

**Einfluss des Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase
Systems auf die Expression des interzellulären Polysaccharid-
Adhäsins von mukoiden *Staphylococcus epidermidis***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

von

Dipl.-Biol. Kathrin Kiel

aus Northeim

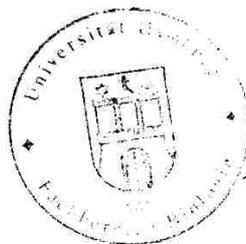
Hamburg 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. D. Mack

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. E. Bock

Tag der Disputation: 01. Februar 2002

Hamburg, den 13. Januar 2002



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Udo Wienand', written in a cursive style.

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 EINLEITUNG.....	12
1.1 Biofilme und Biofilmbildung als pathogener Mechanismus.....	12
1.2 Staphylokokken	15
1.3 Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i>.....	17
1.3.1 Faktoren der primären Adhäsion	17
1.3.2 Faktoren der akkumulativen Phase.....	19
1.3.3 Regulative Faktoren der Biofilmbildung.....	21
1.4 Bakterielle Exopolysaccharide und Polysaccharide von <i>S. epidermidis</i>	22
1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	23
2 MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1 Chemikalien, Plastik- und Einwegartikel.....	25
2.2 Zentrifugen.....	25
2.3 Bakterienstämme	25
2.4 Plasmide, Oligonukleotide und Sonden.....	26
2.4.1 Plasmide	26
2.4.2 Oligonukleotide und Sonden	27
2.5 Puffer und Lösungen.....	28
2.6 Kulturmedien	29
2.6.1 Blut-Agar	29

2.6.2	Einfriermedium.....	29
2.6.3	Tryptone Soya Broth (TSB)	29
2.6.4	Peptone-Yeast Medium, modifiziert (PYØ)	30
2.6.5	Purple-Agar	30
2.6.6	Müller-Hinton-Medium.....	30
2.6.7	Luria-Bertani Medium (LB).....	30
2.6.8	SOC-Medium	30
2.6.9	Zucker.....	30
2.6.10	Aminosäuren.....	31
2.6.11	Antibiotika	31
2.7	Kultivierung der Bakterien	31
2.8	ID 32 Staph System zur Identifizierung von Staphylokokken	32
2.9	Test zur Bestimmung der Biofilmbildung.....	32
2.10	PIA (Exopolysaccharid)-Präparation.....	33
2.10.1	Von Zellen von der Agarplatte	33
2.10.2	Von Zellen aus statischer Flüssigkultur	33
2.11	Koagglutinationstest zur PIA-Quantifizierung	33
2.11.1	Präparation von <i>S. aureus</i> Cowan I	34
2.11.2	Herstellung des Koagglutinationsreagenz	34
2.11.3	Koagglutination	34
2.12	Präparation chromosomaler DNA aus <i>S. epidermidis</i>.....	35
2.13	Restriktionsanalyse von DNA.....	36
2.14	Agarosegel-Elektrophorese.....	36
2.15	Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
2.16	Southern-Blot Hybridisierung.....	37
2.16.1	Southern-Blot	37
2.16.2	Radioaktives <i>random-labeling</i> von DNA-Fragmenten	38

2.16.3	Hybridisierung	38
2.17	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	39
2.18	Autoligation von DNA-Fragmenten.....	40
2.19	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
2.19.1	Inverse <i>long-range</i> PCR	41
2.19.2	Reverse Transkription (RT) – PCR	42
2.20	Klonierungen.....	43
2.20.1	Herstellung elektrokompeter Zellen	43
2.20.2	Elektrotransformation	43
2.20.3	Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	44
2.21	Sequenzierung.....	45
2.21.1	Sequenzanalytik.....	45
2.22	RNA-Extraktion aus <i>S. epidermidis</i>	46
2.22.1	RNA Agarose-Formaldehydgel-Elektrophorese	47
2.23	Northern Blot Hybridisierung.....	47
2.23.1	Northern Blot.....	47
2.23.2	5'-terminale radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden mittels Polynucleotid-Kinase	48
2.23.3	Hybridisierung	48
2.24	Transportversuche mit radioaktiv markierten Zuckern.....	49
2.24.1	Flüssigkeitsszintillations - Zählung	50
2.24.2	Proteinbestimmung.....	50
3	ERGEBNISSE.....	52
3.1	Phänotypische Charakterisierung der Mutanten.....	52
3.1.1	Induktion des mukoiden Phänotyps.....	53
3.1.1.1	Induktion durch verschiedene Medien	53
3.1.1.2	Induktion durch unterschiedliche Zucker	53

3.1.1.3	Induktion durch Aminosäuren	55
3.1.1.4	Korrelation des mukoiden Phänotyps mit dem <i>ica</i> - Genort	56
3.1.1.5	Zusammenfassung der relevanten Bedingungen und Eigenschaften der Stämme für alle folgenden Experimente	58
3.1.2	Biofilmbildung unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren	60
3.1.3	Quantifizierung von PIA unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren	61
3.1.3.1	PIA-Menge der Zellen von der Agarplatte	61
3.1.3.2	PIA-Menge der Zellen aus statischer Flüssigkultur	62
3.2	Genotypische Charakterisierung der Mutanten.....	64
3.2.1	Klonierungsstrategien	64
3.2.2	Sequenzierung - Homologiesuche	68
3.2.2.1	Betroffener Genort in Mutante M20.....	69
3.2.2.2	Betroffener Genort in Mutante M16.....	73
3.2.3	Sequenzanalyse.....	77
3.3	Expression der betroffenen Gene.....	83
3.3.1	Expression von <i>glcT</i>	84
3.3.2	Expression von <i>glcA</i>	85
3.3.3	Expression von <i>icaADBC</i>	89
3.4	Transportstudien	90
3.5	Wachstum mit GlcNAc	93
3.5.1	Säurebildung auf Purple-Agar	93
3.5.2	ID 32 Staph System zur Identifizierung von Staphylokokken	93
3.5.3	Wachstumskurven	94
4	DISKUSSION	97
4.1	Korrelation des mukoiden Phänotyps mit Expression großer Mengen PIA ...	97
4.2	GlcA, ein EII^{Glc}-Transporter und Zucker-spezifisches Element des PTS.....	100
4.2.1	Enzyme II (EII).....	101
4.2.2	Substratspezifität	102

4.2.3	Alternative Transportwege	104
4.3	Antiterminator GlcT ist Transkriptionsregulator des EII-Gens <i>glcA</i>.....	105
4.4	Expression von <i>glcT</i> und <i>glcA</i>	110
4.5	Verwertung von GlcNAc.....	112
4.6	Expression des <i>icaADBC</i>-Operons.....	113
4.7	Hypothesen für die Biosynthese von PIA mit unterschiedlichen Substraten	114
4.7.1	Glucose als Substrat	116
4.7.2	GlcNAc als Substrat	116
4.7.3	Glucosamin als Substrat	119
4.8	Mögliche Ursachen der phänotypischen Beobachtungen	119
4.9	Ausblick	123
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	124
6	LITERATURVERZEICHNIS	126
7	ANHANG	143
7.1	Sequenz von <i>glcA</i>.....	143
7.2	Sequenz von <i>glcT</i>	147

Danksagung

Publikationen

Lebenslauf

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Interaktion des Wirtsorganismus und Antibiotika mit einem Biofilm.....	14
Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Orientierung und Position der Primer für eine RT-PCR.....	42
Abb. 3.1: Mukoider Phänotyp und mukoid-negativer Phänotyp von <i>S. epidermidis</i> 1457	52
Abb. 3.2: Mukoide und mukoid-negative Zellen von <i>S. epidermidis</i> 1457 und den Mutanten M16 und M20.....	59
Abb. 3.3: Extrem mukoide Zellen von <i>S. epidermidis</i> 1457.....	59
Abb. 3.4: PIA-Menge von <i>S. epidermidis</i> 1457, M16, M20 und 1457-M11 von Agarplatten in Abhängigkeit vom Zucker.....	62
Abb. 3.5: PIA-Menge von <i>S. epidermidis</i> 1457, M16, M20 und 1457-M11 aus statischer Flüssigkultur in Abhängigkeit vom Zucker.....	63
Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Transposoninsertionsstelle in der Mutante M16.....	65
Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Transposoninsertionsstelle in der Mutante M20.....	66
Abb. 3.8: Vergleich der klonierten Fragmente mit den Fragmenten aus Wildtyp und Mutanten und dem Produkt der inversen PCR in der Southern Blot Hybridisierung.	68
Abb. 3.9: Schematische Darstellung des doppelt sequenzierten Bereichs der Transposoninsertionsstelle in der Mutante M20.....	69
Abb. 3.10: Umliegende Gene von <i>glcA</i> in <i>S. epidermidis</i> RP62A.....	72
Abb. 3.11: Schematische Darstellung des doppelt sequenzierten Bereichs der Transposoninsertionsstelle in der Mutante M16.....	74
Abb. 3.12: Umliegende Gene von <i>glcT</i> in <i>S. epidermidis</i> RP62A.....	76
Abb. 3.13: Detaillierte Darstellung der Sequenz 5'-aufwärts von <i>glcA</i> in <i>S. epidermidis</i> 1457 (Pos. 121–359 der Sequenz im Anhang).....	78
Abb. 3.14: Mögliche Sekundärstrukturen der RAT-Sequenzen vor <i>glcA</i> aus <i>S. epidermidis</i> 1457 und Vergleich mit schon beschriebenen vor <i>glcA</i> aus <i>S. carnosus</i> und vor <i>ptsG</i> aus <i>B. subtilis</i>	79

Abb. 3.15: Alignment von RAT-Sequenzen vor EII^{Glc} -Genen in verwandten gram-positiven Spezies.	80
Abb. 3.16: Alignment von homologen Antiterminatoren mit ihren funktionellen Domänen.	82
Abb. 3.17: Nachweis der Transkription von <i>glcT</i> in der Northern Blot Hybridisierung. ...	85
Abb. 3.18: Nachweis der Transkription von <i>glcA</i> in <i>S. epidermidis</i> 1457 und den Mutanten M16, M20 und 1457-M11 in der Northern Blot Hybridisierung.	86
Abb. 3.19: Nachweis der Induktion von <i>glcA</i> im Wildtyp <i>S. epidermidis</i> 1457 durch unterschiedliche Zucker in der Northern-Blot-Hybridisierung.	88
Abb. 3.20: Nachweis eines <i>icaADBC</i> spezifischen Transkripts aus <i>S. epidermidis</i> 1457 und den Mutanten M16, M20 und 1457-M11 in der Northern-Blot-Hybridisierung.	89
Abb. 3.21: Transport unterschiedlicher Zucker in Abhängigkeit von der Zeit durch <i>S. epidermidis</i> 1457 und die Mutanten M16, M20 und 1457-M11.	91
Abb. 3.22: Wachstum von <i>S. epidermidis</i> 1457 in PYØ und in PYØ mit Zusatz der angegebenen Zucker mittels OD_{578} in Abhängigkeit von der Zeit.	95
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise und Phosphorylierungen des PTS.	101
Abb. 4.2: Schematische Darstellung der rho-unabhängigen Termination und Antitermination.	107
Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Antiterminatoraktivität in Abhängigkeit vom PTS.	109
Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Verstoffwechslung von Glucose und Glucosamin in <i>S. epidermidis</i> 1457 und hypothetische Wege für die Umsetzungen von GlcNAc in der Biosynthese von PIA.	115

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme	25
Tab. 2.2: Übersicht über verwendete Plasmide	26
Tab. 2.3: Übersicht über verwendete Oligonukleotide und Sonden	27
Tab. 3.1: Bildung eines mukoiden Phänotyps von Wildtyp und Mutanten in Abhängigkeit vom Medium	53
Tab. 3.2: Bildung eines mukoiden Phänotyps von <i>S. epidermidis</i> 1457 auf PYØ-Agarplatten in Abhängigkeit vom Zucker	54
Tab. 3.3: Bildung eines mukoiden Phänotyps von <i>S. epidermidis</i> 1457 auf PYØ-Agarplatten in Abhängigkeit von der Aminozuckerkonzentration.....	55
Tab. 3.4: Bildung eines mukoiden Phänotyps von <i>S. epidermidis</i> 1457 auf TSBØ-Agarplatten in Abhängigkeit von Aminosäure und Zuckerzusatz.....	55
Tab. 3.5: Korrelation von <i>icaADBC</i> Genort und der Fähigkeit zur Ausbildung eines mukoiden Phänotyps unterschiedlicher <i>S. epidermidis</i> Stämme	57
Tab. 3.6: Zusammenfassung der verwendeten Stämme und ihrer Eigenschaften unter den im Folgenden relevanten Bedingungen	58
Tab. 3.7: Biofilmbildung unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren, verglichen mit Standardtestbedingungen	60
Tab. 3.8: Homologe Gene zu dem in Mutante M20 vom Transposon getroffenen Genort <i>glcA</i>	70
Tab. 3.9: Homologe Gene zu dem in Mutante M16 vom Transposon getroffenen Genort <i>glcT</i>	75
Tab. 3.10: Transportraten unterschiedlicher Zucker von <i>S. epidermidis</i> 1457 und Mutanten	91
Tab. 3.11: Säurebildung auf Purple-Agar.....	93
Tab. 3.12: Ergebnisse ID 32 Staph (bioMérieux).....	94
Tab. 4.1: Vergleich der Hexosaminmenge in PIA mit GlcNAc als Substrat und der Menge in die Zellen transportierter GlcNAc-Moleküle	118
Tab. 4.2: Expression eines mukoiden Phänotyps in Abhängigkeit vom PIA-Titer und der sich daraus ergebenden Hexosaminmenge pro mg Protein.....	120

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
AT	Antiterminatorprotein
bp	Basenpaare
CAT	<i><u>Co-AntiTerminator</u></i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i><u>desoxy-ribo<u>n</u>ucleic-<u>a</u>cid</u></i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EI	Enzym I des PTS
EII	Enzym II des PTS
EII ^{Fru}	Enzym II, das Fructose-spezifisch ist
EII ^{Glc}	Enzym II, das Glucose-spezifisch ist
EPS	Exopolysaccharid
Fru	Fructose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
HPr	Histidin Protein des PTS
HUSAR	<u>H</u> eidelberg <u>U</u> nix <u>S</u> equence <u>A</u> nalysis <u>R</u> esources
<i>ica</i>	<i><u>intercellular adhesion</u></i>
IS	Insertionselement
kb	Kilobasenpaare
kDa	kilo Dalton
mRNA	Messenger RNA
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i><u>open reading frame</u></i>)

PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PIA	<i>Polysaccharide intercellular adhesion</i>
Pos.	Position
PRD	PTS-Regulationsdomäne (<i>PTS-regulation domain</i>)
PTS	Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase System
PYØ	Pepton-Yeast Medium, modifiziert
RAT	<i>ribonucleic antiterminator</i>
RBD	RNA Bindungsdomäne (<i>RNA-binding domain</i>)
RBS	Ribosomen Bindungsstelle (<i>ribosome binding site</i>), kennzeichnet die Shine Dalgarno Sequenz
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transkription
S	Svedbergeinheiten
Tab.	Tabelle
TIGR	<i>The Institut for Genomic Research</i>
Tn	Transposon
tRNA	Transfer RNA
TSB	<i>Trypton Soya Broth</i>
TSBØ	TSB ohne Glucose
UDP	Uridin Diphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridin Triphosphat
Wt	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung

IUPAC-Nukleinsäurecode

A	Adenosin	M	A oder C
C	Cytidin	S	G oder C
G	Guanosin	W	A oder T
T	Thymidin	B	G oder T oder C
U	Uridin	D	G oder A oder T
R	G oder A (Purin)	H	A oder C oder T
Y	T oder C (Pyrimidin)	V	G oder C oder A
K	G oder T	N	A oder G oder C oder T (alle)

IUPAC-Aminosäurecode

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

1 Einleitung

1.1 Biofilme und Biofilmbildung als pathogener Mechanismus

Biofilmbildung ist in der Natur ein weit verbreitetes Phänomen. Ein Biofilm wird als Gemeinschaft von Mikroorganismen definiert, die an eine Oberfläche gebunden ist (O'Toole et al., 2000). Die erste Erwähnung, die einen Biofilm betraf, machte Henrici in einer Veröffentlichung im Jahre 1933. Dort stellte er fest, dass die meisten Wasser-Bakterien nicht frei flotierten, sondern unter Wasser auf einer Oberfläche aufwuchsen (Henrici, 1933). Diese Fähigkeit zum Aufwachsen auf Oberflächen, während das Wasser in Bewegung ist, macht man sich heute bei der Reinigung von Abwasser zu Nutze (Kiel, 1998). Biofilme finden sich auch in vielen extremen Standorten, wie z.B. bei der Erzlaugung in Abraumhalden bei pH-Werten von 0 (Edwards et al., 2000). In heißen Quellen wurden Biofilmmatten von Cyanobakterien ausgiebig untersucht (Ward et al., 1998), und neuerdings beginnen Forscher in der Antarktis Biofilme, die das Eis bedecken, zu erforschen (Paerl und Priscu, 1998).

