regulator
Sec	Sekunde(n)
<i>sig<sup>B</sup> oder <math>\sigma^B</math></i>	Sigma <sup>B</sup> -Faktor
<i>SCCmec</i>	staphylococcal cassette chromosome <i>mec</i>
TN917	Transposon 917
TSB	Tryptone Soja Brühe (Englisch: tryptic soy Brühe)
TSB <sub>BBL</sub>	Tryptone Soja Brühe, Hersteller: Fa. Beckton Dickinson, Cockeysville, Ma./USA
TSB <sub>Oxoid</sub>	Tryptone Soja Brühe, Hersteller: Fa. Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, England
U	enzymatische Einheiten (Englisch: Units)
upm	Umdrehungen pro Minute
Wt	Wildtypstamm

## 2. Einleitung

### 2.1. Klassifikation der Staphylokokken

Die Gattung *Staphylococcus* ist taxonomisch zusammen mit den Gattungen *Micrococcus*, *Stomatococcus* und *Planococcus* der Familie der Micrococcaceae zugehörig. Staphylokokken sind 0,5-1,5 µm durchmessende, kugelige bis ovale Gebilde, die sich in Haufen bzw. Trauben anordnen. Sie sind grampositiv, unbeweglich, bilden keine Sporen und sind mit Ausnahme von *S. saccharolyticus* und *S. aureus* subsp. *anaerobius* katalasepositiv und fakultativ anaerob (Kloos 1986; Schleifer 1986; Kloos 1997).

Staphylokokken werden hauptsächlich von Säugetieren isoliert. Dort bewohnen sie normalerweise Haut und Schleimhäute in Konzentrationen von bis zu  $10^4$ - $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>. Einige Spezies besiedeln vorzugsweise charakteristische ökologische Nischen. Zur Zeit werden 39 Staphylokokkenspezies unterschieden, von denen etwa die Hälfte beim Menschen vorkommt. Die Klassifizierung der einzelnen Staphylokokkenspezies erfolgt dabei anhand von Koloniemorphologie, Resistenzmustern, unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten beruhend auf der Fähigkeit zur Bildung spezifischer Enzyme sowie quantitativen und qualitativen Unterschieden der einzelnen Bestandteile der Zellwand (Noble et al. 1978; Kloos 1986; Pfaller 1988; Rupp et al. 1994; Euzeby 1997; Kloos 1997; Drancourt et al. 2002). Eine grobe Einteilung der verschiedenen Staphylokokkenspezies wird anhand der Fähigkeit zur Bildung von Koagulase vorgenommen. Dieses Enzym besitzt Thrombinfunktion und katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin (Sperber et al. 1975).

#### 2.1.1. Koagulasepositive Staphylokokken

In die Gruppe der koagulasepositiven Staphylokokken gehören die Spezies *S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. lutrae* und *S. intermedius*. Die größte humanpathogene und damit klinische Bedeutung kommt der Spezies *S. aureus* zu. Ferner lässt sich *S. schleiferi* subsp. *coagulans* vom Menschen isolieren. Es existieren sogenannte Standortvarietäten der Spezies *S. aureus*, die auch an Tiere adaptiert sind und dort eine spezifische Virulenz entwickelt haben. Alle anderen erwähnten koagulasepositiven Staphylokokkenspezies haben normalerweise nur im Tierreich Bedeutung. Er-

gänzend sei erwähnt, dass die koagulasepositive Spezies *S. intermedius* sowie *S. hyicus* auch bei Menschen, die engen Kontakt mit Tieren haben, aus menschlichem Untersuchungsmaterial isoliert werden können (Kloos et al. 1994).

### 2.1.2. Koagulasenegative Staphylokokken

Bei den koagulasenegativen Staphylokokken unterscheidet man Novobiocin sensible und resistente Spezies. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der bis jetzt beschriebenen koagulasenegativen Staphylokokken (Kloos et al. 1994; Euzeby 1997).

**Tabelle 2:** Auflistung koagulasenegativer Staphylokokken (Kloos et al. 1994)

Novobiocin sensibel		Novobiocin resistent	
Vorkommen		Vorkommen	
Mensch/ Primat	Tier/ Lebensmittel	Mensch/ Primat	Tier/ Lebensmittel
<i>S. capitis</i> <i>S. c. subsp. capitis</i> <i>S. c. subsp. urealyticus</i>	<i>S. carnosus</i> <i>S. c. subsp. carnosus</i> <i>S. c. subsp. utilis</i>	<i>S. saprophyticus</i> <i>S. s. subsp. saprophyticus</i> <i>S. s. subsp. bonis</i>	<i>S. equorum</i> <i>S. e. subsp. equorum</i> <i>S. e. subsp. linens</i>
<i>S. hominis</i> <i>S. h. subsp. hominis</i>	<i>S. succinus</i> <i>S. s. subsp. casei</i> <i>S. s. subsp. succinus</i>	<i>S. cobnii</i> <i>S. c. subsp. cobnii</i> <i>S. c. subsp. urealyticus</i>	<i>S. sciuri</i> <i>S. s. subsp. carnatus</i> <i>S. s. subsp. rodentium</i> <i>S. s. subsp. sciuri</i>
<i>S. schleiferi</i> <i>S. s. subsp. schleiferi</i>	<i>S. felis</i>	<i>S. hominis</i> <i>S. s. subsp. novobiosepticus</i>	
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. xylosus</i>	<i>S. lentus</i>
<i>S. auricularis</i>	<i>S. piscifermentans</i>	<i>S. vitulinus</i>	<i>S. gallinarum</i>
<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. muscae</i>	<i>S. pulvereri</i>	<i>S. arlettae</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. condimentii</i>		<i>S. kloosii</i>
<i>S. caprae</i>	<i>S. caseolyticus</i>		<i>S. vitulus</i>
<i>S. simulans</i>			<i>S. fleurettii</i>
<i>S. saccharolyticus</i>			<i>S. nepalensis</i>
<i>S. pasteurii</i>			
<i>S. pettenkoferi</i>			
<i>S. warneri</i>			

Koagulasenegative Staphylokokken gehören zur normalen Haut und Schleimhautflora des Menschen. Dabei hat vor allem *S. epidermidis* die Körperoberfläche des Menschen praktisch ubiquitär in hohen Populationsdichten besiedelt. Andere beim Menschen vorkommende koagulasenegative Staphylokokkenspezies bilden entweder nur kleinere, transiente, aber ubiquitär vorkommende Populationen aus (z. B. *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. caprae*) oder kommen gehäuft in sehr lokalisierten, speziellen Körperarealen vor (z. B. *S. hominis* und *S. haemolyticus* im Bereich der Achsel-, Inguinal- und Perianalregion, *S. auricularis* im Bereich des äußeren Gehörganges, *S. saprophyticus* mit der Fähigkeit zur Anbindung an Urothelzellen und der möglichen Isolierung aus dem Urogenitaltrakt (Kloos 1986; Kloos 1997).

## **2.2. Fremdkörperassoziierte Infektion durch *S. epidermidis***

### **2.2.1. Kolonialisierung von Fremdkörpern und Ausbildung von Biofilmen**

Koagulasenegative Staphylokokken galten lange Zeit als Erreger mit nur geringem pathogenen Potential. Aufgrund des fast ubiquitären Vorkommens wurden viele Isolate als zufällige Kontaminanten und nicht als relevante Infektionskeime interpretiert. Für Menschen mit normaler Immunkompetenz und fehlenden zusätzlichen Risikofaktoren hat diese Einschätzung der koagulasenegativen Staphylokokken auch heute noch ihre Gültigkeit.

Koagulasenegative Staphylokokken entfalten ihr pathogenes Potential vor allem bei Patienten mit kompromittiertem Immunsystem oder implantierten medizinischen Fremdkörpern (z.B. Dialyseshunts, Venenkathetern, künstlichen Herzklappen, künstlichen Gelenken, Sonden von Herzschrittmachern u.s.w.). *S. epidermidis* ist dabei die mit Abstand am häufigsten isolierte koagulasenegative Staphylokokkenspezies. Weitaus seltener sind auch *S. lugdunensis*, *S. warneri* und *S. haemolyticus* als Verursacher fremdkörperassoziiierter Infektionen isoliert worden (Emori et al. 1993; Kloos et al. 1994; Rupp et al. 1994; Boyce 1997).

Die Kolonialisierung von Polymerkörpern läuft im wesentlichen in zwei Schritten ab. Zunächst erfolgt innerhalb kurzer Zeit die primäre Bindung von vereinzelten Zellen an die Polymeroberfläche. In dieser Phase bilden die Zellen einen einlagigen Zellfilm aus. Die zweite Phase ist durch die Entstehung von mehrlagigen Zellaggregaten mit Produktion von Biofilm gekennzeichnet (Peters et al. 1981; Franson et al. 1984).

## Unspezifische und spezifische Faktoren der primären Anbindung

Die primäre Anheftung an Polymeroberflächen ist ein sehr komplexer Vorgang, der von vielen Faktoren seitens der Polymeroberfläche und der bakteriellen Zelloberfläche abhängt. Unspezifische Oberflächeneigenschaften, wie z. B. Hydrophobizität, Polarität und Oberflächenflächenbeschaffenheit seitens des Polymerfremdkörpers und der Zelloberfläche, sind für eine primäre Anbindung wichtig. Auch Van-der-Waals-Kräfte haben in dieser Phase eine wichtige Funktion (Ludwicka et al. 1984; Fleer et al. 1989). Die Adhäsion ist signifikant erniedrigt, wenn die Polymerfläche von Plasma, Serum oder Albumin bedeckt ist (Pascual et al. 1986; Espersen et al. 1990). Allerdings erhöht die Anwesenheit von Matrixproteinen, wie Fibronectin und Fibrinogen, bei mit Albumin bedeckten Oberflächen die Anbindung. (Vaudaux et al. 1989) (Rupp et al. 1999).

Aber auch spezifische Oberflächenproteine der Bakterien sind für die primäre Anbindung von Bedeutung. Nilsson et al. beschrieben erstmals ein fibrinogenbindendes Protein (*Fbe*) bei *S. epidermidis*. *Fbe* weist Homologien zu dem bei *S. aureus* bekannten clumping factor auf (Nilsson et al. 1998).

Tojo et al. beschrieben 1988 ein Kapselpolysaccharid/Adhäsion (PS/A), welches zwar die primäre Anheftung an Silastic-Katheter vermittelte, jedoch auf die Anbindung an Polyethylenoberflächen keinen Einfluss hatte (Tojo et al. 1988; Muller et al. 1993a; Higashi et al. 1998). In Tierinfektions-Modellen zeigten PS/A-negative isogene Transposonmutanten eine niedrigere Pathogenität, und spezifische Antikörper gegen PS/A erwiesen sich als schützend vor Endokarditiden mit *S. epidermidis* (Tojo et al. 1988; Kojima et al. 1990; Takeda et al. 1991; Shiro et al. 1994). Die Expression dieses Polysaccharids schien aber nicht an die Bildung von Biofilm gekoppelt zu sein. Nahezu die Hälfte aller PS/A-positiven Zellen war biofilmbnegativ (Muller et al. 1993b). *PS/A* zeigt viele Gemeinsamkeiten mit dem im folgenden Text vorgestellten *PLA* (Polysaccharide intercellular antigen). So handelt es sich ebenfalls um ein Polysaccharid mit  $\beta$ -1,6- verknüpften Glucosamineinheiten, welches mit Succinat und Acetat substituiert ist. Die genetische Information von *PS/A* ist, genau wie *PLA*, im *icaADBC*-Gencluster kodiert. *PS/A* exprimierende Stämme binden *PLA* spezifisches Antiserum. Dies alles lässt vermuten, dass *PS/A* und *PLA* nahe verwandt oder

eventuell sogar identisch sind (Muller et al. 1993a; Muller et al. 1993b; McKenney et al. 1998; Mack et al. 2000a).

Als weitere Zellwandproteine, die Einfluss auf die primäre Adhäsion haben, wurden *SypI* und *SypII* sowie das Autolysin *AtlE* bei *S. epidermidis* beschrieben. Spezifische Antikörper führten zu einer signifikanten Störung der primären Adhäsion des Bakteriums an Polysterolkugeln (Timmerman et al. 1991b; Timmerman et al. 1991a; Heilmann et al. 1996b; Heilmann et al. 1996a; Veenstra et al. 1996).

## Kolonialisierung von Polymerfremdkörpern – Phase II

Die zweite Phase der Kolonialisierung ist durch die Ausbildung von mehrlagigen Zellclustern und Produktion von Biofilm gekennzeichnet. Mack et al. beschrieben erstmals einen Faktor, dessen Produktion mit der Expression von Biofilmen assoziiert zu sein schien. Mittels eines Antiserums, welches spezifisch mit biofilmbildenden *S. epidermidis* Stämmen reagierte, konnte das interzelluläre Polysaccharid Antigen (*PLA*) identifiziert werden (Mack et al. 1992).

*PLA* ist ein Polysaccharid, bestehend aus zwei linearen Homoglykanen. Das Polysaccharid 1 besteht aus ca. 130  $\beta$ -(1,6)-gebundenen 2-Desoxy-2-Amino-D-Glucopyranosylresten, die zu 80% n-acetyliert sind. Polysaccharid 2 besitzt eine ausgeprägte Strukturähnlichkeit mit Polysaccharid 1, beinhaltet jedoch einen geringeren Anteil an nicht n-acetylierten Glucosaminresten und enthält Phosphat und Succinat, welche für das leicht anionische Verhalten verantwortlich sind (Mack et al. 1996a; Mack et al. 1996b). Eine Quantifizierung des gebildeten *PLA* war durch eine Bindung der spezifischen Antikörper an den *S. aureus*-Stamm Cowan I im Rahmen eines Koagglutinationsassays möglich. Durch Zusatz von Glucose in das Wachstumsmedium ließ sich die Biofilmbildung und die Produktion von *PLA* induzieren (Mack et al. 1992; Mack et al. 1994). Es zeigte sich, dass *PLA* zusätzlich essentiell für die bei *S. epidermidis* bekannte Hämagglutination von Erythrocyten ist. Bei den bisher erzielten Studienergebnissen ist davon auszugehen, dass es sich bei dem beschriebenen Hämagglutinin um *PLA* handelt (Rupp et al. 1992; Rupp et al. 1995; Fey et al. 1999; Mack et al. 1999; Rupp et al. 1999). Die Enzyme für die Synthese von *PLA* sind im *icaADBC*-Operon kodiert (*ica*=intercellular adhesion). Das Operon hat eine Größe von 3,4 kb und umfasst die vier Gene A, D, B, C, die alle in gleicher Transkriptionsrichtung organisiert sind. Mutationen in diesem Bereich führen zu einem Phänotyp mit deutlichen Störungen der Ak-

kumulationsphase. *IcaA* kodiert für ein transmembranöses Protein mit Homologien zu N-Acetyl-Glucosamintransferasen (412 Aminosäuren), *icaC* für ein hydrophobes Membranprotein (355 Aminosäuren), *icaB* für ein Sekretionsprotein (289 Aminosäuren), *IcaD* überlappt *icaA* und *icaB* und ist in der Operonstruktur in der Reihenfolge *icaADBC* organisiert. Nur wenn *icaA*, *icaD* und *icaC* zusammen exprimiert werden, sind die synthetisierten Oligomere mit dem *PLA*-Antiserum reaktiv. *IcaD* ist genau wie *IcaA* in der zytoplasmatischen Membran lokalisiert (Heilmann et al. 1996b; Heilmann et al. 1996a; Heilmann et al. 1998). Kürzlich wurde bei *S. epidermidis* und *S. aureus* der Genlokus *icaR* beschrieben, der für einen negativen Regulator von *icaA* kodiert (Conlon et al. 2002a; Conlon et al. 2002b; Jefferson et al. 2003; Jefferson et al. 2004; Knobloch et al. 2004).

Als ein weiterer Faktor für die akkumulative Phase wurde das Protein *AAP* (accumulation associated Protein) beschrieben. Schumacher-Perdreau *et al.* konnten bei der durch Mitomycin induzierten Mutagenese von *S. epidermidis* RP62A die Mutante M7 isolieren. Diese synthetisierte das Protein *AAP* nicht mehr, welches zu einer Unfähigkeit der Mutante zur Akkumulation, bei gleichzeitig erhaltener primärer Anbindung, führte (Schumacher-Perdreau et al. 1994). Ein spezifisches Antiserum gegen das Protein konnte die Akkumulationsphase von RP62A inhibieren. Die Bildung von *AAP* scheint nicht mit Biofilmbildung assoziiert zu sein. Bei *S. epidermidis*-Wildtypstämmen konnten Hussain et al. Subpopulationen nachweisen, die biofilmpositiv waren, aber kein *AAP* exprimierten. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die *AAP* – negative Mutante M7 keine Einschränkung ihrer Virulenz in einem Endokarditismodell zeigte (Hussain et al. 1997; Pedreau-Remington et al. 1998).

### **2.3. Mukoidbildung**

*S. epidermidis* bildet bei Wachstum auf mit N-Acetyl-D-Glucosamin substituierten Purple-Agarnährmedien eine schleimige Substanz aus. Dieses Phänomen wurde als Mukoidbildung bezeichnet. Mukoidbildung korreliert mit der Biofilmproduktion und geht mit einer ausgeprägten *PLA*-Produktion einher. Untersuchungen mit Transposonmutanten des mukoid-positiven *S. epidermidis*-Stammes 1457 zeigten, dass eine nicht beeinträchtigte Transkription und Expression des *icaADBC*-Genclusters für die Produktion von Mukoid essentiell ist. Ferner ist die Zusammensetzung des Nährmediums von Bedeutung. So konnte mit peptonhaltigen Medien, die mit den Aminoazuckern Glucosamin oder N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) substituiert wurden, ein Mu-

koid positiver Phänotyp induziert werden (Krokotsch 1998; Kiel 2002; Knobloch et al. 2003).

## **2.4. Methicillinresistenz bei Staphylokokken**

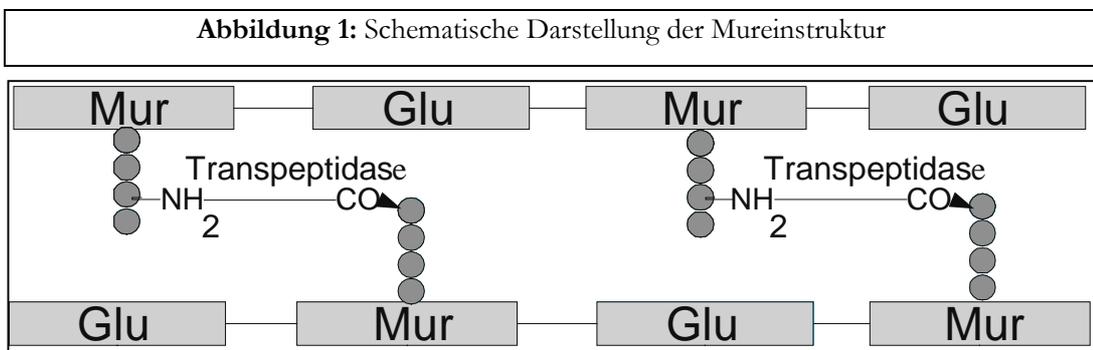
### **2.4.1. Aufbau des Mureins und Wirkweise von $\beta$ -Laktam-Antibiotika**

Die Zellwand von Bakterien hat die Aufgabe, die Zelle vor Noxen zu schützen, die osmotische Differenz zwischen dem Zellinneren und dem Umgebungsmedium abzufangen, der Zelle die äußere Form zu geben und die Kommunikation der Zelle mit der Außenwelt zu gewährleisten. Das Grundgerüst der bakteriellen Zellwand wird aus Murein (Peptidoglycan) gebildet. Dieses besteht aus Aminozuckerketten, sog. Glycanen und aus Oligopeptiden, welche die Glycanstränge miteinander verbinden. Die Glycanketten sind abwechselnd aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure zusammengesetzt. Diese neben- und übereinanderliegenden Ketten werden durch Tetrapeptide quervernetzt. Katalysiert werden diese Verknüpfungen der Glycanketten durch Transpeptidasen. Diese katalysieren die Peptidbindung zwischen der freien  $\text{NH}_2$ -Gruppe einer basischen Aminosäure und der freien Carboxylgruppe einer endständigen Aminosäure einer benachbarten Kette. Das so aufgebaute Murein umhüllt als ein netzartiges Gebilde die gesamte Zelle (Murein-Sacculum) und ist bei grampositiven Bakterien bis zu 80 nm dick, bei gramnegativen Bakterien hingegen nur 2 nm. Der Aufbau des Mureins ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

Die Transpeptidasen besitzen eine hohe Affinität für  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und sind daher als Penicillin bindende Proteine (*PBP*'s) klassifiziert worden. Insgesamt wurden bis jetzt 4 *PBP*s mit einer Größe von 85 kDa (*PBP1*), 81 kDa (*PBP2*), 75 kDa (*PBP3*) und 45 kDa (*PBP4*) bei Staphylokokken beschrieben. *PBP* haben sich aus Serin-Proteinasen entwickelt und ähneln ihnen biochemisch stark (Georgopapadakou et al. 1980a; Waxman et al. 1983; Reynolds 1988; Ghuysen 1994; Ghuysen et al. 1994).

Zur Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gehören Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame. Namensgebend ist der für diese Antibiotikagruppe charakteristische  $\beta$ -Laktamring. Ihre Wirkweise beruht auf der Beeinflussung der Mureinsynthese durch Hemmung der D-Alanin-Transpeptidase. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit D-Alanyl-D-Alanin binden die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika unter Ringöffnung kovalent an die Aminosäure Serin im aktiven Zentrum der D-Alanin-Transpeptidase

und blockieren diese irreversibel (Georgopapadakou et al. 1986). Folge sind fehlende Verknüpfungen der Glycanketten. Es bilden sich L-Formen des Bakteriums (L = benannt nach dem Lister-Institut), die Mureindefekte aufweisen. L-Formen sind gegenüber osmotischen Einflüssen äußerst instabil und nur in bestimmten hypertonen Medien noch überlebensfähig. Diese bakterizide Wirkung entfalten die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika jedoch nur bei proliferierenden Keimen, da nur bei ihnen die Mureinsynthese stattfindet. Die *PBP*'s 1, 2, und 3 haben eine hohe Affinität für die meisten  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und sind für das Zellwachstum essentiell (Corinne 1989; Chambers et al. 1994; Lüllmann et al. 1994; Chambers 1997) (Kayser et al. 1993; Berger - Bächli 1996).



Schematische Darstellung der Mureinstruktur und dem Ansatzpunkt der Transpeptidase. Glu: N-Acetylglucosamin; Mur: N-Acetylmuraminsäure; ● : Aminosäuren (Kayser et al. 1993)

#### 2.4.2. Grundlagen der Isoxazolyl - Penicillinresistenz.

Die häufigste Ursache für die Entwicklung von Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika ist die Bildung von  $\beta$ -Laktamasen (Penicillinasen). Ca. 50 Jahre nach dem ersten klinischen Gebrauch von Penicillin in der Klinik sind ca. 80% aller *S. aureus*-Stämme in der Lage, Penicillinasen zu produzieren. Diese Enzyme hydrolysieren den  $\beta$ -Laktamring, öffnen ihn damit und verhindern so eine Anbindung an die Penicillin bindenden Proteine. Die Entwicklung der penicillinasefesten Isoxazolyl-Antibiotika (z.B. Oxacillin, Methicillin, Flucloxacillin) war ein entscheidender Fortschritt, da sich so eine Möglichkeit bot, auch  $\beta$ -laktamasepositive Keime zu behandeln. Praktisch unmittelbar nach Ersteinsatz von Methicillin im Jahre 1960 traten jedoch prompt die ersten Berichte über Methicillinresistenzen bei *S. aureus* auf (Barber 1961; Jevons 1961; Rolinson 1961; Seligman 1966a; Seligman 1966b; Lüllmann et al. 1994). Seitdem haben sich methicillinresistente *S. aureus*-(MRSA) und *S. epidermidis*-Stämme (MRSE) weltweit aus-

gebreitet und lassen sich auch außerhalb von Krankenhäusern besonders in Einrichtungen zur Versorgung chronisch Kranker und bei Konsumenten parenteral verabreichter Drogen nachweisen. (Klimek et al. 1976; Crossley et al. 1979; Cox et al. 1995; Doebbeling 1995).

Die Ursache der neuen Isoxazolyl-Antibiotikaresistenz beruhte auf einem zusätzlichen *PBP*, welches 1980 erstmals bei MRSA-Stämmen entdeckt wurde: Dieses wurde als *PBP2'* (oder auch *PBP2a*) bezeichnet (Georgopapadakou et al. 1980a; Georgopapadakou et al. 1980b; Georgopapadakou et al. 1982). Das zusätzliche PBP besaß eine Größe von 76 kDa und besaß eine außerordentlich niedrige Affinität gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Es war in der Lage die Funktion der anderen PBP's zu substituieren und ermöglichte so ein Überleben der Zelle bei sonst normalerweise letalen Antibiotikakonzentrationen. Da in diesem Fall keine Zerstörung des Antibiotikums durch  $\beta$ -Laktamasen bestand, beschrieb man dieses Phänomen auch als intrinsische Resistenz (Seligman 1966a; Brown et al. 1980; Corinne 1989; O'Hara et al. 1989; De Jonge et al. 1993; Chambers 1997).

#### **2.4.3. *mecA*- molekulargenetische Grundlage der *PBP2'*-Expression**

*PBP2'* wird durch das 2 kb große Methicillin-Resistenzgen *mecA* kodiert (Matthews et al. 1987; Matthews et al. 1988; Matthews et al. 1990). Das Gen ist bei methicillinresistenten koagulasepositiven und -negativen Staphylokokken weit verbreitet (Hurlimann-Dalel et al. 1992; Suzuki et al. 1992; Suzuki et al. 1993). 1987 konnte *mecA* von einem japanischen MRSA-Stamm kloniert und anschließend sequenziert werden. (Matsuhashi et al. 1986; Song et al. 1987).

*MecA* ist ein Strukturgen eines mobilen DNA-Elementes, welches in der Literatur als "staphylococcal cassette chromosome *mec*" (SCC*mec*) bezeichnet worden ist. Insgesamt konnten bis jetzt vier verschiedene SCC*mec*-Motive in methicillinresistenten Staphylokokken weltweit identifiziert werden, die sich sowohl betreffend Größe und enthaltenen Gensequenzen unterscheiden (Ito et al. 2001; Ma et al. 2002).

Charakteristisch für alle SCC*mec* sind terminal lokalisierte inverted repeats (umgekehrt orientierte Sequenzwiederholungen) und direct repeats (Sequenzwiederholungen mit gleicher Orientierung). Diese sind vor allem im Bereich von *mecA* und Genen gehäuft, die für zwei spezifische Rekombinasen kodieren. Die Gene wurden als "cassette chromosome recombinase A (*csrA*) und B(*csrB*)" bezeichnet und sind für Rekombinationse-

reignisse (Exzision von SCCmec und chromosomale Insertion) von SCCmec essentiell. Ferner enthalten die verschiedenen SCCmec-Varianten Hunderte von open reading frames, sowie mehrere potentiell mobile DNA-Elemente wie Insertionssequenzen (IS), Transposons oder integrierte Plasmide. SCCmec bietet somit der Zelle mit Aufnahme des DNA-Elementes die Möglichkeit, neben der *mecA* vermittelten Informationen für die Produktion von *PBP2'*, multiple anderweitige Resistenzgene chromosomal zu integrieren. Dies erklärt die häufig anzutreffende Multiresistenz methicillinresistenter Staphylokokken. Das in SCCmec mehrfach vorkommende *IS431* ist beispielsweise unter Staphylokokken weit verbreitet und mit verschiedensten Resistenzdeterminanten wie z.B. Sequenzen zur Kodierung der Quecksilber-, Cadmium-, Tobramycin oder Tetrazyklinresistenz assoziiert. Durch homologe Rekombination ist *IS431* in der Lage, verschiedene andere kompatible Insertionssequenzen zu integrieren und sorgt so für eine Anhäufung von Resistenzgenen im Genom der Zelle. Auch das Transposon *Tn554* und das Plasmid *pUB110* konnten in SCCmec identifiziert werden. Diese sind ebenfalls mit verschiedensten Resistenzgenen assoziiert, so z.B. enthält *Tn554* die *ermA* kodierte induzierbare Erythromycinresistenz. SCCmec Typ 1 enthält Genabschnitte für ein Plasmin sensitives Membranprotein und im SCCmec Typ 2 konnten Sequenzen für eine Kalium abhängige ATPase identifiziert werden (Skinner et al. 1988; Archer et al. 1994b; Stewart et al. 1994; Hiramatsu et al. 1996; Ito et al. 2001; Ma et al. 2002; Okuma et al. 2002).

#### 2.4.4. Regulation von *mecA*

Die SCCmec's einiger MRSA- und MRSE-Stämme enthalten die beiden funktionsfähigen Strukturgene *mecI* und *mecR1*, deren Genprodukte die Transkription von *mecA* regulieren. *MecR1* und *mecI* werden unabhängig von *mecA* transkribiert und befinden sich unmittelbar in 5'-Richtung neben *mecA*. *MecR1* kodiert für ein Repressorprotein, welches die Transkription von *mecA* inhibiert. Gleichzeitig verhindert es ebenfalls die *mecR1-mecI* Transkription durch Anbindung an Promoter-Sequenzen des Operons. *MecI* kodiert für ein transmembranöses Signalprotein, welches an der  $\beta$ -Laktam vermittelten Induktion von *mecA* beteiligt ist (Tesch et al. 1990; Hiramatsu et al. 1992; Suzuki et al. 1993; Niemeyer et al. 1996; Sharma et al. 1998).

Die molekulare Organisation, Struktur und Funktion von *mecI* und *mecR1* ist denen der Regulatorgene *blaI* und *blaR1* des  $\beta$ -Laktamasegens (*blaZ*) sehr ähnlich (Gregory et al.

1997). Einige Studien konnten zeigen, dass *mecI* und *blaI* miteinander interagieren können und dass *blaI* im Falle einer fehlenden *mecI*-Regulation (z.B. bei Mutationen mit Inaktivierung von *mecI*) die Transkriptionskontrolle von *mecA* übernehmen kann. Dickinson et al. beschrieben zudem die Möglichkeit einer gleichzeitigen Regulierung von *mecA* durch *blaI* und *mecI* (Ubukata et al. 1989; Ryffel et al. 1992; Hackbarth et al. 1993; Dickinson et al. 2000; McKinney et al. 2001).

Bei intakter Kontrolle von *mecR1* und *mecI* ist die Transkription von *mecA* und damit die Produktion von PBP2' stark supprimiert. Die Produktion von PBP2' erfolgt stark verspätet nach Exposition von Methicillin und in nur quantitativ geringfügigen Mengen. Aufgrund der sehr trägen Aktivierung der Resistenz stellen diese Keime in der mikrobiologischen Diagnostik ein großes Problem dar. In der Literatur werden diese Stämme als "pre-methicillin resistente Staphylokokken" bezeichnet (pre-MRSA/pre-MRSE). Methicillinresistente Staphylokokkenstämme, mit durch Deletionen oder andere Mutationen ausgelösten Inaktivierungen der *mecI/mecR1*-Regulation, exprimieren auch ohne Methicillinexposition kontinuierlich große Mengen an PBP2'. Ein Großteil der MRSA-Stämme, die vor 1970 isoliert werden konnten (der hoch resistente COL MRSA gehört zu diesen Stämmen), zeigten Deletionen im Bereich der Penicillin bindenden Domäne von *mecR1* oder des kompletten *mecI*-Gens (Hurlimann-Dalel et al. 1992; Suzuki et al. 1993; Archer et al. 1994a). Bei den seit 1980 beschriebenen Isolaten dominierten hingegen vor allem Mutationen der *mecA*-Promoterregion und *mecI*-Polymorphismen (Hiramatsu et al. 1996). Ob sich alle diese genannten Beobachtungen von MRSA- auf MRSE-Stämme übertragen lassen, ist derzeit noch nicht sicher geklärt. Kobayashi et al. untersuchten das Vorkommen von genetischen Mutationen der *mecI*- und der *mecA*-Promoterregionen bei 20 MRSA- und 11 MRSE-Stämmen, die zwischen 1993 und 1995 an der Sapporo Medical University isoliert worden waren. Jeder der gewählten Stämme war *mecA*-, *mecI*- und *mecR1*-positiv. In den meisten der MRSA-Stämme wurde entweder im *mecI*-Gen oder in der Promoterregion des *mecA*-Lokus eine Punktmutation einer einzelnen Base entdeckt. Ein Stamm wies eine 28 Basen umfassende Deletion im *mecI*-Gen auf. Im Gegensatz dazu konnte keine dieser Mutationen in den MRSE-Stämmen beobachtet werden. Es konnte ebenfalls keine Mutation des *mecR1*-Lokus in den MRSA- und den MRSE-Stämmen gefunden werden (Kobayashi et al. 1998).

#### 2.4.5. Expressionsvarianten der Methicillinresistenz

Charakteristisch für *mecA* positive Stämme ist die heterogen exprimierte Methicillinresistenz. Dabei zeigen die untersuchten Stämme in der Populationsanalyse eine basale Resistenz in niedrigen Methicillinkonzentrationen. Ein geringer Prozentsatz der Zellen in der Population ist jedoch in der Lage, noch bei weitaus höheren Konzentrationen zu wachsen (Matthews et al. 1984; Hartman et al. 1986).

Dem gegenüber steht die homogene Methicillinresistenz. Stämme mit homogener Resistenz enthalten nur Zellen, die eine high-level Resistenz bis in hohe Methicillinkonzentrationen zeigen. Das Wachstum erfolgt bis zu einer bestimmten, maximalen Methicillinkonzentration. Bei Überschreitung dieser Maximalkonzentration fällt die CFU/ml abrupt ab. Ein Beispiel für einen solchen Stamm ist der MRSA-Stamm COL.

Entsprechend der Expression der Methicillinresistenz konnte die Arbeitsgruppe um Tomasz et al. verschiedene MRSA- und MRSE-Stämme anhand der gemessenen MHKs in vier verschiedene Klassen einteilen. Entscheidend bei dieser Studie ist, dass die Stämme, auch nach mehreren Passagen in nicht selektiven Nährmedien, reproduzierbar das gleiche Expressionsmuster der Resistenz (heterogen vs. homogen) und die gleichen MHKs beibehielten. Jeder Stamm hat damit ein spezifisches Populationsprofil unter definierten Umgebungs- und Wachstumsbedingungen (Tomasz et al. 1991).

Staphylokokken-Stämme, die sich mit ihren MHKs knapp oberhalb der Grenze befinden, welche sensible und resistente Stämme von einander trennt, werden als borderline resistente Stämme bezeichnet. Unter diesen low-level resistenten Stämmen gibt es *mecA*-positive und -negative. *MecA*-positive Stämme besitzen extrem kleine Subpopulationen, die auch bei höheren Antibiotikakonzentrationen noch wachsen können. Bei *mecA*-negativen Stämmen hingegen kann die höher resistente Population nicht nachgewiesen werden. Die erhöhte Resistenz wird hier über eine geringfügige Modifizierung der normalen *PBP's* (1,2,4), einer Überproduktion von  $\beta$ -Laktamasen sowie der Überproduktion des normalen *PBP4* verursacht (Berger-Bachi et al. 1986; Tomasz et al. 1989; Gerberding et al. 1991; Chambers et al. 1994; Hackbarth et al. 1995; Henze et al. 1996a; Henze et al. 1996b).

Die Höhe an produziertem *PBP2'* ist hingegen nicht entscheidend für die Entwicklung einer homogenen oder heterogenen Resistenz. Auch Stämme mit fehlender *mecA*-Regulation durch *mecR1/mecI* oder *blaR1/blaI* und damit kontinuierlich hoher *PBP2'*-Produktion zeigen eine heterogene Methicillinresistenz und teilweise niedrigere MHKs

als Stämme mit niedrigerer *PBP2'*-Produktion (Murakami et al. 1989; Maki et al. 1994; Ryffel et al. 1994a; Maki et al. 1997).

Kondo et. al. beobachteten bei dem Tochterstamm h4 des pre-MRSA Stamm N315 einen Resistenztyp, den sie als eagle type Resistenz bezeichneten. Die Zellen waren bei niedrigen Methicillinkonzentrationen im Wachstumsmedium (2-16 µg/ml) sensibel, zeigten jedoch bei Exposition zu weitaus höheren Konzentrationen (128 – 512 µg/ml) eine ausgeprägte Methicillinresistenz. Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe werden im Diskussionsteil dieser Arbeit eingehender besprochen (Kondo et al. 2001).

#### **2.4.6. Einfluss exogener Faktoren auf die Methicillinresistenz**

Aufgrund der heterogenen Expression der *mecA* vermittelten Methicillinresistenz ist ihre sichere Detektion anhand des Phänotyps schwierig. Die Testvariablen, wie z.B. die Auswahl der Nährmedien, der Zusatz von osmotisch aktiven Substanzen (wie z.B. NaCl, Saccharose), die Inkubationszeit und die Inkubationstemperatur können entscheidende Auswirkungen auf die Expression der Methicillinresistenz haben. So konnte bei 30° C eine höhere *PBP2'*-Produktion als bei 37 oder 40° C gemessen werden. Bei Zusatz von Methicillin in das Nährmedium während der exponentiellen Wachstumsphase waren Kulturen, die bei 30° C wuchsen, resistenter als Vergleichskulturen bei 40° C. Der Zusatz von NaCl zum Nährmedium hatte bei Wachstum in höher temperierten Medien eine Steigerung der MHK und der autolytischen Aktivität zur Folge. Die Zugabe von NaCl zum Nährmedium und das Wachstum bei geringeren Temperaturen konnte die Expression von *PBP2'* steigern (El Hagarawy et al. 1982; Madiraju et al. 1987).

Die üblichen labordiagnostischen Verfahren wurden dementsprechend modifiziert. So wird in der Labordiagnostik meistens Oxacillin statt Methicillin eingesetzt, da dieses eine höhere Stabilität gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen besitzt. Nachteil des Oxacillins ist eine nur geringere Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamasen, so dass bei Borderline-Stämmen mit einer Penicillinasen-Überproduktion Methicillin von Vorteil sein kann (Brown 2001). Der Einsatz anderer  $\beta$ -Laktam-Antibiotika außer Methicillin oder Oxacillin zur Resistenztestung wird nicht empfohlen. Methicillinresistente Stämme besitzen Kreuzresistenzen zu allen anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, dennoch können die

zu testenden Stämme in vitro bei diesen Antibiotika als falsch sensibel erscheinen (Acar et al. 1970; Chambers et al. 1984).