Eine für den Menschen negative Bedeutung haben Biofilme als häufige Ursache von persistierenden Infektionen. Dabei können diverse Bakterienspezies unterschiedlichste Arten von Biofilmen erzeugen, die diese Infektionen verursachen (Costerton et al., 1999). Prominenteste Biofilme sind die auf den Zähnen, aus vor allem acidogenen gram-positiven Kokken, hauptsächlich Streptokokken, die Karies und Parodontose hervorrufen. Sehr gut untersucht sind Biofilme von *Pseudomonas aeruginosa*, die Verursacher von Pneumonien bei Patienten mit Cystischer Fibrose sind (Gacesa, 1998). Besondere Bedeutung kommt den nosokomial, d.h. im Krankenhaus erworbenen, Infektionen zu. Diese werden zu einem großen Teil durch Biofilme auf implantierten Fremdkörpern verursacht. *Staphylococcus epidermidis*, dem das Interesse dieser Arbeit gilt, ist ein Hauptverursacher dieser Infektionen (Schaberg et al., 1991). Der Keim ist in der Lage, Kunststoffimplantate, wie z.B. künstliche Herzklappen, zentrale Venenkatheter, Gelenk- und Gefäßprothesen, Liquor-Shunts, Herzschrittmacher, Kontaktlinsen und auch Silikonbrustimplantate zu besiedeln (Pfaller und Herwaldt, 1988; Rupp und Archer, 1994).

Wie die Beispiele zeigen, können sich Biofilme auf einer Vielzahl biotischer und abiotischer Oberflächen bilden, wobei die meisten Biofilme aus verschiedenen Bakterienspezies bestehen, es aber auch Biofilme aus einer einzigen Spezies gibt (O'Toole

et al., 2000). Bei den Biofilmen von *S. epidermidis* handelt es sich in der Regel um Biofilme mit einer einzigen Spezies.

Biofilme sind strukturell sehr ähnlich aufgebaut und ihre Entstehung ist durch drei charakteristische Schritte gekennzeichnet: (i) initiale Anheftung an eine Oberfläche, gefolgt von (ii) der Bildung von Mikrokolonien, die (iii) letztendlich zum eigentlichen Biofilm akkumulieren. Strukturell ist den Biofilmen gemeinsam, dass die Bakterien in vielschichtigen Zellaggregaten in einer Exopolysaccharid (EPS)-Matrix eingebettet sind. Diese ist strukturgebend und variiert in Abhängigkeit von diversen Umweltparametern (Davey und O'Toole, 2000). In ihr befinden sich Regionen, die Kanäle ausbilden, über die Wasser und Nährstoffe transportiert werden können. Die Bakterien in Biofilmen bilden eine auf ihre Umwelt abgestimmte organisierte Gemeinschaft. In dieser weisen sie je nach Position und der damit verbundenen Nährstoffverfügbarkeit einen anderen physiologischen Status und daraus resultierend eine unterschiedliche Genexpression auf (Costerton et al., 1995). Diese differierenden physiologischen Stadien konnten anhand von Reporter-gentechniken mittels fluoreszierender Sonden direkt sichtbar gemacht werden (Xu et al., 2000).

Die Organisation der Bakterien in einem Biofilm bietet ein Vielzahl von Vorteilen und dies hauptsächlich aufgrund ihrer extrazellulären Matrix aus EPS, Proteinen und anderen Substanzen. Zum einen bietet ein Biofilm mechanischen Schutz, zum anderen aber auch Schutz vor Umwelteinflüssen, wie UV-Strahlung, pH-Wert Änderungen, osmotischem Schock und Vertrocknung. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch die sessile Lebensweise bestimmte Nährstoffe überhaupt erst aufgenommen werden können (Fleming, 1993). Nährstoffe, die zur Verfügung stehen, können in einem Biofilm in idealer Kooperation verwertet werden. So wäre die Degradation von organischem Material zu Methan, z.B. in anaeroben Abwasseranlagen, gar nicht möglich, wenn die fermentativen, acetogenen und methanogenen Bakterien nicht in unmittelbarer Nachbarschaft angesiedelt wären (Schink, 1997; Kiel, 1998). Die Organisation in einem Biofilm erleichtert den Gentransfer. In Biofilmen mit unterschiedlichen Spezies sogar den horizontalen Gentransfer, der bei der Entstehung von antibiotischen Multiresistenzen eine wesentliche Rolle spielt (Davey und O'Toole, 2000).

Ein besonderes Interesse gilt den Vorteilen, die ein Biofilm für Infektionserreger hat. Biofilme wachsen langsam, deshalb kommt es erst sehr spät, wenn der Biofilm schon ausgeprägt ist, zu Symptomen (Costerton et al., 1999). Bei *S. epidermidis* erscheinen die

Symptome der Infektionen nach ganz unterschiedlichen Zeiträumen, so können sie sich Tage oder wenige Wochen nach Einbringen des Fremdkörpers zeigen. Nicht selten aber manifestieren sie sich erst Monate oder Jahre später (Kloos und Bannermann, 1994).

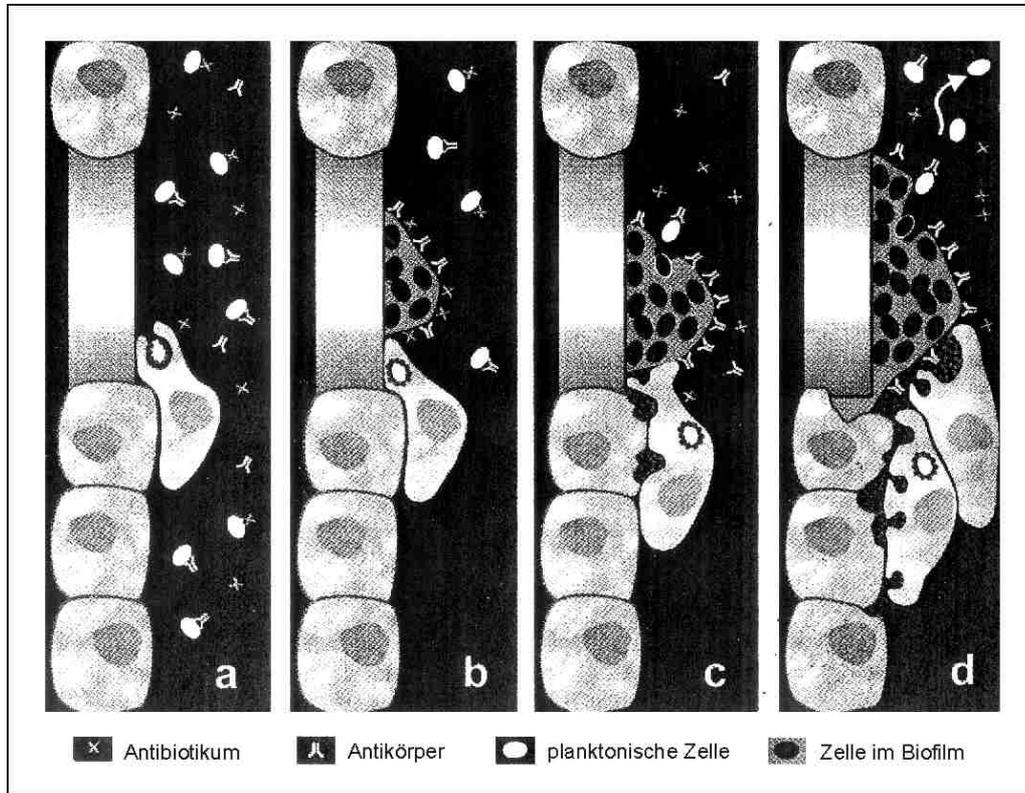


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Interaktion des Wirtsorganismus und Antibiotika mit einem Biofilm (Costerton et al., 1999)

a Planktonische Bakterienzellen können durch Antikörper, Phagozytose und durch Antibiotika eliminiert werden.

b Adhäreierende Zellen bilden einen Biofilm auf der inerten Oberfläche. Dieser Biofilm ist unangreifbar durch Antikörper, Phagozytose und Antibiotika.

c Phagozyten werden vom Biofilm angezogen. Die Phagozytose ist erfolglos, aber es werden phagozytotische Enzyme freigesetzt, die beginnen, das den Biofilm umgebende Gewebe zu zerstören.

d Die Zerstörung des umliegenden Gewebes nimmt drastisch zu. Aus dem vergrößerten Biofilm werden planktonische Zellen frei, die zur Verbreitung der Zellen und erneuten akuten Infektionssymptomen führen können.

Sessile Bakterien stimulieren zwar die Antikörperproduktion, doch ist das Immunsystem nicht in der Lage, die Zellen im Biofilm zu eliminieren. Die wirtseigene Abwehr ist damit zwar in der Lage planktonische Zellen, nicht aber Zellen im Biofilm zu bekämpfen und es kommt zu Beschädigung des umliegenden Gewebes (Abb. 1.1) (Cochrane et al., 1988). Ähnlich ist es mit den Antibiotika. Diese erfassen zwar planktonische Zellen, die aus dem Biofilm freikommen, können den Biofilm selber aber nicht ausreichend angreifen. Unter

Antibiotikagabe kommt es daher bei diesen Infektionen zur typischen Wiederkehr der Symptome (Costerton et al., 1995). Als erfolgreiche Therapie kommt deshalb bei fremdkörperassoziierten Infektionen mit *S. epidermidis* nur das Entfernen des Fremdkörpers in Frage (Younger et al., 1987).

Für die Unempfindlichkeit der Bakterien im Biofilm gegenüber Antibiotika werden mehrere Gründe diskutiert: Die Matrix der Biofilme, hauptsächlich aus polymeren Substanzen bestehend, kann mit den Antibiotika interagieren, was die Diffusion und Wirksamkeit beeinflussen kann. Eine verminderte Wirksamkeit kann auch durch Modifikation durch extrazelluläre Enzyme erfolgen (Gilbert et al., 1997). Wie schon erwähnt, befinden sich die Bakterien im Biofilm in unterschiedlichen metabolischen Stadien. Viele von ihnen wachsen langsam oder gar nicht und sind deshalb durch viele Antibiotika nicht angreifbar (Costerton, 1999). Für die geringe antibiotische Wirksamkeit von Glykopeptiden gegen *S. epidermidis* konnte die Anwesenheit von extrazellulärem Material, langsame Wachstumsraten und eine große Anzahl von Zellen verantwortlich gemacht werden (König et al., 2001). Ein weiterer Grund ist die zunehmende Anzahl von Antibiotikaresistenzen der Infektionsstämme, auch von *S. epidermidis* (Bailey et al., 1990; Archer und Climo, 1994; Raad et al., 1998).

Offensichtlich bietet die Biofilmbildung eine Menge Vorteile, mit denen sich *S. epidermidis* bei der fremdkörperassoziierten Infektion an die Gegebenheiten im Menschen anpasst. Deshalb wird die Fähigkeit zur Biofilmbildung auf Polymeroberflächen als wichtigster pathogener Faktor von *S. epidermidis* angesehen. Stämme, die zur Biofilmbildung in der Lage sind, werden deshalb als Biofilm-positive von den Biofilm-negativen abgegrenzt (Mack, 1999a).

1.2 Staphylokokken

Staphylococcus epidermidis gehört zur Gattung der Staphylokokken, die im Mikroskop durch ihre traubenartige Anordnung auffallen, die der Gattung den Namen gab. Staphylokokken sind gram-positive, unbewegliche Kokken von 0,5-1,5 µm Durchmesser. Sie können einzeln, in Paaren oder Tetraden vorkommen und teilen sich in mehreren Ebenen zu den charakteristischen irregulären Traubenformen. Staphylokokken gehören zusammen mit den Gattungen *Micrococcus*, *Stomatococcus* und *Planococcus* zur Familie der *Micrococcaceae*. Innerhalb dieser Familie fallen sie durch einen sehr niedrigen G+C

Gehalt von nur 30-39 Molprozent auf. Sie sind fakultativ anaerob, wachsen allerdings besser unter aeroben Bedingungen. Staphylokokken sind chemoorganotroph und haben einen respiratorischen und fermentativen Stoffwechsel, bei dem eine Vielzahl von Kohlenhydraten aerob unter Säureproduktion verbraucht wird. Ihr Nährstoffbedarf ist sehr anspruchsvoll, denn sie benötigen eine Vielzahl von Aminosäuren und B-Vitaminen (Kloos und Schleifer, 1986). Allerdings gehören sie zu den Widerstandsfähigsten unter den nicht Sporen-bildenden Bakterien, denn sie können in Gegenwart von bis zu 10 % NaCl wachsen. Einige von ihnen können für 30 min bei 60°C Hitze überleben und sind resistent gegenüber einer Vielzahl von Desinfektiva (Novick, 1993).

Typischerweise findet man Staphylokokken in Assoziation mit der Haut, Hautdrüsen und Schleimhäuten von Warmblütern (Nobel und Naidoo, 1986; Nobel, 1997). Selten werden Staphylokokken auch in verarbeiteten Tierprodukten gefunden, wie z.B. *S. carnosus*, oder in Umweltproben wie Wasser oder Boden. Einige sind sehr spezialisiert, so kommt *S. capitis* fast ausschließlich auf der behaarten Kopfhaut, *S. auricularis* nur in den äußeren Gehörgängen und *S. haemolyticus* sowie *S. hominis* nur im Bereich von Schweißdrüsen vor. Insgesamt gibt es derzeit 32 beschriebene Staphylokokken-Spezies (Kloos, 1997).

Man teilt die Staphylokokken in zwei Klassen ein, die Koagulase-positiven und die Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS) (Schleifer und Kloos, 1975). Zu den Koagulase-positiven gehört als einzige humanpathogene Spezies *S. aureus*, die mit dem größten pathogenen Potential der Staphylokokken auch die am besten untersuchte ist. *S. aureus* kann invasive eitrige Infekte, Furunkel, Wundinfekte, Entzündungen im Hals-Nasen-Ohren Raum und Sepsis hervorrufen. Er ist auch in der Lage, durch Toxinbildung Lebensmittelvergiftungen und das Toxic-Schock-Syndrom zu verursachen (Tenover und Gaynes, 2000). Die weit größere Gruppe sind Koagulase-negative Staphylokokken. Sie galten zunächst als apathogen, wurden dann aber als häufige Erreger nosokomialer Infektionen erkannt (Banerjee et al., 1991; Schaberg et al., 1991). Der häufigste Infektionserreger dieser Gruppe ist der in dieser Arbeit untersuchte *Staphylococcus epidermidis*. *S. epidermidis* kommt auf der gesamten Körperoberfläche vor und ist dort die am häufigsten isolierte Art mit Populationsdichten von bis zu 10^3 - 10^6 Koloniebildene Einheiten pro cm^2 an den Ausgängen von Schweißdrüsen, Haartaldrüsen und den Nasenschleimhäuten (Kloos, 1986).

Normalerweise sind diese Bakterien apathogen für immunkompetente Menschen. Erst durch das Einbringen von Fremdkörpern aus polymeren Kunststoffen oder Metall kommt es zu signifikanten Infektionen. Die verursachenden *S. epidermidis* Stämme dieser

Infektionen stammen meist aus der endogenen Haut- oder Schleimhautflora des Patienten (Rupp und Archer, 1994). Dies kann zu Komplikationen bei der Diagnose führen, da es schwierig ist, Kontaminanten von den klinisch signifikanten Stämmen zu unterscheiden (Kleemann et al., 1993; Herwaldt et al., 1996).

1.3 Biofilmbildung von *S. epidermidis*

Einen ersten Hinweis darauf, dass bei den katheterassoziierten Infektionen ein Biofilm beteiligt ist, brachten elektronenmikroskopische Bilder von infizierten Kathetern. Hier zeigte sich die charakteristische Anordnung der *S. epidermidis* Zellen in vielschichtigen Lagen, eingebettet in eine amorphe Substanz, vermutlich bestehend aus Exopolysacchariden (Franson et al., 1984; Marrie und Costerton, 1984). Stämme, die in einem *in vitro* Test in 96-Loch Zellkulturschalen einen Biofilm ausbildeten, waren häufiger mit signifikanten Infektionen korreliert als Biofilm-negative (Christensen et al., 1985). Die Ausbildung des Biofilms von *S. epidermidis* erfolgt in zwei charakteristischen Phasen: Zunächst kommt es zur initialen Anheftung der Bakterien an die Kunststoffoberfläche, der sogenannten primären Adhäsion. Die zweite Phase ist eine Proliferation und Akkumulation der Bakterien in vielschichtigen Zellclustern, die eine interzelluläre Adhäsion erfordert (Mack, 1999b). Insgesamt ist die Biofilmbildung von *S. epidermidis* ein äußerst komplexer Vorgang, der von einer Vielzahl Faktoren abhängt, von denen bisher erst ein Teil erforscht und verstanden ist.

1.3.1 Faktoren der primären Adhäsion

Die primäre Adhäsion als erster Schritt der Biofilmbildung hängt vor allem von der Interaktion der Bakterien mit der Polymeroberfläche ab, wobei unspezifische wie auch spezifische Adhäsionsmechanismen beteiligt sind. Ein Faktor dabei ist das verwendete Polymer (Hogt et al., 1985; Ludwicka et al., 1984a). Über hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen oder van der Waals Kräfte treten die Bakterienzellen mit ihrer Oberfläche mit dem Polymer in Verbindung (Kloos, 1997). Unmittelbar nach Implantation des Polymers kommt es häufig zu Beschichtungen mit Plasma-Proteinen, extrazellulären Matrix-Proteinen, oder Thrombozyten. Dabei zeigte sich, dass die Anheftung an Polymeroberflächen in Anwesenheit von Serum, Plasma und Albumin deutlich vermindert ist

(Muller et al., 1991). Die Matrix-Proteine Fibronectin und etwas schwächer Fibrinogen verbessern dagegen die Anheftung (Herrmann et al., 1988; Vaudaux et al., 1989; Bartscht, 2001).

Als spezifischer Faktor konnte ein zellwandassoziiertes Fibrinogen-bindendes Protein (Fbe) von *S. epidermidis* HB ermittelt werden, dessen codierendes Gen kloniert und sequenziert wurde. Viele klinische Isolate besitzen das Gen *fbe*. Die Fähigkeit an Fibrinogen zu binden, ist allerdings sehr heterogen ausgeprägt, was auf eine unterschiedliche Expression von Fbe schließen lässt (Nilsson et al., 1998).

Mittels eines monoklonalen Antikörpers wurde ein weiteres zellwandassoziiertes Protein Ssp1 entdeckt, das in einer Fimbrien-ähnlichen Struktur auf der Zelloberfläche von *S. epidermidis* 354 lokalisiert ist. Bei der Reaktion des 200 kDa Proteins mit dem Antikörper wird die primäre Anheftung von *S. epidermidis* 354 an Polystyrolkugeln konzentrationsabhängig signifikant vermindert (Timmerman et al., 1991; Veenstra et al., 1996).

Durch Transposonmutagenese von *S. epidermidis* O-47 mit dem Transposon Tn917 wurde eine Mutante mut1 generiert, die in ihrer Bindung an Polystyrol beeinträchtigt war. Das Transposon inserierte in einem Gen mit hoher Homologie zu einem Autolysin von *S. aureus atl* und wurde *atlE* genannt. Das 148 kDa große Protein besteht aus zwei bakteriolytisch aktiven Domänen, einer 60 kDa Amidase und einer 52 kDa Glucosaminidase. In der Mutante mut1 fehlten mehrere zelloberflächenassoziierte Proteine. Die initiale Anheftung konnte mit der Subklonierung des 60 kDa Proteins in die Mutante mut1 komplementiert werden. Dies bedeutet, dass das Autolysin AtlE eine Rolle bei der Bindung an die Polymeroberfläche während der frühen Phase der Adhäsion spielt und deshalb essentiell für die Biofilmbildung ist (Heilmann et al., 1996a; Heilmann et al., 1997). Die Bedeutung von AtlE für die Pathogenese im Infektionsprozess konnte kürzlich in einem Rattenmodell belegt werden (Rupp et al., 2001).

Von *S. epidermidis* RP62A wurde ein Polysaccharid PS/A gereinigt, das möglicherweise die primäre Adhäsion an Silikon-Katheter vermittelt. Die Anheftung an die Katheter konnte mit Hilfe eines gegen gereinigtes PS/A hergestellten Antiserums inhibiert werden (Tojo et al., 1988). Eine isogene Biofilm-negative Transposonmutante eines PS/A positiven Stammes M187 zeigte eine verminderte Adhäsion an die Katheter sowie eine verminderte Expression von PS/A (Muller et al., 1993a). Da allerdings ungefähr die Hälfte aller PS/A produzierenden Stämme Biofilm-negativ waren, heißt dies, dass PS/A alleine

nicht für die Biofilmbildung verantwortlich sein kann (Muller et al., 1993b). Nachdem PS/A zunächst nur eine Bedeutung in der primären Adhäsion zugeschrieben wurde, hat es nach neueren Erkenntnissen auch in der akkumulativen Phase eine Funktion (McKenney et al., 1998).

1.3.2 Faktoren der akkumulativen Phase

Im Gegensatz zur primären Adhäsion sind für die akkumulative Phase schon detailliertere Mechanismen bekannt.

Von *S. epidermidis* RP62A wurde mittels chemischer Mutagenese eine Mutante M7 erzeugt. Diese ist Biofilm-negativ, ihre initiale Adhäsion an Glas oder Polystyrol ist aber nicht betroffen (Schumacher-Perdrau et al., 1994). Die Mutante M7 ist nicht mehr in der Lage, ein 140 kDa Protein, genannt AAP (*accumulation-associated protein*) zu exprimieren. Die Biofilmbildung von einigen Biofilm-positiven *S. epidermidis* Stämmen wird mit einem Antiserum gegen das gereinigte Protein konzentrationsabhängig inhibiert (Hussain et al., 1997). Da allerdings auch AAP-negative Stämme einen Biofilm produzieren können (Hussain et al., 1997), ist die funktionelle Aufgabe des Proteins bisher nicht bekannt.

Für die Akkumulation der Zellen zu vielschichtigen Biofilmen ist eine Substanz notwendig, die die Zellen zusammenhält, ein sogenanntes interzelluläres Adhäsin. In den frühen elektronenmikroskopischen Bildern war eine amorphe Substanz entdeckt worden, von der man annahm, dass es sich um ein Exopolysaccharid handelt. Auf der Suche nach diesem Faktor, generierten Mack et al. (1992) ein Antiserum, das gegen den Biofilm-positiven Stamm *S. epidermidis* 1457 gerichtet war. Dieses Antiserum reagierte mit einem für biofilmbildende *S. epidermidis* Stämme spezifischem Antigen. Die immunologische Aktivität des Antigens wurde durch Periodat-Oxidation komplett zerstört. Auch Zellaggregate, die sich beim Wachstum im Medium gebildet hatten, wurden durch Periodat-Oxidation aufgelöst. Aus diesen Beobachtungen konnte auf eine Kohlenhydratstruktur, die die interzelluläre Adhäsion vermittelt, geschlossen werden (Mack et al., 1994b). Zwei isogene Tn917-Mutanten M10 und M11 von *S. epidermidis* 13-1 wurden isoliert, die vollständig Biofilm-negativ waren, keine Zellaggregate mehr bildeten und keine Reaktivität mit dem Antiserum zeigten (Mack et al., 1994a).

Es wurde nun das Polysaccharid von *S. epidermidis* 1457, das die interzelluläre Adhäsion vermitteln sollte, ohne Kontaminationen aus den Medien aufgereinigt. Es wurde in einem

Kontroll-Ansatz dieselbe Präparation mit der Mutante 1457-M11 durchgeführt. Das analysierte Polysaccharid wurde mittels Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie in die Polysaccharide I (> 80 %) und II (< 20%) aufgetrennt, wobei Polysaccharid I kationisch ist und Polysaccharid II leicht anionisch. Mittels NMR-Spektroskopie wurde ermittelt, dass Polysaccharid I ein Homoglykan aus 130 β -1-6-verknüpften 2-Deoxy-2-Amino-D-Glucopyranosyl Resten ist. Davon sind 15-20 % nicht N-acetyliert und positiv geladen. Polysaccharid II ist strukturell verwandt mit Polysaccharid I, hat aber einen geringeren Gehalt von nicht N-acetylierten Resten und enthält Phosphat und Estergebundenes Succinat, das es anionisch erscheinen lässt. Gemäß seiner Funktion wird dieses Polysaccharid PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) genannt (Mack et al., 1996a). Für 179 *S. epidermidis* Stämme konnte die Korrelation zwischen Biofilmbildung und PIA-Produktion gezeigt werden (Mack et al., 1996b). Dies unterstreicht die essentielle Bedeutung von PIA in der akkumulativen Phase der Biofilmbildung.

Unabhängig davon isolierten Heilmann et al. (1996a) zwei Transposonmutanten mut2 und mut2a von *S. epidermidis* O-47, die phänotypisch den Mutanten M10 und M11 ähnelten. Durch Transformation dieser Mutanten mit dem Plasmid pCN27, das den *ica* (*intercellular adhesin*)-Genort enthält, konnte die Biofilmbildung wieder hergestellt werden. Bei Expression des Plasmids in *S. carnosus* konnte die Synthese von PIA mittels des an gereinigtem PIA hergestellten Antiserums nachgewiesen werden (Heilmann et al., 1996b). Durch Frame-Shift-Mutationen im *ica*-Genort des rekombinanten *S. carnosus* wurde die Expression der durch den *ica*-Genort veränderten phänotypischen Merkmale verhindert. Der *ica*-Genort, der nach diesen Ergebnissen für die Synthese von PIA verantwortlich ist, besteht aus den vier Genen *icaADBC*, die in einem Operon organisiert sind. IcaA zeigt zusammen mit IcaD N-Acetyl-Glucosaminyltransferase-Aktivität (Gerke et al., 1998). IcaC ist ein hydrophobes integrales Membran-Protein, das keine Ähnlichkeiten zu anderen bisher beschriebenen Proteinen hat, für die PIA-Bildung aber essentiell ist. IcaB ist ein sekretiertes Protein, dessen Funktion ebenfalls unbekannt ist (Heilmann et al., 1996b). Für die Mutanten M10 und M11 und weitere Biofilm-negative Mutanten der Klasse I von *S. epidermidis* 1457 konnte später gezeigt werden, dass sie gleichfalls Transposoninsertionen im *ica*-Operon haben (Mack et al., 2000).

Die Bedeutung von PIA für die Infektion wurde in zwei Tiermodellen unter Verwendung des PIA-exprimierenden Stammes *S. epidermidis* 1457 und der PIA-negativen Mutante 1457-M10 gezeigt. In einem Mausmodell konnte mit dem Wildtypstamm im Gegensatz zur

Mutante häufiger die Entstehung subkutaner Katheter-Abszesse nachgewiesen werden (Rupp et al., 1999a). In einem Rattenmodell konnte die gehäufte Infektion an einem intravenösen Katheter durch den Wildtyp gezeigt werden (Rupp et al., 1999b). Inzwischen konnte von Bartscht (2001) ausgeschlossen werden, dass PIA unter den Standard-Biofilm-Testbedingungen während der primären Adhäsion von Bedeutung ist.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass PIA bei der Hämagglutination von Erythrozyten eine essentielle Bedeutung hat (Mack et al., 1999c).

In diversen *S. aureus* Stämmen wurde der *icaADBC* Genort mit hoher Homologie zu dem in *S. epidermidis* nachgewiesen (Cramton et al., 1999; Horstkotte, unveröffentlicht). Dieser Genort synthetisiert dort ein PIA ähnliches Polysaccharid Poly-N-Succinyl β -1-6 Glucosamin, PNSG (McKenney et al., 1999). Eine klinische Relevanz dieses Genortes und des Polysaccharids bei *S. aureus* konnte bisher allerdings nicht klar gezeigt werden (Fowler et al., 2001).

1.3.3 Regulative Faktoren der Biofilmbildung

Da die Biofilmbildung in Abhängigkeit von einer Vielzahl von Faktoren Schwankungen unterliegt, haben auch regulative Faktoren Einfluss auf die Biofilmbildung. Nur ein geringer Teil dieser Faktoren ist bisher bekannt.

Ziebuhr et al. (1997) beobachteten Phasenvariationen nach mehrmaligem Passagieren von *ica*-positiven Stämmen, die mit einem Biofilm-negativen Phänotyp einhergingen. Der Grund hierfür konnte später in der vorübergehenden Insertion des Insertionselements IS256 in das *icaADBC* Operon nachgewiesen werden (Ziebuhr et al., 1999).

Drei Genorte in *S. epidermidis* mit regulativem Einfluß auf die Biofilmbildung wurden von Mack et al. (2000) entdeckt. Die Inaktivierung dieser Genorte resultierte in dem Verlust des *ica*-Transkripts. Es zeigte sich, dass das *icaADBC*-Operon vermutlich einer Regulation durch den alternativen Sigmafaktor *sigB* unterliegt. In *S. epidermidis* 1457 konnte mit NaCl und EtOH, bekannten Aktivatoren von *sigB*, eine vermehrte Biofilmbildung ermittelt werden. Durch Inaktivierung von RsbU, einem positiven Regulator von *sigB*, wurde die Biofilmbildung inhibiert, und PIA konnte nur noch in geringen Mengen nachgewiesen werden (Knobloch et al., 2001). In *S. aureus* verursachte die direkte Mutation des *sigB* Gens den Verlust des Transkripts des *ica*-Operons (Rachid et al., 2000).

Ein weiterer regulativer Genort der Biofilmbildung liegt im *pur*-Operon, einem Regulator der Purinsynthese (Bartscht, 2001). Zu dem dritten Genort ist bisher nichts näheres bekannt.

Einen indirekt regulativen Einfluß zeigte eine Eisenlimitierung im Medium. Diese förderte in der spät-exponentiellen Wachstumsphase die „Schleim“-Bildung (Deighton und Borland, 1993). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass anaerobe Bedingungen die Expression von PIA stimulieren (Cramton et al., 2001a).

1.4 Bakterielle Exopolysaccharide und Polysaccharide von *S. epidermidis*

Exopolysaccharide (EPS) sind ein großer Bestandteil der Matrix von Biofilmen und für die meisten Vorteile verantwortlich, die ein Biofilm den Bakterien bietet. Polysaccharide sind hydrierte Polymere aus sich wiederholenden Monomeren, die über glykosidische Bindungen verknüpft sind. Es können Homo- oder Heteropolymere sein, die mit organischen oder anorganischen Molekülen substituiert sind. Es werden prinzipiell zwei Arten von bakteriellen Polysacchariden unterschieden: (i) ein amorphe Substanz, die die Zelle umgibt und häufig als Kapsel oder EPS bezeichnet wird oder (ii) mit der Zelle näher verbundene Polysaccharide, wie die Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien (Roberts, 1995). Bakterielle EPS haben durchaus positiven Nutzen und werden deshalb z.B. in der Lebensmittelindustrie als Stabilisatoren von Joghurt eingesetzt (Cerning, 1990). Sie können ferner dazu dienen, die Struktur diverser Lebensmittel gelartiger erscheinen zu lassen. Auch die Konsistenz von Farben und Ölen wird durch bakterielle Polysaccharide beeinflusst. Nicht zuletzt dienen sie der Gesundheit, da sie aufgereinigt, allein oder zusammen mit Proteinen, als Impfstoffe eingesetzt vor Infektionen schützen (Roberts, 1995). Als wichtigster Impfstoff ist hier *Haemophilus influenzae* Kapseltyp b zu nennen, mit dem Säuglinge im Alter von drei Monaten gegen die in diesem Alter häufig tödlich endende Meningitis und Epiglottitis geimpft werden (Peltola, 2000).