Müller-Hinton-Brühe mit oder ohne NaCl-Zusatz hat sich als Nährmedium zur Testung etabliert. Alternativ ist auch Columbia-Agar zur Diagnostik verlässlich und soll bei MRSE-Stämmen eine noch bessere Detektion ermöglichen (Brown et al. 1974; Brown et al. 1986; French et al. 1987; Milne et al. 1987; Milne et al. 1993; DIN 2000; NCCLS 2002; Monsen et al. 2003). Ein Problem bei der Benutzung von Müller-Hinton-Medien ist die Varianz der chemischen Zusammensetzung, die zu unterschiedlichen Testergebnissen führen kann. Trotz Standardrezeptur können aufgrund der natürlich biologischen Herkunft der Einzelelemente (z.B. tierische Proteine) nicht mit jeder Charge exakt gleiche Medien produziert werden. Generell muss diese Einschränkung für alle Medien gelten, allerdings ist Müller-Hinton-Brühe in der Vergangenheit am häufigsten Gegenstand von Studien gewesen (Hindler et al. 1987; Coombs et al. 1996). Das Hinzufügen von NaCl zu Müller-Hinton-, Columbia- und DST-Medien erhöht die Detektion von methicillinresistenten Stämmen. NaCl-Konzentrationen größer als 5 % können kontraproduktiv sein und zu falsch sensiblen Befunden führen. Dies konnte besonders bei koagulasenegativen Staphylokokken beobachtet werden. Eine NaCl-Konzentration von 2 % ist genauso effektiv wie eine 5 %ige, hat jedoch den Vorteil, dass deutlich weniger inhibitorische Effekte auftreten (Brown et al. 1986; Milne et al. 1987; Huang et al. 1993; Milne et al. 1993).

Die Reduktion der Temperatur hat sich als vorteilhaft in der Diagnostik methicillinresistenter Staphylokokken erwiesen. Heute wird als Temperatur 35° C empfohlen (Annear 1968; DIN 2000; NCCLS 2002). Brown et al. berichteten von einer besseren Unterscheidung von sensiblen und resistenten Stämmen bei Testung mit 30° C. Bei dieser Temperatur wachsen jedoch nicht alle Staphylokokkenstämme sicher, so dass es hier zu falsch sensiblen Befunden kommen kann (Brown et al. 1974; Brown 2001). Eine Verlängerung der Inkubationszeit kann bei einigen langsam wachsenden Stämmen die Sensitivität erhöhen. Derzeit werden von DIN und NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) Inkubationszeiten zwischen 18 bzw. vollen 24 Stunden empfohlen.

#### 2.4.7. Spezifische Faktoren mit Einfluss auf die Methicillinresistenz

Mittels Transposonmutagenese konnten viele chromosomale Gene identifiziert werden, die allesamt außerhalb des *mec*-Genlokus liegen und deren Funktion essentiell für eine vollständige Expression der Methicillinresistenz ist. Die meisten dieser Geneorte sind am Aufbau der Zellwand beteiligt. Hierzu zählen die *fem* (factors essential for the expression of methicillin resistance) bzw. *aux* (auxiliary) Gene. Andere gehören in die Gruppe der Regulationsgene, die für die koordinierte Transkription mehrerer unabhängiger Geneorte im Falle einer Exposition der Zelle mit Methicillin notwendig sind. In diese Gruppe gehören beispielsweise die Sigma-Faktoren. Bei den Plasmiden hat vor allem das  $\beta$ -Laktamaseplasmid durch regulative Einflüsse auf die Expression von *mecA* Auswirkungen auf die Methicillinresistenz.

##### $\beta$ -Laktamaseplasmid

Wie schon weiter oben im Text beschrieben, führt eine vollständige Regulation von *mecA* durch das  $\beta$ -Laktamaseplasmid zu dem Resistenzverhalten eines pre-MRSA bzw. pre-MRSE Stammes. Bei Aufnahme des Plasmides durch einen homogen resistenten Staphylokokkenstamm kann dies zu einem heterogenen Expressionstyp führen. Zusätzlich ist eine stabilisierende Wirkung auf den *mec*-Genlokus beschrieben worden. Es scheint in der Lage zu sein, spontane Deletionen innerhalb des *mec*-Gens zu verhindern. Eine Inaktivierung von *blaRI* durch Mutation kann ebenfalls zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Resistenz führen (Boyce et al. 1990; Hiramatsu et al. 1990; Ryffel et al. 1992; Hackbarth et al. 1993; Chambers et al. 1994; Kuwahara-Arai et al. 1996).

##### *cbr\**-Mutationen

Aus fast jedem heterogen resistenten Staphylokokkenstamm können unter Exposition mit steigenden Methicillinkonzentrationen im Nährmedium homogene, hoch resistente Subklone isoliert werden. Hierbei muss generell zwischen zwei Arten von Klonen unterschieden werden. Viele dieser Subklone zeigen einen instabilen Phänotyp und wechseln nach mehreren Passagen in nicht selektiven Nährmedien in den heterogenen Resistenztyp des Ursprungstammes zurück (Tomasz et al. 1991). Einige Subklone bleiben jedoch konstant beim homogen resistenten Phänotyp. Ryffel et al. konnten zeigen, dass eine oder mehrere chromosomale Mutationen außerhalb des *mec*-Genlokus ur-

sächlich für dieses Phänomen sein müssen. Die Arbeitsgruppe benannte diese Mutationen als *chr\** (chromosomal mutations). *Chr\** ist allerdings als theoretisches Konstrukt zu verstehen. Eine genaue Gensequenz wurde von der Arbeitsgruppe nicht spezifiziert (Ryffel et al. 1994b).

### *fem*-Faktoren

Die Bezeichnung *fem* ist eine Abkürzung für den Begriff "factors essential for methicillin resistance". Alternativ werden diese Faktoren auch als *aux* (auxiliary factors) Faktoren in der Literatur bezeichnet (Murakami et al. 1989; Tomasz 1990). Bis jetzt sind *femA*, *femB*, *femC*, *femD(femR)*, *femE*, *femF* und *femX* beschrieben worden. Die Funktionsfähigkeit der *fem*-Faktoren spielt für die Methicillinresistenz der Zelle eine wichtige Rolle. Alle Transposonmutanten, bei denen einzelne *fem*-Faktoren inaktiviert waren, zeigten drastische Reduktionen der Methicillinresistenz. Bis auf *femE*, dessen genaue Funktion bis jetzt noch unbekannt ist, sind alle genannten Faktoren für eine korrekte Synthese des Peptidoglykans der Zellwand essentiell.

*FemA* und *femB* sind in einem Operon organisiert. Es konnte sowohl bei *S. aureus* als auch mit ähnlicher Organisation und Sequenz bei *S. epidermidis* und *S. haemolyticus* entdeckt werden. Das Operon kodiert für zwei ca. 49 kda große Proteine.

Die Zellwand bei Staphylokokken besteht aus über 40 Schichten von Peptidoglykansträngen. Die Quervernetzung der einzelnen Peptidoglykane erfolgt über eine flexible Pentaglycin-Seitenkette, die mit dem angrenzenden Peptid verbunden ist (Labischinski 1992). Die Seitenkette wird durch schrittweise Anknüpfung von Glycinresten synthetisiert, die durch die Zellwand spezifischen Glycyl-tRNAs geliefert werden (Matsushashi et al. 1967). Transposonmutanten mit inaktiviertem *femA* oder *femAB* produzieren nur noch Monoglycinseitenketten mit konsekutiv gestörter Ausbildung der Querverknüpfungen der Peptidoglykane. Diese Mutanten sind hypersensibel gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika bei ungestörter Produktion der *PBP*s (Berger-Bachi et al. 1989; Maidhof et al. 1991; Stranden et al. 1997; Ling et al. 1998).

Transposonmutanten mit inaktiviertem *femB* und funktionsfähigem *femA* synthetisieren Glycinketten mit nur 3 Glycinresten. Auch diese zeigen eine deutliche Reduktion der Methicillinresistenz (Henze et al. 1993). Für die Anknüpfung des ersten Glycins der Seitenkette soll ein als *femX* benannter Faktor notwendig sein. Tschierske et al. beschrieben ein als *FmbB* benanntes Protein, welches die Arbeitsgruppe als mögliches

Genprodukt von *femX* vermutete (Henze et al. 1993; Kopp et al. 1996; Tschierske et al. 1999).

Die Transposoninsertion innerhalb von *femC* führt zur Inaktivierung des Glutaminsynthetase-Repressorgens *glnR*, welches einen polaren Effekt auf das Glutaminsynthetasegen *glnA* hat. Dieses resultiert letztendlich in einem Mangel an Glutamin. Glutamin ist der  $\text{NH}_4^+$ -Donator für die Produktion von Glutamat, welches für die Peptidoglycan-Produktion notwendig ist. Ein in der Literatur benutztes Synonym für *femC* ist *glnRA* (Gustafson et al. 1994).

*FemD* (syn.: *femR* oder *glmM*) ist als Phosphoglucosaminmutase-Gen in dem MRSA-Stamm COL identifiziert worden. Das Genprodukt *femD* katalysiert die chemische Reaktion von Glucosamin-1-Phosphat aus Glucosamin-6-Phosphat. Dieses ist eine Vorstufe der Produktion von UDP-N-Acetylglucosaminen, welche wiederum für die Produktion von Peptidoglykanen notwendig sind (Berger-Bachi et al. 1992; Jolly et al. 1997). *FemD* ist Teil eines Genclusters, dessen fünf Gene zusammen transkribiert werden. Neben *femD* besteht dieser aus den beiden open reading frames orf310 und orf269, dem Gen *arg* (kodiert für Arginase) sowie einem Gen, welches Wu et al. kürzlich als *mnp* ("multiple repeat polypeptide") benannt haben. Namensgebend war das von zahlreichen Wiederholungen bestimmter Aminosäuresequenzen gekennzeichnete Genprodukt. Eine Transposonmutante (RUSA266) von *S. aureus* COL mit inaktiviertem *mnp* zeigte eine dramatische Reduktion der Methicillinresistenz von 1600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  auf 1,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Wu et al. 1999).

Die Inaktivierung von *femF* (Synonym *murE*) führt zu einer Blockade der Peptidoglycanvorstufen-Synthese beim Hinzufügen des Lysins. Die Tn551-Transduktante eines hoch methicillinresistenten *S. aureus*-Stamm zeigte eine drastische Reduktion der MICs (von 1600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  auf 25-50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) sowie eine heterogene Expression der Resistenz (Ornelas-Soares et al. 1994).

Die genaue Funktion von *femE* ist bis jetzt noch unbekannt. Abbildung 2 zeigt schematisch die im Text oben dargestellten Auswirkungen auf das Peptidoglykan bei Inaktivierungen einzelner *fem*-Faktoren.

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Peptidoglykansynthese und Auswirkungen bei Inaktivierung einzelner *fem*-Faktoren

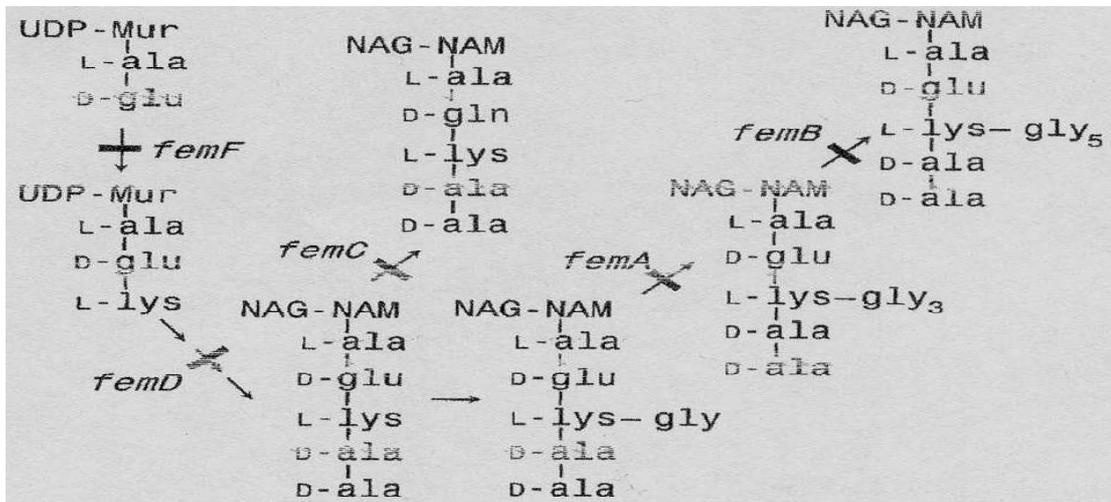


Abbildung nach Chambers (Chambers 1997): Schematische Darstellung der Peptidoglykansynthese und Auswirkungen bei Inaktivierung einzelner *fem*-Faktoren.  
 Abkürzungen: UDP-MUR=Uridindiphosphomuramyl-Peptidvorstufe  
 NAG-NAM=N-Acetylglucosamin-N-Acetylmuraminsäure-Disaccharid

### *Flp* (fmtAlike protein)

Komatsuzawa et al. beschrieben Tn551-Transposonmutanten verschiedener MRSA-Stämme, die bei Zusatz von Triton X-100 in das Nährmedium eine Reduktion der Methicillinresistenz im Vergleich zu den Elternstämmen zeigten. Dieser Effekt zeigte sich jedoch nur bei einigen der getesteten MRSA-Stämme. Ursache war die Inaktivierung des Genabschnittes *flp* (*fmtA* - like protein). Die Transposonmutanten zeigten eine reduzierte Querverknüpfung der Peptidoglykane. Der Zusatz von  $\beta$ -Laktamasen, Fosfomycin und Bacitracin führte zu einer Steigerung der Transkriptionsrate von *flp*. Das Genprodukt von *flp*, FmtA, ist ein Zellmembranprotein und zeigt Homologien zu PBP's und  $\beta$ -Laktamasen, ohne deren spezifische Aktivität zu besitzen. Die genaue Funktion des Proteins ist bis jetzt noch unbekannt (Komatsuzawa et al. 1997; Komatsuzawa et al. 1999; Komatsuzawa et al. 2000).

### *llm*

Maki et al. identifizierten mittels Transposonmutagenese einen Genlokus, der als *llm* bezeichnet worden ist. Nach Insertion des Transposons Tn918 in die  $\lambda$ 3 Region des *llm*-Gens, eines ursprünglich homogen resistenten MRSA-Stammes (SRM551), exprimierte die resultierende Transduktante SRM563 eine heterogene Methicillinresistenz mit deutlich reduzierter MHK. Der *llm*-Genlokus kodiert für ein 38 kDa großes hydrophobes Protein, dessen Funktion bis jetzt noch unklar ist. Die *llm*-inaktivierte Transduktante zeigte eine erhöhte Triton X-100 induzierte Autolyse-Rate (Maki et al. 1994). In einigen Tochterkolonien von SRM563, isoliert unter Exposition von 25 µg/ml Methicillin, ließ sich eine stark erhöhte Transkription des *llm*-Genlokus nachweisen. Ursächlich war eine unabhängige chromosomale Transposition der Insertionssequenz 256 (IS256) in fünf verschiedene Insertionslokalisationen von *llm*. Diese führte zur Bildung eines neuen Hybrid-Promoters, bestehend aus der -35 Region von IS256 und der -10 Region der chromosomalen Zell-DNA. Die durch den neuen Promotor verursachte erhöhte Transkription des *llm*-Gens, führte zu einer signifikanten Steigerung der Methicillinresistenz (Maki et al. 1997).

### Autolyserate und *lytH*

Es gibt mehrere Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Autolyseaktivität einer Zelle und der Expression der Methicillinresistenz belegen. Autolyse spielt normalerweise bei Umbauprozessen der Zellwand im Rahmen von Zellteilung oder lokalen Umbauprozessen eine wichtige Rolle. De Jonge et al. untersuchten die Autolyseaktivität eines homogen high-level methicillinresistenten *S. aureus*-Stammes und verglichen diese mit Tn551-Mutanten desselben Stammes. Der Elternstamm zeigte eine ausgeprägte Autolyseaktivität. Tn551-Insertionen innerhalb von *mecA* führten zum erwarteten Sistieren der PBP2'-Produktion, ohne dass die Autolyserate sich änderte. Andere Transposonmutanten mit Insertionen außerhalb des *mec*-Gens zeigten bei normaler PBP2'-Produktion eine Reduktion der Methicillinresistenz. Die Autolyseaktivität nahm dabei entsprechend der Reduktion der Methicillinresistenz ab. Eine dieser Transposoninsertionen befand sich innerhalb des weiter oben beschriebenen *femA*, alle anderen wurden in der Studie als Insertion in nicht näher spezifizierte *aux*-Genorte klassifiziert. De Jonge et al. vermuteten, dass ein hoher Zellwandumsatz zu

einer Steigerung der Methicillinresistenz führt, da instabile und potentiell tödliche Strukturelemente der Zellwand schneller eliminiert werden können (De Jonge et al. 1992). Andere Arbeitsgruppen beobachteten den gleichen Zusammenhang zwischen Autolyserate und homogener high-level Methicillinresistenz bei *S. aureus* Stämmen (Qoronfleh et al. 1986; Chambers et al. 1987; Gustafson et al. 1989; Gustafson et al. 1992).

Lediglich eine Untersuchung von Gustafson et. al. aus dem Jahre 1989 berichtete von einer geringeren autolytischen Aktivität eines homogen methicillinresistenten Stammes im Vergleich zu korrespondierenden heterogen resistenten und sensiblen Mutanten desselben Stammes. Die Mutationen wurden chemisch durch Behandlung des Wildtypstammes mit 5-Aminoacridine-HCL verursacht. Mögliche Erklärungen der diskrepanten Ergebnisse könnten in der unterschiedlichen Vorgehensweise der Arbeitsgruppen liegen. De Jonge et al. betonten, dass für reproduzierbare Ergebnisse eine Kultivierung der Stämme über mindestens 16 Generationen notwendig war. Gustafson et al. hingegen führten die Autolyse-Versuche unmittelbar nach der chemischen Mutation durch. Ferner verglichen De Jonge et al. isogene Stammpaare miteinander. Bei Mutagenese durch chemische Detergentien ist die Schaffung isogener Stammpaare schlecht möglich. So können sich leicht Mutationen an multiplen Genorten ereignen, die in ihrer Gesamtheit unübersichtlich und in ihren phänotypischen Auswirkungen nur schwer zu bewerten sind (Gustafson et al. 1989; De Jonge et al. 1991).

Die Arbeitsgruppe um Fujimura et al. isolierten aus einer Population eines low-level resistenten *S. aureus*-Stammes mit einer MHK von 6,3 µg/ml eine high-level Mutation (MHK 1600 µg/ml) und fanden als Ursache für die erhöhte Resistenz die Mutation in einem Genabschnitt *lytH*. Dieser weist ausgeprägte Homologien zum *lytC* Genlokus in *B. subtilis* auf, welcher für Zelltrennung, Zellwiederneuerung und Antibiotika induzierte Zellyse eine wichtige Funktion hat. *LytH* kodiert dabei für eine N-acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase (Fujimura et al.; Blackman et al. 1998).

### *agr* und *sar*

Die beiden Genabschnitte *agr* (accessory gene regulator) und *sar* (staphylococcal accessory regulator) sind globale Kontrollgene, die an der Expression von zahlreichen Staphylokokken-Virulenz-Faktoren beteiligt sind. So aktiviert das Transkript des *agr*-Genlokus die Produktion diverser Toxine (wie z.B. TSST-1, Enterotoxine,  $\beta$ -Hämolysin) und reguliert negativ die Synthese von Oberflächenproteinen (z.B. Protein A, Fibronectin bindendes Protein) (Janzon et al. 1990; Kornblum et al. 1990).

Die Transkription von *agr* wird durch *sar* kontrolliert. Es wird vermutet, dass sich das *sar*-Genprodukt an den *agr*-Promotor bindet und die Transkription initiiert (Bayer et al. 1996; Heinrichs et al. 1996; Chien et al. 1998b; Chien et al. 1998a). Die Inaktivierung jeder dieser beiden Gene führte bei einem heterogen exprimierenden *S. aureus*-Stamm zu einer leichten Erniedrigung der high-level exprimierenden Subpopulation. Die MHK's und die PBP2'-Produktion dieser Zellen blieben aber dabei unverändert. Nur PBP 1 und 3 wurden vermindert produziert (Piriz Duran et al. 1996).

### 3. Voraussetzungen dieser Arbeit

Für die Transduktionsversuche dieser Arbeit wird das Transposon Tn917 verwendet. Dieses besitzt eine Größe von 5,3 kb und wurde initial auf dem nicht-konjugativen Plasmid *pAD2* von *Streptococcus faecalis* DS16 identifiziert. Es beinhaltet das Gen *erm*, welches für eine induzierbare Erythromycinresistenz kodiert. Die Transpositionsrate kann durch Exposition zu Erythromycin gesteigert werden (Tomich et al. 1979; Tomich et al. 1980; Shaw et al. 1985).

Transposons sind "springende" Genabschnitte, die in der Lage sind, genetische Information von Zelle zu Zelle oder intrazellulär in andere Positionen des Chromosoms zu übertragen. Die informative Gensequenz des Transposons ist bds. begrenzt von einer kleineren, nicht informativen Nukleotidsequenz, dem Insertionselement (auch Insertosom). Das Transposon kann enzymatisch aus seiner ursprünglichen DNA-Lokalisation herausgelöst und an anderer Stelle des Genoms wieder eingefügt werden. Dieser Vorgang wird Transposition genannt. Dabei ist die das Transposon flankierende Gensequenz (Insertosom) maßgeblich für die spätere chromosomale Insertionslokalisierung im Rahmen der Transposition. Zu einer eigenständigen Replikation ist ein Transposon nicht in der Lage, sondern bedarf eines Replikons, wie z.B. Plasmide. Tn917 gehört zu einer Gruppe von Transposons, die nach dem Modell der replikativen Transposition transponieren. Hierbei erhöht das Transposon seine Kopienanzahl. Ein Replikationsprodukt wird an anderer Stelle durch Rekombination in die DNA inseriert, während das Ursprungstransposon nicht zerstört wird und somit weiterhin erhalten bleibt.

Zum besseren Verständnis der Arbeit soll der Vorgang der Transduktion mit einem Bakteriophagen als Vektor näher erklärt werden. Während des Vermehrungszyklus des Phagen kommt es kurz vor der Zellyse zur Fragmentierung der DNA. Entsprechend der Größe der Fragmente werden diese in den entstehenden Phagen verpackt. Dabei kann es sein, dass neben dem eigentlichen Phagengenom in wenigen Fällen auch Partikel der Wirts-DNA in den Phagen integriert werden. Bei einer Infektion der nächsten Zelle mit Injektion der Phagen-DNA wird dieses Fragment durch homologe Rekombination in das entsprechende Allel der Wirtszelle integriert. Im Falle des hier benutzten Transposons Tn917 können die Zellen mit erfolgter chromosomaler Insertion des

Transposons durch die neu erworbene Fähigkeit der Erythromycinresistenz selektiert werden.

Mittels Transposonmutagenese ist es möglich, isogene Stammpaare herzustellen, die sich nur in einem Merkmal unterscheiden. Durch die Insertion eines Transposons in das Genom besteht nur an dieser Stelle eine genetische Veränderung im Vergleich zum ursprünglichen Empfängerstamm. Verändern sich nun die phänotypischen Merkmale der Transduktante im Vergleich zum Ursprungstamm, so kann ein Zusammenhang zwischen der Genlokalisierung und dem veränderten Phänotyp hergestellt werden.

Unter Verwendung des Transposons Tn917 ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen, mehrere Transposonmutanten im genetischen Background des *S. epidermidis*-Stammes 1457 zu schaffen (Mack et al. 1994; Nedelmann 1999). Die Mutanten wurden aufgrund von Restriktionskartierungen der Tn917-Insertionsstelle und konsekutiven Phänotypänderungen in 6 verschiedene Klassen eingeteilt. (Expression von Biofilm, PIA-Titer, Koloniemorphologie, Induktion von Biofilmbildung in unterschiedlichen Nährmedien). Die einzelnen Insertionslokalisationen der verschiedenen Mutantenklassen werden im Diskussionsteil dieser Arbeit weitergehend besprochen.

Klasse I beinhaltet die Mutanten M10, M11, M13, M21, M22, M24. Alle zeigen einen komplett biofilm- und PIA-negativen Phänotyp bei Testung in TSB<sub>BBL</sub>-Medien. Eine Ausnahme bildete die Transduktante M21 mit einem schwach biofilm- und PIA-positiven Phänotyp. Die primäre Anheftung ist unbeeinträchtigt. Alle diese Mutanten haben die Tn917-Insertionsstellen innerhalb des *icaADBC*-Genclusters. Sequenzierungen zeigten, dass Tn917 in M13 und M24 in *icaA* und M21, M22, M23 in *icaC* inserieren. Die Kolonien der Klasse I sind leuchtend weiß (Mack et al. 2000b).

Die Klasse II beinhaltet die Mutante M12. Auffallend war hier eine veränderte Koloniemorphologie nach längerer Inkubationszeit auf Agarplatten. Die Kolonien blassten ab und „klumpten“ bei dem Versuch, diese in Nährmedien zu suspendieren, extrem zusammen. In TSB<sub>BBL</sub> zeigte diese Mutante einen biofilm- und PIA-negativen Phänotyp (Mack et al. 2000b).

Der Klasse III wurden die Mutanten M15 und M19 zugeteilt. In TSB<sub>Oxid</sub> zeigen diese Mutanten einen biofilmnegativen Phänotyp. Im selben Produkt der Fa. BBL (TSB<sub>BBL</sub>) sind sie hingegen schwach biofilm- und PIA-positiv. Die Kolonien haben eine gräulichere Farbe als der Wildtypstamm oder die Klasse I – Mutanten. Genaue Charakterisierungen der Insertionsstellen zeigten, dass M15 und M19 identische Tn917-

Insertionslokalisationen haben (Knobloch et al. 2001). Im weiteren Text wird diese Transposoninsertion mit M15 bezeichnet.

Die Klasse IV beinhaltet die Mutante M17. Diese war ebenfalls in TSB<sub>Oxoid</sub> biofilmnegativ. In TSB<sub>BBL</sub> war die Mutante biofilm und PIA-bildend. Die Kolonien der Klasse IV sind weiß.

Die Klasse V Mutante M16 zeigt eine geringere Biofilmbildung in TSB<sub>Oxoid</sub> als der Wildtypstamm *S. epidermidis* 1457. In TSB<sub>BBL</sub> exprimiert diese Mutante jedoch quantitativ Biofilm auf dem Niveau des Wildtypstammes.

Die Klasse VI Mutante M20 weist im Vergleich zu M16 keine phänotypischen Unterschiede auf, die Transposoninsertionsstelle ist jedoch auf einem anderem *SmaI*-Fragment lokalisiert. Die Kolonien der Klassen V und VI haben, ähnlich Klasse I und IV, eine hellweiße Farbe. Besonderheit dieser Mutantenklassen ist, dass diese einen mukoidnegativen Phänotyp besitzen, gleichzeitig aber biofilmpositiv sind.

**Tabelle 3:** Tabellarische Auflistung wichtiger phänotypischer Merkmale der Mutantenklassen I bis VI

Stamm	Biofilm in TSB <sub>Oxoid</sub>	Biofilm in TSB <sub>BBL</sub>	Mukoidproduktion	Koloniemorphologie
1457 Wildtyp	++	+++	M	weiß
1457M10 Klasse I	-	-	-	weiß
1457M13 Klasse I	-	-	-	weiß
1457M12 Klasse II	-	-	-	weiß/grau
1457M15 Klasse III	-	+	-	grau
1457M17 Klasse IV	-	++	-	weiß
1457M16 Klasse V	+	+++	-	weiß
1457M20 Klasse VI	+	+++	-	weiß

Die Angaben auf die Mukoidproduktion beziehen sich auf Testungen mit peptonhaltigen Medien, welche mit N-Acetyl-D-Glucosamin substituiert worden sind.

(-)=Biofilm/mukoidnegativ; (+++)=Biofilmbildung OD<sub>570</sub>>2,0;

(++)=Biofilmbildung OD<sub>570</sub>1,0-2,0; (+)=Biofilmbildung OD<sub>570</sub> 0,1-1,0;

(M)=mukoidpositiv (Mack et al. 1999; Mack et al. 2000b; Riedewald 2001)

#### 4. Zielsetzung dieser Arbeit:

Die Arbeiten von Mempel et. al. beschrieben bei dem biofilmpositiven und methicillinresistenten *S. epidermidis*-Stamm RP62A Phasenvarianten mit einem biofilmnegativen und methicillinsensiblen Phänotyp. Als Ursache für den Verlust der Methicillinresistenz konnte eine fehlende *mecA*-Transkription nachgewiesen werden. Anhand dieser Beobachtungen ist die Existenz von Genorte zu vermuten, die gleichzeitige regulative Einflüsse auf die Expression von *ica* und *mecA* haben.(Mempel et al. 1994; Mempel et al. 1995)

Ziel dieser Arbeit war es, die in Kapitel 3 genannten Tn917-Insertionslokalisationen in den biofilmpositiven und methicillinresistenten *S. epidermidis*-Stamm 1057 zu transduzieren. Als Donorstämme verwendeten wir 1457M10, 1457M13 (Klasse I), 1457M12 (Klasse II), 1457M15 (Klasse III), 1457M17 (Klasse IV), 1457M16 (Klasse V), 1457M20 (Klasse VI). Als Vektor für die Transduktion wurde der Bakteriophage 71 ausgewählt, der bereits auf *S. epidermidis* 1457 adaptiert war. Nur bei den Mutanten der Klasse I lag die Tn917-Insertion innerhalb des *icaADBC*-Genclusters, bei allen anderen befand sich diese außerhalb. Klonierungen und Sequenzierungen der an das Transposon angrenzenden chromosomalen Wirts-DNA waren bei den Mutantenklassen II bis VI zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. (Knobloch 1999; Mack et al. 2000b)

Alle diese Tn917-Insertionen hatten nachweislich Einfluss auf die Biofilmproduktion. Durch Transduktion in einen methicillinresistenten *S. epidermidis*-Stamm bestand die Hoffnung, eine oder mehrere Genlokalisationen zu identifizieren, die direkt oder indirekt Einfluss auf die beiden Pathogenitätsfaktoren Biofilmbildung und Methicillinresistenz haben.

## 5. Materialien und Methoden

### 5.2. Materialien

#### 5.2.1. Übersicht über die verwendeten Geräte

**Tabelle 4:** Tabellarische Aufführung der in dieser Arbeit benutzten Geräte

Gerät	Hersteller
Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R mit Rotor BS 4402 Brutschrank 5050E	Fa. Haereus-Christ, Osterode
Eppendorf Zentrifuge 5415 Eppendorf Thermostat 5320 Eppendorf Thermomixer 5436 Eppendorf Photometer 1101M	Fa. Netheler und Hinz, Hamburg
Tischzentrifuge Rotana/S	Fa. Hettich, Tuttlingen
Schüttelinkubator	Fa. New Brunswick Scientific Co, New Brunswick, N.J. (USA)
Schüttelinkubator Lab-Shaker mit Ther- mostat Lab-Therm	Fa. B. Braun, Melsungen
Schüttelwasserbad GFL 1083	Fa. AD Krauth, Hamburg
Waage PC 4400	Fa. Mettler GmbH, Gießen
Feinwaage Sartorius 2432	Fa. Leitz, Wetzlar
Röntgenfilme X-Omat AR.	Fa. Kodak
Röntgenfilme	Fa. Agfa
Zeta-Probe Nylon Blotting Membranes,	Fa. Bio-Rad, Richmond (USA)
Sterilfilter 0,2 µm Porengröße	Fa. Sartorius, Göttingen
Digital-pH-Meter 646	Fa. Knick, Berlin
Gelkammern	Fa. Regina v. Kreutz Laborgeräte
UV-Transilluminator,	Ultra-Violet Products Inc. San Gabriel, Ca. (USA)
UV-Leuchte 30 W.	Fa. NIS

Gerät	Hersteller
Mikrotiterplatten	Fa. Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten Nunclon Delta mit Abdeckung, Zellschaber und Zellkulturschalen (5 cm und 9 cm Durchmesser),	Fa. Nunc, Roskilde (Dänemark)
Gleichspannungsgerät 67510	Fa. Camag
Filterpapier Whatman 3MM	Fa. Balston, England
Chromato VUE-Transluminator C-61	Fa. Vetter K.G
Sofortbildkamera MP-4 Land-Camera Modell 44-32	Polaroid Corporation, Cambridge, Ma. (USA);

### 5.2.2. Übersicht über verwendete Chemikalien

**Tabelle 5:** Tabellarische Aufführung der in dieser Arbeit benutzten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Borsäure z.A. Calciumchlorid 2-hydrat krist. z. A. Chloroform z. A. D(+)-Glucose wasserfrei di-Natriumhydrogenphosphat2-hydrat z.A. Dodecylsulfat (SDS) Ethidiumbromid Isoamylalkohol z. A Natriumchlorid z. A NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaHPO <sub>4</sub> , z.A. Natriumhydroxid z. A Pufferlösung pH 5,00 Pufferlösung pH 7,00 Pufferlösung pH 9,00 Salzsäure rauchend 37 % reinst	Fa. Merck, Darmstadt
Titriplex III z. A	

Chemikalien	Hersteller
Natriumacetat 99 % z. A	Fa Pharmacia Biotech
Formaldehyd 37% Essigsäure 96% Methanol	Fa. Pharmacia Biotech
Aceton Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) Ethanol absolut Bromphenolblau Lambda DNA-HindIII Digest Chloropan: Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 One-Phor-All-buffer Calciumchlorid	Fa. Sigma, München
Ficoll Ethidiumbromid Glycine analytical grade Polyethylenglykol (PEG)	Fa. Serva, Heidelberg
Xylen Cyanol FF	Fa. Fluka
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) Glycin Erythromycin Oxacillin	Fa. Sigma, Deisenhofen
Kongorot Indikatorstoff	Fa. Merck, Darmstadt
Seakem Agarose	FMC Bioproducts, Rockland (USA)
Phenol	Fa. Roth, Karlsruhe
Sephadex G-50 One-Phor-All-Plus-Puffer	Fa. Pharmacia LKB, Schweden
DNA Labelling Kit Ready -To-Go GeneCleanII-Kit	Fa. Bio 101 Inc. ,La Jolla, USA
$^{32}\text{P}$ dCTP (3000 Ci/mmol)	Fa. Amersham Buchler, Braunschweig

Chemikalien	Hersteller
Antibiotikaplättchen	Fa. Boehringer, Mannheim

### 5.2.3. Übersicht über verwendete Enzyme:

**Tabelle 6:** Tabellarische Aufführung der in dieser Arbeit verwendeten Enzym

Enzym	Hersteller
Restriktionsendonuclease <i>AvaI</i> Restriktionsendonuclease <i>XbaI</i> Restriktionsendonuclease <i>PstI</i> Restriktionsendonuclease <i>EcoRI</i>	Fa. Pharmacia Biotech
alkalische Phosphatase	Fa. Boehringer, Mannheim;
RNAse (DNAse-free), DNAse (RNAse-free) Lysostaphin	Fa. Sigma, München

#### 5.2.4. Übersicht über verwendete Nährmedien und deren Bestandteile:

**Tabelle 7:** Tabellarische Aufzählung der in dieser Arbeit verwendeten Bestandteile der verwendeten Nährmedien (Siehe auch Tabelle 8)

Bestandteil Nährmedium	Hersteller
Tryptone Yeast Extract Columbia-Agar Purple Agar Base Bacto-Agar Peptone	Fa. Difco, Detroit/USA
Müller-Hinton-Brühe TSB <sub>BBL</sub>	Fa. Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland, USA
Nutrient Broth No. 2 BHI	Fa. Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England

**Verwendete Nährmedien**

**Tabelle 8:** Tabellarische Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien

Nährmedium	Bestandteile
LB-Brühe (Luria-Bertani-Brühe)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 10 g Tryptone</li> <li>▪ 5 g Yeast Extract</li> <li>▪ 10 g NaCl,</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O</li> </ul>
TSB <sub>BBL</sub> -Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 30 g TSB<sub>BBL</sub></li> <li>▪ ad 1000 ml H<sub>2</sub>O</li> </ul>
TSB – Medium ohne Glukose	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 17 g Tryptone</li> <li>▪ 3 g Peptone</li> <li>▪ 5 g NaCl,</li> <li>▪ 2,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> <li>▪ (pH 7,3)</li> </ul>
Peptone Yeast-Medium (PY-Brühe)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 10 g Pepton</li> <li>▪ 5 g Yeast Extract</li> <li>▪ 5 g NaCl</li> <li>▪ 1 g Glucose</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> <li>▪ (pH 7,5)</li> </ul>
Brain Heart Infusion (BHI)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 37 g BHI</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> <li>▪ pH 7,4 ± 0,2</li> </ul>
Brain Heart Infusion-Agar (BHI-Agar)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 47 g BHI</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> <li>▪ pH 7,4 ± 0,2</li> </ul>
Brain Heart Infusion + 40 (20)mM NaCitrat	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 37 g BHI</li> <li>▪ 40 (20) mM Nacitrat</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O</li> </ul>

Nährmedium	Bestandteile
Brain Heart Infusion (BHI) + 10 µg/ml Erythromycin:	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 37 g BHI</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> <li>▪ 1,2 % Bacto-Agar</li> <li>▪ 10 µg/ml Erythromycin</li> </ul>
Brain Heart Infusion -Softagar +Erythromycin + +20 mM NaCitrat	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 37 g BHI</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> <li>▪ 10 µg/ml Erythromycin</li> <li>▪ 20 mM NaCitrat</li> <li>▪ 0,7 % Bacto-Agar</li> </ul>
Staphylococcus typing Agar (STA-Agar)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 20 g Nutrient Broth No. 2</li> <li>▪ 5 g NaCl,</li> <li>▪ 0,4 g CaCl<sub>2</sub>,</li> <li>▪ 1,2 g Bacto-Agar</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> </ul>
Staphylococcus typing Soft-Agar (STA-Soft-Agar)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 20 g Nutrient Broth No. 2</li> <li>▪ 5 g NaCl,</li> <li>▪ 0,4 g CaCl<sub>2</sub>,</li> <li>▪ 0,7 g Bacto-Agar</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> </ul>
Blutagar	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 42,0 g Columbia-Agar</li> <li>▪ 1,0 g Bacto Agar</li> <li>▪ 2,2 g Glukose</li> <li>▪ 72 ml Schafsblut</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> </ul>
Müller-Hinton-Agar (MH-Agar)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 21 g Müller-Hinton-Brühe</li> <li>▪ 1,2 g Bacto-Agar</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> <li>▪ + 2 % NaCl je nach Versuchsanordnung</li> </ul>

Nährmedium	Bestandteile
Müller-Hinton-Brühe (MH--Brühe)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 21 g Müller-Hinton-Brühe</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> <li>▪ (je nach Versuchsanordnung + 2 % NaCl)</li> </ul>
Purple-Agar mit N-Acetyl-D-Glucosamin-Zusatz	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 31 g Purple-Agar Base</li> <li>▪ ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O aufgefüllt</li> <li>▪ 2,6 % N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc)</li> <li>▪ pH 6,8</li> </ul>

### 5.2.5. Übersicht über verwendete Reagenzien

**Tabelle 9:** Tabellarische Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien

Reagenzien	Bestandteile
PBS-Puffer (phosphate buffered saline)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 8,5 g NaCl,</li> <li>▪ 0,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,</li> <li>▪ 0,75 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1000 ml H<sub>2</sub>O;</li> <li>▪ pH 7,4</li> </ul>
NaCl-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 2,5 M NaCl,</li> <li>▪ 50 mM Tris,</li> <li>▪ 50 mM EDTA,</li> <li>▪ pH 7,0</li> </ul>
TE-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1 mM EDTA</li> <li>▪ 10 mM Tris - HCL</li> <li>▪ pH 8,0</li> </ul>
TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 90 mM Tris</li> <li>▪ 90 mM Borsäure</li> <li>▪ 2,5 mM EDTA</li> <li>▪ pH 8,0</li> </ul>

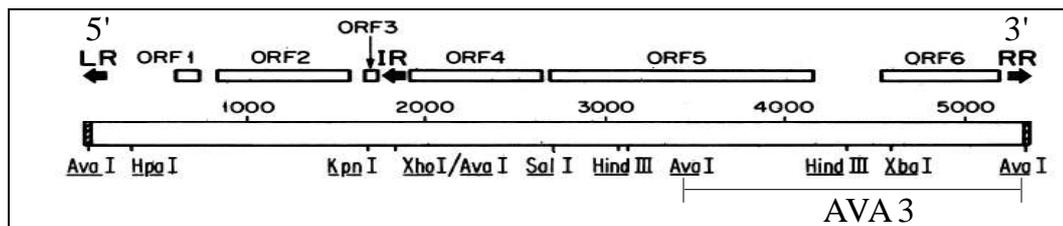
Reagenzien	Bestandteile
DNA-Ladepuffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bromphenolblau 0,25 %</li> <li>▪ Xylen Cyanol FF 0,25 %</li> <li>▪ Ficoll 15 %</li> </ul>
Ethidiumbromid-Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ethidiumbromidlösung mit 10 mg/ml in dH<sub>2</sub>O</li> </ul> <p>Verwendung ohne Sterilisation</p>
20xSSC	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ NaCl 3,0 M</li> <li>▪ Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,3 M</li> <li>▪ pH 7,0</li> </ul>
Bouin's Fixierlösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 0,5 g Picrinsäure 37,5 ml H<sub>2</sub>O</li> <li>▪ 12,5 ml 37 %iges Formaldehyd</li> <li>▪ 2,5 ml 96 %ige Essigsäure</li> </ul>
Hybridisierungslösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1 mM EDTA</li> <li>▪ 0.16 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,</li> <li>▪ 0.34 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> <li>▪ 7 % SDS</li> <li>▪ (pH 7.2),</li> </ul>
Waschlösung 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1 mM EDTA</li> <li>▪ 12.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2)</li> <li>▪ 27.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,</li> <li>▪ 5 % SDS</li> </ul>
Waschlösung 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1 mM EDTA,</li> <li>▪ 12.6 mM NaH<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (pH 7.2),</li> <li>▪ 27.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,</li> <li>▪ 1 % SDS</li> </ul>

## Verwendete DNA- Sonden

### AVA3: 3' Fragment von Tn917.

Die Genfragmente wurden freundlicherweise von Herrn Dr. med. Knobloch bereitgestellt. Die Herstellung erfolgte über *AvaI*-Restriktion eines Tn917 tragenden Plasmides. Das Transposon Tn917 enthält insgesamt mehrere *AvaI*-Restriktionslokalisationen. Nach Restriktion entsteht am 5'-Ende von Tn917 ein Fragment von 1720 Basen, das mittlere Fragment umfasst 1254 Basen, das 3'-Ende des Transposons ergibt ein 2270 Basen umfassendes Fragment. Das letztgenannte Fragment wurde für die Herstellung einer Tn917-spezifischen DNA-Sonde verwendet und als AVA3 bezeichnet. Abbildung 3 zeigt die Lokalisation des als Sonde benutzten DNA-Abschnittes in Tn917.