Für *S. epidermidis* wurde als essentielles Polysaccharid PIA beschrieben (Mack et al., 1996a). Doch schon viel früher hatte man versucht, die als „Schleim“ oder Glykokalyx bezeichnete Matrix zu erforschen. Problematisch dabei war, dass die Präparationen des Materials häufig mit Bestandteilen aus den komplexen Medien verunreinigt waren und eine Kontrolle mit „Schleim“-negativen Zellen fehlte (Mack et al., 2000b).

Eine hochmolekulare extrazelluläre Schleim-Substanz (ESS), die hauptsächlich aus Galaktose und Mannose bestand, sollte für die Anheftung oder die Akkumulation von *S. epidermidis* verantwortlich sein (Ludwicka et al., 1984b). Eine andere Gruppe beschrieb ein Schleim-assoziiertes Antigen (SAA), das hauptsächlich aus Glucose, etwas N-Acetyl-Glucosamin und N-Galaktosamin bestehen sollte (Christensen et al., 1990). Die Präparation wurde reevaluiert und dabei stellte sich heraus, dass die Zusammensetzung hauptsächlich aus N-Acetyl-Glucosamin bestand. Daraufhin wurde geschlossen, dass SAA und PIA verwandt seien (Baldassarri et al., 1996).

PS/A (*capsular polysaccharide/adhesin*) wurde als möglicher Faktor der primären Adhäsion schon beschrieben (1.3.1). Seine Zusammensetzung wurde zunächst als aus Galaktose, Glucosamin, Galaktosamin und Uronsäure bestehend beschrieben (Tojo et al., 1988). Diverse gut charakterisierte *S. epidermidis* Stämme zeigten gleiche Reaktivität sowohl mit dem PS/A- als auch mit dem PIA-Antiserum. Nach Reevaluation änderte sich die Zusammensetzung von PS/A dahingehend, dass es nun ein Polysaccharid mit β -1,6-verknüpften Glucosamineinheiten, hochgradig substituiert mit Succinat und Acetat ist. Zudem wird PS/A wie PIA vom *icaADBC* Genort synthetisiert (McKenney et al., 1998). Dieses lässt vermuten, dass es sich bei PS/A ebenfalls um ein verwandtes Polysaccharid von PIA, wenn nicht sogar dasselbe handelt (Mack et al., 2000b).

Hussain et al. untersuchte eine hochmolekulare Schleimsubstanz und Teichonsäuren von *S. epidermidis* RP62A in chemisch definiertem Medium (Hussain et al., 1991; 1992). Er fand eine ähnliche Zusammensetzung aus Glucose, Glycerol, Alanin, N-Acetyl-Glucosamin und Phosphat. Ferner stellte er fest, dass Teichonsäuren aufgrund nur geringer Unterschiede von Biofilm-positiven zu Biofilm-negativen Stämmen bei der Biofilmbildung keine signifikante Rolle spielen. Jüngste Erkenntnisse zeigen jedoch für *S. aureus*, dass die D-Alanin Substituenten der Teichonsäure aufgrund ihrer Ladung notwendig für die primäre Adhäsion sind (Gross et al., 2001).

1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem für *S. epidermidis* ungewöhnlichen Phänotyp. Auf Purple-Agarplatten, die mit N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) supplementiert waren, waren mukoide Formen von *S. epidermidis* 1457 beobachtet worden (Krokotsch, 1998). Diese waren gekennzeichnet durch ein äußerst „schleimiges“ Aussehen, einem Phänomen, das

eher von Klebsiellen und Pseudomonaden bekannt ist. Bei *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* ist der mukoide Phänotyp mit Virulenz korreliert (Nassif et al., 1989, Boucher et al., 1997). Auch klinische Isolate von *S. aureus* werden in mukoide und mukoid-negative Stämme eingeteilt (Lee und Lee, 2000). In diesen Beispielen ist der mukoide Phänotyp mit der Bildung von Exopolysacchariden verbunden. Da für *S. epidermidis* bekannt ist, dass die Glykokalyx mit ihren Exopolysacchariden eine entscheidende Funktion in der Biofilmbildung hat und damit ein Pathogenitätsfaktor ist, sollte die Bedeutung des mukoiden Phänotyps für *S. epidermidis* untersucht werden.

In der Annahme, es handele sich bei der Expression des mukoiden Phänotyps um einen von der Biofilmbildung abgekoppelten Mechanismus, waren Mutanten gesucht worden, die unter Standard-Testbedingungen biofilmbildend sind, aber nicht in der Lage einen mukoiden Phänotyp zu exprimieren (Krokotsch, 1998; Nedelmann, 1997). Die beiden Transposonmutanten M16 und M20 von *S. epidermidis* 1457 wiesen unter den damaligen Testbedingungen den gewünschten Phänotyp auf (Nedelmann, 1997). Die Isogenität der Mutanten wurde durch Phagentransduktion bestätigt (Nedelmann et al., 1998).

In dieser Arbeit sollte der mukoide Phänotyp näher charakterisiert werden. Zunächst wurde die Induktion des mukoiden Phänotyps im Wildtyp *S. epidermidis* 1457 und den Mutanten M16 und M20 durch unterschiedliche Faktoren untersucht. Dazu wurden verschiedene Medien und Zucker sowie Aminosäuren getestet. Mit den ermittelten Bedingungen wurde dann die Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht. Es sollte nun festgestellt werden, inwieweit es einen Zusammenhang zwischen den beobachteten Phänomenen und den schon bekannten Faktoren der Biofilmbildung, wie der PIA-Expression und dem *icaADBC* Genort, gibt.

Anschließend sollte der Genort der Transposoninsertion in den Mutanten M16 und M20 sequenziert und charakterisiert werden. Um Hinweise auf eine mögliche Funktion der betroffenen Gene zu erhalten, wurden Homologiesuchen in den entsprechenden Datenbanken durchgeführt. Mit Hilfe von RNA-Transkriptionsanalysen sollte bewiesen werden, welche Gene durch die Transposoninsertion inaktiviert wurden. Ferner wurden die Bedingungen der Expression dieser Gene untersucht. Durch weitere geeignete Versuche sollte dann die aufgrund der Homologie vermutete Funktion der Gene bewiesen werden.

Die genotypischen Ergebnisse wurden abschließend in Bezug zu den phänotypischen Beobachtungen gesetzt. Daraus sollten neue Erkenntnisse über die Glykokalyx und die Exopolysaccharid-Synthese von *S. epidermidis* gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Plastik- und Einwegartikel

Bei den verwendeten Chemikalien handelte es sich, wenn nicht anders angegeben, um analysereine Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Plastik- und Einwegartikel stammen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Nürtingen) und Becton Dickenson (Heidelberg).

2.2 Zentrifugen

Die im Folgenden aufgelisteten Zentrifugen wurden verwendet. Im Methodenteil wird die Zentrifugalgeschwindigkeit in x g (x-fache Erdbeschleunigung) angegeben:

Megafuge 1.0 R; Heraeus (Osterode)
 Sorvall RC-5B, GS-3 Rotor; Du Pont Instruments (Newtown USA)
 Biofuge 28 RS, Rotor 6042; Heraeus (Osterode)
 Tischzentrifuge Biofuge *pico*; Heraeus (Osterode)

2.3 Bakterienstämme

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>S. epidermidis</i> 1457	Wildtyp, Blutkulturisolat (Inst. f. Med. Mikrobiologie, UKE, Hamburg)	Mack et al., 1992
<i>S. epidermidis</i> M16*	Transposonmutante; Antiterminator <i>glcT</i> inaktiviert	Nedermann, 1997 diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> M20*	Transposonmutante; Glucosetransporter <i>glcA</i> inaktiviert	Nedermann, 1997 diese Arbeit
<i>S. epidermidis</i> 1457-M11	Transposontransduktante; <i>icaADBC</i> inaktiviert	Mack et al., 1994a
<i>S. epidermidis</i> RP62A		ATCC 35984
<i>S. epidermidis</i> SE5		Rupp und Archer, 1992

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>S. epidermidis</i> 8400, 9142	Klinische Blutkulturisolate (Inst. f. Med. Mikrobiologie, UKE, Hamburg)	Mack et al., 1992
<i>S. epidermidis</i> Stämme: 1815, 1535, 1057, 939, 521, 5179, 7837, 10333, 9225, 9896, 10331	Klinische Isolate, meist Blutkultur (Inst. f. Med. Mikrobiologie, UKE, Hamburg)	Mack et al., 1996b
<i>S. epidermidis</i> Stämme: 6, 11, 12, 26, 29, 31, 32	Klinische Isolate, Blutkultur und von Kathetern, (Inst. f. Med. Mikrobiologie, UKE, Hamburg)	Horstkotte et al., 2001
<i>E. coli</i> TOP10	Stamm für Transformation mit Plasmid pCR2.1 [®] -TOPO oder pCR [®] -XL.TOPO	Invitrogen
<i>S. aureus</i> Cowan I	Stamm mit Protein A zur Adsorption von Antikörpern	Kessler et. al., 1975

* Die Transposonmutanten M16 und M20 wurden durch M. Nedelmann in einem Transposonmutageneseexperiment erzeugt (Nedelmann, 1997). Dieses wurde mit dem temperatursensitiven Plasmid pTV1ts, welches das aus *Enterococcus faecalis* stammende Transposon Tn917 (Shaw und Clewell, 1985) enthält, durchgeführt. Die Isogenität der Mutanten wurde durch Phagentransduktion bestätigt (Nedelmann et al., 1998).

2.4 Plasmide, Oligonukleotide und Sonden

2.4.1 Plasmide

Tab. 2.2: Übersicht über verwendete Plasmide

Name	Eigenschaften	Herkunft
pCR [®] -XL.TOPO	Klonierung langer PCR-Produkte, Klonierung zerstört letales <i>E.coli ccdB</i> Gen (Bernhard et al., 1994), das an <i>lacZα</i> gekoppelt ist	Invitrogen
pCR2.1 [®] -TOPO	Klonierung von PCR-Produkten erfolgt in <i>lacZα</i>	Invitrogen
pkkm16-5	Tn917 - Insertionsregion in M16	diese Arbeit
pkkm20kpn-10	5' Region von Tn917 in M20	diese Arbeit
pkkm20nsi-1	3' Region von Tn917 in M20	diese Arbeit
pTV1ts	temperatursensitives Plasmid aus <i>Enterococcus faecalis</i> , enthält Tn917	Shaw u. Clewell, 1985

2.4.2 Oligonukleotide und Sonden

Die im Folgenden aufgelisteten Oligonukleotide wurden als Primer zur Sequenzierung und zur PCR-Amplifikation sowie als Sonden für die RNA-Hybridisierung verwendet. An einige Oligonukleotide ist die Erkennungssequenz für die dort benannten Restriktionsenzyme angehängt. Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Tab. 2.3: Übersicht über verwendete Oligonukleotide und Sonden

Name	Sequenz 5' - 3'	Position
Plasmide: TopoXL, Topo TA 2.1		
M13.reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Invitrogen
M13.-20	GTA AAA CGA CGG CCA AG	
Transposon Tn917		nach Shaw, 1985 :
Tn917-5'	DNA-Fragmente, durch Restriktionsspaltung mit <i>AvaI</i> generiert	99-1819
Tn917-3'		3073-5343
5L	<u>GCTCGGATCC</u> CTC ACA ATA GAG AGA TGT CAC CG	177-199 / <i>BamHI</i> *
3R	<u>CACGTCGAC</u> GGC CTT GAA ACA TTG GTT TAG TGG	5277-5300 / <i>SalI</i>
kpn1	ACT ACT GAC AGC TTC CAA GGA GC	1523-1545
nsI	GTT CTT GTG AAT CAC GTG TCC C	3283-3304
M20k.11a	TCC TCG TAG GCG CTC GGG AC	97-116
<i>icaADBC</i> -operon		
icaC	GAA ATA GCC ATA CCA TTG TCC	
<i>S. epidermidis</i> M16		im Anhang:
M16.12	TGG TTG TTG CAC TTA CAG ATC	568-589
M16.22	CAG GAG AAT TTT ATA TCG ATG	960-982
M16.11c	TGC TCA TCA TAA TCA CCT TTC	268-289
M16.r1	GTG ATT ATG ATG AGC AAG TAT	274-294
M16.r4	TGA TGT GAT CTG TAA GTG CA	575-595
M16.r5	CAG AGT TGG ATG CAA TAT GT	765-784
glcT.for1	AAA TAA CGG CTT GAT ACA TAT C	102-124
glcT.for2	TTA TTT GGC ATT GAG ACT TG	37-57
glcT.rev1	TTA TTC ACT ACT AAT TTG AAC T	1109-1131
glcT.rev2	CTT ACC ACA AAT AAC AAT ACT C	1175-1197

Name	Sequenz 5'-3'	Position
<i>S. epidermidis</i> M20		im Anhang:
M20n.13a	TGA AAG ATG TTG TTG CCA T	844-863
M20n.23	TAT AAT ACC ACC AGC ACC TG	503-523
M20n.33	CAT AAC CAG TAA CAC GCA ATG	188-209
M20nr.1	GAT CCA ACT AAT GGA TAT GC	673-693
M20nr.2	ATT AGC AAT TGG GAC TGC GT	408-428
M20nr.3	AAT CAT TGC GTG TTA CTG GT	185-205
M20k.21a	ATT ACC AGC TGC AGC ATT GG	1123-1143
M20k.31	TAG TCA ACT GCC ATT CGA TG	1593-1613
M20k.41	GGT GAG ATA ATA CCG TTA TCT G	1930-1952
M20k.51	TAA AGG AAC ATG CTC CAA GT	2228-2248
M20kr.5	AAT ACG TTG GTC GCC TCT A	1074-1093
M20kr.6	AAC CAT CTA ATA CTG CAT G	1336-1355
M20kr.7	ATC GAA TGG CAG TTG ACT AG	1592-1612
M20kr.8	CAA TAT CTT CCA CAT GTA CAG	1880-1901
M20kr.9	CTG TAT CGA TAC CAA TGT GA	2115-2135
M20kr.10	ATC GCT TTA CCA GGA TCG AC	2314-2334
EII.for3	<u>GCTCGGATCCGC</u> ACG TAA ATA AGA AGA TAG AG	285-307 / <i>Bam</i> HI
EII.for4	<u>GCTCGGATCCGA</u> AGA TAG AGA GGA ATG AAT TG	297-319 / <i>Bam</i> HI
EII.rev1	<u>CACGTCGAC</u> TAA TAT ATC CTT GTC CCA GAC	2386- 2406 / <i>Sal</i> I
EII.rev2	<u>CACGTCGAC</u> CCA TTA AGT TAT TCT TAT AGG C	2351-2373 / <i>Sal</i> I

* unterstrichen sind die Erkennungssequenzen für die hinter den Positionen genannten Restriktionsenzyme

2.5 Puffer und Lösungen

Alle im Folgenden aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden für mehrere Methoden benötigt und sind hier in ihren Stammlösungen angegeben. Die für nur eine Methode benutzten Puffer und Lösungen sind jeweils unter den Methoden aufgelistet. Die Lösungen wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15 min Erhitzen bei 121°C in einem Sterilisationsautoklav sterilisiert.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 140 mM NaCl; 9 mM Na₂HPO₄; 2 mM KCl; 1 mM KH₂PO₄; pH 7,4

PBS_N: PBS + 0,05 % (w/v) NaN₃

5 x TBE-Puffer: 450 mM Tris-Borate; 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatrium-salz-Dihydrat (EDTA)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

Ethidium-Bromid Stammlösung: 10 mg/ml

Natriumacetat-Lösung: 3 M; pH 5,2

SDS: 20 % (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS) in H₂O dest.

20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0

2.6 Kulturmedien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Medien durch 15 min Erhitzen bei 121°C in einem Sterilisationsautoklav sterilisiert. Zur Verfestigung wurde, wenn nicht anders angegeben, 15 g Bacto-Agar (Difco 214010) pro Liter Medium hinzugegeben.

2.6.1 Blut-Agar

Columbia-Agar (Difco 13172433)	42,0	g/l
Bacto-Agar (Difco 214010)	1,0	g/l
Glucose	2,2	g/l
Schafsblut	72	ml/l
pH 7,0		

2.6.2 Einfriermedium

1,5 g Bacto-Peptone (Difco 211677) wurde in 100 ml H₂O dest. gelöst, autoklaviert und mit 30 ml autoklavierten Glycerin steril vereinigt.

2.6.3 Tryptone Soya Broth (TSB)

TSB_{BBL}

TSB (Becton Dickinson 4311443)	30	g/l
pH 7,3		

TSB ohne Glucose (TSB \emptyset)

Tryptone (Oxoid L42)	17,0	g/l
Soya Peptone (Oxoid L44)	3,0	g/l
NaCl	5,0	g/l
K ₂ HPO ₄	2,5	g/l
pH 7,3		

2.6.4 Peptone-Yeast Medium, modifiziert (PYØ)

Bacto-Peptide (Difco 211677)	10 g/l
Yeast-Extract (Difco 212750)	5 g/l
NaCl	5 g/l
pH 7,5; eingestellt mit NaOH-Lösung (5 M)	

2.6.5 Purple-Agar

Purple-Agar Base (Difco 0228-17-7)	31 g/l
pH 6,8	

2.6.6 Müller-Hinton-Medium

Müller-Hinton Broth (Difco 0252-17-6)	21 g/l
pH 7,3	

2.6.7 Luria-Bertani Medium (LB)

Tryptone (Difco 211705)	10 g/l
Yeast-Extract (Difco 212750)	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH 7,0	

2.6.8 SOC-Medium

Tryptone (Difco 211705)	20,0 g/l
Yeast-Extract (Difco 212750)	5,0 g/l
NaCl	0,6 g/l
KCl	0,5 g/l
H ₂ O dest.	970 ml
pH 7,0	

Mg ²⁺ Stammlösung (2M):	
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	203 g/l
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	247 g/l

Nach Autoklavieren und Abkühlen wurden 10 ml sterilfiltrierte Mg²⁺ Stammlösung und 20 ml sterilfiltrierte 1 M Glucose-Stammlösungen zu einem Endvolumen von 1 l dazugegeben. Das Medium wurde in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert.

2.6.9 Zucker

Einem Teil der oben beschriebenen Medien wurden zusätzlich folgende Zucker in unterschiedlichen Konzentrationen (prozentuale Angaben jeweils w/v) zugesetzt:

D(+) Glucose (Glc)
D(+) Glucosamin - hydrochlorid (GlcN)
N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc)
D(-) Fructose (Fru)

Zur Überprüfung der Induktion des mukoiden Phänotyps wurden folgende Zucker PYØ zugesetzt: Saccharose, Maltose, Galaktose, Laktose, Cellobiose, Xylose, Arabinose, Sorbitol und Mannose. Die Zuckerlösungen wurden frisch in 10 % (w/v) Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und unmittelbar vor Inokulation der Bakterien zu den flüssigen Medien zugesetzt. Den Medien, die mit Agar verfestigt wurden, wurden sie nach Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C zugegeben.

2.6.10 Aminosäuren

TSBØ wurden die Aminosäuren Glycin, Glutaminsäure, Alanin, Serin und Lysin zu einer Endkonzentration von 0,1 % (w/v) aus einer frisch angesetzten, sterilfiltrierten 10 % (w/v) Stammlösung zugegeben.

2.6.11 Antibiotika

Zur Selektion wurden LB-Medium unterschiedliche Antibiotika aus den unten beschriebenen Stammlösungen zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml Antibiotika im Medium zugegeben.

Antibiotika-Stammlösungen :

Ampicillin	50 mg/ml in 80 % (v/v) Ethanol, Aliquots gelagert -20°C
Chloramphenicol	50 mg/ml in 95 % (v/v) Ethanol, Aliquots gelagert 4°C
Erythromycin	50 mg/ml in 95 % (v/v) Ethanol, Aliquots gelagert 4°C
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O dest., Aliquots gelagert 4°C

Die Antibiotika wurden bei Sigma Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.7 Kultivierung der Bakterien

Die Stammhaltung der Bakterien erfolgte auf Blutagar-Platten, falls nötig mit selektivem Antibiotikum, wobei die Stämme ca. alle vier Wochen überimpft wurden. Als Dauerkonserve wurden sie in 500 µl Einfriermedium bei -80°C gelagert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in einem Brutschrank oder schüttelnd in einem Schüttelinkubator bei 100 upm. Wenn das Wachstum in Flüssigkulturen mittels der Optischen Dichte bei 578 nm

(OD₅₇₈) verfolgt wurde, erfolgte dies mit dem Photometer Eppendorf 1101 M (Hamburg). Die Ausbildung eines mukoiden Phänotyps wurde auf Agar-Platten nach Inkubation für 48 h beurteilt.

2.8 ID 32 Staph System zur Identifizierung von Staphylokokken

Das ID 32 Staph System (API, bioMérieux 32500) ist ein System zur Identifizierung von Staphylokokken anhand standardisierter biochemischer, colorimetrischer Tests. Es wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen und nach 24 h aerober Inkubation das Ergebnis abgelesen und mit Hilfe des Handbuchs ausgewertet.

2.9 Test zur Bestimmung der Biofilmbildung

Die Fähigkeit zur Biofilmbildung wurde mit Hilfe eines semiquantitativen Tests ermittelt (Christensen et al., 1985; Mack et al., 1992). Zur Vorkultur wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes in 2 ml des zu untersuchenden Mediums für 6 h schüttelnd inkubiert. Als Standardtestmedium wurde TSB_{BBL} verwendet. Mit einer Verdünnung von 1:100 wurde die aus dem gleichen Medium bestehende Hauptkultur angeimpft und davon viermal je 200 µl in eine 96-Loch Nunc-Zellkulturplatte (NunclonΔ, Nunc) gegeben. Diese wurde ca. 20 h ohne Schütteln bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde entfernt und die am Boden haftenden Zellen viermal mit 200 µl PBS gewaschen und anschließend ca. 4 h bei 37°C getrocknet. Dieser Biofilm wurde mit 150 µl Gentiana-Violett pro Loch 5 min gefärbt und anschließend überschüssiges Gentiana-Violett durch Spülen mit Leitungswasser entfernt. Die Absorption der angefärbten Zellen wurde im Spektralphotometer ELISA-Processor II (Behring) bei 570 nm (A₅₇₀) gegen eine Referenzwellenlänge von 405 nm gemessen.

Die Ergebnisse der 4 Parallelen wurden gemittelt. Stämme mit einer Absorption A₅₇₀ < 0,1 wurden als Biofilm-negativ betrachtet, mit A₅₇₀ < 1,0 als schwach biofilmbildend und mit A₅₇₀ > 1,0 als stark biofilmbildend.

2.10 PIA (Exopolysaccharid)-Präparation

2.10.1 Von Zellen von der Agarplatte

Um Verunreinigungen der Exopolysaccharide durch die im Medium enthaltenen Bestandteile zu vermeiden, wurden die Agarplatte aseptisch mit einer passgenauen, autoklavierten Dialysemembran (Serva) belegt. Die Stämme wurden auf Blutagarplatten kultiviert. Eine Kolonie wurde in 1 ml PBS resuspendiert und 500 µl davon wurden auf die mit Dialysemembran belegte Agarplatte gegeben. Diese wurden 48 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die mit den Zellen bewachsene Membran in eine sterile Kunststoff-Petrischale überführt, mit 5 ml PBS versetzt und die Zellen mit einem Zellschaber (Nunc) von der Membran geschabt.

Um vergleichbare Zellmengen zu erhalten, wurde die OD₅₇₈ in 5 ml PBS auf 2,5 eingestellt. Diese Zellsuspension wurde viermal 30 s mit 30 s Pause mit Ultraschall (Microtip, 70 % Amplitude; Branson Sonifier 250-D) behandelt. Die Zelltrümmer wurden anschließend 10 min bei 4332 x g abzentrifugiert und der Überstand für 1 h bei 16.000 x g gereinigt. Der verbleibende, überstehende PIA-Rohextrakt wurde für die Koagglutination (2.11) verwendet.

2.10.2 Von Zellen aus statischer Flüssigkultur

Es wurde eine Über-Nacht-Vorkultur in dem Medium mit Zuckerzusatz angesetzt. Aus dieser Vorkultur wurden mit einer 1:100 Verdünnung 10 ml des gleichen Mediums in einer Nunc-Zellkulturpetrischale (NunclonΔ, Nunc) angeimpft. Diese wurde gut vermischt und über Nacht ohne Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die am Boden haftenden Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in 5 ml PBS resuspendiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 2.10.1 beschrieben.

2.11 Koagglutinationstest zur PIA-Quantifizierung

Die Menge von PIA wurde in einem semiquantitativen Koagglutinationstest ermittelt (Mack et al., 1992). Hierbei macht man sich zu Nutze, dass sich auf der Oberfläche von *S. aureus* Cowan I das Protein A befindet. Dieses ist in der Lage, spezifisch mit dem Fc-Fragment von Immunglobulinen, vorwiegend IgG, nahezu aller Säugetiere zu reagieren (Novick, 1993). Es wurden hier die Antikörper des Kaninchenantisera, das gegen PIA gerichtet ist, an die Oberfläche von *S. aureus* Cowan I gebunden. Diese können nun mit

ihrem Fab-Fragment mit dem Antigen PIA reagieren, was zu einer Vielzahl von Vernetzungen führt, die durch Aggregationen der Zellen sichtbar werden (Kessler et al., 1975, 1981)

2.11.1 Präparation von *S. aureus* Cowan I

Zur Präparation wurden Zellen von *S. aureus* Cowan I einer 600 ml TSB Über-Nacht-Kultur 10 min bei 5155 x g geerntet und zweimal mit PBS_N gewaschen. Das Zellgewicht wurde bestimmt und die Bakterien in einer Konzentration von 10 % (w/v) in PBS_N + 1,5 % (v/v) Formaldehyd aufgenommen. Dieser Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur gemischt, die Zellen erneut 10 min bei 5155 x g abzentrifugiert, gewogen und in einer Konzentration von 10 % (w/v) in PBS_N aufgenommen. Der Ansatz wurde nun 5 min in einem 80°C Wasserbad geschwenkt und sofort in einem Eiswasserbad abgekühlt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen zweimal in PBS_N gewaschen, gewogen und in einer Konzentration von 10 % (w/v) in PBS_N aufgenommen. Abschließend wurden sie in 1 ml Aliquots aufgeteilt und bei – 80°C gelagert.

2.11.2 Herstellung des Koagglutinationsreagenz

Zur Herstellung des Koagglutinationsreagenz wurden die anti-PIA-Antikörper an der Oberfläche von *S. aureus* Cowan I fixiert. Die aufgetaute *S. aureus* Cowan I Präparation wurde dreimal mit 1 ml PBS_N gewaschen und anschließend in 900 µl davon aufgenommen. Dazu wurde 100 µl polyklonales anti-PIA-Kaninchenantiserum (385-2-4) gegeben. Das anti-PIA-Antiserum war gegen das gereinigte Polysaccharid I von PIA hergestellt worden (Mack et al., 2001). Der Ansatz wurde gemischt und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Zellen dreimal mit 1 ml PBS_N gewaschen und im letzten Schritt mit PBS_N auf 10 ml aufgefüllt.

2.11.3 Koagglutination

Zur Koagglutination wurde aus dem PIA-Rohextrakt (2.10) eine Verdünnungsreihe in PBS_N jeweils in 1:2 Schritten hergestellt. Ein Objektträger wurde mit drei Streifen von je 15 µl Koagglutinationsreagenz beschichtet. Dazu wurde 5 µl verdünnter PIA-Rohextrakt gegeben und mit der Pipettenspitze durch Rühren gut vermischt. Anschließend wurde der Objektträger 3 min geschwenkt und dann bei Licht gegen einen dunklen Hintergrund die Bildung von Aggregaten abgelesen. Es wurde die Verdünnungsstufe ermittelt, bei der

gerade noch eine Agglutination festzustellen war. Diese Verdünnungsstufe wurde reziprok als Titer angegeben.

Molekulargenetische Methoden

2.12 Präparation chromosomaler DNA aus *S. epidermidis*

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte, indem 2 ml einer Vorkultur aus PYØ - Medium mit 0,1 % Glucose und 1 % (w/v) Glycin mit einer Kolonie beimpft und ca. 6-8 h schüttelnd inkubiert wurden. Daraus wurde eine 100 ml Hauptkultur mit einer Verdünnung von 1:100 beimpft. Diese wurde über Nacht schüttelnd inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 6238 x g. Das Bakteriensediment wurde in 1 ml NaCl Puffer resuspendiert und die Bakterien durch Zugabe von 50 U Lysostaphin lysiert und freigesetzte RNA durch Zusatz von 1 µl RNase (Roche 109126) entfernt. Nach Inkubation dieses Ansatzes für 2-3 h bei 37°C erfolgte die Zugabe von 150 µl 10 % (w/v) SDS und 150 µl NaCl-Puffer. Die Lösungen wurden kräftig gemischt und unter mehrmaligem erneuten Mischen 30 min auf Eis belassen. Zelltrümmer wurden durch 5 min Zentrifugation bei 5000 x g abgetrennt, der Überstand mit 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) versetzt, durchmischt und 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation für 10 min bei 10.000 x g wurde eine Phasentrennung erreicht. Die obere Phase wurde entfernt und im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) versetzt, durchmischt und erneut 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde so oft wiederholt bis eine klare Interphase erreicht war. Nach erneuter Überführung des Überstands wurde dieser mit 1/10 Volumen Natriumacetat-Lösung versetzt und die DNA durch Zugabe von zwei Volumina absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Anschließend wurde die präzipitierte DNA 15 min bei 10.000 x g abzentrifugiert, das Sediment mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und abschließend in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

Die Quantifizierung der DNA erfolgte nach Cryer et al., (1975) bei 260/280 nm im GeneQuant-Spektralphotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit einer Verdünnung von 1:100.

NaCl-Puffer: 2,5 M NaCl; 50 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA; pH 7,0

2.13 Restriktionsanalyse von DNA

Chromosomale DNA der Mutanten und des Wildtyps wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Die zur Spaltung eingesetzten Restriktionsendonucleasen erkennen spezifische Doppelstrangsequenzen und katalysieren die Spaltung von den Phosphodiesterbindungen in der Erkennungssequenz.

In 20 µl Gesamtvolumen wurden gleiche Mengen chromosomaler DNA aus 2.12.1 eingesetzt und mit 1-20 U Enzym, seinem entsprechendem Puffer und H₂O dest. nach Angaben des Herstellers 4 h gespalten.

Um geeignete DNA-Fragmente der Mutanten M16 und M20 für die Klonierung zu finden, wurden folgende Restriktionsenzyme, die Tn917 nicht spalten, einfach und im Doppel-Ansatz mit *SalI* eingesetzt: *AatII*, *ApaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *MluI*, *NarI*, *NotI*, *PstI*, *PvuII*, *SacI*, *ScaI*, *SpeI* und *SphI*.

SalI spaltet Tn917 fast in der Mitte, wodurch es mit Einsatz der Sonden für das 3' und 5' Ende von Tn917 (Tn917-5', Tn917-3') in der Southern-Blot Hybridisierung möglich ist, festzustellen wie das Transposon im DNA Fragment liegt.

Die folgenden Enzyme, die Tn917 einmal spalten, wurden eingesetzt: *KpnI*, *NsiI*, *NcoI*, *SalI*, *XhoI*. Die Größe der jeweiligen Fragmente wurde durch Southern-Blot Hybridisierung mit den Tn917 spezifischen Sonden für das 3' und 5' Ende (Tn917-3', Tn917-5') bestimmt.

Zur Kontrolle von Klonierungen wurden ebenfalls Restriktionsanalysen vorgenommen. Hierzu wurde in einem 20 µl Ansatz 1-20 U Enzym, der entsprechende Puffer, aufgereinigte Plasmid DNA und H₂O dest. nach Angabe des Herstellers 2-3 h gespalten.

Die Enzyme wurden bei den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) und Roche (Mannheim) bezogen.

2.14 Agarosegel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund ihrer Ladung, Größe und Konformation in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 0,7-1,5 % (w/v) Agarosegele eingesetzt. Die hochreine Agarose (SeaKem[®] ME Agarose 50015; Biozym) wurde in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer aufgekocht, abgekühlt und mit 3,3 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Dies wurde in einen Gelträger gegossen und verfestigt. Der Gelträger wurde in die mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Gel-Elektrophoresekammer überführt. Die Proben wurden je nach Volumen

mit 2-5 µl Ladepuffer versetzt und in die Taschen gegeben. Ein Größenstandard, λ-DNA *Hind*III gespalten (Roche 236 250), wurde mitgeführt. Durch Anlegen einer Spannung von 20 bis 120 V wurde die zu analysierende DNA aufgetrennt. Das Gel wurde fotografiert oder mit der Gelauswerteapparatur (312 nm PHASE, Lübeck) dokumentiert.