**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Transposons Tn917 mit Markierung der Lokalisation der AVA3- DNA- Sonde. Zeichnung nach (Shaw et al. 1985)



### *mecA* spezifische DNA-Sonde:

Zum Nachweis des *mecA*-Genabschnittes in *S. epidermidis* 1057 und den korrespondierenden Transduktanten verwendeten wir eine *mecA*-spezifische DNA-Sonde. Diese wurde unter Verwendung eines 1,071 kb großen *XbaI/PstI*-Fragments des Plasmides pBBB85 hergestellt. pBBB85 enthält ein 4,2 kb großes *HindIII*-Fragment, welches den *mecA*-Genlokus des *S. aureus*-Stammes BB270 beinhaltet und in den *E. coli-S.aureus* shuttle Vektor, Plasmid pGC-2, kloniert worden ist. pBBB85 wurde freundlicherweise von B. Berger-Bächi zur Verfügung gestellt (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich, Schweiz).

### 5.2.6. Für Transduktion verwendete Bakteriophagen:

Bakteriophage 71

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von V. T. Rosdahl , Statens Seruminstitut, Kopenhagen, Dänemark.

### 5.2.7. Bakterienstämme dieser Arbeit

**Tabelle 10:** Auflistung der in dieser Arbeit benutzten *S. epidermidis*-Stämme

<i>S. epidermidis</i> Stamm	Herkunft	Bezug
1457wt	Zentralvenenkatheter, Wildtypstamm	diese Arbeit,  klinische Isolate des Institutes für medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Hamburg
10160wt	Blutkultur, Wildtypstamm	
10730wt	Blutkultur, Wildtypstamm	
10248wt	Blutkultur, Wildtypstamm	
8400wt	Blutkultur, Wildtypstamm	
1057wt	Zentralvenenkatheter, Wildtypstamm	
8188wt	Blutkultur, Wildtypstamm	
9142wt	Blutkultur Wildtypstamm	
1457M10	Tn917-Mutante, chromosomale Tn917- Insertion	
1457M12		
1457M13		
1457M15		
1457 M17		
1457M16		
1457M20		
1057M10		
1057 M12		
1057M13		

<i>S. epidermidis</i> Stamm	Herkunft	Bezug
1057M15		
1057M17		
1057M16		
1057M20		
8400 M10	Transduktante, chromosomale Tn917 Insertion	diese Arbeit
8400 M12		
8400 M13		
8400 M15		
8400 M16		
8400 M17		
8400 M20		
10248 M10	Transduktante, chromosomale Tn917 Insertion	diese Arbeit (Nedelman et al. 1998)
9142 M10		
8188 M10		
10160M10		

Auflistung der in dieser Arbeit benutzten *S. epidermidis*-Stämme, die Bezeichnung wt steht für Wildtypstamm. BK für Isolat aus einer Blutkultur, ZK für Isolat von einem infizierten Zentralvenenkatheter. Teilweise sind Verweise auf Veröffentlichungen, die diese Stämme als Gegenstand haben, aufgeführt. Stämme mit dem Bezug "diese Arbeit" sind im Rahmen dieser Dissertationsarbeit entstanden.

### Verwendete *S. aureus*-Stämme

**Tabelle 11:** Auflistung der in dieser Arbeit benutzten *S. aureus*-Stämme

<i>S. aureus</i> -Stamm	Verwendung	Bezug
<i>S. aureus</i> Cowan I	Protein A vermittelte Bindung von Antikörpern	(Kessler 1975)

### 5.2.8. Lagerung der Stämme:

Alle Stämme wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Als Einfriermedium diente 1,5 % Bacto Peptone ad 100 ml  $\text{dH}_2\text{O}$  + 60 ml Glycerin. Beide Bestandteile wurden getrennt autoklaviert und dann steril miteinander vermischt.

## 5.3. Methoden:

### 5.3.1. Resistenztestung mittels Agardiffusionstest

#### Lösungen:

0,9% NaCl-Lösung

Von frischen Übernachtskulturen auf Blutagarplatten wurden Zellsuspensionen (MCFarland 0,5 in 0,9%iger NaCl-Lösung) angefertigt und anschließend mittels eines Wattestäbchens auf Müller-Hinton-Agarplatten dünn aufgetragen. Jede Platte wurde mit jeweils sechs kommerziell erhältlichen antibiotikahaltigen Filterplättchen bestempelt. Die Inkubationszeit betrug 18 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Die sich je nach Sensibilität gegenüber dem zu testenden Chemotherapeutikum bildenden Hemmhöfe wurden ausgemessen und zur phänotypischen Charakterisierung des Stammes tabellarisch fixiert. Diese Resistenztestung wurde zur Detektion von eventuellen Kontaminanten benutzt.

### 5.3.2. Biofilmtestung:

Referenzen: (Christensen et al. 1985; Mack et al. 1992)

#### Lösungen:

1. Gentiana-Violettlösung
2. Bouin's Fixierlösung:
3. PBS-Puffer (phosphat buffered saline)
4.  $\text{TSB}_{\text{BBL}}$

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden Wildtypstämme und Transduktanten auf die Expression von Biofilm untersucht. Der Test wurde mit frischen Übernachtskulturen der zu testenden Stämme durchgeführt. Es wurde eine Kolonie von der Platte abgepickt und in 2 ml  $\text{TSB}_{\text{BBL}}$  ohne Glukose suspendiert. Nach Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 5-6 Stunden im Schüttelinkubator wurden von dieser Flüssigkultur 1:100 Verdünnungen mit  $\text{TSB}_{\text{BBL}}$  hergestellt. 200  $\mu\text{l}$  der Verdünnungen wurden anschließend in jeweils 4 Vertiefungen einer 96-Loch-Zellkulturplatte pipettiert. Es

folgte eine Inkubation für 20 bis 22 Stunden bei 37° C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten „ausgeschlagen“ (relativ kräftig auf ein saugfähiges Material geschleudert), so dass sich die Flüssigkeit aus den Löchern der Platte entleerte. Danach wurde jedes Loch viermal mit PBS-Puffer gespült und nach jedem Spülvorgang wieder erneut ausgeschlagen. Anschließend wurden die Platten bei 37° C im Brutschrank für mindestens vier Stunden getrocknet. Zur Anfärbung des Biofilmes wurde je 50 µl Gentiana-Violettlösung in jede Vertiefung der getrockneten Platte pipettiert und dort für 5 min. belassen. Anschließend wurde die Platte erneut ausgeschlagen, viermal mit Leitungswasser gewaschen und bei Raumluft getrocknet. Die quantitative Messung des Biofilmes erfolgte mit einem Photometer (ELISA Processor II, Fa. Behring) bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm im evaluation mode 3. Eine gemessene Extinktion größer oder gleich 0,1 wurde als biofilmpositiv bewertet.

### 5.3.3. Mukoidtestung auf Purple Agar

#### **Lösungen:**

1. Purple Agar
2. mit Zusatz von 2,6% N-Acetyl-D-Glucosamin

Die Mukoidtestung wurde für weitergehende phänotypische Charakterisierungen benutzt. Mukoid entspricht einer Schleimsubstanz, welche viele biofilmpositive *S. epidermidis*-Stämme beim Wachstum auf Purple Agar entwickeln. Voraussetzung ist jedoch eine Supplementierung des Mediums mit N-Acetyl-D-Glucosamin. Mukoidpositive Stämme bilden erhabene und feuchtglänzende Kolonien, während mukoid-negative *S. epidermidis*-Stämme flache, trockene Kolonien zeigen. Die Zugabe von N-Acetyl-D-Glucosamin kann Mukoidproduktion induzieren. Die Konzentration an N-Acetyl-D-Glucosamin, welche eine maximale Mukoidproduktion bedingt, ist je nach Stamm variabel. Der in dieser Arbeit getestete Stamm 1057wt zeigte eine maximale Mukoidbildung bei einer N-Acetyl-D-Glucosamin-Konzentration von 2,6 %. Bei der Testung wurde jeweils eine Transduktante mit dem korrespondierenden Wildtypstamm auf einer Platte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37° C für 48 Stunden.

#### 5.3.4. Mikrodilutionstest zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

**Referenzen:** (NCCLS 2002)

**Lösungen:**

1. Müller-Hinton-Brühe + 2 % NaCl
2. Oxacillin, gelöst

Von einer frischen Übernachtskultur in Müller-Hinton-Brühe, supplementiert mit 2 % NaCl, wurde eine Verdünnung, mit einer Endkonzentration von  $10^5$  CFU/ml hergestellt. Hierzu erfolgte zunächst eine photometrische Messung der Bakteriensuspension und Verdünnung auf eine  $OD_{578}$  von 0,5. Vorherige Titrationsversuche ergaben, dass dies einer CFU/ml von  $10^8$  entspricht. Diese Suspension wurde dann weiter auf eine Endkonzentration von  $10^5$  CFU/ml verdünnt und in Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wurde eine zuvor hergestellte Oxacillinlösung zupipettiert, so dass eine geometrisch abfallende Oxacillinkonzentrations-Reihe entstand. Getestet wurde mit folgenden Konzentrationen: 1024 µg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml und 0 µg/ml (Wachstumskontrolle).

Danach erfolgte eine Inkubation im Brutschrank für 48 h bei 35° C. Die Ergebnisse wurden nach 24 Stunden und 48 Stunden abgelesen.

### 5.3.5. Koagglutinationstest zur Quantifizierung von PIA

**Referenzen:** (Mack et al. 1992)

**Lösungen:**

1. Lsg 1: 0,05 % /wt / vol )  $\text{NaN}_3$  in PBS
2. TSB ohne Glukose
3. PBS Puffer

#### Extraktion von PIA

Von dem zu untersuchenden Stamm wurde eine Übernachtskultur im Schüttelinkubator ( $37^\circ\text{C}$ , 100 rpm ) unter Verwendung von TSB<sub>BBL</sub> ohne Glukose als Nährmedium hergestellt. Zwei Zellkulturschalen der Fa. Nunc (Roskilde) wurden anschließend jeweils mit 100  $\mu\text{l}$  der Schüttelkultur und 10 ml TSB<sub>BBL</sub>-Lösung versehen. Nach einer Inkubationszeit von 22 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  wurde das Nährmedium vorsichtig entfernt. Auf dem Boden der Platte hatte sich ein Bakterienrasen gebildet, der mit einem Zellschaber abgeschabt wurde. Nach Resuspendierung in 5 ml PBS-Puffer und Zentrifugation bei 3000 rpm für 15 min. wurden die erhaltenen Pellets erneut in PBS-Puffer aufgenommen. Um die Zellmenge der einzelnen Suspensionen verschiedener Stämme vergleichen zu können, wurden diese mittels photometrischer Messung auf eine  $\text{OD}_{578}$  von 2,5 eingestellt.

Zur Herstellung des PIA-Rohextraktes aus den Zellsuspensionen wurden diese im Eisbad mit einem Ultraschallzertrümmerer zweimal für jeweils 30 Sekunden beschallt. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 15 min) wurde der Überstand zur Entfernung der Zellfragmente abpipetiert und in ein Eppendorfhütchen überführt. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation für 1 Stunde bei  $4^\circ\text{C}$  und 14000 rpm. Der verbleibende Überstand, welcher den PIA-Rohextrakt enthält, wurde vorsichtig abpipetiert und mittels eines Sterilfilters (Porengröße  $0,2\ \mu\text{m}$ ) von letzten Zelltrümmern gereinigt.

#### *S. aureus* Cowan I-Präparation

Der Stamm *S. aureus* ist durch das mit seiner Zellmembran fest verbundene Protein A in der Lage, Antikörper mittels Anbindung an den  $\text{F}_c$ -Teil der Immunglobuline zu binden. Diese Eigenschaft wird in diesem Test später genutzt, indem sich mit PIA beladene Immunglobuline an das Protein A anlagern.

Eine Übernachtkultur von *S. aureus* Cowan I wurde für 10 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in Lösung 1 zweimal gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in Lösung 1 (Lsg 1) mit einem 1,5 %igen Zusatz von Formaldehyd fixiert. Hierzu wurde die Lösung für 120 min. nach Zusatz der Zellen auf einem Magnetrührer gemischt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min. bei 6000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einer 10%igen Suspension von Lsg 1 für fünf Minuten in einem auf 80° C angeheizten Wasserbad inkubiert und anschließend im Eisbad gekühlt. Nach erneutem zweimaligem Waschen in einer 10 %igen Suspension von Lösung 1, wurden die Zellen bei -80° C verwahrt.

#### Herstellung eines Koagglutinationsreagenzes

1 ml *S. aureus* Cowan I Präparation wurde nach Reinigung durch dreimaliges Waschen in Lsg 1 mit 100 µl anti-PIA-Kaninchenserum vermischt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Danach erfolgte nochmals eine Reinigung durch dreimaliges Waschen in Lsg 1. Die gereinigte Lösung wurde dann mit Lsg 1 auf 10 ml aufgefüllt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4° C. Die Haltbarkeit des Reagenzes betrug so ca. 10 Tage.

#### Koagglutinationstest

15 µl des Reagenzes wurden mit 5 µl des PIA-Extraktes auf einem Objektträger miteinander vermischt. Die Suspension wurde dann unter leichtem Schwenken drei Minuten inkubiert und, gegen einen dunklen Hintergrund gehalten, abgelesen. Als positiv wurde eine Agglutination, sichtbar an der Ausfällung der Agglutinate, bewertet. Als Negativkontrolle wurde die Testung des Koagglutinationsreagenzes mit einem entsprechenden Puffer durchgeführt. Zur Quantifizierung des PIA-Titers wurden die Proben in Verdünnungsreihen untersucht. Als Antigentiter wurde die höchste Verdünnungsstufe bezeichnet, bei der noch eine positive Reaktion stattfand.

### 5.3.6. Durchführung einer Transduktion mit Phage 71

Referenzen: (Swanstrom et al. 1951; Kayser 1972; Rosendorf et al. 1974; Poston et al. 1977; De Saxe et al. 1978)

Herstellung eines Phagenlysates

Lösungen:

1. Nutrient Broth No. 2
2. STA-Agar + Calciumchlorid
3. STA- Soft Agar (0,7%Agar)
4. BHI-Brühe + 40 mM NaCitrat
5. BHI-Brühe + 20 mM NaCitrat
6. BHI-Softagar
7. 1 M Natriumcitrat

Zunächst wurde eine Kultur des Donorstammes in Nutrient Broth No. 2 für mindestens drei Stunden bei 37° C im Schüttelbrutschrank inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Kultur mittels eines Photometers gemessen. Ziel war eine optische Dichte von ca. 0,3 OD<sub>578</sub>. 1,0 ml dieser Bakteriensuspensionen wurden dann zu 800 µl des Phagenlysates pipettiert und mit 3 ml 46° C warmen STA-Softagar vermischt. Anschließend wurde der Softagar auf einer STA-Agarplatte ausgegossen. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37° C für 18 Stunden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde auf jede der Platten 5 ml Nutrient Broth No. 2 pipettiert und der Soft-Agar mit einem Spatel vorsichtig abgeschabt. Nährlösung und abgeschabter Softagar wurden dann in ein 50 ml Röhrchen der Fa. Falcon (Falcontube) überführt. Um die Phagen aus dem Softagar in die Nährlösung zu überführen, wurde das Falcontube mit seinem Inhalt ca. 1 min heftig geschüttelt. Es erfolgte danach eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm. Der Überstand wurde abpipettiert, nochmals bei 3000 rpm für 10 min, erneut vorsichtig vom Sediment getrennt und anschließend steril filtriert. (Porengröße 0,2 µm). Die so erhaltenen Phagenlysate hatten einen Phagentiter zwischen 10<sup>8</sup> und 10<sup>10</sup> PFU/ml.

### Plaquetitration der erhaltenen Phagenlysate

Die im vorigen Schritt erhaltenen Lysate wurden in Nutrient Broth No.2 verdünnt. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-2}$ - $10^{-8}$  angefertigt. 400  $\mu$ l des entsprechend verdünnten Phagenlysates wurden dann zusammen mit 4 ml auf 46° C abgekühlten STA-Softagar und 1 ml eines empfänglichen Bakterienstammes auf einer STA-Agarplatte ausplattiert. Danach erfolgte eine Bebrütung für 18 Stunden bei 30° C im Brutschrank. Die nach Inkubation sichtbaren Plaques wurden danach zur Berechnung der PFU/ml ausgezählt.

### Transduktion auf den gewünschten Empfängerstamm

Zur Transduktion wurden nur frische Übernachtskulturen der Empfängerstämme verwendet. Die Kulturen wuchsen dabei auf Blutagarplatten. Zunächst wurden die Zellen in 6 ml Nutrient Broth No. 2 + Calciumchlorid suspendiert. Durch UV-Bestrahlung des Phagenlysates sollte die Chance chromosomaler Transposoninsertionen erhöht werden. Aus diesem Grunde wurden die für die Transduktion ausgewählten Phagenlysate für 90 Sekunden mit UV-Licht bestrahlt. (UV-Leuchte 30 Watt, Fa. NIS, 30 cm Abstand) Kurz vor Zugabe der Phagenlysate wurden die Bakteriensuspensionen für 180 Sekunden auf 56° C erhitzt. Durch diese Maßnahme ließen sich bei *S. epidermidis* 1057 höhere Transduktionsfrequenzen erzielen. Durch die kurzzeitige Erwärmung werden zelluläre Abwehrmechanismen gedämpft, die eine erfolgreiche Transduktion sonst verhindern könnten. Nach der kurzen Erhitzung wurden die Suspensionen zügig durch Kühlung im Eisbad wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

Nach Abschluss der Bestrahlung wurden 0,5 ml der gewünschten Phagenlysate zu 1 ml der entsprechenden Bakteriensuspensionen der Empfängerstämme gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C. Die Absorption der Phagenpartikel wurde durch Zugabe von 40 ml 1 M Natriumcitrat gestoppt und die Bakterien für 15 min. bei 3000 rpm und 4° C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das am Boden anhaftende Pellet anschließend einmalig mit eiskalter BHI-Brühe + 40 mM NaCitrat und zweimalig mit eiskalter BHI-Brühe+20mM NaCitrat gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in BHI-Brühe+20 mM NaCitrat für 3-4 Stunden bei 37° C inkubiert.

Tn917 beinhaltet eine *erm*-kodierte Erythromycinresistenz. Dies wurde als Selektionsmerkmal ausgenutzt. Nur erfolgreich transduzierte Zellen mit chromosomaler Tn917-Insertion wuchsen in den mit Erythromycin supplementierten Nährmedien.

Die Suspensionen wurden mit jeweils 3 ml BHI-Softagar, der 20 mM Nacitrat und 10 µg/ml Erythromycin enthielt, auf BHI-Agarplatten mit 10 µg/ml Erythromycin ausplattiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37° C im Brutschrank für 48 Stunden. Als Negativkontrolle zum Ausschluss einer Kontamination wurden jeweils 0,5 ml des benutzten Phagenlysates zu 1 ml Nutrient Broth No. 2 + Calciumchlorid pipettiert und anschließend ebenfalls inkubiert.

### 5.3.7. Southern-Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden

**Referenzen:** (Sambrook et al. 1989), Herstellerangaben zum Umgang mit den Restriktionsendonukleasen.

#### Präparation chromosomaler DNA

##### **Lösungen:**

1. NaCl-Puffer
2. 7 % SDS (Natrium - Dodecylsulfat)
3. Chloropan: Chloroform/Isoamylalkohol 24 : 1
4. TE-Puffer
5. 3 M Na-Acetat, pH 7,0
6. 96 % Ethanol
7. PY-Brühe + 1 % Glycin
8. Lysostaphin

Es wurde zunächst der zu testende Stamm in 10 ml PY-Brühe + 1 % Glycin bei 37° C im Schüttelinkubator über ca. 12-16 Stunden inkubiert. 4 ml dieser Vorkultur wurden anschließend in 400 ml PY-Brühe + 1% Glycin verimpft und erneut für 20 bis 24 Stunden im Schüttelinkubator bei 37° C belassen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 6000 rpm für 15 min. bei Raumtemperatur (Sorvall Zentrifuge, GS3 Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3 ml NaCl-Puffer aufgenommen. Zur Zellyse wurde anschließend 100 µl Lysostaphin (1500 U/ml) und 2,5 µl RNase (0,5 mg/ml Fa. Boehringer) hinzugegeben und für ca. 3 Stunden bei 37° C inkubiert. Danach wurden 3 ml 7 %iges SDS zu den lysierten Zellen pipettiert und 30 min auf Eis gelagert. Es erfolgte dann die Zugabe von 7 ml Chloropan und nach vortexen eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden, bis die Auftren-

nung in 3 Phasen erfolgt war. Nach 30 minütiger Zentrifugation mit 4000 rpm bei Raumtemperatur, wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abpipetiert und in ein neues Gefäß überführt. Der Überstand wurde mit 0,1 vol einer 3 M Na-Acetat Lösung versetzt. Nach Zugabe von 2 vol 96 %igem Ethanol wurde die in der Interphase ausgefallene DNA mit einer gebogenen Pasteurpipette aufgewickelt und kurz luftgetrocknet. Die DNA wurde dann in 500 µl TE-Puffer überführt und dann bei 37° C innerhalb von vier Stunden im Puffer gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4° C. Unter diesen Bedingungen war die DNA über Monate verwendbar.

### Verdau der DNA mittels Restriktionsendonukleasen

#### **Lösungen:**

1. One-phor-all-plus-Buffer
2. TE-Puffer zur Verdünnung
3. Restriktionsenzyme

Um zu gewährleisten, dass die einzelnen Reaktionsgemische (DNA-Probe und Restriktionsendonuklease) relativ zu einander die in etwa gleichen DNA-Konzentrationen enthielten, wurde vor dem Verdau jede DNA-Probe ohne Zugabe von Restriktionsendonukleasen auf einem kleinen Gel für ca. 2 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand des anschließend angefertigten Photos wurden dann Proben mit einer hohen DNA-Konzentrationen den übrigen Proben durch Verdünnung mittels TE-Puffer angeglichen.

Anschließend wurde der Reaktionsverdau angesetzt: Ca. 5 U der Restriktionsendonuklease, One-phor-all-plus-Buffer und 0,5-1 µg der zu testenden DNA bildeten dabei das Reaktionsgemisch. Für alle Enzyme war eine Inkubationstemperatur von 37° C für ca. 3 Stunden notwendig. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung des Verdau auf Agarosegelen.

## Elektrophoretische Auftrennung der verdauten DNA-Proben

### Lösungen:

1. DNA-Ladepuffer
2. TBE-Puffer(Tris-Borat-EDTA-Puffer)
3. Ethidiumbromid-Lösung
4. DNA-Marker: Hind III gespaltene  $\lambda$ -Phagen DNA  
Größe der Fragmente: (Basenpaare):  
23131, 9419, 6559, 4361, 2322, 2023, 564, 125

Wir verwendeten für die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Proben Agarosegele. Zur Herstellung wurde 0,7 %ige SeaKem-Agarose durch Aufkochen in TBE-Puffer gelöst. Die ca. 60° C warme Agarose wurde mit 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid versetzt, so dass die DNA bereits während der Elektrophorese gefärbt wurde.

Die Agaroselösung wurde in eine Horizontalgelkammer gegossen und bis zur Erstarrung abgekühlt. Wir verwendeten insgesamt zwei Größen von Gelen. Das kleinere hatte eine Laufstrecke von 7,5 cm, das größere eine von 17 cm. Nach Verfestigung des Gels wurde die Gelkammer solange mit TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel mit ca. 1 mm Puffer bedeckt war. Von den zu untersuchenden DNA-Proben wurden jeweils 22  $\mu\text{l}$  (großes Gel) bzw. 18  $\mu\text{l}$  (kleines Gel) in eine Geltasche pipettiert und mit 2  $\mu\text{l}$  DNA-Ladepuffer versetzt. Die beiden äußeren Geltaschen wurden mit der HindIII- $\lambda$ -DNA als Größenmarker beladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 5 V/cm für vier Stunden bzw. 1 V/cm über Nacht durchgeführt. Das Gel wurde danach auf einem UV-Transilluminator mit einer Sofortbildkamera fotografiert.

## Southernblotting von DNA auf Nitrozellulosemembranen

### Lösungen:

1. 0,5M NaOH

Für die spätere Hybridisierung der DNA war das Überführen der DNA auf Nitrozellulosemembranen notwendig. Die Überführung findet bei dem hier benutzten Verfahren durch Kapillarkräfte statt. Hierfür wurden zwei Plastikschalen mit 0,5 M NaOH gefüllt. Zwischen beide Schalen wurde eine Glasplatte gelegt, auf die Filterpapiere aufgelegt wurden. Diese überragten die Glasplatte und reichten auf beiden Seiten in die mit NaOH gefüllten Schalen, so dass sich die Papiere rasch mit NaOH vollsogen. Das Agaro-

segel wurde faltenfrei auf die Filterpapiere aufgelegt und anschließend die Nitrozellulosemembran blasenfrei aufgetragen. Die Ränder des Gels wurden mit Zellophanfolie abgedeckt, um ein seitliches austreten der NaOH-Lösung zu verhindern. Auf die Membran wurde dann mit NaOH getränktes Filterpapier und anschließend mehrlagig Zellstoff aufgelegt. Abschließend wurde zum Beschweren und zum Aufbau eines gleichmäßigen Druckes eine Glasplatte auf den Zellstoff gelegt, die wiederum mit einer kleineren, flüssigkeitsgefüllten Flasche beschwert wurde. Man beließ die ganze Anordnung für 16 Stunden. Die Membran wurde anschließend 2 x mit SSC gewaschen und anschließend die DNA bei 80° C fixiert.

### Southern-Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde

#### **Lösungen:**

1. Hybridisierungslösung
2. Waschlösung 1 (Wash I)
3. Waschlösung 2 (Wash II)

Eine zuvor hergestellte radioaktiv markierte DNA-Sonde (siehe Kapitel 5.3.8) wurde zunächst für 30 min bei 80° C zur Denaturierung inkubiert. Zunächst erfolgte eine Prähybridisierung der Membran in 50 ml Hybridisierungslösung für 20 min bei 65° C im Schwenkwasserbad. Danach wurde die benutzte Hybridisierungslösung verworfen, die Schale erneut mit 50 ml Hybridisierungslösung versehen und die Membran hinzugefügt. Anschließend wurde die DNA-Sonde hinzugegeben und der gesamte Ansatz für 16 Stunden bei 65° C im Schwenkwasserbad hybridisiert. Nach Abschluss der Hybridisierung erfolgte die Waschung der Membran jeweils zweimal in Wash I und Wash II für jeweils 20 min bei 65° C im Schwenkwasserbad. Die so behandelte Membran wurde dann in Folie eingeschweißt und auf einen Film aufgelegt (Kodak X-Omat). Die Belichtungszeit war abhängig von der Anreicherung der zu untersuchenden Membran und der radioaktiven Aktivität der Sonde. Meistens war eine Belichtungszeit zwischen 6-12 Stunden bei -80° C notwendig. Nach Abschluss der Belichtung wurde der Film dann in einem Crurix 2425 Entwickler der Fa. Agfa entwickelt.

### 5.3.8. Herstellung von spezifischen DNA-Sonden

**Referenzen:** Herstellerangaben (GeneCleanII-Kit)

**Lösungen:**

1. 3 M NaI
2. TBE-Modifizier
3. Glasmilch
4. NEW WASH-Lösung
5. TE-Puffer

Eine DNA-Probe wurde enzymatisch mit der gewünschten Restriktionsendonuklease verdaut und auf einem mit Ethidiumbromid angefärbten Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde dann mit einem sterilen Skalpell das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel herausgetrennt und in ein Eppendorfhütchen überführt. Das Volumen wurde anschließend durch Auswiegen bestimmt. Dabei entsprechen 1 mg Agarose ca. 1 ml H<sub>2</sub>O. Es wurde anschließend das 0,5 fache Volumen des TBE-Modifiziers und das 4,5fache Volumen einer 3M NaI Lösung hinzugegeben. Dann erfolgte eine Inkubation im Wasserbad bei 50° C.

Die folgenden Arbeitsschritte bis zum nächsten Absatz wurden bei einer Temperatur von 4° C durchgeführt. 5 µl der gut suspendierten Glasmilch wurden zu der DNA pipettiert und beides im Vortexer gemischt. Ziel war es, die DNA an die Glasmilch anbinden zu lassen. Hierfür war eine Inkubationszeit von 5 min. notwendig. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Suspension für 2 min. in einer Zentrifuge bei 12000 rpm zentrifugiert. Es erfolgte danach ein dreimaliger Waschvorgang mit NEW-Wash-Lösung. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die NEW-Wash-Lösung verworfen. und das Pellet, bestehend aus der an die Glasmilch gebundenen DNA, in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

Um die DNA jetzt wieder von der Glasmilch abzulösen, wurde die Suspension in einem Wasserbad für 3 min bei 55° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 15000 rpm. Im Überstand befand sich jetzt die gewünschte DNA, das Pellet bestand aus der Glasmilch und wurde verworfen. Der Überstand mit der DNA wurde in ein neues steriles Eppendorfhütchen pipettiert und bei – 20°C gelagert.

Radioaktive Markierung von DNA-Sonden mit [<sup>32</sup>P]dCTP

**Referenzen:** Herstellerangaben (Ready-to-go DNA-Labeling Kit)

**Lösungen:**

1. TE-Puffer
2. Hybridisierungslösung
3. Waschlösung 1
4. Waschlösung 2

Im Rahmen dieser Arbeit wurden radioaktiv markierte Sonden zur Darstellung der chromosomalen Tn917-Insertion und des *mecA*-Genes von *S. epidermidis* 1057 verwendet.

Zunächst wurden 25 bis 50 ng der DNA in 45 µl TE-Puffer gelöst und bei 95° C für 15 min. denaturiert. Danach wurde die Probe kurz auf Eis gestellt und zentrifugiert. Anschließend wurde der TE-Puffer mit dem denaturierten Plasmid gemäß den Herstellerangaben auf das Ready-To-go-Kit pipettiert. Dann wurde zur Markierung der DNA das [<sup>32</sup>P] markierte dCTP hinzugegeben und für 15 min. bei 37° C inkubiert. Nach Reinigung über eine Mini-Sephadex-Säule (Entfernung der Restnukleotide) wurde die fertige Sonde bei -20° C verwahrt.

### 5.3.9. Pulsfeldgelelektrophorese

Die Pulsfeldgelelektrophoresen wurden von Dr. med. H.-A. Elsner vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf durchgeführt. Bei den Untersuchungen wurde ein CHEF-DR II System verwendet. (Fa. Bio-Rad, München). Die Benutzung erfolgte unter Anwendung eines Standardprotokolls (Schwarzkopf et al. 1993).

### 5.3.10. Testung der Methicillinresistenz

Populationsanalysen mittels oxacillinhaltigen Müller-Hinton-Agarplatten

**Referenzen:** (Tomasz et al. 1991; Mack et al. 2002)

**Lösungen:**

1. Müller-Hinton-Brühe + 2 % NaCl
2. Müller-Hinton-Agar+ 2 % NaCl
3. Oxacillin

Zur Populationsanalyse wurden Müller-Hinton-Agarplatten, supplementiert mit 2 % NaCl, mit definierten Mengen eines Oxacillinzusatzes hergestellt (0 µg/ml Agar, 1 µg/ml Agar, 2,5 µg/ml Agar, 6 µg/ml Agar, 12,5 µg/ml Agar, 25 µg/ml Agar, 50 µg/ml Agar, 100 µg/ml Agar, 200 µg/ml Agar und 400 µg/ml Agar). Von den zu testenden Transduktanten und dem Wildtypstamm wurde dann von einer frischen Übernachtskultur eine Bakteriensuspension mit einer  $OD_{578}$  von 0,5 in Müller-Hinton-Brühe hergestellt. Um eine Auszählbarkeit der Kolonien zu gewährleisten, wurden die Bakteriensuspensionen verdünnt ausplattiert. Die Verdünnungsstufen variierten je nach zu testender Transduktante aufgrund der teilweise ausgeprägt unterschiedlichen Expression der Methicillinresistenz.

Jede Platte wurde mit 100 µl Bakteriensuspension versehen. Dabei wurde die Verdünnung zunächst auf die Agarplatte pipettiert, welche zuvor auf einen Drehteller aufgesetzt worden war. Die Zellsuspension wurde durch Aufsetzen eines sterilen Glasspatels auf die Agaroberfläche, bei gleichzeitiger Drehung des Tellers, gleichmäßig auf der Platte verstrichen. Jeder getestete Stamm wurde pro Versuchsreihe jeweils dreimal auf diese Weise ausplattiert. Danach erfolgte eine Inkubation bei 37° C für 48 Stunden. Die Kolonien wurden danach ausgezählt. Aus den drei resultierenden Koloniezahlen pro getesteten Stamm wurde der Mittelwert gebildet und die CFU/ml in ein Diagramm mit logarithmischer Skalierung eingetragen. Bei jeder Testung einer Transduktante wurde der Wildtypstamm mitgetestet und mit der Transduktante direkt verglichen.

## Testung auf Oxacillingradientenplatten

### Lösungen:

1. Müller-Hinton-Brühe + 2 % NaCl
2. Müller-Hinton-Agar+ 2 % NaCl
3. Oxacillin

Nachteil der oben beschriebenen Methode war es, dass die getesteten Stämme (Wildtypstamm vs. Transduktante) nicht direkt auf einer Platte wuchsen. Um die Stämme unter möglichst gleichen Bedingungen miteinander vergleichen zu können, wählten wir eine Austestung auf Gradientenplatten. Dabei sollte die Konzentration an Oxacillin von einer Seite der Platte zur anderen kontinuierlich ansteigen. Die Platten wurden aus diesem Grunde zweizeitig gegossen. Zunächst wurde eine Seite der Platte auf einer schiefen Ebene mit ca. 10° Neigung plaziert. Es wurden nun 38 ml Müller-Hinton-Agar + 2 % NaCl mit einer Oxacillinkonzentration von 100 µg/ml Agar in die Schale gegossen. An der erhöhten Seite der Platte bestand dabei noch eine schmale Stelle, die nicht mit Agar benetzt war. Nach Auskühlen des Agars wurde die Platte wieder gerade gestellt und die gleiche Menge Müller-Hinton-Agar + 2 % NaCl, diesmal jedoch ohne Oxacillinzusatz, auf den ausgehärteten Agar gegossen. Als Resultat erhielt man eine Zellkulturplatte, die auf einer Seite 0 µg Oxacillin/ml Agar und auf der anderen Seite 100 µg/ml aufwies. Zwischen diesen Konzentrationsbereichen stieg die Konzentration an Oxacillin kontinuierlich an.

Von den zu testenden Transduktanten und dem Wildtypstamm wurden frische Übernachtskulturen auf Blutagarplatten angefertigt. Diese wurden dann in Müller-Hinton-Brühe suspendiert, so dass man eine Suspension mit einer  $OD_{578}$  von 0,5 erhielt. Diese Suspension wurde dann jeweils mit Müller-Hinton-Brühe 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Danach wurden mittels eines Wattestäbchens die Verdünnungen in parallelen Bahnen auf die Platte aufgetragen (siehe Photos im Ergebnisteil dieser Arbeit). Die Inkubation erfolgte über 48 Stunden bei 37° C.

## 6. Ergebnisse

### 6.2. Vorbemerkung

Zu Beginn dieser Arbeit lagen die Mutanten M10, M13, M15, M17, M16 und M20 des *S. epidermidis*-Stammes 1457 vor. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit war, bis auf bei den Mutanten der Klasse I, noch keine Klonierung und Sequenzierung der an das Transposon angrenzenden chromosomalen DNA-Abschnitte vorgenommen worden. In Tabelle 3 (Seite 31) werden die wichtigsten phänotypischen Merkmale der in dieser Arbeit verwendeten Mutanten nochmals zusammengefasst. Bei den geplanten Transduktionen sollten die oben aufgeführten Mutanten von *S. epidermidis* 1457 als Donorstämme fungieren.

Alle Transposoninsertionsstellen der ausgewählten Mutantenklassen haben nachgewiesen Auswirkungen auf die Biofilm- und PIA-Produktion. Von Interesse war es nun, ob eine oder mehrere Insertionsstellen, im genetischen Background eines *mecA*-positiven *S. epidermidis*-Stammes, Einfluss sowohl auf die Methicillinresistenz als auch die Biofilm- und PIA-Produktion haben. In zurückliegenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gelang eine Adaptierung des Phagen 71 auf den Stamm 1457, so dass dieser für die geplanten Transduktionen in dieser Arbeit verwendet wurde (Mack et al. 1994).

### 6.3. Transduktion einer Klasse I Tn917-Insertion in verschiedene unabhängige *S. epidermidis*-Stämme

Um zu überprüfen, ob mit dem ausgewählten Phagen 71 problemlose Transduktionen in mehrere unabhängige *S. epidermidis*-Stämme möglich sind, sollte zunächst Tn917 unter Verwendung von 1457M10 in verschiedene klinische Isolate transduziert werden. Als Empfängerstämme wurden die Isolate 8188, 1057, 10160, 10248 und 10730 ausgewählt (siehe Tabelle 10 und Tabelle 12).

Bei der Auswahl der Empfängerstämme war eine Sensibilität gegenüber Erythromycin von Bedeutung, da die durch Tn917 kodierte Erythromycinresistenz bei erfolgreich transduzierten Zellen ein Selektionsmerkmal darstellte. *S. epidermidis* 1057 und 10248 waren zusätzlich methicillinresistent. Die weiteren phänotypischen Eigenschaften sind in Tabelle 3 (Seite 31) aufgeführt. Als Kontrollstamm wurde zusätzlich auf *S. epidermidis* 1457 transduziert.

Nach Herstellung eines Phagenlysates auf 1457M10 wurde Tn917 nach dem unter Kapitel 5.3.6 beschriebenen Verfahren auf die oben genannten *S. epidermidis*-Stämme transduziert. Das benutzte Phagenlysat hatte einen Phagentiter von  $2,1 \times 10^9$  PFU/ml. Um Kontaminationen des Phagenlysates ausschließen zu können, wurden 0,5 ml des Phagenlysates als Negativkontrolle ebenfalls auf jeweils zwei BHI-Platten mit Erythromycinzusatz ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37° C blieben die Kontrollplatten ohne Zellwachstum. Bis auf den *S. epidermidis*-Stamm 10730 war eine Transduktion bei allen verwendeten Empfängerstämmen möglich. Die Transduktionsfrequenz der einzelnen Transduktanten ist in Tabelle 12 aufgeführt. Phänotypisch zeigten alle Transduktanten einen biofilmmnegativen Phänotyp und eine neue, durch Tn917 kodierte, Makrolidresistenz (siehe Tabelle 13).

Die genotypische Charakterisierung erfolgte mittels Southern-Blot-Hybridisierung der chromosomalen DNA mit der [<sup>32</sup>P]dCTP-markierten, Tn917-spezifischen DNA-Sonde AVA3. Als Zeichen einer erfolgreichen Transposoninsertion hybridisierte die Sonde mit der chromosomalen DNA aller erhaltenen Transduktanten. Die als Negativkontrolle ebenfalls mit der gleichen Sonde hybridisierte DNA der Wildtypstämme zeigte hingegen kein Signal. (siehe Abbildung 4, Seite 63)

## Tabellen und Bildmaterial zu Kapitel 6.3

**Tabelle 12:** Transduktion von M10 in verschiedene unabhängige *S. epidermidis*-Stämme.

Wildtypstämme	Koloniefarbe	Methicillinresistenz	Erythromycinresistenz	Biofilm TSB <sub>BBL</sub> OD <sub>570nm</sub>	
1457	weiß	sensibel	sensibel	>2,5	
8188	weiß	sensibel	sensibel	>2,5	
1057	weiß	resistent	sensibel	>2,5	
10160	weiß	sensibel	sensibel	>2,5	
10248	weiß	resistent	sensibel	>2,5	
10730	weiß	sensibel	sensibel	>2,5	
M10 Transduktanten	Koloniefarbe	Methicillin-resistenz	Erythromycinresistenz	Biofilm TSB <sub>BBL</sub> OD <sub>570nm</sub>	Transduktionsfrequenz
1457M10	weiß	sensibel	resistent	0,01	$7,0 \times 10^{-9}$
8188M10	weiß	sensibel	resistent	0,01	$1,9 \times 10^{-9}$
1057M10	weiß	resistent	resistent	0,01	$6,6 \times 10^{-9}$
10160M10	weiß	sensibel	resistent	0,02	$0,5 \times 10^{-9}$
10248M10	weiß	resistent	resistent	0,01	$1,0 \times 10^{-9}$
10730	Transduktion nicht möglich				

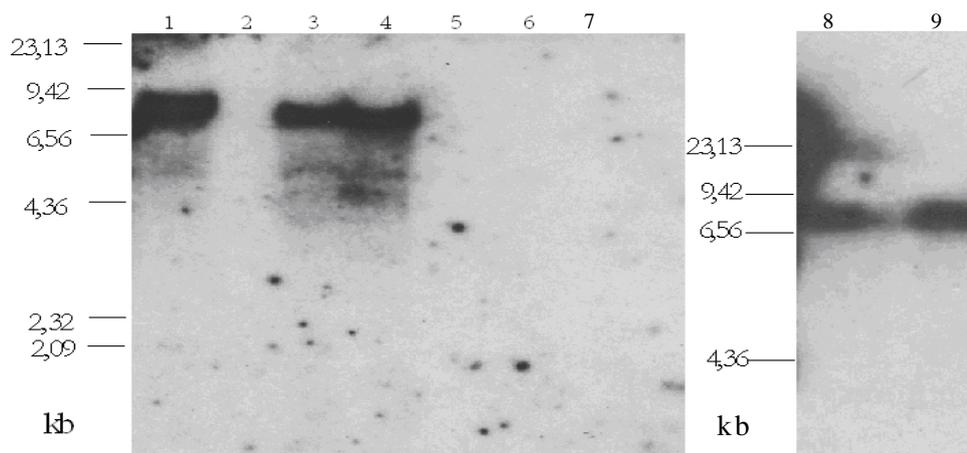
Die neue Erythromycinresistenz ist Tn917 kodiert. Siehe bitte Kapitel 6.3 Die Transduktionsfrequenz ist definiert als die Anzahl der Transduktanten pro Plaque forming unit (PFU) des Phagenlysates. Je höher die Transduktionsfrequenz ist, desto effizienter ist die Transduktion abgelaufen.

**Tabelle 13:** Hemmhofdurchmesser in mm der *S. epidermidis*-Stämme 8188, 1057, 10160, 10248, 1457 und korrespondierenden Transduktanten im Agardiffusionstest

Antibiotikum/ Stamm	P 1 0	G M 1 0	C 3 0	F M 1 0 0	FO 5	N N 1 0	E 1 5	NET 3 0	C C 1 0	CIP 5	SXT	T E 3 0
8188	12	24	28	24	20	26	26	26	30	30	22	32
8188M10	12	26	26	28	20	26	0	26	0	30	22	32
1057	15	19	33	31	25	12	30	31	34	32	15	12
1057M10	15	17	30	29	23	10	0	30	0	30	14	11
10160	16	30	26	26	26	26	28	28	30	32	16	28
10160M10	15	30	28	26	26	26	0	28	0	32	16	28
10248	10	8	22	22	12	0	26	16	26	20	0	24
10248M10	10	8	26	22	12	0	0	18	0	22	0	22
1457	36	30	30	32	30	30	30	30	35	32	30	35
1457M10	35	30	30	30	30	29	0	30	0	31	30	34

Die neue Makrolidantibiotika-Resistenz (Erythromycin=E15; Clindamycin=CC10) ist Tn917 kodiert.

**Abbildung 4:** Autoradiographien: *EcoRI* verdaute chromosomale DNA nach Hybridisierung mit der Tn917-spezifischen, [<sup>32</sup>P]dCTP-markierten DNA-Sonde AVA3



(1)8188M10, (2)8188, (3)10248M10, (4)10160M10, (5)10160, (6)10248wt, (7) 1057, (8) 1057M10, (9)1457M10

#### **6.4. Charakterisierung des *S. epidermidis*-Stammes 1057wt**

Die *S. epidermidis*-Stämme 1057 und 10248 waren beide methicillinresistent. Aufgrund höherer Transduktionsfrequenzen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Phagen 71 wählten wir 1057 für die weiteren Versuche aus (siehe Tabelle 12).

*S. epidermidis* 1057 konnte von einem infizierten zentralen Venenkatheter isoliert werden. Der Keim war methicillinresistent und wies die für die spätere Selektion notwendige Sensibilität gegenüber Erythromycin auf. Nach Inkubation auf Blutagarplatten zeigten die Kolonien eine hellweiße Farbe. 1057 war biofilm- und mukoidbildend (siehe Tabelle 20 und Abbildung 10).

Mittels eines Mikrodilutionstestes wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) gegenüber Oxacillin bestimmt. Diese ist definiert als die Mindestkonzentration einer Substanz, die das Wachstum des zu testenden Organismus gerade noch zu hemmen vermag. Als Nährmedium verwendeten wir Müller-Hinton-Brühe mit 2 %igem NaCl-Zusatz. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden bei 35° C. Abgelesen wurde die MHK nach 24 und 48 Stunden. Nach 24 Stunden betrug diese 256 µg/ml, nach 48 Stunden 512 µg/ml. Die chromosomale DNA von 1057 hybridisierte mit einer *mecA*-spezifischen DNA-Sonde. Es handelte sich somit bei 1057 um eine *mecA* kodierte Methicillinresistenz (siehe Abbildung 5). In den Populationsanalysen zeigte der Stamm eine heterogene Expression der Methicillinresistenz (siehe Kapitel 6.9.2).

#### **6.5. Transduktion von sechs verschiedenen Tn917-Insertionslokalisationen in *S. epidermidis* 1057, 1457 und 8400**

Für die folgenden Transduktionen wurden Phagenlysate auf den Donorstämmen *S. epidermidis* 1457M10, M12, M13, M15, M16, M17 und M20 hergestellt. Die Titer der benutzten Phagenlysate sind in Tabelle 14 angeführt. Bis auf die Klasse I Mutanten, M10 und M13, befand sich bei allen Mutanten die Insertionslokalisation von Tn917 außerhalb des *icaADBC*-Genlokus. Als Kontrolle transduzierten wir parallel mit demselben Phagenlysat auf die beiden oxacillinsensiblen *S. epidermidis*-Stämme 1457 und 8400.

Die phänotypischen Eigenschaften der *S. epidermidis* 1057 Transduktanten sollten mit denen von 1457 und 8400 Transduktanten aus demselben Transduktionsversuch verglichen werden. Die verschiedenen Tn917-Insertionen waren im genetischen Background von *S. epidermidis* 1457 schon gut charakterisiert, so dass die Analyse ausgewählter phänotypischer Merkmale Rückschlüsse auf eine erfolgreiche chromosomale Tn917-Insertionen geben konnte. Nach jeder Transduktion wurden deshalb die erhaltenen Transduktanten betreffend Koloniemorphologie, Biofilmbildung und Resistenzverhalten phänotypisch charakterisiert. Die erfolgreiche chromosomale Transposoninsertion wurde mittels Southern-Blot-Hybridisierung unter Verwendung der Tn917-spezifischen, [<sup>32</sup>P]dCTP-markierten DNA-Sonde AVA3 nachgewiesen. Aufgrund der relativ geringen Transduktionsfrequenzen bei Transduktion auf 1057 waren hochtitrige Phagenlysate mit Titern von 10<sup>9</sup> bis 10<sup>10</sup> PFU/ml notwendig (siehe Tabelle 14, Tabelle 15 und Tabelle 16).

Alle Transduktanten zeigten die für ihre jeweilige Tn917-Insertionsklasse erwarteten phänotypischen Veränderungen (Tabelle 3, Seite 31). So exprimierten alle die durch Tn917 kodierte neue Makrolidantibiotika-Resistenz (siehe Tabelle 17, Tabelle 18 und Tabelle 19). Die Klasse I Mutanten waren biofilmnegativ, Klasse III und IV schwach biofilmpositiv und die Klassen V und VI stark biofilmpositiv. Die Transduktanten der Klasse II differierten reproduzierbar in graue und weiße Phasenvarianten auf. Diese Beobachtung galt für alle M12 Transduktanten von 1457, 1057 und 8400. Die Transduktanten der Klasse II waren, wie erwartet, biofilmnegativ. Nach *EcoRI*-Verdau der chromosomalen DNA und Southern-Blot-Hybridisierung mit der [<sup>32</sup>P]dCTP markierten, Tn917-spezifischen DNA-Sonde AVA3, zeigte sich für alle Transduktanten ein Signal auf *EcoRI*-Fragmenten erwarteter Größe. Bei 1057M13 bestand ein kleineres *EcoRI*-Fragment als bei 1457 und 8400. Dies ist durch einen *EcoRI*-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus innerhalb des *ica*-Genlokus bei *S. epidermidis* erklärbar und wird im Diskussionsteil dieser Arbeit noch eingehender besprochen.

Nach *EcoRI*-Verdau der chromosomalen DNA und Southern-Blot-Hybridisierung mit einer [<sup>32</sup>P]dCTP markierten *mecA*-spezifischen DNA-Sonde, zeigten der Wildtypstamm und alle Transduktanten ein Signal auf einem *EcoRI*-

Fragment gleicher Größe. Eine Größenänderung des EcoRI-Fragmentes hatte sich also nach Transduktion nicht ergeben. Eine Tn917-Insertion in *mecA* war damit unwahrscheinlich (siehe Abbildung 5).

### **6.6. Mukoidtestung der Klasse V und VI Transduktanten**

Die Klasse V und VI Mutanten sind in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bereits aufgefallen, da diese auf mit N-Acetyl-D-Glucosamin supplementierten peptonhaltigen Medien Biofilm aber kein Mukoid ausbildeten. Um zu überprüfen, ob auch 1057M16 und 1057M20 bei bestehender Biofilmproduktion unter diesen Bedingungen kein Mukoid bilden und damit dem Phänotyp der entsprechenden 1457 Mutanten entsprechen, testeten wir diese beiden Transduktanten auf Purple Agar mit einem N-Acetyl-D-Glucosamin-Zusatz. Parallel kontrollierten wir den Phänotyp von 1457M16 und 1457M20. Die Konzentration an N-Acetyl-D-Glucosamin für eine optimale Mukoidbildung variierte von Stamm zu Stamm. Bei 1057wt zeigte sich bei einer Konzentration von 2,6 % N-Acetyl-D-Glucosamin die stärkste Mukoidproduktion. 1457 hingegen exprimierte Mukoid bei 1,6 % am stärksten. Die Klasse V und VI Transduktanten zeigten sowohl in 1057 als auch in 1457 den erwarteten biofilmpositiven und mukoidnegativen Phänotyp (siehe Abbildung 10).

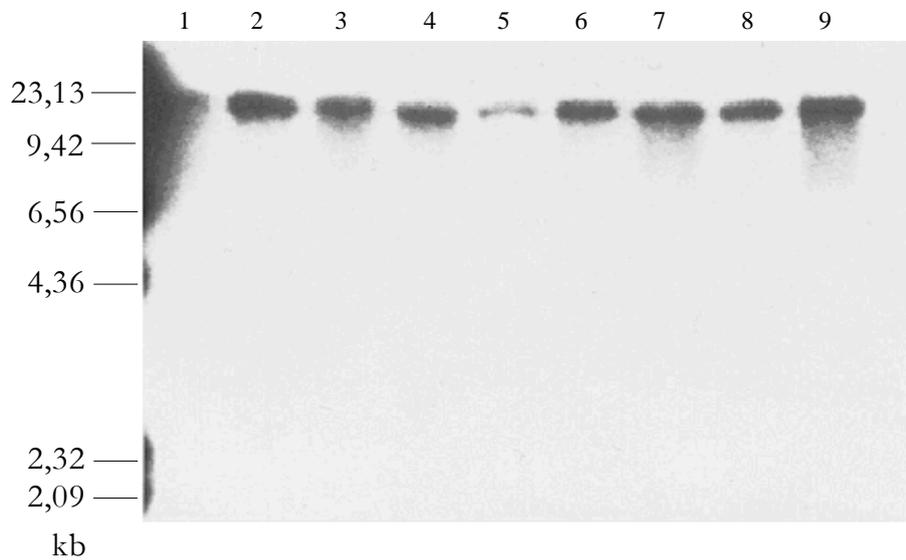
### **6.7. PIA-Expression von *S. epidermidis* 1057 und korrespondierenden Transduktanten**

Die PIA-Expression von *S. epidermidis* 1057 und 1457 sowie den korrespondierenden Transduktanten wurde, wie in Kapitel 5.3.5 beschrieben, quantitativ bestimmt. Die Testung wurde unter Verwendung von TSB<sub>BBL</sub> durchgeführt. *S. epidermidis* 1057 war in diesen Tests ein schwächerer PIA-Produzent als 1457. Die PIA-Titer der 1057-Transduktanten waren dementsprechend ebenfalls geringer als die der entsprechenden Transduktanten im genetischen Background von 1457. Wie erwartet, zeigten die Klassen III, IV, V und VI Transduktanten beider Stämme einen PIA-positiven Phänotyp. Die übrigen Trans-

duktanten waren alle PIA-negativ (siehe Tabelle 21). Die PIA-Titer der *S. epidermidis* 8400-Transduktanten wurden nicht bestimmt.

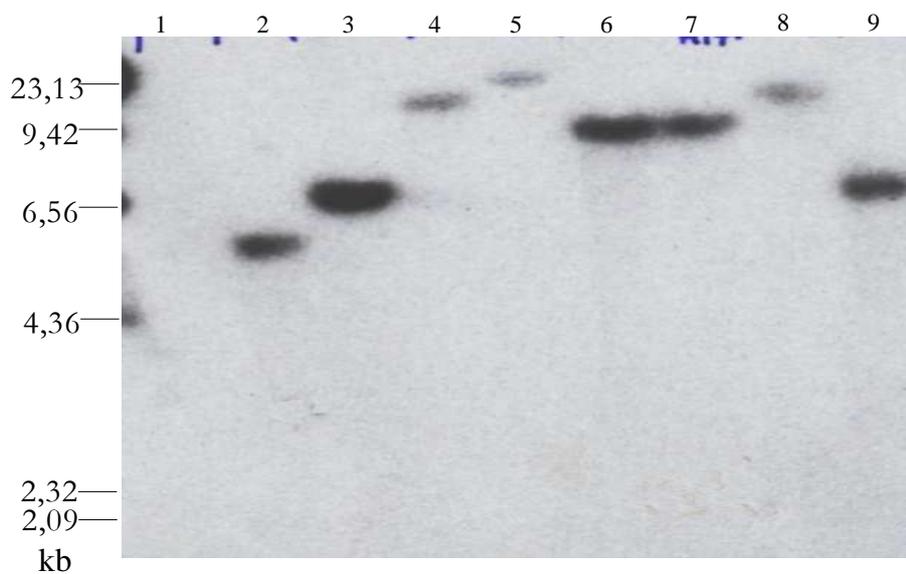
Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 6.5 und 6.6

**Abbildung 5:** Autoradiographien *EcoRI* verdauter chromosomaler DNA nach Hybridisierung mit einer *mecA*-spezifischen, [<sup>32</sup>P]dCTP-markierten DNA-Sonde



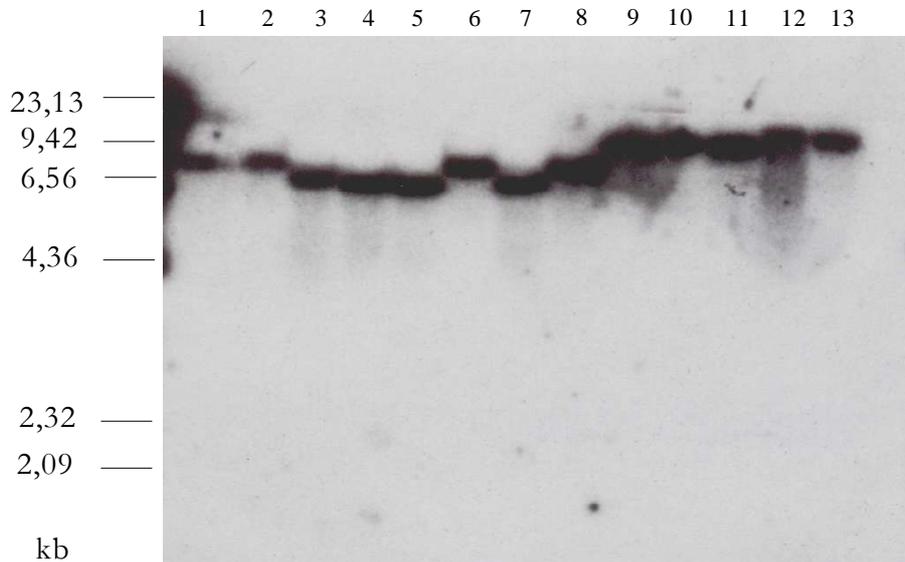
(1)1057wt, (2)1057M10, (3)1057M12, (4)1057M13, (5)1057M15, (6)1057M16, (7)1057M17, (8)1057M15, (9)1057M20.

**Abbildung 6:** Autoradiographien *EcoRI* verdauter chromosomaler DNA nach Hybridisierung mit der Tn917 spezifischen, [<sup>32</sup>P] dCTP-markierten DNA-Sonde AVA3



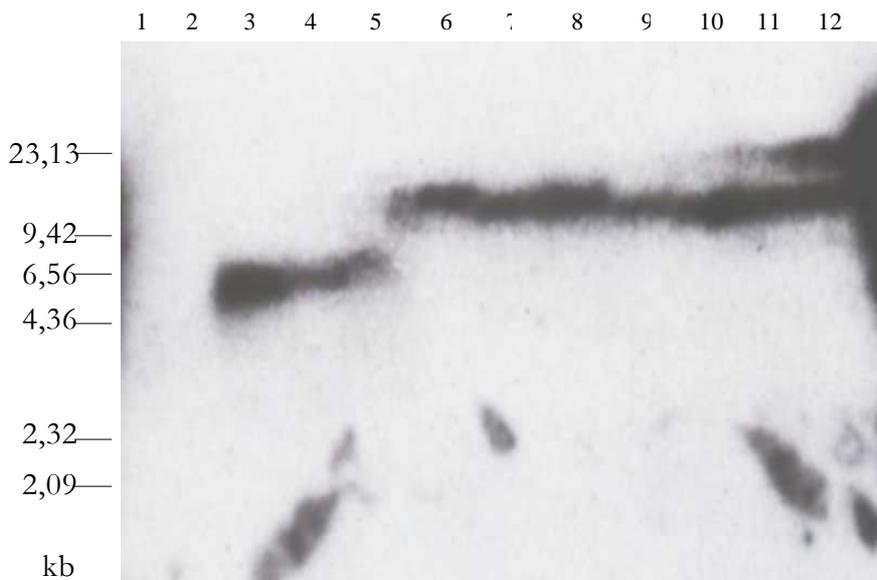
(1)1057wt, (2)1057M12, (3)1057M10, (4)1057M15; (5)1057M16 (6) 1057M17, (7) 1057M17, (8)1057M15, (9)1057M20

**Abbildung 7:** Autoradiographien: *EcoRI* verdauter chromosomaler DNA nach Hybridisierung mit der Tn917-spezifischen, [<sup>32</sup>P]dCTP-markierten DNA-Sonde AVA3



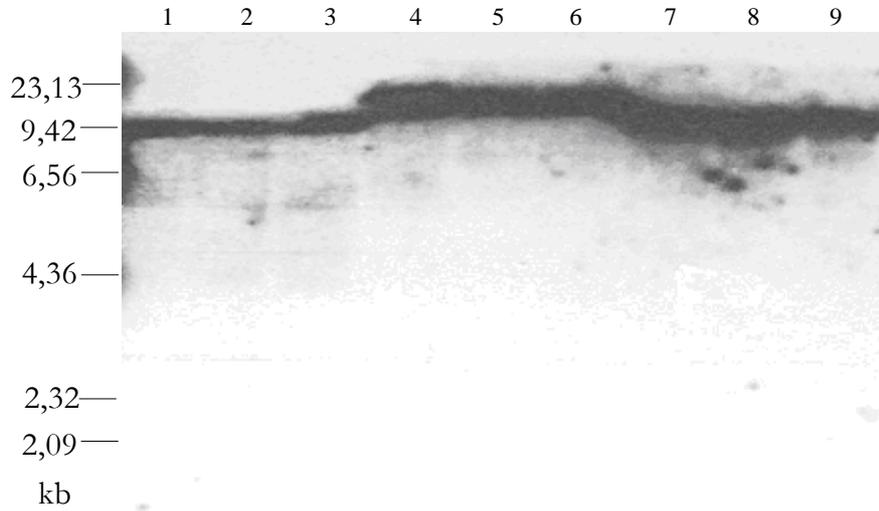
(1)1457M10, (2)1057M10, (3)1457M12, (4)1057M12, (5)8400M12, (6)1457M13, (7)1057M13, (8)8400M13, (9)1457M15 (10)1057M15 (11)8400M15, (12)1457M16, (13)1057M16. Bei der Insertion der Transduktante 1057M13 besteht ein Restriktionsfragementlängenpolymorphismus .

**Abbildung 8:** Autoradiographien *EcoRI* verdauter chromosomaler DNA nach Hybridisierung mit der Tn917-spezifischen, [<sup>32</sup>P] dCTP-markierten DNA-Sonde AVA3



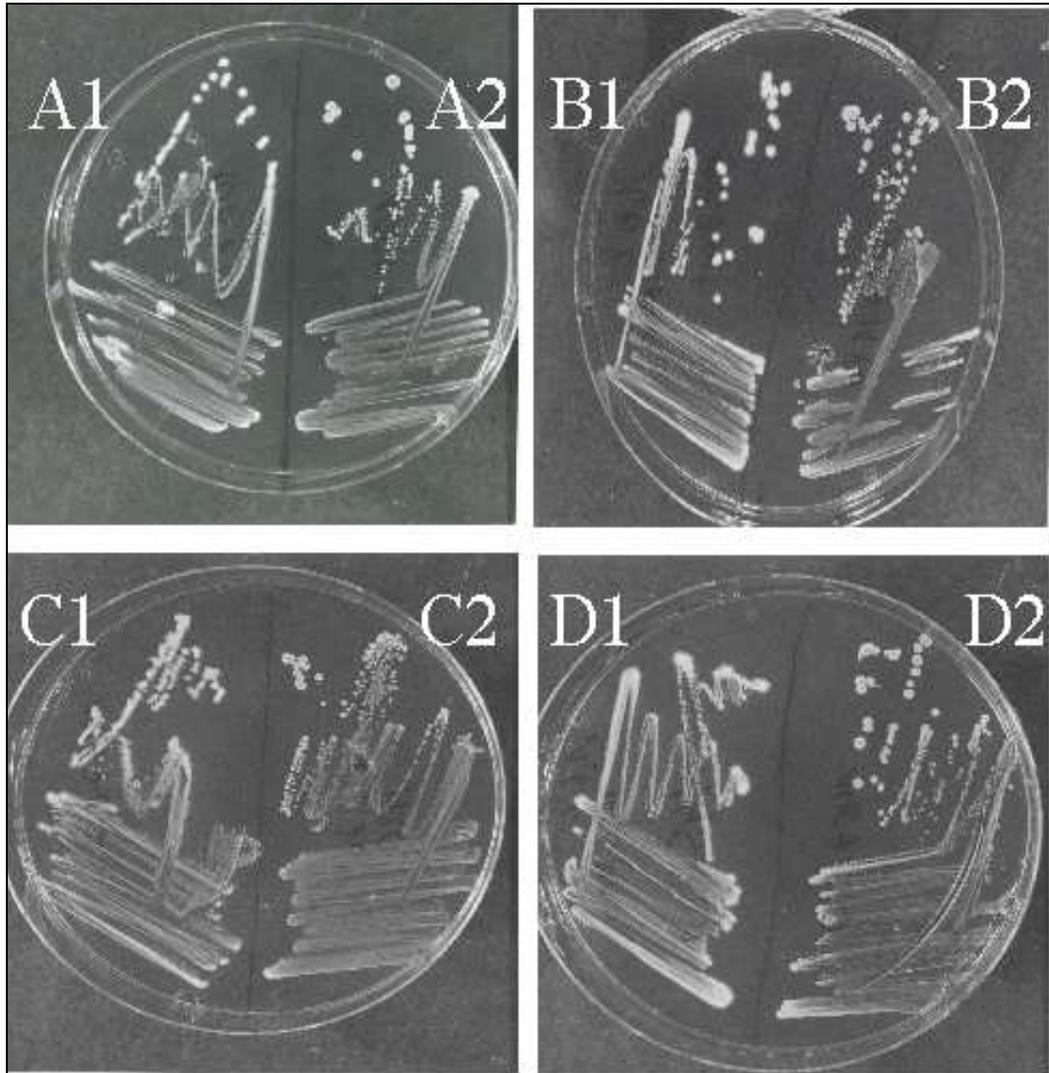
(1)1057wt, (2)8400wt, (3)8400M20, (4)1057M20, (5)1457M20, (6)8400M15, (7)1057M15, (8)1457M15, (9)8400M17, (10)1057M17, (11)1057M17, (12)1457M17

**Abbildung 9:** Autoradiographien: *EcoRI* verdaute chromosomale DNA nach Hybridisierung mit der Tn917 spezifischen, [<sup>32</sup>P] dCTP-markierten DNA-Sonde AVA3



(1)1457M17, (2)1057M17, (3)8400M17, (4)1457M16, (5)1057M16, (6)8400M16,  
(7)1457M15, (8)1057M15, (9)8400M15

**Abbildung 10:** Mukoidbildung auf Purple Agar, supplementiert mit N-Acetyl-D-Glucosamin



A1/A2 und C1/C2 sind mit 2,6%; B1/B2 und D1/D2 mit 1,6% N-Acetyl-D-Glucosamin supplementiert. (A1)1057wt mukoidpositiv, (A2)1057M16 mukoidnegativ, (B1)1457wt mukoidpositiv, (B2)1457M16 mukoidnegativ, (C1)1057wt mukoidpositiv, (C2) 1057M20 mukoidnegativ, (D1)1457wt mukoidpositiv, (D2)1457M20 mukoidnegativ

**Tabelle 14:** Titer der benutzten Phagenlysate bei Transduktion von Tn917 in *S. epidermidis* 1057 unter Angabe der Transduktionsfrequenz

Phagenlysate	Titer des Phagenlysates (PFU/ml)	resultierende Transduktante	Transduktionsfrequenz
M10	$4,0 \times 10^9$	1057M10	$6,6 \times 10^{-9}$
M13	$4,0 \times 10^9$	1057M13	$3,0 \times 10^{-9}$
M12	$1,7 \times 10^{10}$	1057M12	$1,4 \times 10^{-9}$
M15	$8,1 \times 10^9$	1057M15	$9,9 \times 10^{-10}$
M17	$1,2 \times 10^{10}$	1057M17	$1,0 \times 10^{-8}$
M16	$1,4 \times 10^{10}$	1057M16	$6,1 \times 10^{-9}$
M20	$1,3 \times 10^{10}$	1057M20	$3,4 \times 10^{-9}$

**Tabelle 15:** Titer der benutzten Phagenlysate bei Transduktion von Tn917 in *S. epidermidis* 1457 unter Angabe der Transduktionsfrequenz.

Phagenlysate	Titer des Phagenlysates (PFU/ml)	Resultierende Transduktante	Transduktionsfrequenz
M10	$4,0 \times 10^9$	1457M10	$7 \times 10^{-9}$
M13	$4,0 \times 10^9$	1457M13	$5,4 \times 10^{-8}$
M12	$1,2 \times 10^{10}$	1457M12	$1,7 \times 10^{-8}$
M15	$8,1 \times 10^9$	1457M15	$3,1 \times 10^{-9}$
M17	$1,2 \times 10^{10}$	1457M17	$1,2 \times 10^{-8}$
M16	$1,7 \times 10^{10}$	1457M16	$1,9 \times 10^{-8}$
M20	$1,3 \times 10^9$	1457M20	$2,3 \times 10^{-7}$

**Tabelle 16:** Titer der benutzten Phagenlysate bei Transduktion von Tn917 in *S. epidermidis* 8400 unter Angabe der Transduktionsfrequenz.

Phagenlysat	Titer des Phagenlysates (PFU/ml)	Resultierende Transduktante	Transduktionsfrequenz
M10	$4,0 \times 10^9$	8400M10	$6,3 \times 10^{-9}$
M13	$4,0 \times 10^9$	8400M13	$3,7 \times 10^{-9}$
M12	$1,2 \times 10^{10}$	8400M12	$4,8 \times 10^{-9}$
M15	$8,1 \times 10^9$	8400M15	$6,5 \times 10^{-9}$
M17	$1,2 \times 10^{10}$	8400M17	$1,2 \times 10^{-9}$
M16	$1,7 \times 10^{10}$	8400M16	$3,1 \times 10^{-9}$
M20	$1,3 \times 10^9$	8400M20	$1,2 \times 10^{-8}$

**Tabelle 17:** Hemmhofdurchmesser in mm von 1057wt und korrespondierenden Transduktanten im Agardiffusionstest.

Antibiotikum/Stamm	P10	GM 10	C30	FM 100	FO5	NN 10	E15	NET 30	CC 10	CIP 5	SXT	TE 30
1057wt	15	19	33	31	25	12	30	31	34	32	15	12
1057M10	15	17	30	29	23	10	0	30	0	30	14	11
1057M12	14	17	30	30	23	9	0	31	0	28	15	11
1057M13	16	19	30	34	25	12	0	30	0	34	14	12
1057M15	13	16	29	30	23	10	0	30	0	34	14	12
1057M17	14	16	28	28	23	12	0	31	0	29	15	11
1057M16	13	19	28	30	17	10	0	29	0	26	15	11
1057M20	12	20	28	30	20	10	0	30	0	30	18	12

Die neue Makrolidantibiotika-Resistenz (Erythromycin=E15; Clindamycin=CC10) ist Tn917 kodiert.

**Tabelle 18:** Hemmhofdurchmesser von 1457wt und korrespondierenden Transduktanten im Agardiffusionstest.

Antibiotikum/ Stamm	P10	GM 10	C30	FM 100	FO5	NN 10	E15	NET 30	CC 10	CIP 5	SXT	TE 30
1457wt	36	30	30	32	30	30	30	30	35	32	30	35
1457M10	35	30	30	30	30	29	0	30	0	31	30	34
1457M12	36	30	30	30	30	30	0	30	0	30	30	33
1457M13	35	30	31	30	30	30	0	29	0	30	30	33
1457 M15	36	30	30	31	30	31	0	29	0	30	30	35
1457 M17	35	31	31	30	30	30	0	30	0	31	30	33
1457 M 16	36	30	30	31	30	30	0	29	0	30	30	31
1457 M 20	36	31	30	30	30	30	0	30	0	30	30	30

Die neue Makrolidantibiotika-Resistenz (Erythromycin=E15; Clindamycin=CC10) ist Tn917 kodiert.

**Tabelle 19:** Hemmhofdurchmesser von 8400wt und korrespondierenden Transduktanten im Agardiffusionstest.

Antibiotikum/ Stamm	P10	GM 10	C30	FM 100	FO5	NN 10	E15	NET 30	CC 10	CIP 5	SXT	TE 30
8400wt	12	22	30	32	32	26	30	26	30	30	30	0
8400M10	12	22	30	26	30	26	0	26	0	30	30	0
8400M12	12	22	32	26	29	26	0	28	0	32	30	0
8400M13	12	24	26	26	28	26	0	26	0	30	30	0
8400M15	12	22	26	28	30	26	0	28	0	30	32	0
8400M16	14	22	26	26	30	28	0	26	0	30	30	0
8400M17	12	22	26	26	32	26	0	26	0	30	30	0
8400M20	12	22	26	26	30	28	0	26	0	30	30	0

Die neue Makrolidantibiotika-Resistenz (Erythromycin=E15; Clindamycin=CC10) ist Tn917 kodiert.

**Tabelle 20:** Tabellarische Auflistung von Biofilmbildung und Koloniefarbe der Wildtypstämme. 1457wt, 1057wt, 8400wt und ihren korrespondierenden Transposonmutanten der Klasse I-VI

Klasse/ Transduktante	Biofilmbildung TSB <sub>BBL</sub>			Koloniefarbe		
	1057	1457	8400	1057	1457	8400
Wildtyp	>2,5	>2,5	>2,5	weiß	weiß	Weiß
M10	0,06	0,06	0,05	weiß	weiß	weiß
M13	0,02	0,02	0,04	weiß	weiß	weiß
M12	0,05(w)/ 0,05	0,03(w)/ 0,02	0,01(w)/ 0,01 (g)	weiß/ grau	weiß/ grau	weiß/ grau
M15	<b>0,11</b>	<b>0,12</b>	<b>0,32</b>	weiß	weiß	weiß
M17	<b>0,28</b>	<b>0,31</b>	<b>0,28</b>	weiß	weiß	weiß
M16	<b>0,77</b>	<b>1,44</b>	>2,5	weiß	weiß	weiß
M20	<b>0,65</b>	<b>1,8</b>	>2,5	weiß	weiß	weiß

Biofilmpositive Messwerte sind fett unterlegt. Die Klasse II differierte in eine graue(g) und weiße(w) Phasenvariante auf.

**Tabelle 21:** Tabellarische Auflistung der PIA-Expression von *S. epidermidis* 1057 und 1457 sowie den korrespondierenden Transduktanten.

Stamm	PIA-Produktion in TSB <sub>BBL</sub>	Stamm	PIA-Produktion in TSB <sub>BBL</sub>
1057wt	64	1457wt	1024
1057M10	0	1457M10	0
1057M13	0	1457M13	0
1057M12	0	1457M12	0
1057M15	4 (sehr schwach)	1457M15	32
1057M16	64	1457M16	1024
1057M17	16	1457M17	256
1057M20	64	1457M20	1024

Angegeben ist der reziproke Wert des PIA-Antigentiters. Dieser wurde als die höchste Verdünnungsstufe des Antiserums ermittelt, bei der noch eine positive, makroskopisch sichtbare Koagglutination stattfand.

## 6.8. Charakterisierung der M12-Transduktanten

Die Transduktanten der Klasse II (M12) zeigten betreffend Koloniemorphologie und Biofilmtestung Merkmale, die sie von den anderen Mutantenklassen deutlich unterschieden.