Ladepuffer:

Bromphenolblau 0,25 % (w/v); Xylen Cyanol FF 0,25 % (w/v); Ficoll 15 % (w/v)

2.15 Extraktion von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen 28704) aus Agarosegelen extrahiert. Dabei wird das Agarosegel geschmolzen, die DNA Salz- und pH-Wert abhängig an die Silica-Matrix adsorbiert und Kontaminationen werden abgewaschen. Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.16 Southern-Blot Hybridisierung

Die durch Restriktionsspaltung und Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden zunächst aus dem Agarosegel auf eine Membran transferiert und anschließend mit einer spezifischen Sonde radioaktiv detektiert (Sambrook et al., 1989). Aufgrund der Lage des Fragments relativ zu einem Größenstandard konnte auf seine Größe geschlossen werden.

2.16.1 Southern-Blot

Zunächst wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente im Southern Blot mittels alkalischen Kapillartransfers auf einer Nylonmembran immobilisiert (Southern, 1975). Hierzu wurden zwei Puffertanks, die mit einer aufliegenden Glasplatte verbunden sind, mit 0,4 M NaOH gefüllt. Über vier Lagen Filterpapier (Machery-Nagel Type 713) wurden die Tanks mit einer Brücke verbunden. Darauf lagen weitere der Größe des Agarosegels entsprechende vier Lagen Filterpapier. Das von den Taschen befreite Gel wurde nun mit der Oberseite nach unten aufgelegt und mit der Nylonmembran (Zeta-Probe[®], Blotting Membran, Bio-Rad 162-0156) bedeckt. Weitere vier Lagen Filterpapier und ein Stapel Papierhandtücher wurden entsprechend der Gelgröße daraufgestapelt. Bei allen Lagen wurde darauf geachtet, dass sie luftblasenfrei aufgelegt wurden. Abschließend wurde eine Glasplatte aufgelegt und

diese mit ca. 500 g Gewicht beschwert. Die Puffertanks wurden mit Klarsichtfolie (Saran[®], DOW Chemikals) bedeckt und das Gel mit dieser umrandet. Der Transfer der DNA-Fragmente erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und dann bei 80°C in einem Ofen 1 h getrocknet.

2.16.2 Radioaktives *random-labeling* von DNA-Fragmenten

Zur Detektion von DNA-Fragmenten wurden mit dem „random-oligolabeling“ Verfahren (Feinberg und Vogelstein, 1983, 1984) spezifische, radioaktiv markierte Sonden hergestellt. Dabei wird bei der Zweitstrang-Synthese der DNA, die in 100 bis 200 bp Fragmenten erfolgt, radioaktiv markiertes dCTP eingebaut. Die Markierung erfolgte mit dem Ready-To-Go[®] DNA (-dCTP) Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech 27-9251-01).

Dazu wurden 25-50 ng der Sonden DNA und 5 ng λ -DNA *HindIII* gespaltener Größenstandard (Roche 236 250) auf 45 μ l mit H₂O dest. aufgefüllt und 10 min bei 95°C in einem Heizblock denaturiert. Dann wurde der Ansatz unmittelbar 2 min auf Eis gestellt und anschließend zu dem lyophilisierten Ready-To-Go[®] Mix gegeben. Nach Durchmischen und Zugabe von 5 μ l [α -³²P] dCTP (110 TBq/mmol; 370 kBq/ μ l) (Amersham Pharmacia Biotech AA 0065) wurden die DNA-Fragmente 10-15 min bei 37°C markiert. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden anschließend durch Zentrifugation für 3 min bei 11.000 x g über eine selbsthergestellte Sephadex[®] G-50-Säule (Sambrook et al., 1989; Anhang E) abgetrennt. Das Eluat konnte nun für die anschließende Hybridisierung verwendet werden.

2.16.3 Hybridisierung

Zur Detektion der gewünschten Fragmente wurde die Membran aus 2.16.1 mit den radioaktiv markierten Sonden aus 2.16.2 hybridisiert. In einem Kunststoffgefäß wurde die Membran 20 min in 50 ml Hybridisierlösung bei 65°C und leichtem Schwenken in einem Schüttelwasserbad (GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)) prä-hybridisiert. Währenddessen wurde die radioaktiv markierte Sonden-DNA 10 min bei 95°C denaturiert, dann 2 min auf Eis abgekühlt und anschließend dazu gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht ebenfalls bei 65°C unter leichtem Schwenken im Schüttelwasserbad statt. Nach Abgießen der Hybridisierlösung wurde die Membran zweimal 30 min in Waschlösung I und anschließend zweimal 30 min in Waschlösung II

gewaschen. Die noch feuchte Membran wurde in Kunststoffolie eingeschweißt und in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm X-Omat[®] AR (Kodak 150 1451) bei -80°C entsprechend der Signalstärke unterschiedlich lang exponiert. Mit Hilfe des mit hybridisierten DNA Größenstandards konnte anhand der Lage des detektierten Fragments dessen Größe bestimmt werden.

Hybridisierlösung:

1 mM EDTA; 0,16 M NaH_2PO_4 ; 0,34 M Na_2HPO_4 pH 7,2; 7 % (w/v) SDS

Waschlösung I:

1 mM EDTA; 12,6 mM NaH_2PO_4 ; 12,6 mM Na_2HPO_4 pH 7,2; 5 % (w/v) SDS

Waschlösung II:

1 mM EDTA; 12,6 mM NaH_2PO_4 ; 12,6 mM Na_2HPO_4 pH 7,2; 1 % (w/v) SDS

2.17 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Um eine ausreichende Menge reine Tn917-haltige DNA-Fragmente zu gewinnen, wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

Aus zwei sterilfiltrierten 10 % und 40 % (w/v) Saccharose-Stammlösungen und sterilem H_2O dest. wurden 10, 16, 22, 28, 34 und 40 % (w/v) konzentrierte Lösungen hergestellt. In klarsichtigen, oben offenen Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann Ultraclear Centrifuge Tubes 344 057) wurde der Gradient vorsichtig aufgeschichtet und 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C zur vollständigen Ausbildung stehen gelassen.

Es wurde in einem Restriktionsansatz (2.13) mit einem Gesamtvolumen von $400\ \mu\text{l}$ die chromosomale DNA des gewünschten Stammes mit dem entsprechendem Enzym über Nacht gespalten. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von $40\ \mu\text{l}$ Natriumacetat-Lösung und $800\ \mu\text{l}$ absolutem Ethanol ca. 2-4 h bei -20°C gefällt, 10 min bei $10.000 \times g$ abzentrifugiert, in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und dann in $300\ \mu\text{l}$ TE-Puffer aufgenommen. Auf drei aufgeschichteten Gradientenröhrchen wurden $100\ \mu\text{l}$ dieser Lösung vorsichtig aufgegeben. In der Ultrazentrifuge (Beckmann L5-50B, Rotor SW 50) wurden die DNA-Fragmente durch Zentrifugation 3,5 h bei $45.000\ \text{Upm}$ der Größe nach getrennt. Anschließend wurde mit einer Kanüle ein kleines Loch unten in die Röhrchen gestochen und der Gradient durch Auffangen gleicher heraustropfender Mengen fraktioniert. Die entsprechenden Fraktionen der 3 Gradienten wurden vereinigt, mit $1/10$ Volumen Natriumacetat-Lösung und 2 Volumina absolutem Ethanol über Nacht gefällt,

10 min bei 10.000 x g abzentrifugiert, in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 30 µl TE-Puffer resuspendiert. Von dieser Lösung wurden 10 µl in einem 0,8 % (w/v) Agarosegel analysiert, um festzustellen in welcher Fraktion sich das gewünschte Fragment befindet.

2.18 Autoligation von DNA-Fragmenten

Um das geeignete transposontragende Fragment zu amplifizieren und es anschließend zu klonieren, mussten die durch Restriktionsanalyse entstandenen überstehenden Enden zunächst durch Ligation verbunden werden. Dazu wurden unterschiedliche Verdünnungen der in Frage kommenden Fraktionen (2.17) in einem 20 µl Ligationsansatz mit dem zugehörigem Reaktionspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche 481 220) eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht.

2.19 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifikation von DNA Fragmenten (Saiki et al., 1985). Dabei dient die doppelsträngige DNA als *template*, zwei zu den Einzelsträngen komplementäre Oligonukleotid-Primer für das 3' und 5' Ende dienen der DNA Polymerase als Start. Durch abwechselnde Zyklen von Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer (Annealing) und Synthese des komplementären Stranges kommt es zur Vervielfältigung des vorliegenden Fragments.

Die Standard-PCRs wurden mit Hilfe des DyNAzymeTM DNA Polymerase Kits (Finnzyme F-550L) durchgeführt. In einem 50 µl Ansatz wurde ca. 25-100 ng *template*-DNA, Primer in einer Konzentration von 0,3 nM, Desoxynukleotide (dNTPs) mit je 200 µM und 2 U Polymerase eingesetzt. Es wurde der Optimized-DyNAzymeTM-Puffer benutzt. Der Ansatz wurde mit 30 µl Mineralöl überschichtet und die Amplifikation fand unter den im Folgenden genannten Bedingungen im Thermocycler (Perkin Elmer "Cetus") statt. Anschließend wurden die PCR-Produkte in einer Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Sollten die PCR-Produkte kloniert und sequenziert werden, wurde die ExpandTM High fidelity-Polymerase (Roche 1732641) mit Korrekturleseigenschaften benutzt. Die PCR wurde unter den oben beschriebenen Bedingungen, nur mit einer Synthesetemperatur von 68°C durchgeführt.

Bedingungen für den allgemeinen Amplifikationszyklus:

	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Denaturierung	92 / 94 ^a	2 min	1
Denaturierung	92 / 94	40 s	
Annealing	40-65 ^b	30 s	25-34 ^c
Synthese	72 / 68 ^a	30 s – 10 min ^d	
Endsynthese	72 / 68	7 min	1

^a Die Temperaturen richteten sich nach der verwendeten Polymerase.

^b Die Temperatur richtete sich nach der Schmelztemperatur der Primer

^c Die Zyklenzahl richtete sich nach der Menge des *templates*

^d Die Zeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA Fragments, in der Regel 1 min/kb

2.19.1 Inverse *long-range* PCR

Zur Amplifikation des unbekanntem Genbereichs um die Transposoninsertionsstelle diente als *template* das autoligierte, transposontragende Fragment. Die Primer waren so gewählt, dass die Synthese des Stranges aus dem Transposon in Richtung des unbekanntem Bereichs erfolgte. Da dieser Genbereich sehr groß war, wurde ein besonderer Polymerase-Mix gewählt. Die inverse *long-range* PCR wurden mit Hilfe des ExpandTM Long Template PCR Systems (Boehringer 1681 834) durchgeführt. Als *template* dienten die Ligationsansätze (2.18) in unterschiedlichen Verdünnungen, die in einem 50 µl Ansatz nach 10 min Inaktivierung der Ligase bei 65°C eingesetzt wurden. Es wurde Puffer 3 des Systems benutzt und die dNTPs in einer Konzentration von je 0,5 µM, Primer in einer Konzentration von je 0,3 nM und 2,5 U Polymerase eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers wurden zunächst auf Eis zwei Ansätze pipettiert. In einem wurden dNTPs, Primer und *template*, in dem anderen Puffer und Enzym gemischt. Diese wurden dann zusammengeführt und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Als Kontrolle wurde Plasmid DNA von Plasmid pTV1ts, welches das Transposon Tn917 enthält, mitgeführt.

Die Amplifikationsbedingungen waren wie oben beschrieben, denaturiert wurde bei 92°C. Zunächst wurden 10 Zyklen mit konstanter Syntheszeit durchgeführt, die anschließenden 15 Zyklen erfolgten jeweils mit 20 s Verlängerung je Zyklus.

2.19.2 Reverse Transkription (RT) – PCR

Die Reverse Transkription (RT)-PCR wurde hier eingesetzt, um zu überprüfen, ob bestimmte Genabschnitte als transkriptionelle Einheiten vorliegen. Als *template* diente hier DNA-freie RNA, die zunächst mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben werden musste.

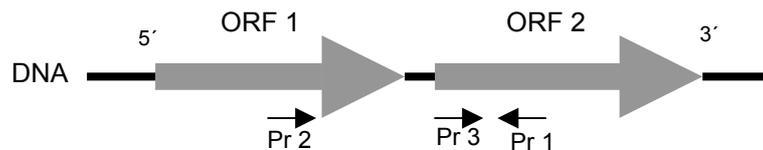


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Orientierung und Position der Primer (Pr) für eine RT-PCR. Mit dieser sollte getestet werden, ob die offenen Leserahmen 1 und 2 (ORF graue Pfeile) eine transkriptionelle Einheit bilden. Dargestellt anhand der Lage der ORFs der DNA, die der der mRNA entspricht.

Zunächst wurde ca. 3 µg/µl RNA (2.22) in einem 60 µl Ansatz mit 6 U RNase-freier DNase (RQ1, Promega) und dem entsprechendem Puffer 15 min bei 37°C von DNA befreit. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Zur Entfernung der DNase wurde der Ansatz mit 60 µl (Chloroform/ Isoamylalkohol; Bio101 6020-604) behandelt, die RNA anschließend mit 1/10 Volumen Natriumacetat-Lösung und 60 µl DIPS (DEPC-behandeltes Isopropanol, Bio101 6020-605) gefällt und gewaschen.

Es folgte die reverse Transkription in einem 20 µl Ansatz. Der Primer in einer Konzentration von 0,3 µM, entsprach Pr1 in Abb. 2.1. Es wurde der entsprechende Puffer und dNTPs in einer Konzentration von je 200 µM und 25 U MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase (Stratagene 600084) zugegeben, der Ansatz wurde 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde für 5 min bei 80°C die Reverse Transkriptase inaktiviert und der Ansatz schließlich 5 min auf Eis inkubiert. 10 µl dieses Ansatzes wurden anschließend in einer Standard-PCR (2.19) eingesetzt. Hierzu wurden die beiden Primer Pr1 und Pr2 verwendet (Abb. 2.1). Es wurde eine Kontrolle mit DNase behandelte RNA, die keiner reversen Transkription unterzogen worden war, mitgeführt. Weist dieser Ansatz ein PCR-Amplifikat auf, so ist dies ein Zeichen für eine Verunreinigung der RNA mit DNA. Ein weiterer Ansatz zur Kontrolle der reversen Transkription wurde mit Pr1 und Pr3, der noch innerhalb des ORF2 lokalisiert war, durchgeführt.

2.20 Klonierungen

Die Standard-PCR Produkte wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning[®] Kit in den Vektor pCR2.1[®]-TOPO ligiert (Invitrogen K4700 Vers. C). Die *long-range* PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TOPO[™] XL PCR Cloning Kits in den pCR[®]-XL.TOPO ligiert (Invitrogen K4500 Vers. H). Dabei hat der linearisierte Vektor jeweils einen 3' Thymidin Überhang. Mit Hilfe der Topoisomerase wird das PCR-Produkt, das durch die Polymerase einen *template*-unabhängigen 3' Adenosin Überhang hat, in den Vektor ligiert (Shuman, 1994). Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers vorgegangen und der ligierte Vektor anschließend in elektrokompente *E. coli* TOP 10 Zellen transformiert (2.20.1, 2.20.2).

2.20.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Um Bakterienzellen elektrisch transformieren zu können, muss die Bakterienzellsuspension völlig salzfrei sein.

Eine 10 ml Über-Nacht-Vorkultur aus LB-Medium mit *E. coli* TOP 10 wurde vollständig zu 250 ml LB-Medium gegeben und diese Hauptkultur schüttelnd ca. 2,5-3 h bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5-0,6 inkubiert. Die im Folgenden benutzten sterilen Gefäße, Lösungen und Zentrifugen waren alle vorgekühlt und die Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach Erreichen der OD₅₇₈ wurde die Kultur unmittelbar in einem Eiswasserbad 10-15 min abgekühlt und anschließend 20 min bei 5155 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 2,5 ml eiskaltem H₂O dest. gut resuspendiert und anschließend mit 250 ml H₂O dest. aufgefüllt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Das in der Restflüssigkeit resuspendierte Bakteriensediment wurde dann in ein 50 ml Kunststoffreaktionsgefäß überführt und mit 20 ml eiskaltem, autoklaviertem 10 % (v/v) Glycerin versetzt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4332 x g wurde das verbleibende Zellvolumen abgeschätzt und mit demselben Volumen 10 % (w/v) Glycerin aufgefüllt. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden sofort bei -80°C eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.20.2 Elektrotransformation

Bei der Elektrotransformation wird durch Anlegen einer Spannung kurzzeitig die Zellwand der Bakterien perforiert, so dass fremde DNA aufgenommen werden kann.

Die Elektrotransformationen erfolgten mit dem Elektroporator "Gene-Pulser II" (Bio-Rad, Hercules, California) und im wesentlichen nach den Vorgaben des Herstellers. Von dem

Klonierungsansatz (2.20) wurden 1 oder 2 μl auf ein Aliquot der elektrokompenten Zellen (2.20.1) gegeben, durch vorsichtiges Rühren mit der Spitze vermischt und luftblasenfrei in die Elektroporationsküvette (0,1 cm; Bio-Rad 166-2089) gegeben. Bei den folgenden Einstellungen: Widerstand 200 Ω = low range (high range: ∞), Kapazität: 25 μF , Spannung 2,25 kV wurden die *E. coli* TOP 10 Zellen bei Zeitkonstanten von 4 bis 5 ms transformiert. Unmittelbar danach wurde 500 μl vorgewärmtes SOC-Medium in die Küvetten gegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C in einem Reagenzglas schüttelnd inkubiert. Davon wurden je 10 μl , 50 μl und 100 μl auf LB-Agarplatten, die mit einem selektivem Antibiotikum beschickt waren, ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Klone enthalten das gewünschte Plasmid.

2.20.3 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Plasmid-Mini Präparation (Birnbaum und Doly, 1979)

Um Plasmide aus *E. coli* zu extrahieren, wurde 1,5 ml LB-Medium mit selektivem Antibiotikum mit einer Kolonie des Klons, der das Plasmid enthält, über Nacht schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden 10 min bei 10.000 x g abzentrifugiert und in 100 μl kalter Lösung I resuspendiert. Dazu wurde 200 μl Lösung II gegeben und fünfmal schnell invertiert. Dieser Ansatz wurde auf Eis gestellt und 150 μl Lösung III dazugegeben, gut durchgeschüttelt und 5 min dort belassen. Anschließend wurden die Zelltrümmer für 5 min bei 10.000 x g, 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und gut geschüttelt. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation für 2 min bei 10.000 x g bei 4°C wurde der Überstand mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und die Plasmid-DNA 2 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach der folgenden Zentrifugation für 5 min bei 6000 x g bei 4°C wurde das Sediment mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und abschließend in 40 μl TE-Puffer oder sterilem H₂O dest. resuspendiert. Dazu wurde 1 μl RNase (Roche 109 126) gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Kontrolle, ob das Plasmid das gewünschte Insert enthielt, wurden anschließend 2 μl dieser Lösung in einem 20 μl Ansatz einer Restriktionsanalyse (2.13) unterzogen.

Lösung I: 50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0

Lösung II: 0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS

Lösung III: 60 ml 5 M Kalium-Acetat; 11,5 ml Essigsäure 96 % (v/v); 28,5 ml H₂O dest.

Qiagen Mini-Präparation

Plasmid-Mini Präparationen wurden auch mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden 27106) durchgeführt. Das System beruht auf alkalischer Lyse der Bakterienzellen gefolgt von der Adsorption der DNA an eine Silica-Matrix in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. In fallender Salzreihe wurde die DNA anschließend eluiert. Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.21 Sequenzierung

Für die Sequenzierungen wurde das ABI Prism[®]dGTP BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City Calif., Nr. 44303152) verwendet. Das Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Als *template* wurden die Plasmide aus Tab. 2.2 verwendet, die Primer sind in Tab. 2.3 aufgelistet. Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, dann erfolgte eine Aufreinigung von überschüssigen Nukleotiden über Centri-Sep-Säulen (Princeton Separations, Adelphia) und anschließend wurde die Sequenz durch Kapillarelektrophorese im ABI Prism[®]S310 (PE Applied Biosystems) *Sequencer* ermittelt.

2.21.1 Sequenzanalytik

Die erhaltenden Sequenzen wurden mit Hilfe des HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) - Programm Pakets (EMBL, Heidelberg: www.genius.embnet.dkfz-heidelberg.de) oder des Programms VectorNTI (InforMax, Oxford, UK) bearbeitet und analysiert. Für Homologiesuchen wurden die Sequenzen mittels BLAST mit den internationalen Datenbanken des European Molecular Biology Laboratory (EMBL, www.embl.de), des National Centers for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) und The Institut for Genomic Research (TIGR, www.tigr.org) verglichen. Aus der TIGR-Datenbank wurde die zum Abschluß dieser Arbeit nahezu vollständige Sequenz von *S. epidermidis* RP62A bezogen.

Methoden zur Untersuchung der Genexpression

2.22 RNA-Extraktion aus *S. epidermidis*

Die RNA-Extraktion wurde mit Hilfe des FastRNA™ Kit, blue (Bio101 6020-600) durchgeführt (Dobinsky und Mack, 2001). Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C und auf Eis durchgeführt und alle benutzten sterilen Gefäße und Zentrifugen waren vorgekühlt.

Eine 10 ml Über-Nacht-Vorkultur aus PYØ ohne Zuckerzusatz wurde 1:40 verdünnt in eine 80 ml Hauptkultur von PYØ mit 0,4 % (w/v) des entsprechenden Zuckers gegeben. Diese wurde 3-4 h schüttelnd inkubiert und das Wachstum mittels der OD₅₇₈ verfolgt. Es musste eine OD₅₇₈ von mindestens 2,8 erreicht werden, um eine ausreichende Zellmenge zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 4332 x g abzentrifugiert und das Sediment in 10 ml PBS durch gründliches Resuspendieren gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation für 10 min bei 4332 x g wurde das Sediment über Nacht bei – 80°C gelagert oder sofort in 100 µl eiskalten H₂O (aqua ad injectabile, Braun AG, Melsungen) und 500 µl CRSR (Chaotropisches RNA stabilisierendes Reagenz; Bio 101 6020-602) sehr gut resuspendiert. Diese Lösung wurde in vorgekühlte mit 100 µl CIA (Chloroform/Isoamylalkohol; Bio101 6020-604) und 500 µl kaltem sauren Phenol, pH 4,5 (Amresco, Ohio 6981), gefüllte FastRNA™-Tubes (mit Silica-Keramik Perlen gefüllt, Bio101 6020-601) überführt. Der Zellaufschluss erfolgte im FastPrep™ cell disruptor (FP 120, Bio101, Savant instruments, Farmingdale, N.Y.) dreimal 20 s bei maximaler Geschwindigkeit. Sofort wurde der Ansatz 10 min auf Eis gestellt und anschließend die Zelltrümmer 15 min bei 16.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 µl DIPS (DEPC-behandeltes Isopropanol, Bio101 6020-605) und 50 µl Natriumacetat-Lösung versetzt und die RNA über Nacht bei –20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 16.000 x g wurde das Sediment mit 200 µl SEWS (RNAse freie Salz/Ethanol Waschlösung; Bio101 6020-606) gewaschen, SEWS anschließend abpipettiert und die RNA in 100-200 µl SAFE (DEPC behandeltes H₂O, Bio101 6020-607) gelöst. Mittels des GeneQuant-Spektralphotometers (Amersham Pharmacia Biotech) wurde die RNA-Menge quantifiziert. Aufgrund der großen Mengen Exopolysaccharid der Zellen wurde die RNA zusätzlich mit 20 µl LiCl-Lösung (12 M, Bio101 6020-611) pro 100 µl SAFE 1 h bei –20°C ein weiteres Mal gefällt, 15 min bei 16.000 x g abzentrifugiert, mit 200 µl SEWS gewaschen und abschließend in SAFE zu einer Endkonzentration von 2 µg/µl RNA aufgenommen. Nach nochmaliger Quantifizierung wurde die RNA in Aliquots von 10 µg aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

2.22.1 RNA Agarose-Formaldehydgel-Elektrophorese

Zur Kontrolle der RNA-Extraktion und für die anschließende Northern Blot Analyse wurde die RNA in einem Agarose-Formaldehydgel der Größe nach aufgetrennt.

Die Elektrophoresekammer mit Gelträger und Kamm wurde zunächst gründlich mit 1 M HCl, 1 M NaOH und dann mit 70 % (w/v) Ethanol gewaschen. Es wurde ein 0,9 % (w/v) Agarose-Formaldehydgel hergestellt, indem die Agarose in 1 x MOPS[®]-Laufpuffer und H₂O dest. gelöst, aufgeköcht und auf ca. 60°C abgekühlt wurde. Durch Zugabe von 16,6 ml Formaldehyd (37 % (v/v)) und 3,3 µl Ethidiumbromid-Lösung wurde ein Gesamtvolumen von 100 ml erreicht. Zu dem 10 µg RNA-Aliquot (2.22) wurde 10 µl Probenpuffer gegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 65°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2,5 µl Ladepuffer wurde das Gel beladen und die Gelelektrophorese in 1 x MOPS[®]-Laufpuffer über Nacht bei 20 V durchgeführt.

Das Gel wurde fotografisch mit Hilfe der Gelauswerteapparatur (312 nm PHASE, Lübeck) dokumentiert.

10 x MOPS[®]-Laufpuffer: 200 mM MOPS[®] (Morpholinpropansulfonsäure, Roth 6979.3), 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0

Probenpuffer: 100 µl Formamid; 33,3 µl Formaldehyd; 20 µl 10 x MOPS[®]; 20 µl H₂O dest.

Ladepuffer: 50 % (v/v) Glycerin; 0,4 % (w/v) Bromphenolblau; 0,2 % (w/v) Xylen-Cyanol

2.23 Northern Blot Hybridisierung

Die Untersuchung der Expression von Genen auf RNA-Ebene erfolgte mittels Northern Blot Analyse. Hierbei wird die RNA zunächst mittels Kapillartransfers auf eine Nylonmembran transferiert und die Gene anschließend mit Hilfe spezifischer radioaktiv markierter Sonden detektiert.

2.23.1 Northern Blot

Nach Auftrennung der RNA im Agarose-Formaldehydgel (2.22.1) wurde das Gel 30 min in 15 x SSC equilibriert. Anschließend wurde die RNA entsprechend des Southern-Blots (2.16.1), allerdings mit 15 x SSC, auf eine Nylonmembran (Zeta-Probe[®], Blotting Membran, Bio-Rad 162-0156) über Nacht bei Raumtemperatur transferiert. Die Membran wurde dann kurz in 2 x SSC gespült und für 1 h bei 80°C in einem Ofen getrocknet.

2.23.2 5'-terminale radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden mittels Polynucleotid-Kinase

Die Sonden zur Detektion der auf RNA-Ebene exprimierten Gene wurden 5'-terminal mittels der Polynucleotid-Kinase radioaktiv markiert (Sambrook et al., 1989). Dabei wird in einer Reaktion γ - ^{32}P von $[\gamma$ - $^{32}\text{P}]$ dATP auf die durch Dephosphorylierung des 5'-Endes entstandene Hydroxy-Gruppe übertragen. In der Austausch-Reaktion wird das nicht markierte Phosphat von der DNA auf ADP übertragen und die dephosphorylierte DNA mit ^{32}P rephosphoryliert.

Die Markierung wurde in einem Ansatzvolumen von 20 μl durchgeführt. Dazu wurden 20 pmol des entsprechenden Oligonukleotids mit H_2O dest., 10 U Polynucleotid-Kinase (Roche 174645), dem zugehörigem Reaktionspuffer und 5 μl $[\gamma$ - $^{32}\text{P}]$ dATP (110 TBq/mmol; 370 kBq/ μl) für 43 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit 2 μl Natriumacetat-Lösung und 70 μl eiskaltem absoluten Ethanol 4 h bei -20°C oder 1 h bei -80°C gefällt. Anschließend wurde 15 min bei 10.000 x g zentrifugiert, mit 200 μl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und dann in 100 μl H_2O dest. aufgenommen. Die Überprüfung der Markierung erfolgte durch Messung der Radioaktivitätsmenge im Szintillationszähler.

2.23.3 Hybridisierung

Die Membran wurde in 30 ml Hybridisierlösung 20 min bei 50°C im Schüttelwasserbad prähybridisiert. Zur Hybridisierung wurde 10 % (w/v) Dextransulfat (Roth 5956.1) und der vollständige Ansatz der markierten Sonde (2.23.2) zugegeben. Damit wurde die Membran über Nacht bei 50°C unter leichtem Schwenken im Schüttelwasserbad hybridisiert. Anschließend wurde die Membran einmal 30 min in Waschlösung I und zweimal 30 min in Waschlösung II gewaschen. Die noch feuchte Membran wurde in Kunststoffolie eingeschweißt und in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm X-Omat[®] AR (KODAK 1501451) bei -80°C unterschiedlich lang exponiert.

Hybridisierlösung: 5 x SSC; 7 % (w/v) SDS; 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0; 10 x Denhardts

50 x Denhardts: 1 % (w/v) Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech); 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone K90; 1 % (w/v) Rinderserumalbumin (Serva 11930)

Waschlösung I: 3 x SSC; 5 % (w/v) SDS; 20 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0; 10 x Denhardts

Waschlösung II: 1 x SSC; 1 % (w/v) SDS

2.24 Transportversuche mit radioaktiv markierten Zuckern

Um Defekte im Transportsystem der Bakterien nachzuweisen, wurden Transportversuche mit radioaktiv markierten Zuckern durchgeführt (modifiziert nach Fiegler et al., 1999). Es wurde die Aufnahme der markierten Moleküle in die Zelle innerhalb einer kurzen Zeitspanne ermittelt, um auszuschließen, dass die Zucker verstoffwechselt werden.

Eine 10 ml Über-Nacht-Vorkultur in PYØ ohne Zuckerzusatz wurde 1:40 in eine 80 ml Hauptkultur von PYØ mit 0,4 % (w/v) des entsprechenden Zuckers gegeben. Diese wurde 3-4 h schüttelnd inkubiert und das Wachstum mittels der OD₅₇₈ kontrolliert.

Alle im Folgenden benutzten sterilen Gefäße und Lösungen wurden vorgewärmt und die Zentrifugationsschritte bei 37°C durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 6 min bei 4332 x g geerntet und in 15 ml Transportpuffer (TP) durch Resuspension gründlich gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml TP aufgenommen, gründlich resuspendiert, mit TP auf eine OD₅₇₈ von 3,0 eingestellt und in drei Aliquots von je 1 ml aufgeteilt. Ein Aliquot wurde für die Proteinbestimmung (2.24.2) bei -20°C über Nacht eingefroren. Die anderen 2 Aliquots wurden in ein 30°C Wasserbad gestellt. Eine 10-fach Filtrationseinheit (Kunststoffbrett mit 10 Aussparungen von 27 mm Ø, Eigenbau) mit angeschlossener Vakuumpumpe (ABM) wurde mit 6 Celluloseacetat-Membranfiltern (0,45 µm Porengröße; 25 mm Ø; Schleicher & Schuell OE 64, 10404006) beschickt und mit TP gespült. Zu der Zellsuspension wurde nun radioaktiv markierter und unmarkierter Zucker zu einer Endkonzentration von 200 µM im Ansatz gegeben. Die Radioaktivität im Ansatz entsprach jeweils ca. 40 kBq. Unmittelbar nach Zugabe wurde sehr gut gemischt und sofort 150 µl Suspension als Nullwert entnommen. Durch Filtration wurden die Zellen auf dem Filter immobilisiert und die radioaktive Lösung abgewaschen. Unmittelbar nach Aufgabe der Zellen wurde mit 5 ml eiskaltem TP gewaschen. Im Abstand von 30 s wurden weitere 4 Proben von 150 µl und die letzte Probe im Abstand von 1 min entnommen und ebenso behandelt. Daran anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit je 5 ml eiskaltem TP gewaschen. Die Membranen wurden dann 1 h bei 80°C in einem Ofen getrocknet.

Um auszuschließen, dass die Zucker außen unspezifisch an den Zellen haften, wurden Kontrollen mit Zellen durchgeführt, die für 10 min bei 80°C durch Hitze inaktiviert wurden.