1457M12, 8400M12 und 1057M12 zeigten phänotypisch unmittelbar nach der Transduktion eine weiße Koloniefarbe. Nach einigen Passagierungen auf Blutagarplatten differenzierten sich jedoch zwei Arten von Koloniemorphologien heraus: Neben der weißen zeigte sich reproduzierbar eine graue Subkolonie. Separierte man die weißen und die grauen Kolonien auf getrennte Platten, so differenzierten diese Subkolonien erneut in die zwei vorbeschriebenen Varianten auseinander. Die weißen und grauen Kolonien zeigten im Biofilmtest einen biofilmmnegativen Phänotyp. Die grauen Kolonien waren kaum in flüssigen Nährmedien zu suspendieren, da die Zellen stets in groben Klumpen adhärirten. Der weiße Kolonietyp ließ sich hingegen problemlos in Suspension bringen. Antibiotogramme vom Wildtypstamm und von den M12-Transduktanten zeigten, bis auf die von Tn917-kodierte Makrolidresistenz, ein identisches Resistenzmuster (siehe Tabelle 22). Eine Southern-Blot-Hybridisierung chromosomaler DNA von 1057M12 und 1457M12 (graue und weiße phänotypische Varianten) mit der [<sup>32</sup>P]dCTP markierten, Tn917-spezifischen DNA-Sonde AVA3 zeigte Tn917-Insertionen auf identischen *EcoRI*-Fragmenten (siehe Abbildung 12). Zum letztendlichen Ausschluss, dass es sich bei den beiden Phänotypen der M12-Transduktante um Kontaminanten handelte, wurde eine Pulsfeldgelelektrophorese mit 1057wt und den beiden Kolonievarianten 1057M12 grau sowie 1057M12 weiß durchgeführt. Eine Kontaminante als Erklärung für die differierende Koloniemorphologie konnte so ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 11). Die beobachteten Veränderungen gehören damit fest zum phänotypischen Profil der M12-Insertionslokalisation.

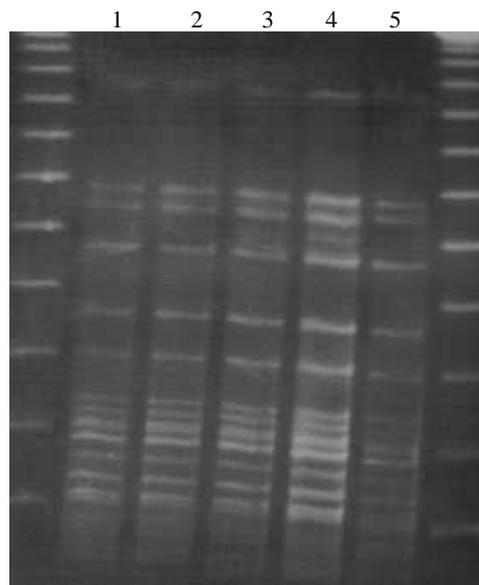
Tabellen und Abbildungen zu Kapitel 6.8

**Tabelle 22:** Hemmhofdurchmesser von 8400wt,1457wt,1057wt und korrespondierenden M12 Transduktanten im Agardiffusionstest

Antibiotikum/ Stamm	P10	GM 10	C30	FM 100	FO5	NN 10	E15	NET 30	CC 10	CIP 5	SXT	TE 30
1457wt	36	30	30	32	30	30	30	30	35	32	30	35
1457M12 grau	34	30	29	30	30	32	0	30	0	30	32	31
1457M12 weiß	36	30	30	30	30	30	0	30	0	30	30	33
8400 wt	23	25	25	27	31	23	25	25	27	29	25	7
8400M12 grau	25	22	27	29	32	23	0	25	0	28	26	7
8400M12 weiß	25	25	29	25	29	25	0	29	0	27	25	6
1057wt	15	19	33	31	25	12	30	31	34	32	15	12
1057M12 grau	13	17	30	30	23	9	0	31	0	28	15	10
1057M12 weiß	13	17	30	30	23	9	0	31	0	28	15	10

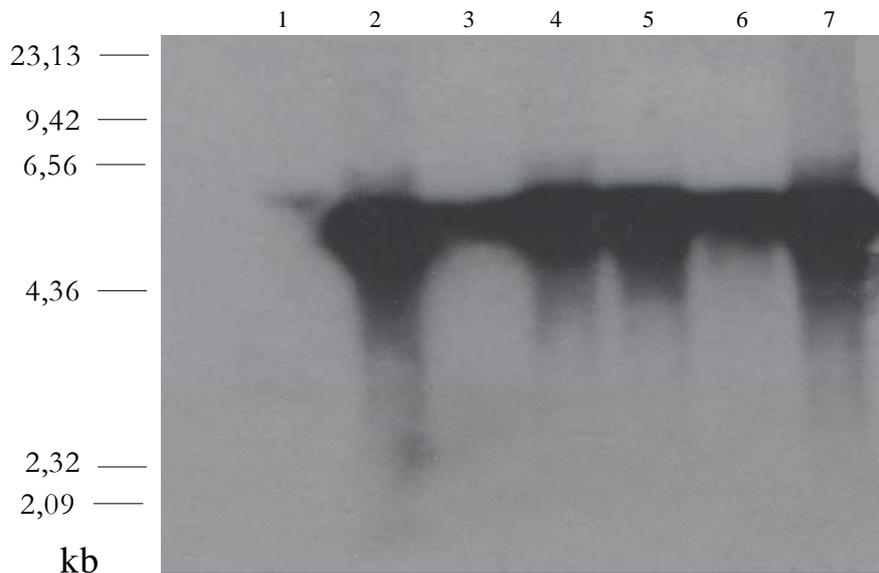
Die neue Makrolidantibiotika-Resistenz (Erythromycin=E15; Clindamycin=CC10) ist Tn917 kodiert

**Abbildung 11:** Pulsgelelektrophorese der Phasenvarianten von 1057M12



(1)1057M12 weiß, (2)1057M12 grau, (3) und (4)1057M12 weiße Phasenvariante (5)1057 Wildtyp

**Abbildung 12:** Autoradiographien: EcoRI verdaute chromosomale DNA nach Hybridisierung mit [<sup>32</sup>P] dCTP markierten Tn917 spezifischer DNA-Sonde AVA3



(1)1057wt, (2)1457M12grau, (3)1057M12grau, (4)1057M12grau, (5)1457M12weiß, (6)1057M12weiß, (7)1057M12weiß; grau= graue Koloniemorphologie, weiß= weiße Koloniemorphologie

## 6.9. Methicillinresistenz der verschiedenen *S. epidermidis* 1057

### Transposonmutanten

#### 6.9.1. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Nach erfolgreicher Transduktion der Mutantenklassen I-VI auf den methicillinresistenten *S. epidermidis*-Stamm 1057, untersuchten wir die Auswirkung der Tn917-Insertion auf die Expression der Methicillinresistenz. Zunächst war von Interesse, ob sich die minimale Hemmkonzentration (MHK) der Transduktanten betreffend Oxacillin im Vergleich zum Wildtypstamm verändert hatte. Hierzu führten wir einen Mikrodilutionstest mit Oxacillin unter Benutzung von Müller-Hinton-Brühe und einem 2 %igen Zusatz von NaCl durch. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden bei 35° C, die erste Auswertung erfolgte nach 24 Stunden. Nach 24 Stunden Inkubationszeit zeigten der Wildtypstamm und die Transduktanten der Klasse I (M10 und M13), IV (M17), V und VI eine MHK von 256 µg/ml. Bei den Klasse II (M12) und III (M15) Transduktanten

betrug die MHK hingegen 128 µg/ml. Nach 48 Stunden steigerte sich die MHK der Klasse I, IV, V und VI Transduktanten um eine Konzentrationsstufe auf 512 µg/ml. In gleicher Relation veränderte sich auch die MHK der Klasse II und III Transduktanten auf 256 µg/ml. Diese Ergebnisse zeigten somit eine geringfügige Verringerung der MHK um eine Verdünnungsstufe bei 1057M12 und 1057M15 im Vergleich zum Wildtypstamm und den anderen Transduktanten (siehe Tabelle 23). Da es sich bei *S. epidermidis* 1057 um eine *mecA* vermittelte Methicillinresistenz handelte, war ein heterogenes Expressionsmuster der Resistenz zu erwarten. Für die Analyse der einzelnen Subpopulationen innerhalb der Stämme war die Bestimmung der MHK ungeeignet. Um Resistenzverschiebungen der einzelnen Subpopulationen abbilden zu können, untersuchten wir den Wildtypstamm und die Transduktanten mit den im folgenden Abschnitt vorgestellten zwei Methoden.

### **6.9.2. Populationsanalysen von *S. epidermidis* 1057 und korrespondierenden Transduktanten auf MH-Agarplatten mit definierten, variierenden Oxacillinkonzentrationen**

Zur Populationsanalyse plattierten wir die zu testenden Stämme auf Müller-Hinton-Agarplatten aus, denen definierte Mengen an Oxacillin zugesetzt worden waren. Es wurden dafür Platten mit Oxacillinkonzentrationen von 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 6 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml und 400 µg/ml Agar angefertigt. Auch bei diesen Versuchen wurde dem Agar 2 % NaCl zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden bei 37° C. Die letztendlich ausplattierten Zellsuspensionen wurden so verdünnt, dass die am Ende des Versuches gewachsene Koloniedichte eine sichere Auszählung möglich machte. Die im Abbildungs- und Tabellenteil dieses Kapitels dargestellten Diagramme zeigen jeweils vergleichend die CFU/ml vom Wildtypstamm und einer korrespondierenden Transduktante. Der Wildtypstamm und die Transduktante wurden bei jeder Versuchsreihe parallel ausplattiert und inkubiert, um möglichst gleiche Wachstumsbedingungen für beide zu testenden Stämme zu gewährleisten.

Der Wildtypstamm zeigte das für *mecA*-Stämme so typische heterogene Expressionsmuster der Oxacillinresistenz. 90 % aller Zellen besaßen eine

MHK  $\geq 6 \mu\text{g/ml}$ . Die Klasse I Mutanten 1057M10 und 1057M13 zeigten dasselbe Populationsmuster wie der Wildtypstamm. Die Resistenzverteilung der einzelnen Subpopulationen ähnelte der des Wildtypstammes stark. Signifikante Resistenzverschiebungen zeigten sich nicht. Die Insertion des Transposons innerhalb des *icaADBC*-Genclusters schien damit keine Auswirkungen auf die Expression der Methicillinresistenz zu haben (siehe Abbildung 13 und Abbildung 15).

Innerhalb der Klasse III Mutante 1057M15 ließ sich eine deutliche Zunahme von sensibleren Subpopulationen im Vergleich zum Wildtypstamm nachweisen. Nach wie vor zeigte der Stamm eine heterogene Oxacillinresistenz, dabei hatten jedoch mehr als 90 % aller Subpopulationen eine MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  Oxacillin (siehe Abbildung 17).

Die Resistenzverteilung der Populationen der Klasse IV Mutante 1057M17 zeigte einen Wechsel zu stärker oxacillinresistenten Zellen. 90 % aller Zellen hatten dabei eine MHK von  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$  Oxacillin. Bemerkenswerterweise wechselte die Transduktante das Expressionsmuster der Oxacillinresistenz von der ursprünglich heterogenen Resistenz des Wildtypstammes zu einer homogenen (siehe Abbildung 19).

Die Transduktanten der Klasse V (M16) und VI (M20) zeigten keine Änderung des Resistenzverhaltens. Auch hier zeigten 90 % eine MHK von  $6 \mu\text{g/ml}$  Oxacillin (siehe Abbildung 21 und Abbildung 23).

Die Austestung der Klasse II Mutante 1057M12 stellte sich als problematisch dar. Wie oben beschrieben, differenzierte diese Mutantenklasse in Varianten mit weißer und grauer Kolonimorphologie. Die grauen Kolonien ließen sich auch unter größten Bemühungen nicht ausreichend in Suspension bringen. Dieses war jedoch für die Versuchsanordnung zwingend notwendig. Die optische Dichte der Suspension ließ sich bei der grauen Variante nicht zuverlässig bestimmen, so dass ein Vergleich zwischen dieser Variante mit den anderen Transposonklassen und dem Wildtypstamm nicht valide möglich war.

### 6.9.3. Untersuchung von *S. epidermidis* 1057 und korrespondierenden Transduktanten auf Oxacillingradientenplatten

Wie im Einleitungsteil dieser Arbeit beschrieben, ist die Expression der Methicillinresistenz von vielen unterschiedlichen Wachstumsbedingungen abhängig (Änderungen der Zusammensetzungen des Nährmediums, Temperatur, Wachstumsphase u.s.w.). Aus diesem Grunde wählten wir zur Verifizierung der Ergebnisse aus den Populationsanalysen den direkten Vergleich von Transduktante und Wildtypstamm auf nur einer Agarplatte. Zu diesem Zweck setzten wir Oxacillingradientenplatten ein. Vorteil dieser Methode war es, dass die jeweils miteinander verglichenen Stämme möglichst ähnliche Wachstumsbedingungen hatten.

Die Gradientenplatten wurden so gegossen, dass sich auf einer Seite der Platte kein Oxacillin befand, auf der anderen Seite jedoch eine Konzentration von 100 µg/ml Oxacillin bestand. Zwischen diesen beiden Bereichen stieg die Konzentration kontinuierlich an (siehe Kapitel 5.3.10). Als Nährmedium wählten wir ebenfalls Müller-Hinton-Brühe mit einem 2 %igen Zusatz von NaCl. Auf jeder Platte wurde jeweils eine 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnte Bakteriensuspension der zu testenden Transduktante und des Wildtypstammes ausplattiert.

Auch hier zeigte sich das gleiche Resistenzverhalten der einzelnen Transduktantenklassen, wie auch schon bei der oben dargestellten Populationsanalyse besprochen.

Die Klasse I Transduktanten 1057M10 und 1057M13 wuchsen auf den Gradientenplatten bis zu dem gleichen Plattenabschnitt wie der Wildtypstamm (siehe Abbildung 14 und Abbildung 16).

Entsprechend den Ergebnissen bei der Populationsanalyse wurde das Wachstum der Klasse III Transduktante 1057M15 durch geringere Oxacillinkonzentrationen gehemmt (siehe Abbildung 18).

1057M17 (Klasse IV) wuchs mit einem breiten Bakterienrasen bis in die Endkonzentration von 100 µg/ml. Auch hier zeigte diese Transduktante, wie schon bei der Populationsanalyse, eine ausgeprägtere Oxacillinresistenz als der Wildtypstamm (siehe Abbildung 20).

Die Klasse V und VI Transduktanten zeigten ebenfalls keine Veränderung der Oxacillinresistenz im Vergleich zum Wildtypstamm (siehe Abbildung 22 und Abbildung 24).

Die Klasse II Mutante 1057 M12 ließ sich auch im Rahmen dieses Versuchs nur eingeschränkt austesten. Die graue Phasenvariante war praktisch aufgrund Ihrer Unlöslichkeit in Flüssigkeiten diesem Test nicht zugänglich. Wir wählten daher die weiße Variante dieser Transduktante. Diese zeigte auf den Gradientenplatten eine geringere Resistenz als der Wildtypstamm (siehe Abbildung 25).

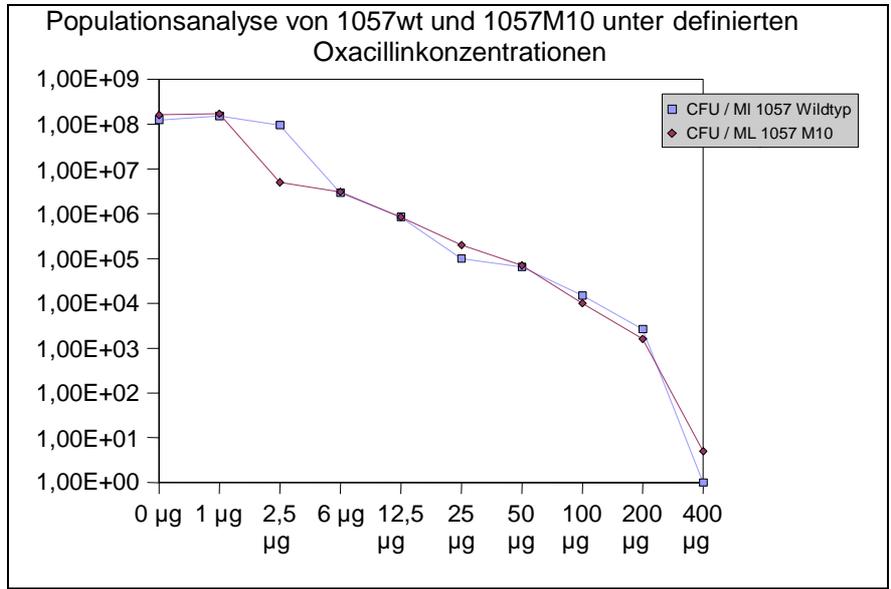
### Grafiken und Tabellen zu Kapitel 6.9.2 und 6.9.3

**Tabelle 23:** Tabellarische Darstellung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) betreffend Oxacillin des *S. epidermidis*-Stammes 1057 und den in dieser Arbeit erstellten Transduktanten.

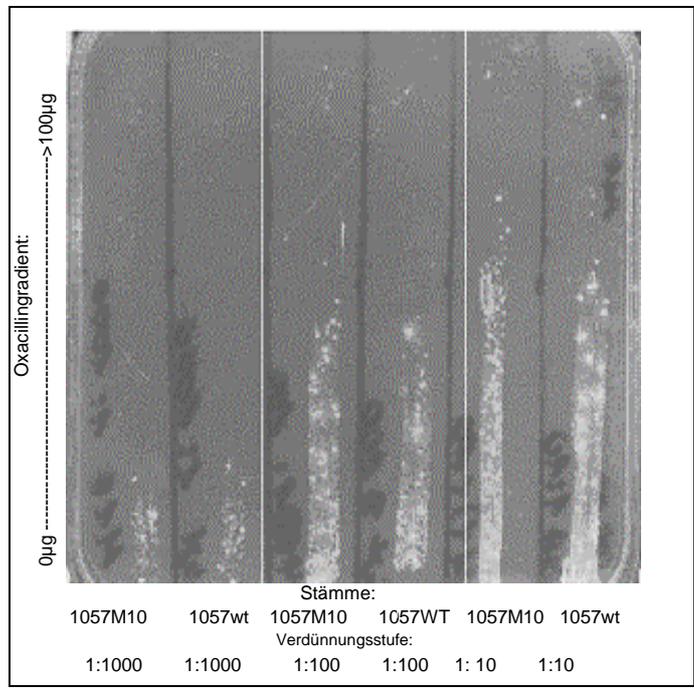
Stamm	MHK Oxacillin 24 h	MHK Oxacillin 48 h
1057wt	256 µg/ml	512 µg/ml
1057M10	256 µg/ml	512 µg/ml
1057 M12	<b>128 µg/ml</b>	<b>256 µg/ml</b>
1057M13	256 µg/ml	512 µg/ml
1057M15	<b>128 µg/ml</b>	<b>256 µg/ml</b>
1057M16	256 µg/ml	512 µg/ml
1057M20	256 µg/ml	512 µg/ml

Klasse I Mutanten 1057M10 und 1057M13

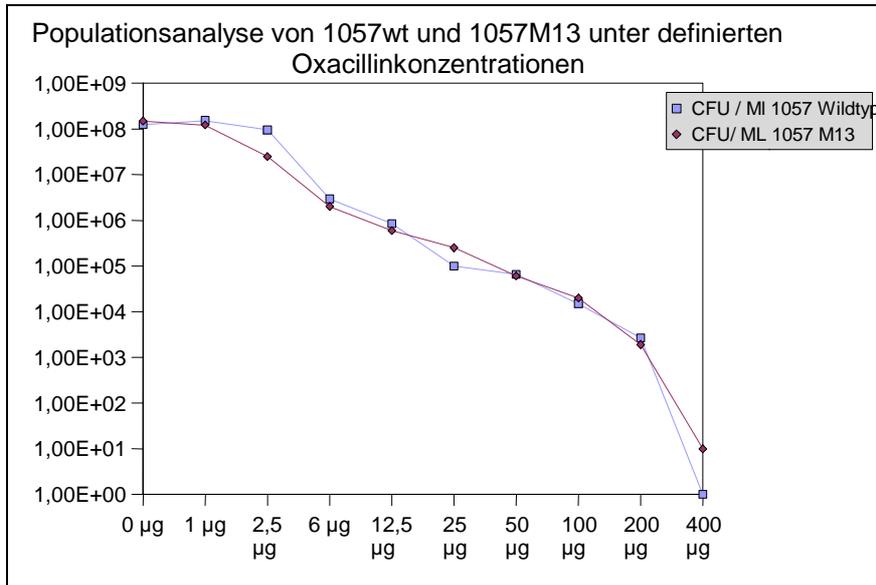
**Abbildung 13:** Populationsanalyse der Klasse I Transduktante 1057M10 im Vergleich zum Wildtypstamm 1057wt unter definierten Oxacillinkonzentrationen.



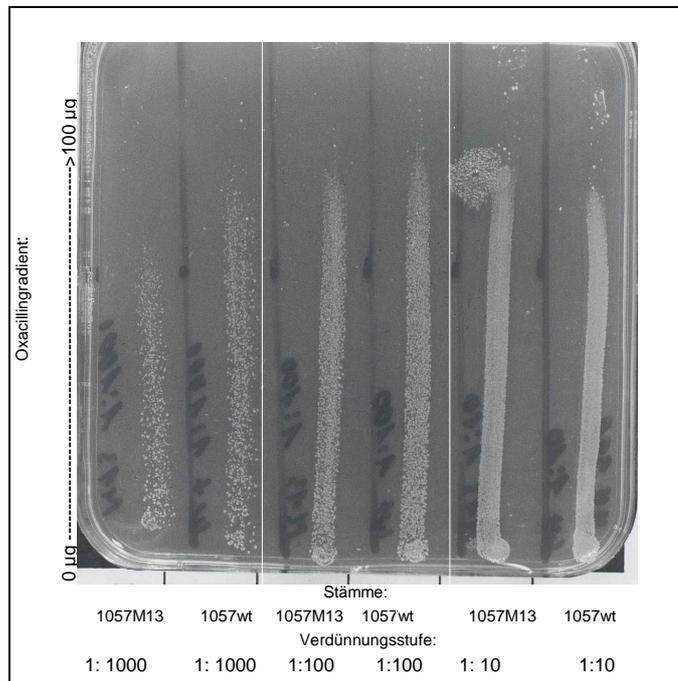
**Abbildung 14:** Vergleichende Darstellung des Wachstums von 1057wt und 1057M10 auf einer Müller-Hinton-Agarplatte mit Oxacillinkonzentrationsgradienten



**Abbildung 15:** Populationsanalyse der Klasse I Transduktante 1057M13 im Vergleich zum Wildtypstamm 1057wt unter definierten Oxacillinkonzentrationen

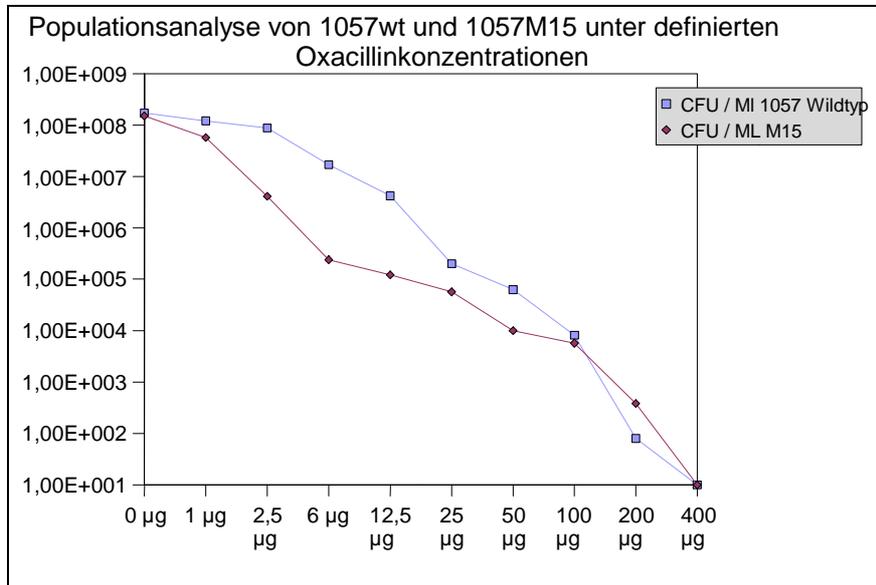


**Abbildung 16:** Vergleichende Darstellung des Wachstums von 1057wt und 1057M13 auf einer Müller Hinton Agarplatte mit Oxacillinkonzentrationsgradienten

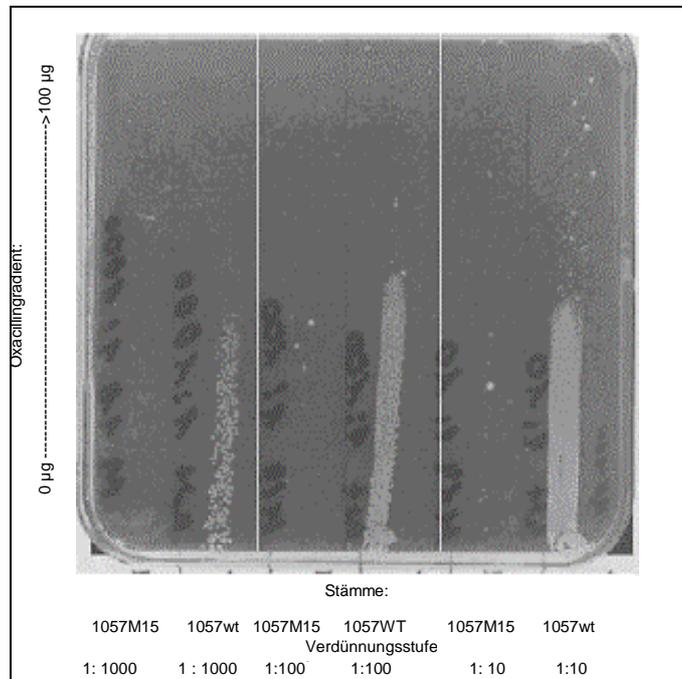


Klasse III Mutante 1057M15

**Abbildung 17:** Populationsanalyse der Klasse III Transduktante 1057M15 im Vergleich zum Wildtypstamm 1057 unter definierten Oxacillinkonzentrationen.

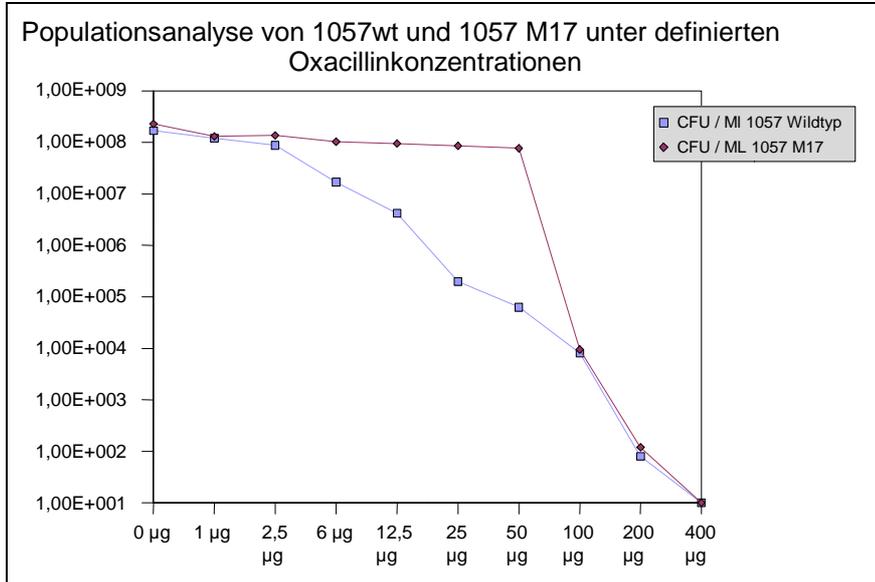


**Abbildung 18:** Vergleichende Darstellung des Wachstums von 1057wt und 1057M15 auf einer Müller Hinton Agarplatte mit Oxacillinkonzentrationsgradienten

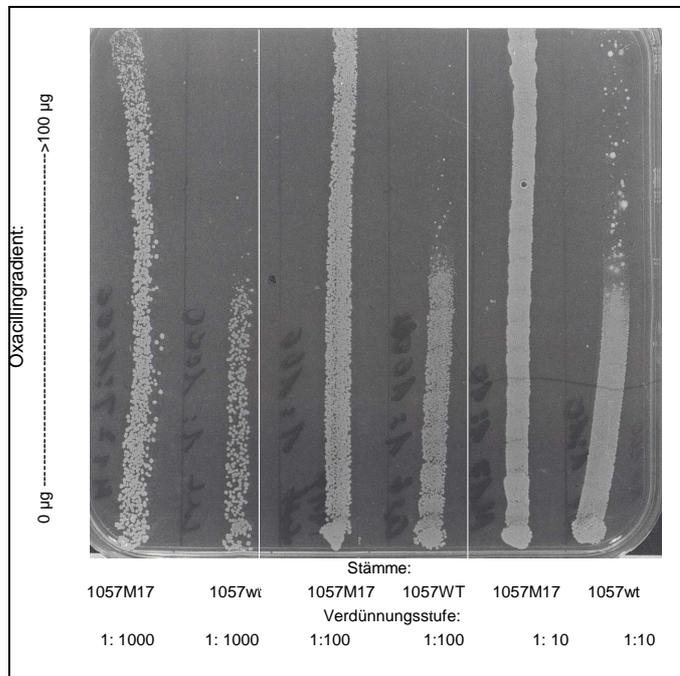


Klasse IV Mutante 1057M17

**Abbildung 19:** Populationsanalyse der Klasse IV Transduktante 1057M17 im Vergleich zum Wildtypstamm 1057 unter definierten Oxacillinkonzentrationen.

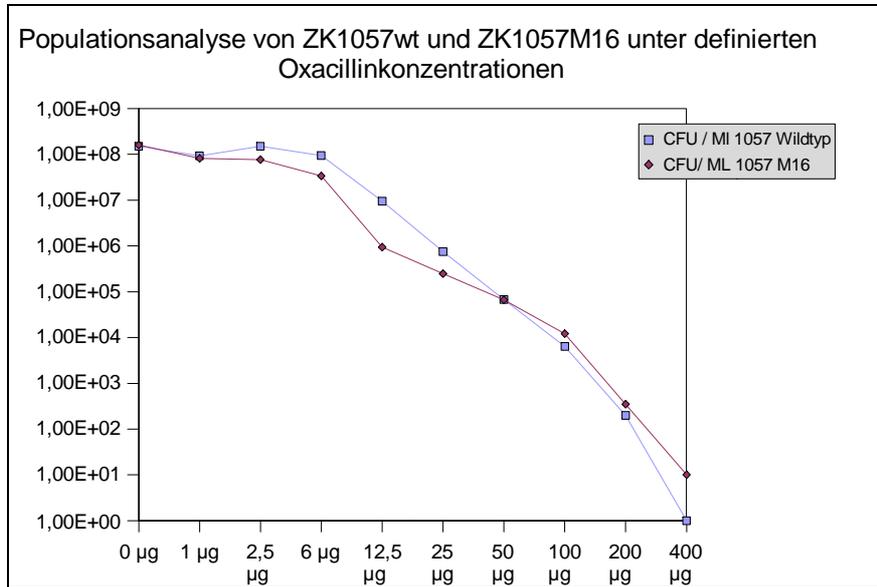


**Abbildung 20:** Vergleichende Darstellung des Wachstums von 1057wt und 1057M17 auf einer Müller Hinton Agarplatte mit Oxacillinkonzentrationsgradienten

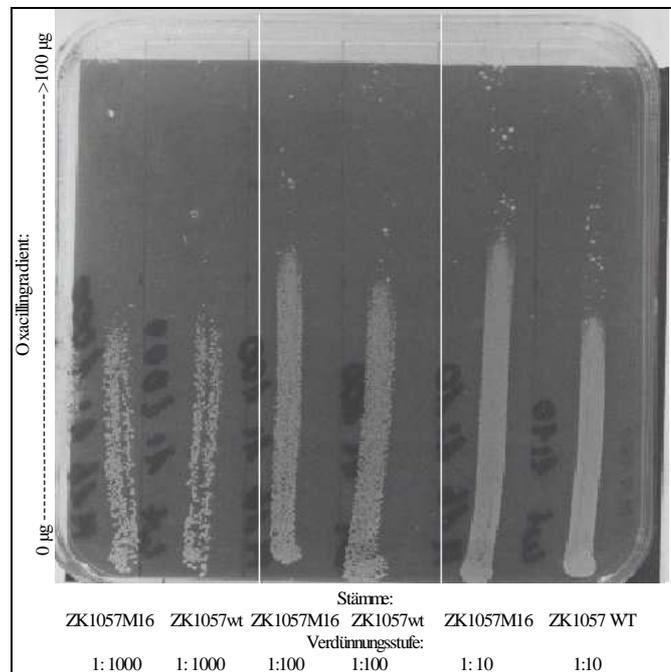


Klasse V Transduktante 1057M16

**Abbildung 21:** Populationsanalyse der Klasse V Transduktante 1057M16 im Vergleich zum Wildtypstamm 1057 unter definierten Oxacillinkonzentrationen.

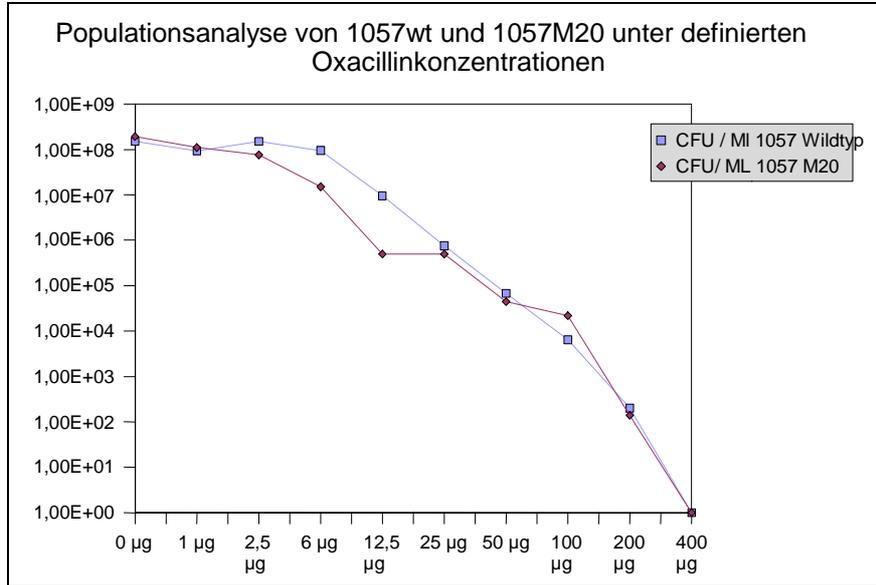


**Abbildung 22:** Vergleichende Darstellung des Wachstums von 1057wt und 1057M16 auf einer Müller Hinton Agarplatte mit Oxacillinkonzentrationsgradienten

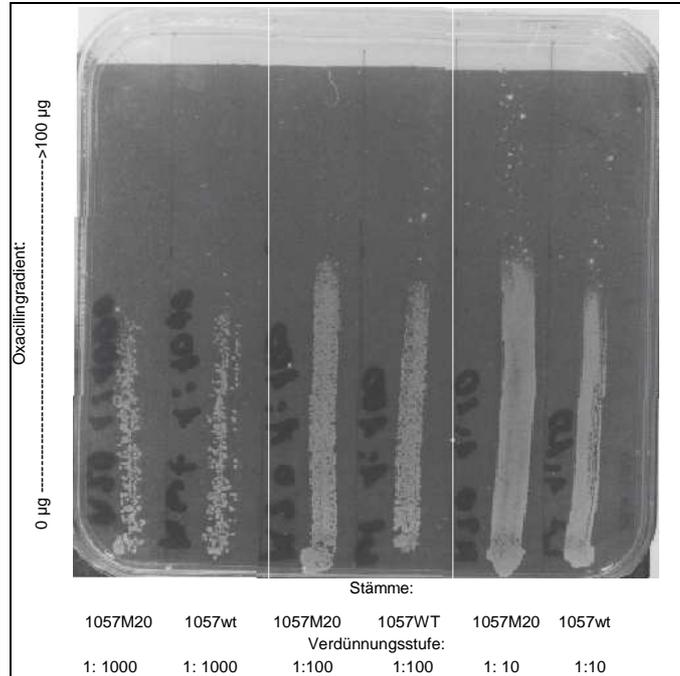


Klasse VI Transduktante 1057M20

**Abbildung 23:** Populationsanalyse der Klasse VI Transduktante 1057M20 im Vergleich zum Wildtypstamm 1057wt unter definierten Oxacillinkonzentrationen.

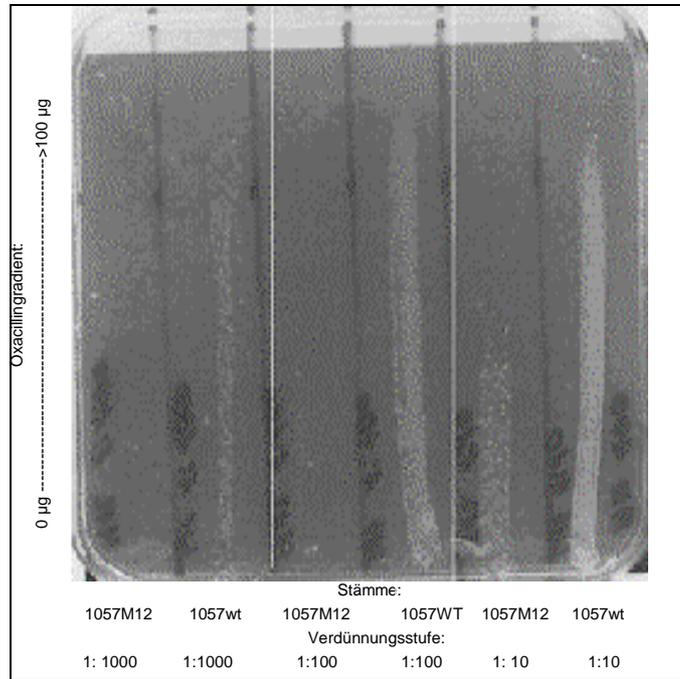


**Abbildung 24:** Vergleichende Darstellung des Wachstums von 1057wt und 1057M20 auf einer Müller Hinton Agarplatte mit Oxacillinkonzentrationsgradienten



Klasse II Mutante 1057M12

**Abbildung 25:** Vergleichende Darstellung des Wachstums von 1057wt und 1057M12 auf einer Müller Hinton Agarplatte mit Oxacillinkonzentrationsgradienten



## 7. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir den Einfluss von sechs verschiedenen chromosomalen Insertionslokalisationen des Transposons Tn917 im genetischen Background des methicillinresistenten *S. epidermidis*-Stammes 1057. Ziel war es, Genorte zu identifizieren, die direkt oder indirekt Einfluss auf Biofilmproduktion und Methicillinresistenz haben. Die Schaffung isogener Stammpaare mittels Transduktion war für die Analyse ideal. Da sich das Genom des Wildtypstammes und der Transduktante nur im Bereich der Tn917-Insertion voneinander unterschieden, konnten Veränderungen phänotypischer Merkmale leicht auf eine Inaktivierung bestimmter Genorte im Bereich der Transposoninsertion zurückgeführt werden.

Als Donorstämme dienten Tn917-Mutanten der Klasse I bis VI des *S. epidermidis*-Stammes 1457. Von allen der gewählten Transposoninsertionen war eine Beeinflussung der Biofilmproduktion in biofilmpositiven *S. epidermidis*-Stämmen bekannt. Nur bei den Klasse I Mutanten (M10 und M13) befand sich die Transposoninsertionsstelle innerhalb des *icaA*-Genes. Alle anderen besaßen die Insertion außerhalb des *ica*-Genclusters. Die genaue Funktion der Genorte, in die Tn917 bei den Klassen II-VI inseriert hatte, war zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nicht bekannt.

Bei 1057 handelte es sich um einen *mecA*-positiven, methicillinresistenten *S. epidermidis*-Stamm. Eine *mecA*-spezifische, [<sup>32</sup>P] dCTP markierte Sonde, hybridisierte mit der DNA des Wildtypstammes und allen korrespondierenden Transduktanten. Die DNA wurde zuvor mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*-verdaut. Die sich anschließend in der Southern-Hybridisierung darstellenden Fragmente waren bei Wildtypstamm und Transduktanten von gleicher Größe. Eine Tn917-Insertion in *mecA* bei einer der Transduktanten konnte somit ausgeschlossen werden. Der Wildtypstamm und alle Transduktanten zeigten in der Populationsanalyse die für *mecA*-positive Stämme so typische heterogene Methicillinresistenz (Parker et al. 1970; Hartman et al. 1986; Dickinson et al. 2000). Eine bemerkenswerte Ausnahme stellte die Transduktante 1057M17 dar, die eine homogene Resistenz exprimierte.

## 7.2. Ergebnisse der MHK-Testung

Die Methode der MHK-Bestimmung stellte sich als ungeeignet für die vergleichende Analyse der Methicillinresistenz von Wildtypstamm und Transduktanten heraus. Das Wachstum des Stammes in einem flüssigen Medium machte es unmöglich, Resistenzveränderungen einzelner Subpopulationen innerhalb des getesteten Stammes zu erfassen. Beim Vergleich der MHK-Werte von Wildtypstamm und Transduktanten zeigten sich dementsprechend nur geringe Unterschiede. Die MHK der Klasse II und Klasse III Transduktanten, 1057M12 und 1057M15, war nach 24 Stunden und nach 48 Stunden Inkubationszeit um jeweils eine Verdünnungsstufe niedriger als die des Wildtypstammes und der übrigen Transduktanten.

## 7.3. *IcaADBC* und *mecA*: Existenz gemeinsamer regulativer Faktoren

Die Transduktanten der Klasse II, III und IV im genetischen Background von *S. epidermidis* 1057 zeigten in den Untersuchungen dieser Arbeit eine interessante Verknüpfung zwischen den beiden Pathogenitätsfaktoren Biofilmbildung und Methicillinresistenz.

Unsere Arbeitsgruppe konnte mittlerweile beweisen, dass die Veränderung des Biofilmphänotyps auf Inaktivierungen von Genabschnitten mit Einfluss auf die *icaADBC*-Transkription zurückzuführen ist. Eine Northern-Blot-Analyse konnte bei keiner der drei Mutanten 1457M12, 1457M15 und 1457M17 ein *icaADBC*-spezifisches Transkript in der exponentiellen Wachstumsphase nachweisen. Alle Stämme wuchsen vor RNA-Extraktion in TSB<sub>Oxid</sub>. Nach Transfer des Plasmides pTX*icaADBC* (enthält *icaADBC* und einen Xylose induzierbaren Promotor) und Xylose-Induktion waren alle drei Transduktanten erneut in der Lage, auch in TSB<sub>Oxid</sub>, Biofilm und PIA in gleichem Umfang wie der Wildtypstamm zu produzieren (Mack et al. 2000b).

Mempel et al. beschrieben im Rahmen einer Studie über den methicillinresistenten *S. epidermidis*-Stamm RP62A Phasenvarianten, die ebenfalls gleichzeitig Veränderungen der Biofilmproduktion und der Expression der Methicillinresistenz aufwiesen.

Die Arbeitsgruppe konnte verschiedene Phasenvarianten von RP62A beim Wachstum auf Congo Red Agar isolieren. Diese wiesen eine deutlich erniedrigte Adhärenzfähigkeit an Plastikoberflächen auf, waren biofilmbiofilmnegativ und exprimierten eine verringerte Resistenz gegenüber Methicillin, Oxacillin und Penicillin. Alle Phasenvarianten wechselten nach mehreren Passagierungen in antibiotikafreien Medien zu der biofilmpositiven Ursprungsvariante zurück. Diese Revertanten zeigten das gleiche Resistenzprofil und den gleichen biofilmpositiven Phänotyp wie

der Wildtypstamm. Nach einer Inkubation von vier Stunden bei subinhibitorischen Methicillinkonzentrationen zeigten die Phasenvarianten wieder die volle Resistenz des Wildtypstammes gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. *S. epidermidis* RP62A ist *mecA*-positiv. Im Northern-Blot zeigten die Phasenvarianten jedoch kein *mecA*-spezifisches Transkriptionsprodukt. Der Elternstamm hingegen wies ein starkes *mecA*-Signal als Zeichen einer hohen Ablesefrequenz auf (Mempel et al. 1994; Mempel et al. 1995). Diese Beobachtungen lassen einen regulativen, bis dato unbekanntem Genlokus, mit Einfluss auf *icaADBC* und *mecA* vermuten.

Dass dieser Regulator in einer der beiden resistenzgeminderten Transduktanten 1057M12 und 1057M15 durch die Tn917-Insertion betroffen ist, konnte anhand von weitergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden. Eine Northern-Blot Analyse mit RNA des Wildtypstammes und der 1057-Transduktanten M10, M12, M15, M17 wurde untersucht. Die Stämme wuchsen dabei vor Extraktion der RNA jeweils in Müller-Hinton-Brühe mit oder ohne Zusatz von Oxacillin. Die RNA wurde in der exponentiellen Wachstumsphase extrahiert, auf Nylonmembranen geblottet und mit einer *mecA*-spezifischen Sonde hybridisiert. Die RNA jedes Stammes hybridisierte mit der Sonde. Die Hybridisierung der RNA der Stämme, die in oxacillinhaltigen Nährmedien wuchsen, erbrachte ein deutlich stärkeres Signal, verglichen mit den nicht-induzierten Stämmen (Mack et al. 2002). Dies zeigte, (i) dass bei allen Transduktanten der *mecA*-Genlokus transkribiert wird und (ii) dass bei keiner der Transduktanten die oxacillininduzierte gesteigerte Transkription von *mecA* gestört war. Damit war ausgeschlossen, dass eine der Transposoninsertionen direkt oder indirekt Einfluss auf die *mecA*-Transkription hatte. Somit sind die von Mempel et al. beschriebenen Resistenzminderungen der Phasenvarianten von den in dieser Arbeit beobachteten Phänotypänderungen der Transduktanten 1057M12 und 1057M15 klar abzugrenzen.

#### **7.4. Klasse I Transduktanten 1057M10 und M13: Insertion in *icaA***

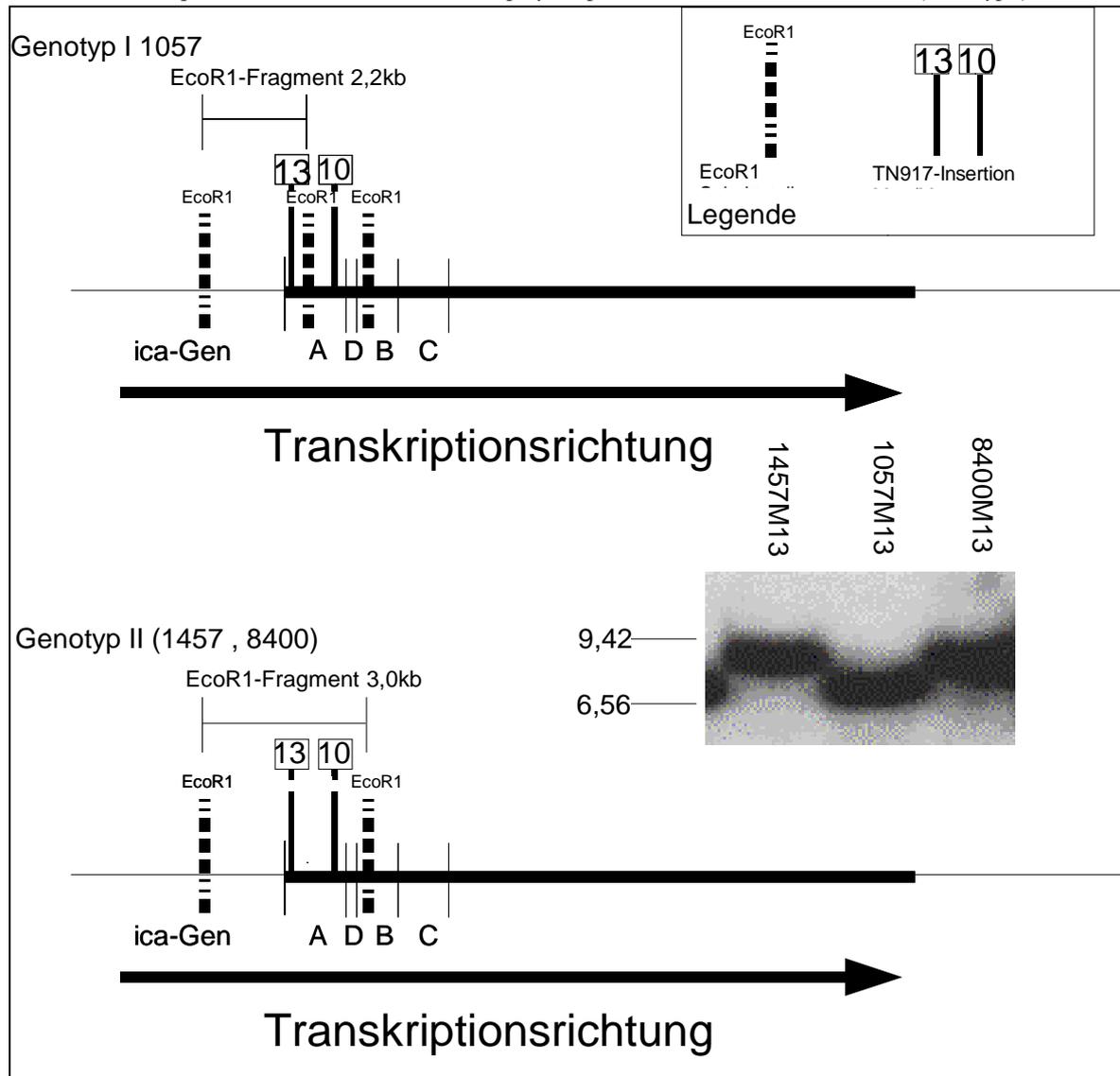
Die Tn917-Insertion der Transduktanten 1057M10 und 1057M13 befindet sich innerhalb des *icaA*-Genlokus (Mack et al. 2000b; Mack et al. 2001). Bei der Southern-Hybridisierung mit der Tn917-spezifischen Sonde AVA3 zeigte sich, dass Tn917 bei 1057M13 auf einem kleineren *EcoRI*-Fragment lokalisiert war als bei 1457M13 und 8400M13. Ursache ist ein bei *S. epidermidis* bekannter Schnittstellenpolymorphismus in *icaA*. Unsere Arbeitsgruppe identifizierte im wesentlichen zwei verschiedene *icaA*-Genotypen. Genotyp I besitzt eine zusätzliche *EcoRI*-Schnittstelle in *icaA* (ergibt ein 2,2 kb großes *EcoRI*-Fragment), Genotyp II fehlt diese Schnittstelle (ergibt ein 3,0 kb großes *EcoRI*-Fragment). 1457 besitzt den Genotyp II. Da 8400 ebenfalls in der Sou-

thern-Hybridisierung die gleiche *EcoRI*-Fragmentgröße aufwies, ist auch dieser Stamm dem gleichen Genotyp zuzuordnen. Bei *S. epidermidis* 1057M13 ist auch nach Tn917-Insertion die offensichtlich bestehende, zusätzliche *EcoRI*-Schnittstelle erhalten geblieben. 1057 besitzt damit den Genotyp I. Die in der Southern-Hybridisierung sich darstellenden *EcoRI*-Fragmente mit Tn917-Insertion zeigten die erwarteten Fragmentgrößen. Das Transposon Tn917 besitzt eine Größe von 5,257kb (Shaw et al. 1985). Nach *EcoRI*-Verdau müsste sich damit also bei *S. epidermidis* 1057M13 ein 7,457kb großes (2,2kb + 5,257kb) und bei 1457M13/8400M13 ein 8,257kb großes (3,0kb + 5,257kb) Fragment ergeben. (siehe Abbildung 26) (Mack et al. 1994; Mack et al. 1999; Rohde et al. 2001a; Rohde et al. 2001b).

Die Klasse I Transduktanten zeigten in der Populationsanalyse und auf Gradientenplatten keine Veränderung der Methicillinresistenz. Ein direkter oder indirekter Einfluss von *icaA* auf die Methicillinresistenz scheint damit nicht zu bestehen.

**Abbildung 26:** Schematische Darstellung der M13 Tn917-Insertionslokalisierung in *icaA*

Durch den bei *S. epidermidis* bekannten Schnittstellenpolymorphismus erhält man bei 1057M13 (Genotyp I) ein



0,8kb kleineres Fragment als bei 1457M13 und 8400M13 (Genotyp II). Der Bildausschnitt auf der rechten Seite zeigt nochmals die *EcoRI* verdaute chromosomale DNA der *S. epidermidis*-Stämme 1457M13, 1057M13 und 8400M13 nach Hybridisierung mit der [<sup>32</sup>P]dCTP markierten DNA-Sonde AVA3.

### 7.5. Klasse II Mutante M12: Tn917-Insertion in *purR*-Gene

Die Transposonmutante *S. epidermidis* 1057M12 zeigte eine deutliche Reduktion der Methicillinresistenz im Vergleich zum Wildtypstamm. Auf den Gradientenplatten entwickelte 1057M12 bei steigenden Oxacillinkonzentrationen ein deutlich geringeres Wachstum als der Wildtypstamm.

In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten die an das Transposon angrenzenden DNA-Abschnitte kloniert, sequenziert und identifiziert werden. Die Sequenzanalyse der an das Transposon angrenzenden DNA erbrachte vier offene Leserahmen. Diese wurden aufgrund der ausgeprägten Homologien zu Genen mit bekannter Funktion in *B. subtilis* mit *purR*, *yabJ*, *spoVG* benannt (Knobloch et al. 2003). Transkriptionsanalysen unserer Arbeitsgruppe mit *S. epidermidis* 1457 konnten zwei Transkripte dieser Genregion identifizieren. Das erste umfasste *yabJ* und *spoVG* (Größe 0,95kb), das zweite *purR*, *yabJ* und *spoVG*. Aufgrund der Größe von 2,6 kb ist die Involvierung eines vierten, unbekanntes Genes zu vermuten. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um das Gen *yabH*, welches bei *B. subtilis* und *S. aureus* vor *purR* lokalisiert ist. Beide Transkripte waren bei 1457 in der exponentiellen Wachstumsphase nachweisbar gewesen und fehlten in der stationären Phase. In 1457M12 konnten keine Transkripte von *purR*, *yabJ*, und *spoVG* nachgewiesen werden, so dass eine Inaktivierung dieser Gene durch die Tn917-Insertion anzunehmen ist. Abbildung 27 zeigt schematisch die von unserer Arbeitsgruppe identifizierte Tn917-Insertionslokalisierung (Bartscht 2002; Knobloch et al. 2003).

#### *purR* und *yabJ*

Die Gene *purR* und *yabJ* bilden bei *B. subtilis* ein Operon und kodieren für Regulatorproteine der Purinsynthese (Sinha et al. 1999; Weng et al. 2000). Purine sind als Bausteine von Nucleosiden, Nucleotiden und Nucleinsäuren für die Zelle essentiell. Die Grundlage der Synthese von AMP, GMP und der Desoxyribonucleotide dATP und dGTP stellt Inosinmonophosphat (IMP) dar. Die Synthese von IMP aus 5-Ribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) ist im 12 Gene umfassenden *pur*-Operon (*purEKBCSQLFMNHD*-Operon) kodiert (Ebbole et al. 1987; Weng et al. 1995).

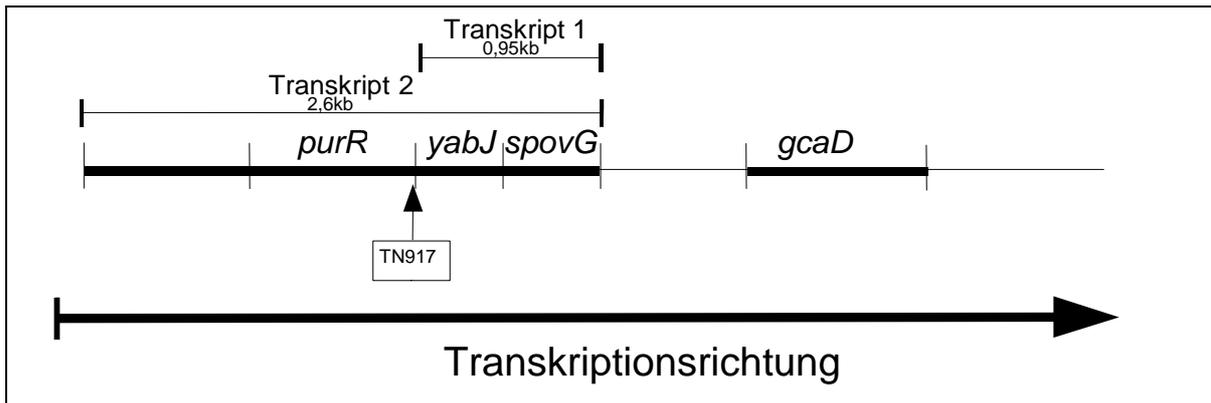
Die Purin-Biosynthese wird in *B. subtilis* über das negative regulierende Repressorprotein *PurR* kontrolliert. Das *pur*-Operon wird dabei zweifach reguliert. Zum einen über die Hemmung der Transkriptionsinitiation (Adenin / *PurR* vermittelt), zum anderen über eine frühzeitige Transkriptionsterminierung (Guanosin vermittelt) (Weng et al. 1995).

*PurR* ist als Dimer organisiert. Eine Domäne des Repressorproteins enthält eine Bindungsstelle für PRPP, die andere ist zur DNA Anbindung fähig. Diese bindet an Promotorregionen des *purR*-Operons, *purA*, *purR* und des *pyr*-Operon (Weng et al. 1995; Shin et al. 1997). *PurR* besitzt keine katalytische Aktivität (Sinha et al. 2003).

Adenin wird unter Verbrauch von PRPP in ADP umgewandelt. ADP ist zusätzlich ein allosterischer Hemmer der PRPP-Synthetase, so dass hohe Adeninspiegel über Verbrauch und Hemmung der Synthese von PRPP zu niedrigen PRPP-Spiegeln führen. Liegt das Repressorprotein ohne gebundenes PRPP vor, kann es sich an die Kontrollregion vor dem *purEKBCSQLFMNHD*-Operon binden und die Transkription desselbigen verhindern. Niedrige PRPP- Spiegel inhibieren so die Purinsynthese. Die Zugabe von Adenin in das Nährmedium konnte bei *B. subtilis* zu einer Transkriptionshemmung des *pur*-Operons führen (Weng et al. 1995; Shin et al. 1997).

Für die Adenin-vermittelte Repression von *purR* ist zusätzlich das Genprodukt von *yabJ* notwendig (Weng et al. 2000). Insbesondere scheint *yabJ* für die Regulation für *purA* durch *purR* notwendig zu sein (Rappu et al. 1999). Ob die Regulationsmechanismen bei *S. epidermidis* ähnlich denen von *B. subtilis* sind, ist noch unklar. So konnte zum Beispiel *purR* bei *Lactococcus lactis* ebenfalls nachgewiesen werden. Hier fungierte das Protein jedoch als positiver Regulator (Kilstrup et al. 1998a; Kilstrup et al. 1998b).

*SpoVG* wird bei *B. subtilis* als negativer Regulator der Sporulation vermutet. Das Transkript lässt sich vor allem in der exponentiellen Phase bei *B. subtilis* in großen Mengen nachweisen. Geringe Mengen des Transkriptes sind auch in der stationären Phase nachweisbar gewesen (Matsuno et al. 1999). Auch bei *S. epidermidis* 1457wt zeigte sich das gleiche Bild. Die größte Menge an Transkripten ließ sich in der exponentiellen Wachstumsphase nachweisen, in der stationären zeigte sich nur noch ein geringer Anteil des Transkriptes. In *S. epidermidis* 1457 ließ sich kein Einzeltranskript von *spoVG* nachweisen. Möglicherweise fehlt dem Gen bei *S. epidermidis* ein eigener Promotor (Bartscht 2002). Nach *in trans*-Komplettierung von 1457M12 mittels Protoplastentransformation und Verwendung eines Xylose-induzierbaren Promotors, wurden die erhaltenen phänotypischen Merkmale überprüft. Auch nach separater Komplementierung von *purR*, *yabJ* und *spoVG* blieb der biofilmbegleitende Phänotyp erhalten. Um die Biofilmbildung wieder herzustellen, bedarf es damit vermutlich der gemeinsamen Transkription von mindestens zwei der genannten Gene (Bartscht 2002).



**Abbildung 27:** Schematische Darstellung der Tn917 Insertionslokalisierung der Klasse II Mutante 1457M12 (Bartscht 2002). Die beiden identifizierten Transkripte sind oben eingezeichnet. Bei dem nicht benannten Gen vor *purR* handelt es sich um *yabH*.

### 7.5.2. Diskussion der verschiedenen Phasenvarianten von 1057M12

Die extreme Tendenz der Klasse II Transposonmutante, beim Versuch der Herstellung einer Zellsuspension zu klumpen, zeigte sich im genetischen Background von 1457, 1057 und 8400. Die Transduktanten aller Stämme entwickelten reproduzierbar jeweils eine graue und eine weiße biofilmmegative Phasenvariante. Die Analyse der grauen und der weißen 1057M12 Varianten per Pulsfeldgelelektrophorese konnte eindeutig zeigen, dass es sich bei den verschiedenen Kolonieförmungen um Transduktanten des Wildtypstammes 1057 handelte und nicht um Kontaminanten. Zusammenfassend zeigten die erhobenen Ergebnisse, dass es sich bei den zwei Kolonieförmungen um Morphologiephänomene handelte, die fest dem phänotypischen Profil der Tn917 Insertionsstelle der Klasse II Mutanten zugerechnet werden können.

Weitergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit der Klasse II Mutante 1457M12 zeigten, dass die Tn917-Insertion zu vielfältigen Phänotypänderungen führt. 1457M12 zeigte bei Wachstum auf Blutagar die schon oben erwähnte gräuliche Koloniefarbe, eventuell durch eine verringerte Pigmentbildung hervorgerufen. Intermittierend traten auch hier die weißen Phasenvarianten auf. Im Gegensatz zum Wildtypstamm bildete 1457M12 auf Blutagarplatten aus Humanblut keine Hämolysehöfe um die Kolonien. Die weiße Phasenvariante von 1457M12 hingegen war wieder in der Lage zu hämolysieren. Eine separate *in trans*-Komplementierung des Genes *spoVG* konnte sowohl den weißen Phänotyp als auch die Hämolysehöfe wieder herstellen. Anhand dieser Ergebnisse ist die Entwicklung der Phasenvarianten mit der Tn917 verursachten *spoVG*-Inaktivierung assoziiert (Bartscht 2002).

### 7.5.3. Diskussion der Reduktion der Methicillinresistenz bei 1057M12

Eine Populationsanalyse von 1057M12 auf Müller-Hinton-Agarplatten mit Oxacillinzusatz, wie bei den anderen Transduktanten dieser Arbeit, war aufgrund der nur schwer in Lösung zu bringenden Zellaggregate nicht reproduzierbar möglich. Aus diesen Gründen sind in dieser Arbeit nur die Ergebnisse der Gradientenplatten vorgestellt worden. Die Insertion von Tn917 konnte sowohl bei den grauen als auch den weißen Koloniformen per Southernblotting und Hybridisierung mit einer Tn917-spezifischen Sonde nachgewiesen werden.

Dass die Zunahme der sensiblen Zellen bei 1057M12 durch eine Beeinträchtigung der *mecA*-Transkription hervorgerufen wurde, konnte in weitergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 7.3) (Mack et al. 2002).

In der bis dato bestehenden Literatur ließ sich kein Hinweis auf einen Einfluss von einem der drei Genabschnitte auf die Methicillinresistenz bei Bakterien finden. Die vielfältigen phänotypischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtypstamm lassen jedoch regulative Einflüsse von *purR*, *yabJ* und *spoVG* auf weitaus mehr Genorte vermuten, die letztendlich für die beobachteten Resistenzminderungen bei 1057M12 verantwortlich sein könnten. Für *PurR* konnten bei *B. subtilis* in den vier verschiedenen Operons, *pur*, *purA*, *purR* und *pur* Pur-Box-Sequenzen nachgewiesen werden (Weng et al. 1995; Shin et al. 1997). Bei *E. coli* wurden kürzlich mehrere Genorte identifiziert, die möglicherweise durch *purR* koreguliert werden. An die Gene *glnB*, *prsA*, and *speA* war eine in vitro Anbindung von *PurR* möglich. Die Auswirkung auf die Expression dieser drei Genorte wurde mittels eines *lacZ*-Reporters untersucht. Dabei zeigte sich eine zwei bis dreifache Repression dieser Gene durch *purR*. Diese Gene haben mit dem Nukleotid-Metabolismus assoziierte Funktionen (He et al. 1993). Keiner dieser Genorte wurde bis dato bei *S. epidermidis* oder *S. aureus* beschrieben.

Die Vancomycinresistenz *vanA*-negativer Staphylokokken wird durch einen veränderten Zellwandaufbau verursacht. Dieses Motiv wurde zuerst bei dem *MRSA*-Stamm Mu50 beschrieben, konnte dann aber auch bei anderen vancomycinresistenten Stämmen nachgewiesen werden (Cui et al. 2000; Hiramatsu et al. 2001; Cui et al. 2003).

Diese Stämme exprimieren eine stark verdickte Zellwand, besitzen eine erhöhte Autolyserate und entlassen einen hohen Anteil an Zellwandmaterial in das umgebende Nährmedium (Hanaki et al. 1998a; Hanaki et al. 1998b). Die Peptidoglykanstränge der Zellwand besitzen deutlich verminderte Quervernetzungen und einen höheren Anteil an Pentapeptid-Ketten. Es wird ver-

mutet, dass die Vancomycinresistenz durch den veränderten Aufbau der Zellwand resultiert. So kann diese aufgrund des höheren Anteils an terminalen D-Alanyl-D-Alanin Dipeptiden einen höheren Anteil an Vancomycin binden. Auf der Anbindung an D-Alanyl-D-Alanin-Enden von Peptidoglycanvorstufen mit konsekutiver Verhinderung der Zellwandsynthese beruht die Wirkweise der Glykopeptidantibiotika (Sheldrick et al. 1978).

Mongodin et al. beschrieben erst kürzlich die Relevanz einer vermehrten Transkription von *purR* kontrollierten Genorte für die Vancomycinresistenz bei *S. aureus*. Die Arbeitsgruppe verglich per Microarray die Gen-Transkripte bei den intermediär vancomycinresistenten *S. aureus*-Stämmen HIP5827 und Mu50 (MHK=8 µg/ml) mit einem hoch vancomycinresistenten *S. aureus*-Stamm (MHK = 32 µg/ml). Unter den 35 Genen, die bei dem hochresistenten Stamm stark vermehrt transkribiert wurden, befanden sich 15 Gene, die in die Purinbiosynthese involviert sind. Das Repressorgen *purR* wies in diesem Stamm eine Mutation auf (Mongodin et al. 2003).

Parallelen zu den Klasse II Mutanten ergeben sich aufgrund der stark veränderten Koloniemorphologie dieser Mutante. Durch die Inaktivierung von *purR* und den angrenzenden Genen zeigen diese Mutanten die erwähnte graue Koloniemorphologie und die extreme Neigung, bei dem Versuch eine Bakteriensuspension herzustellen, zu klumpen. Diese Phänomene könnten Folge einer veränderten Zellwandzusammensetzung sein.

Zu erwähnen ist, dass für MU50 neben den Zellwandveränderungen noch eine erhöhte Expression von PBP2a beschrieben worden ist (Hiramatsu et al. 1997). Dies ist, wie oben bereits dargestellt, aufgrund der nachgewiesenen unveränderten Transkription von *mecA* bei dem in dieser Arbeit verwendeten *S. epidermidis*-Stamm 1057M12 nicht der Fall. Von einer Reduktion der Methicillinresistenz bei *vanA*-negativen methicillinresistenten Staphylokokken ist bisher nicht berichtet worden. Somit sind die Beobachtungen betreffend vancomycinresistenter Staphylokokken sicher nur begrenzt mit denen bei 1057M12 übereinstimmend. Dennoch kann eine *purR*-vermittelte Regulation von Enzymen der Zellwandsynthese angenommen werden. Zukünftige Untersuchungen der Klasse II Mutanten sollten daher eine Analyse der Zellwandzusammensetzung mit einbeziehen.

Aktuellere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe von *S. epidermidis* 1457M12 zeigten in Schüttelkulturen ein Absinken der Zellzahlen nach ca. 10 Stunden. Der Wildtypstamm befand sich zu diesem Zeitpunkt in der stationären Wachstumsphase. Während die Zellzahlen des Wildtypstammes die nächsten Stunden annähernd konstant blieben, sanken diese bei der Klasse II Mutante auf knapp die Hälfte der OD<sub>578</sub> des Wildtypstammes ab. Die Untersucher vermuteten, dass

1457M12 verfrüht in die Absterbephase eintritt. Sowohl beim Wachstum in der Schüttelkultur als auch in Mikrotiterplatten enthielten die Kulturen des Wildtypstammes nach 16 Stunden ca. fünffach mehr Zellen als die Mutante. Die Zelldichte zum Zeitpunkt der exponentiellen Wachstumsphase hingegen war bei Wildtypstamm und Mutante gleich (Bartscht 2002).

Die Oxacillingradientenplatten wurden in dieser Arbeit nach 48 Stunden abgelesen. Das deutlich geringere Wachstum auf den Gradientenplatten könnte mit dem oben angeführten Phänomen zusammenhängen. Möglicherweise beruht die vermutete Reduktion der Methicillinresistenz nicht auf einer wirklichen Sensibilisierung der Subpopulationen sondern auf einem generellen Wachstumsdefizit, welches auch ohne Antibiotikaexposition bei 1057M12 besteht. Um diese Frage zu klären, wären Untersuchungen der Wachstumskinetiken von 1057M12 und dem Wildtypstamm ohne Antibiotikazusatz notwendig.

Zusammengefasst lässt sich mit dem gegenwärtigen Stand der Forschung die in dieser Arbeit geschilderte verminderte Methicillinresistenz der Klasse II Transduktante nicht ausreichend klären. Sicher beruhen die vielfältigen phänotypischen Veränderungen der Klasse II Mutante auf noch unbekanntem koregulativen Wirkungen der *purR*-, *yabJ*- und *spoVG*-Genorte. Weitergehende Sequenzierungen des *S. epidermidis* Genoms und das Auffinden von neuen *Pur-Box*-Sequenzen könnten diesbezüglich neue regulativ abhängige Genregionen bei *S. epidermidis* identifizieren. Da der Angriffsort der Isoxazolympenicilline die Zellwand ist und die auffälligen unterschiedlichen Koloniemorphologien wahrscheinlich ebenfalls Ursache unterschiedlicher Zellwandzusammensetzungen sind, ist die Analyse der Zellwand der Klasse II vielversprechend und sollte Gegenstand weiterer Forschungen sein.

### **7.6. Klasse III Transduktante 1057M15: Tn917-Insertion in Gen *rsbU***

Die Populationsanalyse der Klasse III Transduktante 1057M15 zeigte, im Vergleich zum Wildtypstamm, eine deutliche Zunahme methicillinsensiblerer Subpopulationen. Unsere Arbeitsgruppe konnte inzwischen das molekulargenetische Korrelat der Phänotypänderung identifizieren. Die Analyse der das Transposon flankierenden chromosomalen DNA-Sequenzen zeigte, dass die Tn917-Insertion in 5' Richtung 19 bp vom Translations-Start-Codon des *rsbU*-Gens lokalisiert ist. RsbU ist Teil des Sigma<sup>B</sup>-Operons von *S. epidermidis*, welches für den alternativen Sigmafaktor  $\sigma^B$  (*Sig<sup>B</sup>*) kodiert (Knobloch et al. 2001; Knobloch et al. 2004).

### 7.6.1. Der alternative Sigmafaktor $\sigma^B$

Bei höhergradigen Änderungen des Zellstoffwechsels, z.B. bei Reduktion des Nährstoffangebotes, dem Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase in die stationäre oder bei Exposition der Zelle mit exogenen Stressoren (wie z. B. Alkohol, Antibiotika, Hitze, Salz u.s.w.), ist die situationsabhängige Expression vieler unabhängiger Genabschnitte notwendig. Der alternative Sigmafaktor  $\sigma^B$ , zuerst bei *Bacillus subtilis* beschrieben, kontrolliert nachweislich die Transkription von mehr als 100 Genen entsprechend des induzierenden exogenen Stimulus. Die Genprodukte der unter dem Einfluss von  $\sigma^B$  stehenden Gene werden entsprechend ihrer Funktion als “general stress proteins“ (GSPs, z.B. *GsiB*, *Ctc* und *RsbW*) und “heat-specific stress proteins“ (Hsps, z.B. *DnaK* und *GroEL*) bezeichnet (Volker et al. 1994; Maul et al. 1995; Hecker et al. 1996; Hecker et al. 1998).

Die Transkriptionsregulation erfolgt durch Anbindung von  $\sigma^B$  an spezifische Bindungsstellen, die am Core-Enzym der RNA-Polymerase lokalisiert sind. Das Core-Enzym der RNA-Polymerase mit angelagertem Sigmafaktor wird als Holoenzym bezeichnet (Holoenzym = das komplette, aus Coenzym und Apoenzym bestehende Enzym). Der Sigmafaktor selbst hat keine katalytische Funktion. Seine Funktion besteht in der spezifischen Erkennung des Promotors entlang des codogenen DNA-Stranges und dient damit der gezielten Transkription einzelner DNA-Abschnitte in definierten Situationen. Durch die Selektivität der Sigmafaktoren für bestimmte Gruppen von DNA-Abschnitten „führen“ diese praktisch die RNA-Polymerase an die sinnvollen Promoterstellen und ermöglichen dort erst die für die Transkription notwendige Interaktion. Sigmafaktoren stellen damit einen Mechanismus dar, der Bakterien die simultane Transkription einer Vielzahl unabhängiger Gene ermöglicht, sofern alle diese Gene die für den Sigmafaktor spezifischen Promotorelemente enthalten (Finlay et al. 1997).

$\sigma^B$  ist bis jetzt nur bei einer kleinen Gruppe grampositiver Bakterien beschrieben worden. So konnte man das Protein bei Zellen der *Bacillus*-, *Staphylococcus*- und *Listerien*- Gattungen identifizieren. Verwandte regulative Proteine wurden bei *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces*-Spezies und in Zyanobakterien (*Synechocystis*-Spezies) beschrieben (De Maio et al. 1996; De Maio et al. 1997; Kullik et al. 1997; Mittenhuber 2002; Viollier et al. 2003; Ferreira et al. 2004).

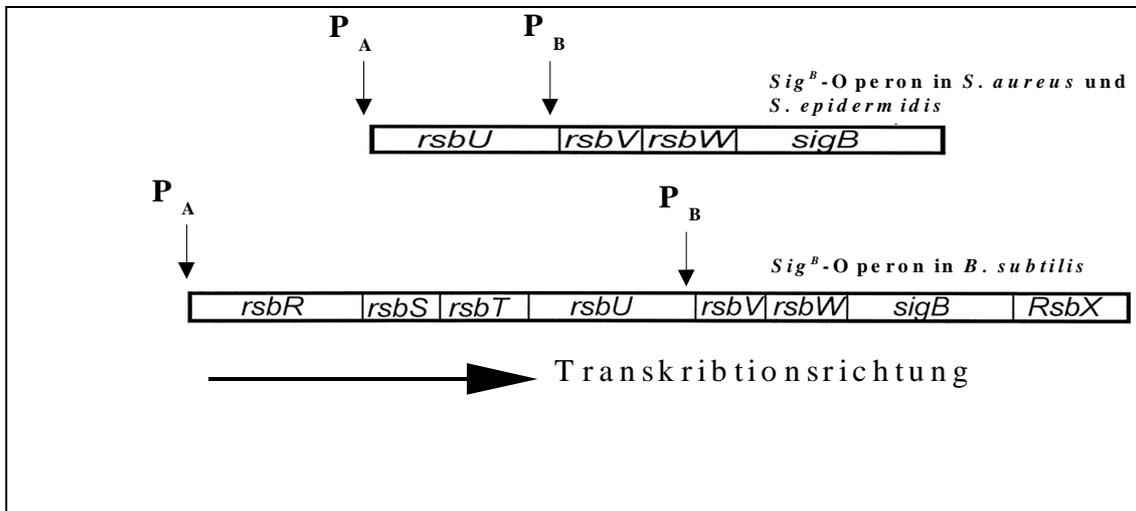
### 7.6.2. Struktur des $\sigma^B$ -Operons bei *B. subtilis*, *S. aureus* und *S. epidermidis*

Das Operon besteht bei *B. subtilis* aus insgesamt 8 Genen, die in folgender Reihenfolge angeordnet sind: *rsbS*, *rsbR*, *rsbT*, *rsbU*, *rsbV*, *rsbW*, *sigB* und *rsbX*. Dabei steht *rsb* für “regulation of  $\sigma^B$ “. Alle 8 Gene werden beginnend von dem  $\sigma^A$ -abhängigen Promotor  $P_A$  transkribiert. Ein interner  $\sigma^B$ -abhängiger Promotor  $P_B$  ist zwischen *rsbU* und *rsbV* positioniert und erhöht die Expression der nachfolgenden Gene (*rsbV*, *rsbW*, *sigB* und *rsbX* bei *sigB*-Aktivität (Kalman et al. 1990; Wise et al. 1995).

Strukturell zeigt das bei *S. aureus* identifizierte  $\sigma^B$ -Operon eine ausgeprägte Homologie zu dem Operon in *B. subtilis*. Wu et al beschrieben bei *S. aureus* einen vier open-reading-frames umfassenden Gencluster (orf333, orf108, orf159 und orf256) und benannten diesen aufgrund der umfangreichen Übereinstimmungen nach dem bei *B. subtilis* identifizierten  $\sigma^B$ -Operon. Orf256 entsprach dabei dem  $\sigma^B$ -Gen ( $\sigma^B$ ), das Genprodukt wurde daher als *Sigma<sup>B</sup>*-Faktor (*Sig<sup>B</sup>*) benannt. Orf333, orf108, orf159 wurden entsprechend ihrer Homologien den Genen *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* zugeordnet. In 3' Richtung von orf333 (*rsbU*) ließ sich auch bei *S. aureus* ein  $\sigma^A$  abhängiger Promotor und in 5' ein  $\sigma^B$ -abhängiger Promotor nachweisen. (Wu et al. 1996).

Bei *S. epidermidis* konnte unsere Arbeitsgruppe mittlerweile den gleichen strukturellen Aufbau des  $\sigma^B$ -Operons wie bei *S. aureus* nachweisen (siehe Abbildung 28) (Knobloch et al. 2001)

**Abbildung 28:** Schematische Darstellung des  $\sigma^B$ -Operons bei *S. aureus*, *S. epidermidis* und *B. subtilis*.



$P_A$  und  $P_B$  kennzeichnen die Lokalisation des  $\sigma^A$  – bzw.  $\sigma^B$ - abhängigen Promotors (Abbildung nach (Smirnova et al. 1998))

### 7.6.3. Regulationsmechanismen des $\sigma^B$ -Operons

Wie im vorigen Textabschnitt beschrieben, umfasst das  $\sigma^B$ -Operon von *B. subtilis* acht Gene, das von *S. aureus* und *S. epidermidis* lediglich vier. Da die Regulationsmechanismen des  $\text{Sig}^B$ -Operons bei *B. subtilis* am ausführlichsten erforscht worden sind, sollen diese hier zunächst aufgeführt werden.

Die Transkriptionsinduktion von  $\sigma^B$  erfolgt bei einer Verringerung des Nährstoffangebotes, dem Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase sowie bei Exposition der Zelle zu exogenen Stressoren (Hitze, Kälte, Alkohol, Antibiotika) (Benson et al. 1993a; Boylan et al. 1993; Volker et al. 1994; Smirnova et al. 1998). Die beiden regulativen Proteine *RsbW* und *RsbU* spielen bei der Aktivitätskontrolle von  $\sigma^B$  eine zentrale Rolle.

Bei Veränderungen des Nährstoffangebotes mit unterschiedlichen intrazellulären ATP-Spiegeln ist die Transkription *RsbW*-kontrolliert. Das Protein ist in der Lage entweder mit unphosphoryliertem *RsbV* oder mit  $\sigma^B$  eine Komplexbildung einzugehen. Durch Komplexbildung mit  $\sigma^B$  verhindert *RsbW* die Bildung des vollständigen Holoenzym (RNA-Polymerase Core-Enzym + Sigmafaktor) und somit die Anbindung an den codogenen DNA-Strang zur Transkription. Bei hohen intrazellulären ATP-Spiegeln, wie sie bei guter Nährstoffversorgung im Medium und

damit bei Zeiten von exponentiellem Wachstum bestehen, phosphoryliert *RsbW* *RsbV* zu *RsbV-P*. ATP fungiert hierbei als Phosphatdonor. *RsbW* bindet in diesem Fall vermehrt an  $\sigma^B$ . Sinkt der ATP-Spiegel hingegen ab, wird die Phosphorylierung zunehmend ineffizienter. Der steigende Anteil von dephosphoryliertem *RsbV* bindet zunehmend *RsbW*. Konsekutiv erhöht sich die Menge an freiem  $\sigma^B$  und damit die Transkriptionsrate von  $\sigma^B$ . Da  $\sigma^B$  durch Anbindung an den spezifischen Promotor  $P_B$  die Transkription des  $\sigma^B$ -Gens selbst induzieren kann, hat die Produktion von  $\sigma^B$  eine schnelle Potenzierung der Genprodukte zur Folge. Diese Regulationswege führen zu einer Expressionshemmung von  $\sigma^B$  in Situationen mit exponentiellem Wachstum bei hohem Nährstoffangebot. Bei Abnahme der Nährstoffe und dem folgenden Wechsel in eine stationäre Wachstumsphase wird  $\sigma^B$  hingegen vermehrt transkribiert (Kalman et al. 1990; Benson et al. 1992; Benson et al. 1993b; Benson et al. 1993c; Boylan et al. 1993; Dufour et al. 1994; Voelker et al. 1995b; Alper et al. 1996; Kang et al. 1996; Yang et al. 1996; Kang et al. 1998).

Exogene Stressoren (z.B. Hitze, osmotische Veränderungen, Ethanol- oder Antibiotikaexposition) setzen eine ATP- und *RsbW*- unabhängige Aktivierung von  $\sigma^B$  in Gang. In diesem Fall wird *RsbT* aktiviert. Dieses Protein ist normalerweise aufgrund einer Bindung an den negativen Regulator *RsbS* inaktiv. *RsbR*, ein weiteres Regulatorprotein, ist in der Lage, an *RsbS* oder *RsbT* zu binden. Die genaue Funktion und Aktivierung dieses Proteins ist noch unklar. Bei Stressexposition phosphoryliert und inaktiviert *RsbT* das Protein *RsbS*. Ferner ist *RsbT* in der Lage, *RsbU* zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Dieses wiederum dephosphoryliert *RsbV-P* unabhängig vom bestehenden ATP-Vorkommen. Die daraus resultierende *RsbW*-Bindung an *RsbV* führt, wie oben beschrieben, zur vermehrten  $\sigma^B$ -Transkription. Das durch *RsbT* inaktivierte *RsbS-P* kann durch *RsbX* dephosphoryliert und damit reaktiviert werden. Dieses führt zu einer vermehrten Bindung von *rsbT*. Da *rsbX* in 5' von  $\sigma^B$  lokalisiert ist, steigt der *RsbX*-Level mit steigender  $\sigma^B$ -Aktivität. Dies scheint ein Kontrollmechanismus zu sein, um eine ungezügeltere  $\sigma^B$ -Aktivität zu begrenzen (Boylan et al. 1993; Voelker et al. 1995a; Voelker et al. 1995b; Wise et al. 1995; Voelker et al. 1996; Yang et al. 1996).

Bei *S. epidermidis* und *S. aureus* konnten die Gene *rsbS*, *rsbT*, *rsbR* und *rsbX* nicht nachgewiesen werden (Wu et al. 1996; Knobloch et al. 2001). Unsere Arbeitsgruppe konnte mittlerweile die gleichen Regulationsbeziehungen von *rsbU*, *rsbV*, *rsbW* und  $\sigma^B$  zueinander wie bei *S. aureus* und *B. subtilis* aufzeigen (Knobloch et al. 2004). Von regulativen Einflüssen auf *rsbU* durch bis dato

noch nicht identifizierte Gene ist ebenfalls auszugehen. Dieses muss Gegenstand weiterer Forschung sein.

#### 7.6.4. Tn917-Insertion in *rsbU* führt zu einer Reduktion der Methicillinresistenz

Die Tn917-Insertion in *rsbU* der Klasse III Transduktante 1057M15 führte zu einer signifikanten Reduktion der Methicillinresistenz. Wie oben beschrieben, ist *rsbU* an der Aktivierung des  $\sigma^B$ -Operons bei Exposition zu exogenen Stressoren, wie z.B. Antibiotika, maßgeblich beteiligt, so dass die beobachtete Resistenzminderung bei 1057M15 zu einem inaktivierten *rsbU*-Genlokus paßt.

Wu et. al. beschrieben ebenfalls eine drastische Reduktion der Methicillinresistenz bei dem homogen methicillinresistenten *S. aureus*-Stamm COL. Die zwei Tn551-Transduktanten RUSA168 (Tn551 Insertion in  $\sigma^B$ ) und RUSA122 (Tn551 Insertion in *rsbU*) zeigten beide eine drastische Reduktion der MHK im Vergleich zum Wildtypstamm. Diese war bei *S. aureus* COL ausgeprägter als bei *S. epidermidis* 1057 M15. Bei RUSA168 reduzierte sich die MHK von 1600  $\mu\text{g/ml}$  (COL-Elternstamm) auf 25  $\mu\text{g/ml}$ , bei RUSA 122 auf 50 $\mu\text{g/ml}$  (Wu et al. 1996). Die Gründe für die bei 1057M15 weitaus schwächere Reduktion der MHK können vielfältig sein. Bei *S. epidermidis* 1057wt handelt es sich um einen heterogen methicillinresistenten, bei *S. aureus* COL hingegen um einen homogen resistenten Stamm. Wie schon in der Einleitung dieser Arbeit besprochen, ist das genetische Korrelat einer homogen exprimierenden Methicillinresistenz unklar. Bei *S. aureus* gibt es mehrere Hinweise darauf, dass an der Expression einer homogenen high-level Resistenz das Zusammenspiel multipler unabhängiger Genorte notwendig ist (De Jonge et al. 1991; Berger-Bachi et al. 1992; De Lencastre et al. 1994).

Falls ein Teil dieser Gene einer  $\sigma^B$ -Kontrolle unterliegen würde, so wäre eine drastischere MHK-Reduktion aufgrund der multiplen betroffenen Gene mit essentieller Relevanz für eine maximale, homogene Expression der Methicillinresistenz erklärbar. Eine bis jetzt noch nicht bekannte  $\text{Sig}^B$ -Kontrolle der vielen bei *S. aureus* beschriebenen Genorte mit Einfluss auf die Methicillinresistenz (*fem*, *aux*, *chr\**) wäre denkbar (siehe Kapitel 2.4.7).

Wie oben bereits in Kapitel 7.3 beschrieben, konnte ein Einfluss der *rsbU*-Inaktivierung auf die Transkription von *mecA* durch unsere Arbeitsgruppe bereits ausgeschlossen werden. Passend dazu zeigte sich auch bei Wu et al keine Veränderung der von RUSA168 und RUSA122 produzierten PBP2a Mengen (Wu et al. 1996; Mack et al. 2002).

### 7.6.5. Tn917-Insertion in *rsbU* führt zu einem biofilmnegativen Phänotyp

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tn917-Insertion in *S. epidermidis* 1057M15, 1457M15 und 8400M15 zur Expression eines biofilmnegativen Phänotyps führte. Da die Phänotypänderung bei allen Stämmen aufgetreten war, handelte es sich um ein generelles Phänomen der Klasse III Transduktanten. Offensichtlich ist die Expression von Biofilm in *S. epidermidis* *rsbU* abhängig. Sequenzanalysen des *icaADBC*-Operons erbrachten keinen Anhalt für einen  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor (Knobloch et al. 2001).

Aktuellere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten aufzeigen, dass in *S. epidermidis*-Transduktanten mit inaktiviertem *rsbU* oder  $\sigma^B$  eine vermehrte Transkription von *icaR* besteht. Bei *icaR* handelt es sich um einen negativen Regulator des *icaADBC*-Genclusters, der sowohl bei *S. epidermidis* als auch bei *S. aureus* nachgewiesen werden konnte (Conlon et al. 2002a; Conlon et al. 2002b; Jefferson et al. 2003; Jefferson et al. 2004). Sequenzanalysen von *icaR* erbrachten ebenfalls keinen Anhalt für einen  $\sigma^B$ -abhängigen Promotor. Anhand dieser Ergebnisse ist ein  $\sigma^B$ -kontrollierter, bis jetzt noch unbekannter, negativer Regulator von *icaR* zu vermuten. Der Wegfall dieses negativen Regulators, hervorgerufen durch die Inaktivierung von *rsbU*, führte zu dem in dieser Arbeit beobachteten biofilmnegativen Phänotyp von 1057M15, 1457M15 und 8400M15 (Knobloch et al. 2004).

Die exogenen Stressoren NaCl und Ethanol, die in *B. subtilis* *rsbU*-vermittelte  $\sigma^B$ -Aktivierungen hervorrufen, haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Biofilmbildung in Klasse III *S. epidermidis*-Transduktanten. In aktuellen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe exprimierten die Klasse III Transposonmutanten der Stämme 1457 und 8400, nach Zusatz von Ethanol zum Nährmedium, wieder Biofilm und PIA. Die Zugabe von NaCl konnte hingegen keine erneute Biofilmbildung induzieren (Knobloch et al. 2001; Knobloch et al. 2002). Conlon et al. konnten zeigen, dass Ethanol zu einer verminderten *icaR*-Transkription führt und so zu einem erneut biofilmpositiven Phänotyp führen kann. Die genaue Vermittlung der ethanolinduzierten *icaR*-Hemmung ist noch unklar (Conlon et al. 2002a).

Auch bei *S. aureus* ist ein Einfluss von  $\sigma^B$  auf die Expression von Biofilm beschrieben worden. Rachid et al berichteten von einer  $\sigma^B$ -null Mutante eines klinischen *S. aureus*-Isolates, welche ebenfalls einen biofilmnegativen Phänotyp exprimierte. Nachdem der Stamm durch ein Plasmid mit einem intakten  $\sigma^B$ -Operon komplementiert worden war, zeigte dieser erneut einen biofilmpositiven Phänotyp (Rachid et al. 2000). Ob sich jedoch diese Beobachtung generell auf alle *S. aureus*-Stämme übertragen lässt, ist fraglich. Valle et al. berichteten von einem *S. aureus*-

Stamm, bei dem das Virulenz-Kontrollgen *sarA* einen weitaus dominierenderen Einfluss auf die Biofilmbildung besaß als  $\sigma^B$  (Valle et al. 2003). *SarA* gehört, neben *agr* und *sae* zu einer Gruppe von Kontrollgenen, welche die Expression einer Reihe von Virulenzfaktoren bei *S. aureus* steuern. (Kornblum et al. 1990; Chien et al. 1998b; Chien et al. 1998a; Manna et al. 1998).

### **7.7. Klasse IV Transduktante 1057M17: Expression einer homogenen Methicillin-resistenz durch Tn917-Insertion**

Die Insertion von Tn917 führte bei *S. epidermidis* 1057 zu einer signifikanten Zunahme von resistenten Subpopulationen. Im Rahmen der Populationsanalyse exprimierte die Transduktante statt der ursprünglichen heterogenen Methicillinresistenz des Wildtypstammes einen homogen resistenten Phänotyp. Die Gesamt-MHK der Transduktante änderte sich hingegen nicht. Darüber hinaus führte die Insertion in *S. epidermidis* 1457, 8400 und 1057 zu einem schwach biofilm- und PIA-positiven Phänotyp.

Sequenzanalysen der an das Transposon angrenzenden chromosomalen DNA bei 1457M17 ergaben, dass sich die Tn917-Insertion in einem open-reading-frame befindet, dessen Gensequenzen auch in anderen Bakterienspezies beschrieben worden sind. Über die Funktion und Zuordnung des Genes ist bis jetzt noch nichts weiteres bekannt (Knobloch 1999; Knobloch et al. 2003) (Knobloch, J.K.-M.; D.Mack; unveröffentlichte Daten.).

Eine Änderung der Transkriptionsfrequenz von *mecA* in *S. epidermidis* 1057M17 konnte als Ursache für die veränderte Methicillinresistenz ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 7.3). Direkte oder indirekte regulative Einflüsse des durch die Tn917-Insertion betroffenen Genlokus auf *mecA* erklären die beobachteten Resistenzveränderungen nicht (Mack et al. 2002). Bei Untersuchungen mit methicillinresistenten *S. aureus* Stämmen konnten einige Genorte identifiziert werden, die bei Inaktivierung durch Transposonmutagenese einen Wechsel von einer heterogenen zu einer homogenen Methicillinresistenz bewirkten. Ein Einfluss dieser Genorte auf die Biofilmproduktion bei *S. aureus* ist bis jetzt nicht beschrieben worden. Bei *S. epidermidis* konnte bis dato keines dieser Gene nachgewiesen werden.

Ryffel et al. beschrieben, dass ein zuvor methicillinsensibler *S. aureus*-Stamm nach Aufnahme des *mecA* enthaltenden Plasmides pBBB79 eine heterogene Methicillinresistenz exprimierte. Die aus diesem Stamm unter Exposition von hohen Methicillinkonzentrationen im Nährmedium isolierten Subklone zeigten einen homogenen resistenten Phänotyp. Auch nach mehreren Wachstumpassagen in Medien ohne Methicillinzusatz behielten die Subklone ihren homogenen Phänotyp. Die Eliminierung des *mecA* enthaltenden Plasmides führte sowohl bei dem heterogenen Ursprungsstamm als auch bei der homogenen Subpopulation zu dem ursprünglichen methicillinsensiblen Phänotyp. Nach erneuter Aufnahme des Plasmides zeigte die ehemals homogen resistente Variante wieder eine homogene high-level Resistenz, die ehemals heterogene Population erneut eine heterogene low-level Resistenz. Die Arbeitsgruppe postulierte daraufhin, dass die Genmutationen, die entscheidend für die Entwicklung eines heterogenen oder eines homogenen Phänotyps sind, nicht durch den *mec*-Genlocus vermittelt werden und außerhalb von *mec* lokalisiert sind. Die Arbeitsgruppe bezeichnete diese Mutationen als *chr\** (chromosomal mutations). Bei diesen Mutationen handelt es sich allerdings nur um ein rein hypothetisches Konstrukt, genaue Gensequenzen und Genlokalisationen wurden nicht identifiziert (Ryffel et al. 1994a). Bei *S. aureus* wurden mehrere Genorte beschrieben, die in die Gruppe der *chr\**-Gene gehören könnten.

Die Arbeitsgruppe um Fujimara et al. isolierten aus einem low-level resistenten *S. aureus*-Stamm (MHK: 6,3 µg/ml) eine hochresistente Mutante mit einer MHK von 1600 µg/ml. Ursache für die erhöhte Resistenz war die Mutation in einem als *lytH* bezeichneten Genabschnitt. *LytH* wies ausgeprägte Homologien zum *lytC*-Genort in *B. subtilis* auf. Dieser hat für Zelltrennung, Zellwanderneuerung und antibiotikainduzierte Zellyse eine wichtige Funktion. *LytH* kodiert dabei für eine N-acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase (Fujimura et al.; Blackman et al. 1998) Auch Gustafson et al. fanden bei einer homogen exprimierenden high-level Mutation eines resistenten *S. aureus* eine geringere autolytische Aktivität als bei dem low-Level resistenten Ursprungsstamm (Gustafson et al. 1992). Bei *S. epidermidis* wurde bis dato kein Genabschnitt beschrieben, der Homologien zu *lyt\**-Genorten aufweist. Die autolytische Aktivität der Klasse IV Mutanten wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und müsste Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Kondo et al. beschrieben, dass ein Tochterstamm (h4) des pre-MRSA-Stammes N315 einen neuen Phänotyp exprimierte, den die Arbeitsgruppe als „eagle type“ Resistenz bezeichnete. Der von N315 unter Methicillinexposition isolierte Stamm h4 zeigte eine ausgeprägte Methicillin-

resistenz bei Wachstum in Medien mit hohen Methicillinkonzentrationen (128 µg/ml bis 512 µg/ml Methicillin) und gleichzeitig paradoxerweise eine Sensibilität bei niedrigen Methicillinkonzentrationen (2 µg/ml bis 16 µg/ml). Die Deletion des *mecI*-Genlokus in h4 führte zu einer homogenen Methicillinresistenz. Es gelang, zwei Genorte aus h4 zu klonieren, die als *bmrA* und *bmrB* bezeichnet worden sind. Sequenzuntersuchungen ergaben, dass *bmrA* Homologien zu Amidohydrolase-Enzymen, *bmrB* zu Acyl-Transportproteinen (ACP=acyl carrier proteins) aufweist. Nach Transformation von *bmrA* und *bmrB* in N315 zeigte dieser plötzlich eine “eagle type“ Resistenz. Eine Transformation in den heterogen exprimierenden Stamm LR5 führte zu einer homogenen Methicillinresistenz. Die Arbeitsgruppe geht davon aus, dass ein intakter *mecI* und *bmrA/bmrB* Genlokus zu einer “eagle type“ Resistenz führt. Für den Wechsel von einem heterogenen zu einem homogenen Phänotyp sind hingegen intakte *bmrA/bmrB*-Genorte bei gleichzeitig inaktiviertem *mecI*-Genlokus notwendig. Die Menge an produziertem PBP2a hatte auch bei dieser Studie keinen Einfluss auf den Resistenztyp und die MHK (Kondo et al. 2001).

Für die M17-Insertionslokalisation ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um Genorte handelt, die für ein regulatives Protein kodieren, welches eine direkte oder indirekte Transkriptionskontrolle auf den *icaADBC*-Gencluster ausübt. Wie in Kapitel 7.3 beschrieben, konnte der Transfer des Plasmides pTX*icaADBC* nach Xylose-Induktion die Biofilmproduktion in 1457M17 wiederherstellen. Diese Ergebnisse schließen eine Beteiligung des inaktivierten Genortes an der Produktion von PIA-Vorstufen oder ein Transportsystem für die Exportierung von PIA nach extrazellulär aus (Mack et al. 2000b). Die Inaktivierung regulativer Gensequenzen, welche direkt oder indirekt die *icaADBC*-Transkription beeinflussen, würde die aufgeführten Ergebnisse am ehesten erklären.

Zusammengefasst handelt es sich bei der M17-Insertionslokalisation um ein Gen mit der Fähigkeit zur Transkriptionskontrolle von *icaADBC* und einem direkten oder indirekt regulativen Einfluss auf die Expression der Methicillinresistenz. Dabei besteht keine Veränderung der *mecA*-Transkriptionsrate, sondern die veränderte Expression eines Proteins, welches auf noch nicht bekanntem Wege zu einer Reduktion der Sensibilität gegenüber Methicillin führt. Die Identifizierung dieses Proteins muss Gegenstand weiterer Forschung sein. Die Ergebnisse könnten interessante neue Erkenntnisse über den Zusammenhang der beiden Virulenzfaktoren Biofilmbildung und Methicillinresistenz erbringen.

**7.8. Klasse IV und V Transduktanten: 1057M16 und M20 Insertion in *glcA* und *glcT***

*S. epidermidis* 1057M16 und 1057M20 zeigten keine Veränderung der Methicillinresistenz in der Populationsanalyse und auf den Oxacillingradientenplatten. Weitergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit *S. epidermidis* 1457M16 und 1457M20 konnten zeigen, dass Tn917 bei beiden Mutanten in Gene des Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase Systems (PTS) inseriert. Dieses Enzymsystem wird bei vielen Bakterien zum Transport unterschiedlicher Zucker nach intrazellulär genutzt. Ferner hat es eine Funktion bei Signaltransduktion, Chemotaxis und Stickstoffmetabolismus.

Bei 1457M20 befindet sich die Tn917-Insertion in *glcA*, welches für das Glucose spezifische Enzym II (EII) kodiert. In der Mutante 1456M16 befindet sich Tn917 im Antiterminatorgen *glcT*, welches die Transkription von *glcA* reguliert. Die Inaktivierung der beiden Gene führt zu dem in dieser Arbeit beobachteten mukoidnegativen und biofilmpositiven Phänotyp von 1057M16 und 1057M20. Weitergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Mutanten diesen Phänotyp auf peptonhaltigen Medien exprimieren, die mit N-Acetyl-Glucosamin substituiert sind. Eine Substitution mit Glucosamin konnte bei 1457M16 und M20 den mukoidpositiven Phänotyp des Wildtypstammes wieder induzieren.

Wie oben erwähnt, konnte in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit kein Einfluss der Tn917-Insertion in diesen beiden Transduktanten ermittelt werden.

## 8. Zusammenfassung

Biofilmbildung und Methicillinresistenz stellen zwei wesentliche Pathogenitätsfaktoren von *S. epidermidis* dar. Der *icaADBC*-Genlokus ist als genetisches Korrelat für Biofilmbildung und PIA-Produktion bei *S. epidermidis* und *S. aureus* identifiziert worden. Grundlage dieser Arbeit bildeten sechs verschiedene Tn917-Mutantenklassen des methicillinsensiblen, *mecA*-negativen *S. epidermidis*-Stammes 1457, die alle direkt oder indirekt regulativ die Transkription des *icaADBC*-Genlokus beeinflussen. Die Transposoninsertionslokalisationen M10, M13 (Klasse I), M12 (Klasse II), M15 (Klasse III), M17 (Klasse IV), M16 (Klasse V) und M20 (Klasse VI) wurden in dieser Arbeit von *S. epidermidis* 1457 in den methicillinresistenten, *mecA*-positiven *S. epidermidis*-Stamm 1057 transduziert.

Das phänotypische Profil der resultierenden 1057-Transduktanten entsprach dem der korrespondierenden 1457 Mutanten. Southernblot-Hybridisierungen mit einer Tn917-spezifischen Sonde zeigten Tn917-Insertionen auf identischen *EcoRI*-Fragmenten der 1057- und 1457-Transduktanten. Eine *mecA*-spezifische Sonde hybridisierte mit den gleichen DNA-Fragmenten *EcoRI*-gespaltener DNA von *S. epidermidis* 1057 und allen in dieser Arbeit geschaffenen 1057-Transduktanten.

In Populationsanalysen auf oxacillinhaltigen Müller-Hinton-Agarplatten zeigte *S. epidermidis* das für *mecA* positive Stämme typische heterogene Resistenzmuster mit einer MHK  $\geq 6 \mu\text{g/ml}$  für 90 % aller Zellen. Die Populationsanalysen der Klasse I, V und VI Transduktanten entsprachen denen des Wildtypstammes. Die Klasse III Transduktante 1057M15 zeigte eine signifikante Zunahme sensiblerer Subpopulation mit einer Reduktion der MHK auf  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  für 90 % der Zellen. Die Klasse IV Transduktante 1057M17 exprimierte ein homogenes Resistenzprofil mit einer MHK von  $\geq 50 \mu\text{g/ml}$  für 90 % aller Zellen. Vergleichende Resistenzprüfungen des Wildtypstammes und aller Transduktanten auf Oxacillingradientenplatten erbrachten die gleichen Ergebnisse. Die mittels Populationsanalyse nicht charakterisierte Klasse II Transduktante 1057M12 zeigte auf den Gradientenplatten ein signifikant vermindertes Wachstum im Vergleich zum Wildtypstamm. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass (i) die in dieser Arbeit verwendeten Tn917-Insertionen in mehreren unabhängigen *S. epidermidis*-Stämmen die gleichen Phänotypänderungen induzieren und dass (ii) drei Tn917-Insertionslokalisationen, welche die Expression von *icaADBC* auf transkriptioneller Ebene beeinflussen, zu signifikanten Veränderungen der Methicillinresistenz führen.

## 9. Literaturverzeichnis

- Acar, J. F., P. Courvalin and Y. A. Chabbert** (1970). "Methicillin-resistant staphylococemia: bacteriological failure of treatment with cephalosporins." *Antimicrobial Agents Chemother* 10: 280-285.
- Alper, S., A. Dufour, D. A. Garsin, L. Duncan and R. Losick** (1996). "Role of adenosine nucleotides in the regulation of a stress-response transcription factor in *Bacillus subtilis*." *J Mol Biol* 260(2): 165-177.
- Annear, D. I.** (1968). "The effect of temperature on resistance of *Staphylococcus aureus* to methicillin and some other antibiotics." *Med J Aust* 1(11): 444-446.
- Archer, G. L., D. M. Niemeyer, J. A. Thanassi and M. J. Pucci** (1994a). "Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 38(3): 447-454.
- Archer, G. L. and D. M. Niemeyer** (1994b). "Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci." *Trends Microbiol* 2(10): 343-347.
- Barber, M.** (1961). "Methicillin-resistant staphylococci." *J Clin Pathol* 14: 385-393.
- Bartscht, K.** (2002). "Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* an Oberflächen: Charakterisierung einer Biofilm-negativen Transposonmutante." Dissertation 2002 im Fachbereich Biologie, Universität Kiel.
- Bayer, M. G., J. H. Heinrichs and A. L. Cheung** (1996). "The molecular architecture of the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 178(15): 4563-4570.
- Benson, A. K. and W. G. Haldenwang.** (1993a). "The *sB*-dependent promoter of the *Bacillus subtilis sigB* operon is induced by heat shock." *J. Bacteriol.* 175: 1929 - 1935.
- Benson, A. K. and W. G. Haldenwang** (1993b). "*Bacillus subtilis* sigma B is regulated by a binding protein (RsbW) that blocks its association with core RNA polymerase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(6): 2330-2334.
- Benson, A. K. and W. G. Haldenwang** (1993c). "Regulation of sigma B levels and activity in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 175(8): 2347-2356.
- Benson, A. K. and W. G. Haldenwang** (1992). "Characterization of a regulatory network that controls sigma B expression in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 174(3): 749-757.

- Berger - Bächli, B.** (1996). "Update on Methicillin Resistance Mechanisms in Staphylococci." *Chemotherapy* 2: 19 - 26.
- Berger-Bachi, B., A. Strassle, J. E. Gustafson and F. H. Kayser** (1992). "Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 36(7): 1367-1373.
- Berger-Bachi, B., A. Strassle and F. H. Kayser** (1986). "Characterization of an isogenic set of methicillin-resistant and susceptible mutants of *Staphylococcus aureus*." *Eur J Clin Microbiol* 5(6): 697-701.
- Berger-Bachi, B., L. Barberis-Maino, A. Strassle and F. H. Kayser** (1989). "FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization." *Mol Gen Genet* 219(1-2): 263-269.
- Blackman, S. A., T. J. Smith and S. J. Foster** (1998). "The role of autolysins during vegetative growth of *Bacillus subtilis* 168." *Microbiology* 144 ( Pt 1): 73-82.
- Boyce, J. M.** (1997). "Epidemiology and prevention of nosocomial infections." *The Staphylococci in Human Disease*, ed. KB Crossley, GI Archer, New York: Churchill Livingstone 1: 309 - 329.
- Boyce, J. M., A. A. Medeiros, E. F. Papa and C. J. O'Gara** (1990). "Induction of beta-lactamase and methicillin resistance in unusual strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Antimicrob Chemother* 25(1): 73-81.
- Boylan, S. A., A. R. Redfield, M. S. Brody and C. W. Price** (1993). "Stress-induced activation of the sigma B transcription factor of *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 175(24): 7931-7937.
- Brown, D. F. and P. E. Reynolds** (1980). "Intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*." *FEBS Lett* 122(2): 275-278.
- Brown, D. F.** (2001). "Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci." *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1: 65-70.
- Brown, D. F. and D. Kothari** (1974). "The reliability of methicillin sensitivity tests on four culture media." *J Clin Pathol* 27(5): 420-426.
- Brown, D. F. and V. S. Yates** (1986). "Methicillin susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* on media containing five percent sodium chloride." *Eur J Clin Microbiol* 5(6): 726-728.
- Chambers, H. F.** (1997). "Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications." *Clin Microbiol Rev* 10(4): 781-791.

- Chambers, H. F., M. J. Sachdeva and C. J. Hackbarth** (1994). "Kinetics of penicillin binding to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus*." *Biochem J* 301 ( Pt 1): 139-144.
- Chambers, H. F. and C. J. Hackbarth** (1987). "Effect of NaCl and nafcillin on penicillin-binding protein 2a and heterogeneous expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 31(12): 1982-1988.
- Chambers, H. F., C. J. Hackbarth, T. A. Drake, M. G. Rusnak and M. A. Sande** (1984). "Endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbits: expression of resistance to beta-lactam antibiotics in vivo and in vitro." *J Infect Dis* 149(6): 894-903.
- Chien, Y., A. C. Manna and A. L. Cheung** (1998a). "SarA level is a determinant of agr activation in *Staphylococcus aureus*." *Mol Microbiol* 30(5): 991-1001.
- Chien, Y. and A. L. Cheung** (1998b). "Molecular interactions between two global regulators, sar and agr, in *Staphylococcus aureus*." *J Biol Chem* 273(5): 2645-2652.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton and E. H. Beachey** (1985). "Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices." *J Clin Microbiol* 22(6): 996-1006.
- Conlon, K. M., H. Humphreys and J. P. O'Gara** (2002a). "Regulation of icaR gene expression in *Staphylococcus epidermidis*." *FEMS Microbiol Lett* 216(2): 171-177.
- Conlon, K. M., H. Humphreys and J. P. O'Gara** (2002b). "icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*." *J Bacteriol* 184(16): 4400-4408.
- Coombs, G. W., J. W. Pearman, C. H. Khinsoe and J. D. Boehm** (1996). "Problems in detecting low-expression-class methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* with batches of Oxoid Mueller-Hinton agar." *J Antimicrob Chemother* 38(3): 551-553.
- Corinne, J. H. C., H.** (1989). "Methicillin - Resistant Staphylococci: Genetics and Mechanisms of Resistance." *Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy* 7: 991 - 994.
- Cox, R. A., C. Mallaghan, C. Conquest and J. King** (1995). "Epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Controlling the spread outside hospital." *J Hosp Infect* 29(2): 107-119.
- Crossley, K., B. Landesman and D. Zaske** (1979). "An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II. Epidemiologic studies." *J Infect Dis* 139(3): 280-287.

- Cui, L., X. Ma, K. Sato, K. Okuma, F. C. Tenover, E. M. Mamizuka, C. G. Gemmell, M. N. Kim, M. C. Ploy, N. El-Solh, V. Ferraz and K. Hiramatsu** (2003). "Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*." *J Clin Microbiol* 41(1): 5-14.
- Cui, L., H. Murakami, K. Kuwahara-Arai, H. Hanaki and K. Hiramatsu** (2000). "Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50." *Antimicrob Agents Chemother* 44(9): 2276-2285.
- De Jonge, B. L. and A. Tomasz** (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(2): 342-346.
- De Jonge, B. L., Y. S. Chang, D. Gage and A. Tomasz** (1992). "Peptidoglycan composition in heterogeneous Tn551 mutants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain." *J Biol Chem* 267(16): 11255-11259.
- De Jonge, B. L., H. De Lencastre and A. Tomasz** (1991). "Suppression of autolysis and cell wall turnover in heterogeneous Tn551 mutants of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain." *J Bacteriol* 173(3): 1105-1110.
- De Lencastre, H. and A. Tomasz** (1994). "Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 38(11): 2590-2598.
- De Maio, J., Y. Zhang, C. Ko, D. B. Young and W. B. Bishai** (1996). "A stationary phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2790 - 2794.
- De Saxe, M. J. and C. M. Notley** (1978). "Experiences with the typing of coagulase-negative staphylococci and micrococci." *Zbl Bakt Hyg* 241: 46-59.
- DeMaio, J., Y. Zhang, C. Ko and W. R. Bishai** (1997). "Mycobacterium tuberculosis sigF is part of a gene cluster with similarities to the *Bacillus subtilis* sigF and sigB operons." *Tuber Lung Dis* 78(1): 3-12.
- Dickinson, T. M. and G. L. Archer** (2000). "Phenotypic expression of oxacillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*: roles of mecA transcriptional regulation and resistant-subpopulation selection." *Antimicrob Agents Chemother* 44(6): 1616-1623.
- DIN** (2000). "Deutsches Institut für Normung e. V., Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Diagnostische Verfahren." *DIN-Taschenbuch* Beuth-Verlag, Berlin. 222.
- Doebbeling, B. N.** (1995). "The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonisation and infection." *J Chemother* 7 Suppl 3: 99-103.

- Drancourt, M. and D. Raoult** (2002). "rpoB gene sequence-based identification of Staphylococcus species." *J Clin Microbiol* 40(4): 1333-1338.
- Dufour, A. and W. G. Haldenwang** (1994). "Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-sigma factor (RsbW) and its antagonist (RsbV)." *J Bacteriol* 176(7): 1813-1820.
- Ebbole, D. J. and H. Zalkin** (1987). "Cloning and characterization of a 12-gene cluster from *Bacillus subtilis* encoding nine enzymes for de novo purine nucleotide synthesis." *J Biol Chem* 262(17): 8274-8287.
- El Hagarawy, N., W. Lenz, A. Elkhoully and A. H. El Molla** (1982). "The importance of incubation temperature for detecting beta-lactam-resistant *Staphylococcus aureus* strains." *Infection* 10(6): 371-374.
- Emori, T. G. and R. P. Gaynes** (1993). "An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory." *Clin Microbiol Rev* 6(4): 428-442.
- Espersen, F., B. J. Wilkinson, B. Gahrn-Hansen, V. Thamdrup Rosdahl and I. Clemmensen** (1990). "Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro." *APMIS* 98(5): 471-478.
- Euzeby, J.** (1997). "List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet." *JP. Int J Syst Bacteriol* 47: 590-592.
- Ferreira, A., M. Gray, M. Wiedmann and K. J. Boor** (2004). "Comparative genomic analysis of the sigB operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria." *Curr Microbiol* 48(1): 39-46.
- Fey, P. D., J. S. Ulphani, F. Gotz, C. Heilmann, D. Mack and M. E. Rupp** (1999). "Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*." *J Infect Dis* 179(6): 1561-1564.
- Finlay, B. B. and S. Falkow** (1997). "Common themes in microbial pathogenicity revisited." *Microbiol Mol Biol Rev* 61(2): 136-169.
- Fleer, A. and J. Verhoef** (1989). "An evaluation of surface hydrophobicity and extracellular slime in the pathogenesis of foreign-body-related infections due to coagulase-negative staphylococci." *J. Invest. Sur.* 2: 391 - 396.
- Franson, T. R., N. K. Sheth, H. D. Rose and P. G. Sohnle** (1984). "Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters." *J Clin Microbiol* 20(3): 500-505.
- French, G. L., J. L. Ling, Y. W. Hui and H. K. Oo** (1987). "Determination of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* by agar dilution and disc diffusion methods." *J Antimicrob Chemother* 20(4): 599-608.

- Fujimura, T. and K. Murakami** (1997). "Increase of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* caused by deletion of a gene whose product is homologous to lytic enzymes." *J Bacteriol* 179(20): 6294-6301.
- Georgopapadakou, N. H., S. A. Smith and D. P. Bonner** (1982). "Penicillin-binding proteins in a *Staphylococcus aureus* strain resistant to specific beta-lactam antibiotics." *Antimicrob Agents Chemother* 22(1): 172-175.
- Georgopapadakou, N. H. and F. Y. Liu** (1980a). "Penicillin-binding proteins in bacteria." *Antimicrob Agents Chemother* 18(1): 148-157.
- Georgopapadakou, N. H. and F. Y. Liu** (1980b). "Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: Relation to antibacterial activity." *Antimicrob Agents Chemother* 18(5): 834-836.
- Georgopapadakou, N. H., B. A. Dix and Y. R. Mauriz** (1986). "Possible physiological functions of penicillin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 29(2): 333-336.
- Gerberding, J. L., C. Miick, H. H. Liu and H. F. Chambers** (1991). "Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 35(12): 2574-2579.
- Ghuysen, J. M.** (1994). "Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases." *Trends Microbiol* 2(10): 372-380.
- Ghuysen, J. M., J. Lamotte-Brasseur, B. Joris and G. D. Shockman** (1994). "Binding site-shaped repeated sequences of bacterial wall peptidoglycan hydrolases." *FEBS Lett* 342(1): 23-28.
- Gregory, P. D., R. A. Lewis, S. P. Curnock and K. G. Dyke** (1997). "Studies of the repressor (BlaI) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*." *Mol Microbiol* 24(5): 1025-1037.
- Gustafson, J., A. Strassle, H. Hachler, F. H. Kayser and B. Berger-Bachi** (1994). "The femC locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon." *J Bacteriol* 176(5): 1460-1467.
- Gustafson, J. E., B. Berger-Bachi, A. Strassle and B. J. Wilkinson** (1992). "Autolysis of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 36(3): 566-572.
- Gustafson, J. E. and B. J. Wilkinson** (1989). "Lower autolytic activity in a homogeneous methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain compared to derived heterogeneous-resistant and susceptible strains." *FEMS Microbiol Lett* 50(1-2): 107-111.

- Hackbarth, C. J., T. Kocagoz, S. Kocagoz and H. F. Chambers** (1995). "Point mutations in Staphylococcus aureus PBP 2 gene affect penicillin- binding kinetics and are associated with resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 39(1): 103-106.
- Hackbarth, C. J. and H. F. Chambers** (1993). "blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant Staphylococcus aureus." *Antimicrob Agents Chemother* 37(5): 1144-1149.
- Hanaki, H., K. Kuwahara-Arai, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum, H. Labischinski and K. Hiramatsu** (1998a). "Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strains Mu3 and Mu50." *J Antimicrob Chemother* 42(2): 199-209.
- Hanaki, H., H. Labischinski, Y. Inaba, N. Kondo, H. Murakami and K. Hiramatsu** (1998b). "Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strain Mu50." *J Antimicrob Chemother* 42(3): 315-320.
- Hartman, B. J. and A. Tomasz** (1986). "Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of Staphylococcus aureus." *Antimicrob Agents Chemother* 29(1): 85-92.
- He, B., K. Y. Choi and H. Zalkin** (1993). "Regulation of Escherichia coli glnB, prsA, and speA by the purine repressor." *J Bacteriol* 175(11): 3598-3606.
- Hecker, M. and U. Volker** (1998). "Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted Bacillus subtilis cells by the expression of the sigmaB regulon." *Mol Microbiol* 29(5): 1129-1136.
- Hecker, M., W. Schumann and U. Volker** (1996). "Heat-shock and general stress response in Bacillus subtilis." *Mol Microbiol* 19(3): 417-428.
- Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack and F. Gotz** (1996a). "Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis." *Mol Microbiol* 20(5): 1083-1091.
- Heilmann, C., C. Gerke, F. Perdreau-Remington and F. Gotz** (1996b). "Characterization of Tn917 insertion mutants of Staphylococcus epidermidis affected in biofilm formation." *Infect Immun* 64(1): 277-282.
- Heilmann, C. and F. Götz** (1998). "Further characterization of Staphylococcus epidermidis transposon mutants deficient in primary attachment or intercellular adhesion." *Zbl. Bacteriol.* 287: 69 - 83.
- Heinrichs, J. H., M. G. Bayer and A. L. Cheung** (1996). "Characterization of the sar locus and its interaction with agr in Staphylococcus aureus." *J Bacteriol* 178(2): 418-423.

- Henze, U., T. Sidow, J. Wecke, H. Labischinski and B. Berger-Bachi** (1993). "Influence of femB on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 175(6): 1612-1620.
- Henze, U. U. and B. Berger-Bachi** (1996a). "Penicillin-binding protein 4 overproduction increases beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 40(9): 2121-2125.
- Henze, U. U., M. Roos and B. Berger-Bachi** (1996b). "Effects of penicillin-binding protein 4 overproduction in *Staphylococcus aureus*." *Microb Drug Resist* 2(2): 193-199.
- Higashi, J. M., I. W. Wang, D. M. Shlaes, J. M. Anderson and R. E. Marchant** (1998). "Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene." *J Biomed Mater Res* 39(3): 341-350.
- Hindler, J. A. and N. L. Warner** (1987). "Effect of source of Mueller-Hinton agar on detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* using a screening methodology." *J Clin Microbiol* 25(4): 734-735.
- Hiramatsu, K., N. Konodo and T. Ito** (1996). "Genetic basis for molecular epidemiology of MRSA." *J. Infect. Chemoth.* 2: 117 - 129.
- Hiramatsu, K., K. Asada, E. Suzuki, K. Okonogi and T. Yokota** (1992). "Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)." *FEBS Lett* 298(2-3): 133-136.
- Hiramatsu, K., E. Suzuki, H. Takayama, Y. Katayama and T. Yokota** (1990). "Role of penicillinase plasmids in the stability of the *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 34(4): 600-604.
- Hiramatsu, K., L. Cui., M. M. Kuroda and T. Ito.** (2001). "The emergence and evolution of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Trends in microbiology* 9: 486-493.
- Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri and F. C. Tenover** (1997). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility." *J Antimicrob Chemother* 40(1): 135-136.
- Huang, M. B., T. E. Gay, C. N. Baker, S. N. Banerjee and F. C. Tenover** (1993). "Two percent sodium chloride is required for susceptibility testing of staphylococci with oxacillin when using agar-based dilution methods." *J Clin Microbiol* 31(10): 2683-2688.
- Hurlimann-Dalel, R. L., C. Ryffel, F. H. Kayser and B. Berger-Bachi** (1992). "Survey of the methicillin resistance-associated genes *mecA*, *mecR1-mecI*, and *femA-femB* in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 36(12): 2617-2621.

- Hussain, M., M. Herrmann, C. v. Eiff, F. Pedreau-Remington and G. Peters** (1997). "A 140-kilodalton extracellular protein essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces." *Infect. Immun.* 65: 519 - 524.
- Ito, T., Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn and K. Hiramatsu** (2001). "Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 45(5): 1323-1336.
- Janzon, L. and S. Arvidson.** (1990). "The role of the -hemolysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*." *EMBO J.* 9: 1391-1399.
- Jefferson, K. K., S. E. Cramton, F. Gotz and G. B. Pier** (2003). "Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR." *Mol Microbiol* 48(4): 889-899.
- Jefferson, K. K., D. B. Pier, D. A. Goldmann and G. B. Pier** (2004). "The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 186(8): 2449-2456.
- Jevons, M.** (1961). *Letter. Br. Med. J.* 1: 124-125.
- Jolly, L., S. Wu, J. van Heijenoort, H. de Lencastre, D. Mengin-Lecreulx and A. Tomasz** (1997). "The *femR315* gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase." *J Bacteriol* 179(17): 5321-5325.
- Kalman, S., M. L. Duncan, S. M. Thomas and C. W. Price** (1990). "Similar organization of the *sigB* and *spoIIA* operons encoding alternate sigma factors of *Bacillus subtilis* RNA polymerase." *J Bacteriol* 172(10): 5575-5585.
- Kang, C. M., K. Vijay and C. W. Price** (1998). "Serine kinase activity of a *Bacillus subtilis* switch protein is required to transduce environmental stress signals but not to activate its target PP2C phosphatase." *Mol Microbiol* 30(1): 189-196.
- Kang, C. M., M. S. Brody, S. Akbar, X. Yang and C. W. Price** (1996). "Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor sigma(b) in response to environmental stress." *J Bacteriol* 178(13): 3846-3853.
- Kayser, F. H. J. W., and P. Corrodi** (1972). "Transduction and elimination of resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 2: 217-223.

- Kayser, H. F., J. K. A. Bienz and J. Eckert** (1993). "Medizinische Mikrobiologie." Thieme Verlag.
- Kessler, S. W.** (1975). "Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein." *A; J. Immunol.* 115: 1617-1624.
- Kiel, K.** (2002). "Einfluss des Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase Systems auf die Expression des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins von mukoiden *Staphylococcus epidermidis*." Dissertation, Universität Hamburg.
- Kilstrup, M., S. G. Jessing, S. B. Wichmand-Jorgensen, M. Madsen and D. Nilsson** (1998a). "Activation control of pur gene expression in *Lactococcus lactis*: proposal for a consensus activator binding sequence based on deletion analysis and site-directed mutagenesis of purC and purD promoter regions." *J Bacteriol* 180(15): 3900-3906.
- Kilstrup, M. and J. Martinussen** (1998b). "A transcriptional activator, homologous to the *Bacillus subtilis* PurR repressor, is required for expression of purine biosynthetic genes in *Lactococcus lactis*." *J Bacteriol* 180(15): 3907-3916.
- Klimek, J. J., F. J. Marsik, R. C. Bartlett, B. Weir, P. Shea and R. Quintiliani** (1976). "Clinical, epidemiologic and bacteriologic observations of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large community hospital." *Am J Med* 61(3): 340-345.
- Kloos, W. E. and T. L. Bannerman** (1994). "Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci." *Clin Microbiol Rev* 7(1): 117-140.
- Kloos, W. E.** (1986). "Ecology of human skin." In P.A. Mardh and K.H. Schleifer (eds.), *Coagulase-negative staphylococci*. Almqvist and Wiksell International, Stockholm: 37 - 50.
- Kloos, W. E.** (1997). "Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans." In: Crossley, K. B., and G. L. Archer. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone: 113 -137.
- Knobloch, J. K., S. Jager, M. A. Horstkotte, H. Rohde and D. Mack** (2004). "RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene icaR." *Infect Immun* 72(7): 3838-3848.
- Knobloch, J. K., M. A. Horstkotte, H. Rohde, P. M. Kaulfers and D. Mack** (2002). "Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*." *J Antimicrob Chemother* 49(4): 683-687.

- Knobloch, J. K., K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H. H. Feucht and D. Mack** (2001). "Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress." *J Bacteriol* 183(8): 2624-2633.
- Knobloch, J. K.** (1999). "Molekulare Charakterisierung von Transposoninsertionsstellen biofilmnegativer und mukoidnegativer *Staphylococcus epidermidis* Mutanten." Dissertation im Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.
- Knobloch, J. K., M. Nedelmann, K. Kiel, K. Bartscht, M. A. Horstkotte, S. Dobinsky, H. Rohde and D. Mack** (2003). "Establishment of an arbitrary PCR for rapid identification of Tn917 insertion sites in *Staphylococcus epidermidis*: characterization of biofilm-negative and nonmucoid mutants." *Appl Environ Microbiol* 69(10): 5812-5818.
- Kobayashi, N., K. Taniguchi and S. Urasawa** (1998). "Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*." *Antimicrob Agents Chemother* 42(3): 717-720.
- Kojima, Y., M. Tojo, D. A. Goldmann, T. D. Tosteson and G. B. Pier** (1990). "Antibody to the capsular polysaccharide/adhesin protects rabbits against catheter-related bacteremia due to coagulase-negative staphylococci." *J Infect Dis* 162(2): 435-441.
- Komatsuzawa, H., G. H. Choi, T. Fujiwara, Y. Huang, K. Ohta, M. Sugai and H. Suginaka** (2000). "Identification of a *fmtA*-like gene that has similarity to other PBP6s and beta-lactamases in *Staphylococcus aureus*." *FEMS Microbiol Lett* 188(1): 35-39.
- Komatsuzawa, H., K. Ohta, H. Labischinski, M. Sugai and H. Suginaka** (1999). "Characterization of *fmtA*, a gene that modulates the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 43(9): 2121-2125.
- Komatsuzawa, H., M. Sugai, K. Ohta, T. Fujiwara, S. Nakashima, J. Suzuki, C. Y. Lee and H. Suginaka** (1997). "Cloning and characterization of the *fmt* gene which affects the methicillin resistance level and autolysis in the presence of triton X-100 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 41(11): 2355-2361.
- Kondo, N., K. Kuwahara-Arai, H. Kuroda-Murakami, E. Tateda-Suzuki and K. Hiramatsu** (2001). "Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under *mec* regulator gene control." *Antimicrob Agents Chemother* 45(3): 815-824.
- Kopp, U., M. Roos, J. Wecke and H. Labischinski** (1996). "Staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge biosynthesis: a novel antistaphylococcal target?" *Microb Drug Resist* 2(1): 29-41.

- Kornblum, J., B. Kreiswirth, S. J. Projan, H. Ross, a. R. P. Novick. and I. R. P. N. (ed.)** (1990). "*Agr*: a polycistronic locus regulating exoprotein synthesis in *Staphylococcus aureus*." Molecular biology of the staphylococci. VCH Publishers, New York, N.Y.: 373-402.
- Krokotsch, A.** (1998). "Reinigung und Charakterisierung eines für biofilmbildene *Staphylococcus epidermidis*-tämme spezifischen Polysaccharids." Dissertation 1998 im Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.
- Kullik, I. I. and P. Giachino** (1997). "The alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus*: regulation of the sigB operon in response to growth phase and heat shock." Arch Microbiol 167(2/3): 151-159.
- Kuwahara-Arai, K., N. Kondo, S. Hori, E. Tateda-Suzuki and K. Hiramatsu** (1996). "Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP 2' production." Antimicrob Agents Chemother 40(12): 2680-2685.
- Labischinski, H.** (1992). "Consequences of the interaction of beta-lactam antibiotics with penicillin binding proteins from sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains." Med. Microbiol. Immunol. 181: 241-265.
- Ling, B. and B. Berger-Bachi** (1998). "Increased overall antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus* *femAB* null mutants." Antimicrob Agents Chemother 42(4): 936-938.
- Ludwicka, A., B. Jansen, T. Wadstrom and G. Pulverer** (1984). "Attachment of staphylococci to various synthetic polymers." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 256(4): 479-489.
- Lüllmann, H., K. Mohr and A. Ziegler** (1994). "Taschenatlas der Pharmakologie." 2. Auflage: 264-265.
- Ma, X. X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum and K. Hiramatsu** (2002). "Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains." Antimicrob Agents Chemother 46(4): 1147-1152.
- Mack, D., K. Bartscht, S. Dobinsky, M. Horstkotte, K. Kiel, J. K.-M. Knobloch and S. P.** (2000a). "Staphylococcal Factors Involved in Adhesion and Biofilm Formation on Biomaterials." Y. H. An and R. J. Friedmann (ed.) Handbook for studying bacterial adhesion: principles, methods, and applications. Humana Press Totowa, N. J.
- Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. H. Feucht, H. A. Elsner, R. Laufs and M. E. Rupp** (1999). "Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination." Infect Immun 67(2): 1004-1008.

- Mack, D., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge and R. Laufs** (1996a). "The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis." *J Bacteriol* 178(1): 175-183.
- Mack, D., M. Haeder, N. Siemssen and R. Laufs** (1996b). "Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin." *J Infect Dis* 174(4): 881-884.
- Mack, D., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, J. K. Knobloch, H. A. Elsner and H. H. Feucht** (2000b). "Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation." *Infect Immun* 68(7): 3799-3807.
- Mack, D., N. Siemssen and R. Laufs** (1992). "Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion." *Infect Immun* 60(5): 2048-2057.
- Mack, D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann and R. Laufs** (1994). "Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin." *Infect Immun* 62(8): 3244-3253.
- Mack, D., A. Sabottke, S. Dobinsky, H. Rohde, M. A. Horstkotte and J. K. Knobloch** (2002). "Differential expression of methicillin resistance by different biofilm- negative *Staphylococcus epidermidis* transposon mutant classes." *Antimicrob Agents Chemother* 46(1): 178-183.
- Mack, D., K. Bartscht, C. Fischer, H. Rohde, C. de Grahl, S. Dobinsky, M. A. Horstkotte, K. Kiel and J. K. Knobloch** (2001). "Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation." *Methods Enzymol* 336: 215-239.
- Madiraju, M. V., D. P. Brunner and B. J. Wilkinson** (1987). "Effects of temperature, NaCl, and methicillin on penicillin-binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis, and autolysis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 31(11): 1727-1733.
- Maidhof, H., B. Reinicke, P. Blumel, B. Berger-Bachi and H. Labischinski** (1991). "femA, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin- resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains." *J Bacteriol* 173(11): 3507-3513.
- Maki, H., T. Yamaguchi and K. Murakami** (1994). "Cloning and characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 176(16): 4993-5000.

- Maki, H. and K. Murakami** (1997). "Formation of potent hybrid promoters of the mutant *llm* gene by IS256 transposition in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 179(22): 6944-6948.
- Manna, A. C., M. G. Bayer and A. L. Cheung** (1998). "Transcriptional analysis of different promoters in the *sar* locus in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 180(15): 3828-3836.
- Matsuhashi, M., M. D. Song, F. Ishino, M. Wachi, M. Doi, M. Inoue, K. Ubukata, N. Yamashita and M. Konno** (1986). "Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 167(3): 975-980.
- Matsuhashi, M., C. , P. Dietrich and J. L. S. .** (1967). "Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. The role of soluble ribonucleic acid and of lipid intermediates in glycine incorporation in *Staphylococcus aureus*." *J. Biol. Chem.* 242: 3191-3206.
- Matsuno, K. and A. L. Sonenshein** (1999). "Role of SpoVG in asymmetric septation in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol* 181(11): 3392-3401.
- Matthews, P. and A. Tomasz** (1990). "Insertional inactivation of the *mec* gene in a transposon mutant of a methicillin-resistant clinical isolate of *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 34(9): 1777-1779.
- Matthews, P. R., K. C. Reed and P. R. Stewart** (1987). "The cloning of chromosomal DNA associated with methicillin and other resistances in *Staphylococcus aureus*." *J Gen Microbiol* 133 ( Pt 7): 1919-1929.
- Matthews, P. R. and P. R. Stewart** (1988). "Amplification of a section of chromosomal DNA in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following growth in high concentrations of methicillin." *J Gen Microbiol* 134 ( Pt 6): 1455-1464.
- Matthews, P. R. and P. R. Stewart** (1984). "Resistance heterogeneity in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *FEMS Microbiol. Lett.* 22: 161-166.
- Maul, B., U. Volker, S. Riethdorf, S. Engelmann and M. Hecker** (1995). "sigma B-dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*." *Mol Gen Genet* 248(1): 114-120.
- McKenney, D., J. Hubner, E. Muller, Y. Wang, D. A. Goldmann and G. B. Pier** (1998). "The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin." *Infect Immun* 66(10): 4711-4720.
- McKinney, T. K., V. K. Sharma, W. A. Craig and G. L. Archer** (2001). "Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators." *J Bacteriol* 183(23): 6862-6868.

- Mempel, M., H. Feucht, W. Ziebuhr, M. Endres, R. Laufs and L. Gruter** (1994). "Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*." *Antimicrob Agents Chemother* 38(6): 1251-1255.
- Mempel, M., E. Muller, R. Hoffmann, H. Feucht, R. Laufs and L. Gruter** (1995). "Variable degree of slime production is linked to different levels of beta-lactam susceptibility in *Staphylococcus epidermidis* phase variants." *Med Microbiol Immunol (Berl)* 184(3): 109-113.
- Milne, L. M., G. D. Curtis, M. Crow, W. A. Kraak and J. B. Selkon** (1987). "Comparison of culture media for detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci." *J Clin Pathol* 40(10): 1178-1181.
- Milne, L. M., M. R. Crow, A. G. Emptage and J. B. Selkon** (1993). "Effects of culture media on detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci by disc diffusion methods." *J Clin Pathol* 46(5): 394-397.
- Mittenhuber, G.** (2002). "A phylogenomic study of the general stress response sigma factor *sigmaB* of *Bacillus subtilis* and its regulatory proteins." *J Mol Microbiol Biotechnol* 4(4): 427-452.
- Mongodin, E., J. Finan, M. W. Climo, A. Rosato, S. Gill and G. L. Archer** (2003). "Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin." *J Bacteriol* 185(15): 4638-4643.
- Monsen, T., S. Persson, H. Edebro, S. Granstrom and J. Wistrom** (2003). "Mueller-Hinton agar is superior to PDM blood agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Clin Microbiol Infect* 9(1): 61-64.
- Muller, E., J. Hubner, N. Gutierrez, S. Takeda, D. A. Goldmann and G. B. Pier** (1993a). "Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime." *Infect Immun* 61(2): 551-558.
- Muller, E., S. Takeda, H. Shiro, D. Goldmann and G. B. Pier** (1993b). "Occurrence of capsular polysaccharide/adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci." *J Infect Dis* 168(5): 1211-1218.
- Murakami, K. and A. Tomasz** (1989). "Involvement of multiple genetic determinants in high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 171(2): 874-879.
- NCCLS** (2002). "National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twelfth informational supplement." National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.: M100-S112.
- Nedelmann, M.** (1999). "Genetische Untersuchungen zur Entstehung von adhärennten Biofilmen von *Staphylococcus epidermidis* auf Kunststoffoberflächen." Medizinische Dissertation. Universität Hamburg.

- Nedelmann, N., A. Sabottke, R. Laufs and D. Mack** (1998). "Generalized Transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains." *Zentrbl für Bakteriologie* 287: 85-92.
- Niemeyer, D. M., M. J. Pucci, J. A. Thanassi, V. K. Sharma and G. L. Archer** (1996). "Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 178(18): 5464-5471.
- Nilsson, M., L. Frykberg, J. I. Flock, L. Pei, M. Lindberg and B. Guss** (1998). "A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*." *Infect Immun* 66(6): 2666-2673.
- Noble, W. C. and D. G. Pitcher** (1978). "Microbial ecology of the human skin ." *Adv. Microbiol. Ecol.* 2: 245-253.
- O'Hara, D. M., C. R. Harrington and P. E. Reynolds** (1989). "Immunological detection of penicillin-binding protein 2' in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*." *FEMS Microbiol Lett* 48(1): 97-103.
- Okuma, K., K. Iwakawa, J. D. Turnidge, W. B. Grubb, J. M. Bell, F. G. O'Brien, G. W. Coombs, J. W. Pearman, F. C. Tenover, M. Kapi, C. Tiensasitorn, T. Ito and K. Hiramatsu** (2002). "Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community." *J Clin Microbiol* 40(11): 4289-4294.
- Ornelas-Soares, A., H. de Lencastre, B. L. de Jonge and A. Tomasz** (1994). "Reduced methicillin resistance in a new *Staphylococcus aureus* transposon mutant that incorporates muramyl dipeptides into the cell wall peptidoglycan." *J Biol Chem* 269(44): 27246-27250.
- Parker, M. T. and J. H. Hewitt** (1970). "Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Lancet* 1(7651): 800-804.
- Pascual, A., A. Fler, N. A. Westerdaal and J. Verhoef** (1986). "Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro." *Eur J Clin Microbiol* 5(5): 518-522.
- Pedreau-Remington, F., M. A. Sande, G. Peters and H. F. I. Immun.** (1998). "The abilities of a *Staphylococcus epidermidis* wild type strain and its slime-negative mutant to induce endocarditis in rabbits are comparable." 66: 2778 - 2781.
- Peters, G., R. Locci, and G. Pulverer** (1981). "Microbial colonization of prosthetic devices: Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters." *Zbl. Bakt. Hyg. Orig. B.* 173: 293 - 299.
- Pfaller, M. A., and L.A. Herwaldt** (1988). "Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci." *Clin. Microbiol. Rev.* 1: 281 - 299.

- Piriz Duran, S., F. H. Kayser and B. Berger-Bachi** (1996). "Impact of sar and agr on methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *FEMS Microbiol Lett* 141(2-3): 255-260.
- Poston, S. M. and T. J. Palmer** (1977). "Transduction of penicillinase production and other antibiotic-resistance markers in *Staphylococcus epidermidis*." *J Gen Microbiol* 103(2): 235-242.
- Qoronfleh, M. W. and B. J. Wilkinson** (1986). "Effects of growth of methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* in the presence of beta-lactams on peptidoglycan structure and susceptibility to lytic enzymes." *Antimicrob Agents Chemother* 29(2): 250-257.
- Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker and W. Ziebuhr** (2000). "Alternative Transcription Factor Sigma<sup>B</sup> Is Involved in Regulation of Biofilm Expression in a *Staphylococcus aureus* Mucosal Isolate." *Journal of Bacteriology* 182: p. 6824 - 6826.
- Rappu, P., B. S. Shin, H. Zalkin and P. Mantsala** (1999). "A role for a highly conserved protein of unknown function in regulation of *Bacillus subtilis* purA by the purine repressor." *J Bacteriol* 181(12): 3810-3815.
- Reynolds, P. E.** (1988). "The essential nature of staphylococcal penicillin binding proteins." In: P. Actor, L. Danco-Moore, M.L.Higgins, M.R. Salton and G. D. Shockmann (ed.) *Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.: 343-351.
- Riedewald, J.** (2001). "Phänotypische Charakterisierung biofilmbnegativer Transposonmutanten: Identifizierung des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins als Hämagglutinin von *Staphylococcus epidermidis*." Dissertation 2001 im Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.
- Rohde, H., J. K. Knobloch, M. A. Horstkotte and D. Mack** (2001a). "Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of icaADBC genotype-independent factors." *Med Microbiol Immunol (Berl)* 190(3): 105-112.
- Rohde, H., J. K. Knobloch, M. A. Horstkotte and D. Mack** (2001b). "Correlation of *Staphylococcus aureus* icaADBC genotype and biofilm expression phenotype." *J Clin Microbiol* 39(12): 4595-4596.
- Rolinson, G. N.** (1961). *Letter. Br. Med. J.* 1: 125.
- Rosendorf, L. L. and F. H. Kayser** (1974). "Transduction and plasmid deoxyribonucleic acid analysis in a multiply antibiotic-resistant strain of *Staphylococcus epidermidis*." *J Bacteriol* 120(2): 679-686.
- Rupp, M. E. and G. L. Archer** (1994). "Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress." *Clin Infect Dis* 19(2): 231-243; quiz 244-235.

- Rupp, M. E., N. Sloot, H. G. Meyer, J. Han and S. Gatermann** (1995). "Characterization of the hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis*." *J Infect Dis* 172(6): 1509-1518.
- Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht and D. Mack** (1999). "Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model." *Infect Immun* 67(5): 2627-2632.
- Rupp, M. E. and G. L. Archer** (1992). "Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*." *Infect Immun* 60(10): 4322-4327.
- Ryffel, C., F. H. Kayser and B. Berger-Bachi** (1992). "Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci." *Antimicrob Agents Chemother* 36(1): 25-31.
- Ryffel, C., A. Strassle, F. H. Kayser and B. Berger-Bachi** (1994a). "Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 38(4): 724-728.
- Ryffel, C., A. Strassle, F. H. Kayser and B. Berger-Bachi** (1994b). "Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38:: 724-728.
- Sambrook, J., F. Fritsch and T. Maniatis** (1989). "Molecular Cloning." 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schleifer, K. H.** (1986). "Micrococceae." In P. H. A. Sneath (ed.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*; Williams and Wilkins, Baltimore. Vol. 2: 1003.
- Schumacher-Perdreau, F., C. Heilmann, G. Peters, F. Gotz and G. Pulverer** (1994). "Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7." *FEMS Microbiol Lett* 117(1): 71-78.
- Schwarzkopf, A., H. , H. Karch, J. Schmidt and Heesemann.** (1993). "Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping-factor negative, oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J. Clin. Microbiol.* 31: 2281 - 2285.
- Seligman, S. J.** (1966a). "Methicillin-resistant staphylococci: genetics of the minority population." *J Gen Microbiol* 42(2): 315-322.
- Seligman, S. J.** (1966b). "Penicillinase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Nature* 209(27): 994-996.

- Sharma, V. K., C. J. Hackbarth, T. M. Dickinson and G. L. Archer** (1998). "Interaction of native and mutant MecI repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci." *J Bacteriol* 180(8): 2160-2166.
- Shaw, J. H. and D. B. Clewell** (1985). "Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*." *J Bacteriol* 164(2): 782-796.
- Sheldrick, G. M., P. G. Jones, O. Kennard, D. H. Williams and G. A. Smith** (1978). "Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine." *Nature* 271(5642): 223-225.
- Shin, B. S., A. Stein and H. Zalkin** (1997). "Interaction of *Bacillus subtilis* purine repressor with DNA." *J Bacteriol* 179(23): 7394-7402.
- Shiro, H., E. Muller, N. Gutierrez, S. Boisot, M. Grout, T. D. Tosteson, D. Goldmann and G. B. Pier** (1994). "Transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in elaboration of capsular polysaccharide/adhesin and slime are avirulent in a rabbit model of endocarditis." *J Infect Dis* 169(5): 1042-1049.
- Sinha, S., P. Rappu, S. C. Lange, P. Mantsala, H. Zalkin and J. L. Smith** (1999). "Crystal structure of *Bacillus subtilis* YabJ, a purine regulatory protein and member of the highly conserved YjgF family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13074-13079.
- Sinha, S. C., J. Krahn, B. S. Shin, D. R. Tomchick, H. Zalkin and J. L. Smith** (2003). "The purine repressor of *Bacillus subtilis*: a novel combination of domains adapted for transcription regulation." *J Bacteriol* 185(14): 4087-4098.
- Skinner, S., B. Inglis, P. R. Matthews and P. R. Stewart** (1988). "Mercury and tetracycline resistance genes and flanking repeats associated with methicillin resistance on the chromosome of *Staphylococcus aureus*." *Mol Microbiol* 2(2): 289-292.
- Smirnova, N., J. Scott, U. Voelker and W. G. Haldenwang** (1998). "Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* sigB operon mutations that suppress the loss of the negative regulator RsbX." *J Bacteriol* 180(14): 3671-3680.
- Song, M. D., M. Wachi, M. Doi, F. Ishino and M. Matsuhashi** (1987). "Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion." *FEBS Lett* 221(1): 167-171.
- Sperber, W. H. and S. R. Tantini**. (1975). " Interpretation of tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*." *Appl. Microbiol.* 29: 502 - 505.
- Stewart, P. R., D. T. Dubin, S. G. Chikramane, B. Inglis, P. R. Matthews and S. M. Poston** (1994). "IS257 and small plasmid insertions in the *mec* region of the chromosome of *Staphylococcus aureus*." *Plasmid* 31(1): 12-20.

- Stranden, A. M., K. Ehlert, H. Labischinski and B. Berger-Bachi** (1997). "Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a femAB null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 179(1): 9-16.
- Suzuki, E., K. Kuwahara-Arai, J. F. Richardson and K. Hiramatsu** (1993). "Distribution of mec regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains." *Antimicrob Agents Chemother* 37(6): 1219-1226.
- Suzuki, E., K. Hiramatsu and T. Yokota** (1992). "Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for mecA gene distribution." *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 429-434.
- Swanstrom, M. and M. H. Adams** (1951). "Agar layer method for production of high titer phage stocks." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 78: 372-375.
- Takeda, S., G. B. Pier, Y. Kojima, M. Tojo, E. Muller, T. Tosteson and D. A. Goldmann** (1991). "Protection against endocarditis due to *Staphylococcus epidermidis* by immunization with capsular polysaccharide/adhesin." *Circulation* 84(6): 2539-2546.
- Tesch, W., C. Ryffel, A. Strassle, F. H. Kayser and B. Berger-Bachi** (1990). "Evidence of a novel staphylococcal mec-encoded element (mecR) controlling expression of penicillin-binding protein 2'." *Antimicrob Agents Chemother* 34(9): 1703-1706.
- Timmerman, C. P., A. Fleer, J. M. Besnier, L. De Graaf, F. Cremers and J. Verhoef** (1991a). "Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene." *Infect Immun* 59(11): 4187-4192.
- Timmerman, C. P., J. M. Besnier, L. De Graaf, R. Torensma, A. J. Verkley, A. Fleer and J. Verhoef** (1991b). "Characterisation and functional aspects of monoclonal antibodies specific for surface proteins of coagulase-negative staphylococci." *J Med Microbiol* 35(2): 65-71.
- Tojo, M., N. Yamashita, D. A. Goldmann and G. B. Pier** (1988). "Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*." *J Infect Dis* 157(4): 713-722.
- Tomasz, A., H. B. Drugeon, H. M. de Lencastre, D. Jabes, L. McDougall and J. Bille** (1989). "New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity." *Antimicrob Agents Chemother* 33(11): 1869-1874.
- Tomasz, A., S. Nachman and H. Leaf** (1991). "Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci." *Antimicrob Agents Chemother* 35(1): 124-129.

- Tomasz, A.** (1990). "Auxiliary genes assisting in the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." in R. P. Novick (ed.) *Molecular Biology of the Staphylococci*, VCH Publishers, New York: 565 - 584.
- Tomich, P. K., F. Y. An and D. B. Clewell** (1980). "Properties of erythromycin-inducible transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*." *J Bacteriol* 141(3): 1366-1374.
- Tomich, P. K., F. Y. An and D. B. Clewell** (1979). "A transposon (Tn917) in *Streptococcus faecalis* that exhibits enhanced transposition during induction of drug resistance." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 43 Pt 2: 1217-1221.
- Tschierske, M., C. Mori, S. Rohrer, K. Ehlert, K. J. Shaw and B. Berger-Bachi** (1999). "Identification of three additional femAB-like open reading frames in *Staphylococcus aureus*." *FEMS Microbiol Lett* 171(2): 97-102.
- Ubukata, K., R. Nonoguchi, M. Matsuhashi and M. Konno** (1989). "Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein." *J Bacteriol* 171(5): 2882-2885.
- Valle, J., A. Toledo-Arana, C. Berasain, J. M. Ghigo, B. Amorena, J. R. Penades and I. Lasa** (2003). "SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*." *Mol Microbiol*. 48: 1075 - 1087.
- Vaudaux, P., D. Pittet, A. Haeblerli, E. Huggler, U. E. Nydegger, D. P. Lew and F. A. Waldvogel** (1989). "Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin." *J Infect Dis* 160(5): 865-875.
- Veenstra, G. J. C., F. F. M. Cremers, H. v. Dijk and A. F. .** (1996). "Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*." *J. Bacteriol*. 178: 537 - 548.
- Viollier, P. H., G. H. Kelemen, G. E. Dale, K. T. Nguyen, M. J. Buttner and C. J. Thompson** (2003). "Specialized osmotic stress response systems involve multiple SigB-like sigma factors in *Streptomyces coelicolor*." *Mol Microbiol* 47(3): 699-714.
- Voelker, U., A. Dufour and W. G. Haldenwang.** (1995a). "The *Bacillus subtilis* *rsbU* gene product is necessary for RsbX-dependent regulation of  $\sigma$ B." *J. Bacteriol*. 177: 114 - 122.
- Voelker, U., A. Voelker, B. Maul, M. Hecker, A. Dufour and W. G. Haldenwang** (1995b). "Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses." *J Bacteriol* 177(13): 3771-3780.
- Voelker, U., A. Voelker and W. G. Haldenwang** (1996). "Reactivation of the *Bacillus subtilis* anti-sigma B antagonist, RsbV, by stress- or starvation-induced phosphatase activities." *J Bacteriol* 178(18): 5456-5463.

- Volker, U., S. Engelmann, B. Maul, S. Riethdorf, A. Volker, R. Schmid, H. Mach and M. Hecker** (1994). "Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*." *Microbiology* 140 ( Pt 4): 741-752.
- Waxman, D. J. and J. L. Strominger** (1983). "Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics." *Annu Rev Biochem* 52: 825-869.
- Weng, M., P. L. Nagy and H. Zalkin** (1995). "Identification of the *Bacillus subtilis* pur operon repressor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7455-7459.
- Weng, M. and H. Zalkin** (2000). "Mutations in the *Bacillus subtilis* purine repressor that perturb PRPP effector function in vitro and in vivo." *Curr Microbiol* 41(1): 56-59.
- Wise, A. A. and C. W. Price.** (1995). "Four additional genes in the *sigB* operon of *Bacillus subtilis* that control activity of the general stress factor  $\sigma^B$  in response to environmental signals." *J. Bacteriol.* 177: 123 - 133.
- Wu, S., H. de Lencastre and A. Tomasz** (1996). "Sigma-B, a putative operon encoding alternate sigma factor of *Staphylococcus aureus* RNA polymerase: molecular cloning and DNA sequencing." *J Bacteriol* 178(20): 6036-6042.
- Wu, S. W. and H. De Lencastre** (1999). "Mrp--a new auxiliary gene essential for optimal expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Microb Drug Resist* 5(1): 9-18.
- Yang, X., C. M. Kang, M. S. Brody and C. W. Price** (1996). "Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor." *Genes Dev* 10(18): 2265-2275.

## 10. Danksagungen/Widmungen

Ich möchte mich hiermit bei dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Herrn Prof. Dr. med. Mack für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und insbesondere für die freundliche, engagierte und ausdauernde Unterstützung bedanken. Seine Begeisterung an wissenschaftlicher Arbeit war in frustrierenden Momenten eine große Hilfe und motivierte zur Fortsetzung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Laufs danke ich für die Bereitstellung der benutzten Räumlichkeiten und Gerätschaften.

Herrn Dr. med. H. A. Elsner danke ich für die Durchführung der Pulsgelelektrophorese.

Frau C. Schlüter sei für die qualitativ sehr hochwertigen photographischen Arbeiten und deren stets sehr zügige Durchführung gedankt.

Meinen ehemaligen "Laborkolleginnen und -Kollegen" Frau Dr. med. S. Dobinsky, Frau Dr. K. Bartscht, Herrn C. Degrahl, Herrn Dr. med. H. Rohde, Herrn Dr. med. J. Riedewald, Herrn Dr. med. J. K.-M. Knobloch und Herrn Dr. med. M. Horstkotte verdanke ich unzählige unterhaltsame Stunden im Labor und eine hilfsbereite, kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mit unermüdlicher Aufmunterung, steter freundlicher Motivationshilfe sowie praktischer Korrekturhilfe die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

## 11. Lebenslauf

Name: Axel Sabottke  
Geboren am: 09.05.1974  
Wohnort: Hartzloh 6  
22307 Hamburg  
Telefon: 0049 / 40 / 633 18 990  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig  
Konfession: evangelisch

1974: geboren als Sohn des Technikers Eckhard Sabottke und seiner Ehefrau Ingrid Sabottke, geb. Schlichte

Schulbildung:  
1980: Einschulung in die Grundschule Hasselbrook  
1984: Überwecheln in das Gymnasium Lerchenfeld  
1993: Abitur am Gymnasium Lerchenfeld

Medizinstudium:  
1993: Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg  
1995: Physikum, Universität Hamburg  
1996: Erstes Staatsexamen, Universität Hamburg  
1999: Zweites Staatsexamen, Universität Hamburg  
2000: Drittes Staatsexamen, Universität Hamburg

Arzt im Praktikum:  
2000: Abteilung für Kardiologie und Pneumologie  
AK Barmbek, Hamburg  
Ltd. Arzt: Prof. Dr. med. Spiller

Assistenzarzt:  
2001: Abteilung für Diabetologie und Endokrinologie  
AK Barmbek, Hamburg  
Ltd. Arzt: Prof. Dr. med. Schwedes  
2003: Intensivstation  
AK. Barmbek, Hamburg  
Ltd. Arzt: Dr. med. Fritz  
2005: Abteilung für Pneumologie  
AK Barmbek, Hamburg  
Kommissarischer Leiter: Dr. med. Ludwig

Wissenschaftliche Arbeiten:  
Doktorarbeit:  
Untersuchung zur Methicillinresistenz bei sechs biofilm-negativen Tn917-Transposonmutanten des *S. epidermidis*-Stammes 1057.

Doktorvater:  
Prof. Dr. med. Mack,  
Institut für Infektionsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
1996: Beginn der experimentellen Laborarbeit, Dauer 2 Jahre

Veröffentlichungen:  
Nedermann, M., A. Sabottke, R. Laufs, and D. Mack. 1998. Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different staphylococcus epidermidis strains  
Zbl. Bakt. Int. J. Med. Microbiol. 287, 85 – 92  
Mack, D. Sabottke, A. Dobinsky, S. Rohde, H. Horstkotte, M. A. Knobloch, J. K. Differential expression of methicillin resistance by different biofilm- negative Staphylococcus epidermidis transposon mutant classes, Antimicrob Agents Chemother. 46, 178-183

## **12. Eidesstaatliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

-----  
(HH, d. 27.02.06, A. Sabottke)