Transportpuffer (TP): 0,1 M MOPS[®] (Morpholinpropansulfonsäure, Roth 6979.3); 0,5 mM MgSO₄; 10 mM NaCl; pH 7,0 eingestellt mit 10 M NaOH

Verwendete radioaktiv markierte Zucker:

D-[1-¹⁴C] Glucose; 2,11 GBq/mmol; 7,4 MBq/ml
D-[1-¹⁴C] Glucosamin-Hydrochlorid; 1,85 GBq/mmol; 7,4 MBq/ml
N-Acetyl-D-[1-¹⁴C] Glucosamin; 1,85 GBq/mmol; 7,4 MBq/ml
D-[U-¹⁴C] Fructose; 11,7 GBq/mmol; 7,4 MBq/ml

Die radioaktiv markierten Zucker wurden bei Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

2.24.1 Flüssigkeitsszintillations - Zählung

Da ¹⁴C zu den beta-emittierenden radioaktiven Isotopen gehört und der Zerfall nicht direkt nachgewiesen werden kann, wurde mittels Flüssigkeitsszintillations-Zählung eine indirekte Nachweismethode angewandt. Dabei regt die Energie des Zerfalls andere organische Verbindungen zur Fluoreszenz an, und das emittierte Licht kann mittels Photoverstärker gemessen und in elektrische Impulse umgewandelt werden. Diese Impulse sind proportional zum radioaktiven Zerfall.

Die Membranfilter aus den Transportexperimenten (2.24) wurden in Kunststoff-Szintillationsgefäße (Packard) überführt und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Pico-Fluor 15; Packard 6013059) bedeckt. Durch kurzes Schütteln wurden die Zellen von der Membran gelöst und die Proben anschließend im Tri-Carb 460C Liquid Scintillation System Counter (Packard) im ¹⁴C-Spektrum vermessen.

Zur Bestimmung des Quenching wurden für alle Zucker Kalibriergeraden (0,93-5,6 kBq) unter denselben Bedingungen erstellt.

2.24.2 Proteinbestimmung

Als Bezugsgröße für die Aufnahme radioaktiv markierter Moleküle wurde die Proteinmenge im Ansatz nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Zum Zellaufschluss wurden zu 300 µl des auf eine OD₅₇₈ von 3,0 eingestellten Aliquots 15 U Lysostaphin (Serva) gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. In einem Dreifachansatz wurden davon je 50 µl zu 2,5 ml Farbreagenz Coomassie Brilliant Blue G250 (Bio-Rad Protein Assay 500-0006; 1:5 mit H₂O dest. verdünnt) gegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde mit einem Spektralphotometer

(Beckmann UV/VIS Spectrophotometer DU[®] 530) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des integrierten Proteinbestimmungsprogramms und einer mit Rinderserumalbumin (Serva 11930) erstellten Kalibriergerade (0,1-1 g/l).

Die Transportraten wurden angegeben in nmol Zucker pro Milligramm zelluläres Protein pro Minute.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den zunächst auf Purple-Agarplatten beobachteten mukoiden Phänotyp weiter zu untersuchen. Die mukoid-negativen Transposonmutanten M16 und M20 von *S. epidermidis* 1457 sollten näher charakterisiert werden und die durch die Tn917-Insertionen betroffenen Genorte sequenziert werden. Anhand von Northern-Blot-Analysen sollten die inaktivierten Gene und die Expression dieser Gene ermittelt werden. Durch geeignete Versuche sollte die aufgrund der Homologien vermuteten Funktionen bewiesen werden.

3.1 Phänotypische Charakterisierung der Mutanten

Auf Purple-Agarplatten, die mit 0,4 % GlcNAc supplementiert waren, war nach 48 bzw. 72 h ein mukoider Phänotyp beobachtet worden (Krokotsch, 1998; Nedelmann, 1997). Dieser Phänotyp ist gekennzeichnet durch einen sehr „schleimig“ erscheinenden Bakterienrasen, einzelne Kolonien sind nicht klar umrissen und benachbarte Kolonien verlaufen ineinander (Abb. 3.1 A). Ein mukoid-negativer Phänotyp dagegen ist gekennzeichnet durch einen trockenen, nicht schleimigen Bakterienrasen mit klar umgrenzten Kolonien (Abb. 3.1 B).

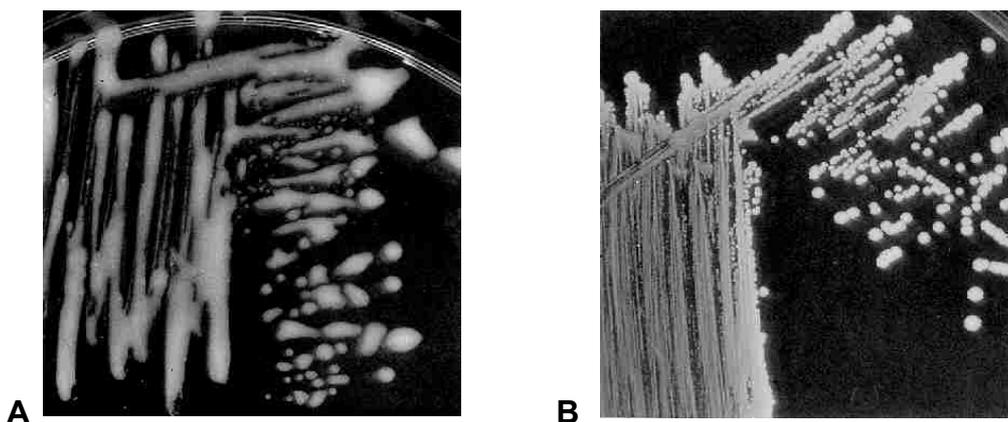


Abb. 3.1: **A** Mukoider Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 auf PYØ-Agar mit 0,4 % (w/v) Glucosamin **B** Mukoid-negativer Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 auf PYØ-Agar mit 0,4 % (w/v) Glucose

Die beiden Mutanten M16 und M20 zeigten auf Purple-Agar, supplementiert mit GlcNAc, einen mukoid-negativen Phänotyp (Nedelmann 1997). Es sollte nun zunächst festgestellt werden, durch welche Bedingungen ein mukoider Phänotyp induziert werden kann.

3.1.1 Induktion des mukoiden Phänotyps

3.1.1.1 Induktion durch verschiedene Medien

Zunächst wurden der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 und die Mutanten M16 und M20 auf Agarplatten verschiedener Medien, die mit 0,4 % GlcNAc supplementiert waren, auf Bildung eines mukoiden Phänotyps getestet (Tab. 3.1). Dabei wurde festgestellt, dass der Wildtyp neben Purple-Agar auch auf Müller-Hinton-Agar und PYØ-Agar einen mukoiden Phänotyp bildet. Auf TSBØ-Agar war kein mukoider Phänotyp zu beobachten. Die deutlichsten Unterschiede zwischen mukoidem und mukoid-negativem Phänotyp waren auf PYØ-Agar festzustellen und deshalb wurde im Folgenden PYØ als Basismedium verwendet.

Tab. 3.1: Bildung eines mukoiden Phänotyps von Wildtyp und Mutanten in Abhängigkeit vom Medium

Medien*	Wt 1457	M16	M20
Purple-Agar	+	-	-
PYØ	++	-	-
Müller-Hinton	+	-	-
TSBØ	-	-	-

(+) mukoid (-) mukoid-negativ

* Die Medien waren mit 0,4 % (w/v) GlcNAc supplementiert

3.1.1.2 Induktion durch unterschiedliche Zucker

Unterschiedliche Zucker wurden PYØ in Konzentrationen von 0,5 %, 1,0 % und 1,5 % (w/v) zugesetzt und die Bildung eines mukoiden Phänotyps von Wildtyp *S. epi-*

dermidis 1457 darauf getestet. Nur die beiden Aminozucker Glucosamin und GlcNAc können einen mukoiden Phänotyp induzieren (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Bildung eines mukoiden Phänotyps von *S. epidermidis* 1457 auf PYØ-Agarplatten in Abhängigkeit vom Zucker

Zucker	0,5 % (w/v)	1,0 % (w/v)	1,5 % (w/v)
Glucose	-	-	-
Glucosamin	+	+	W.g.
N-Acetyl-Glucosamin	+	+	+
Fructose	-	-	-
Saccharose	-	-	-
Maltose	-	-	-
Galaktose	-	-	-
Laktose	-	-	-
Cellobiose	-	-	-
Xylose	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Mannose	-	-	-

(+) mukoid; (-) mukoid-negativ;

(W.g.) Wachstum gehemmt - keine Kolonien in der zweiten und dritten Öse

Im Folgenden sollte die Konzentration der beiden Aminozucker ermittelt werden, bei welcher der mukoide Phänotyp am deutlichsten exprimiert wird. Bei einer Konzentration von 0,4 % (w/v) wurde mit beiden Aminozuckern ein vergleichbarer Phänotyp beobachtet (Tab. 3.3). Bei Glucosamin-Konzentrationen größer als 1,0 % (w/v) war das Wachstum der Bakterien auf der Agarplatte gehemmt. Es war nur noch der Rasen zu sehen, der teilweise nicht vollständig war. Kolonien in der zweiten und dritten Öse wurden nicht gebildet (siehe auch Abb. 3.3). Alle folgenden Experimente wurden nun mit Zuckerkonzentration von 0,4 % (w/v) durchgeführt.

Tab. 3.3: Bildung eines mukoiden Phänotyps von *S. epidermidis* 1457 auf PYØ-Agarplatten in Abhängigkeit von der Aminozuckerkonzentration

Konzentration	GlcN	GlcNAc
0,1 % (w/v)	+	-
0,4 % (w/v)	+	+
0,8 % (w/v)	++	+
1,2 % (w/v)	W.g.	+
1,6 % (w/v)	W.g.	+

(+) mukoid; (-) mukoid-negativ;
(W.g.) Wachstum gehemmt - keine Kolonien in der zweiten und dritten Öse

3.1.1.3 Induktion durch Aminosäuren

Da ein mukoider Phänotyp nur mit Aminozuckern und nur mit den Medien erzeugt werden konnte, die Pepton oder *Casamino-acids* beinhalten, wurde die genauere Zusammensetzung von Bacto-Peptone bei der Firma Difco angefordert. Bacto-Peptone ist enzymatisch verdautes Protein, das einen dementsprechend hohen Anteil frei verfügbarer Aminosäuren hat. Die Hauptbestandteile sind Glutaminsäure (ca. 10 % (w/v)) und Glycin (ca. 15 % (w/v)). Dies ließ vermuten, dass die Aminogruppe einen entscheidenden Einfluß auf die Bildung des mukoiden Phänotyps haben könnte.

Tab. 3.4: Bildung eines mukoiden Phänotyps von *S. epidermidis* 1457 auf TSBØ-Agarplatten in Abhängigkeit von Aminosäure und Zuckerzusatz

Aminosäure*	Glc**	GlcN	GlcNAc
Glycin	-	+	-
Glutaminsäure	-	+	-
Alanin	-	++	-
Serin	-	+	-
Lysin	-	++	-

(+) mukoid; (-) mukoid-negativ;
*Aminosäuren 0,1 % (w/v) und **Zucker 0,4 % (w/v)

Es wurden TSBØ-Agarplatten, die keinen mukoiden Phänotyp induzieren, mit 0,1 % (w/v) verschiedener Aminosäuren und 0,4 % (w/v) Glucose, bzw. Glucosamin oder GlcNAc versetzt. Die Bildung eines mukoiden Phänotyps wurde getestet.

Bei Zusatz von jeder der getesteten Aminosäuren und 0,4 % (w/v) Glucosamin konnte ein mukoider Phänotyp induziert werden (Tab. 3.4). Allerdings wurden bei allen diesen Ansätzen keine Kolonien in der zweiten und dritten Öse, ähnlich den Glucosamin-Konzentrationen von über 1,0 % (w/v), beobachtet. Einen extrem mukoiden Phänotyp wies *S. epidermidis* 1457 auf TSBØ-Agarplatten auf, die mit Glucosamin und Alanin oder Lysin supplementiert worden waren (Abb. 3.3). In der zweiten und dritten Öse erschien auch hier das Wachstum gehemmt, denn es waren keine Kolonien zu erkennen.

Mit Glucose und GlcNAc konnte auf TSBØ-Agar auch mit zusätzlicher Aminosäure kein mukoider Phänotyp induziert werden.

3.1.1.4 Korrelation des mukoiden Phänotyps mit dem *ica* - Genort

Die isolierten Biofilm-negativen Transposonmutanten von *S. epidermidis* 1457 der Klasse I wiesen einen mukoid-negativen Phänotyp auf (Nedelmann, 1997). Es zeigte sich, dass diese Mutanten, wie auch die in dieser Arbeit als Kontrollmutante mitgeführte Mutante 1457-M11, eine Transposoninsertion in dem für die PIA-Bildung verantwortlichen Genort *icaADBC* haben (Mack et al., 2000a). Aus diesem Grund wurden unterschiedliche *S. epidermidis* Stämme auf ihre Fähigkeit zur Ausbildung eines mukoiden Phänotyps untersucht und mit dem Vorhandensein eines intakten *icaADBC* Genorts korreliert. Der Nachweis des *icaADBC* Genortes erfolgte durch PCR von *icaB* (Mack et al., 2001). Aus Tabelle 3.5 ist ersichtlich, dass nur die Stämme einen mukoiden Phänotyp exprimieren können, die einen intakten *icaADBC* Genort haben.

Tab. 3.5: Korrelation von *icaADBC* Genort und der Fähigkeit zur Ausbildung eines mukoiden Phänotyps unterschiedlicher *S. epidermidis* Stämme auf PYØ-Agarplatten

Stamm	<i>icaADBC</i> *	mukoid	
		GlcN**	GlcNAc
1457	+	+	+
1457-M11	- ^a	-	-
RP62A	+	++	++
SE5	+	++	++
8400	+	+	++
9142	+	+	-
1815	+	+	+
1535	+	+	+
1057	+	+	+
939	+	+	+
521	+	-	-
5179	+	-	-
7837	+	-	-
9225	-	-	-
9896	-	-	-
10331	-	-	-
6	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
26	-	-	-
29	-	-	-
31	-	-	-
32	-	-	-

* Nachweis per PCR von *icaB*: (+) PCR-Amplifikat, (-) kein PCR-Amplifikat

^a *icaADBC* durch Transposoninsertion inaktiviert

** Zucker 0,4 % (w/v): (+) mukoid, (-) mukoid-negativ

3.1.1.5 Zusammenfassung der relevanten Bedingungen und Eigenschaften der Stämme für alle folgenden Experimente

Es wurde gezeigt, dass ein mukoider Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 am besten auf PYØ mit 0,4 % (w/v) Glucosamin oder GlcNAc exprimiert wird. Auf PYØ mit Glucose oder Fructose wurde kein mukoider Phänotyp exprimiert. In den folgenden Experimenten wurde, wenn nicht anders angegeben, dieses Medium und die angegebenen Zucker in einer Konzentration von 0,4 % (w/v) verwendet.

Die beiden Transposonmutanten M16 und M20 von *S. epidermidis* 1457 wurden nun unter den ermittelten Bedingungen getestet. Die Mutanten M16 und M20 sind auf PYØ-Agarplatten mit 0,4 % (w/v) GlcNAc mukoid-negativ (Tab. 3.6, Abb. 3.2). Dies war auch von Nedelmann auf Purple-Agarplatten festgestellt worden (Nedelmann, 1997). Allerdings sind beide Mutanten auf PYØ-Agarplatten mit 0,4 % (w/v) Glucosamin wie der Wildtyp weiterhin mukoid (Tab. 3.6, Abb. 3.2). Die Mutante 1457-M11, bei welcher der *icaADBC* Genort inaktiviert ist und die keinen mukoiden Phänotyp ausbilden kann, diente in den folgenden Experimenten als mukoid-negative Kontrolltransposonmutante.

Tab. 3.6: Zusammenfassung der verwendeten Stämme und ihrer Eigenschaften unter den im Folgenden relevanten Bedingungen

Stamm	<i>icaADBC</i> funktionell	Glc*	GlcN	GlcNAc	Fru
1457	ja	-	+	+	-
M16	ja	-	+	-	-
M20	ja	-	+	-	-
1457-M11	inaktiviert	-	-	-	-

(+) mukoid; (-) mukoid-negativ;

* Die Zucker 0,4 % (w/v) wurden PYØ-Agarplatten zugesetzt.

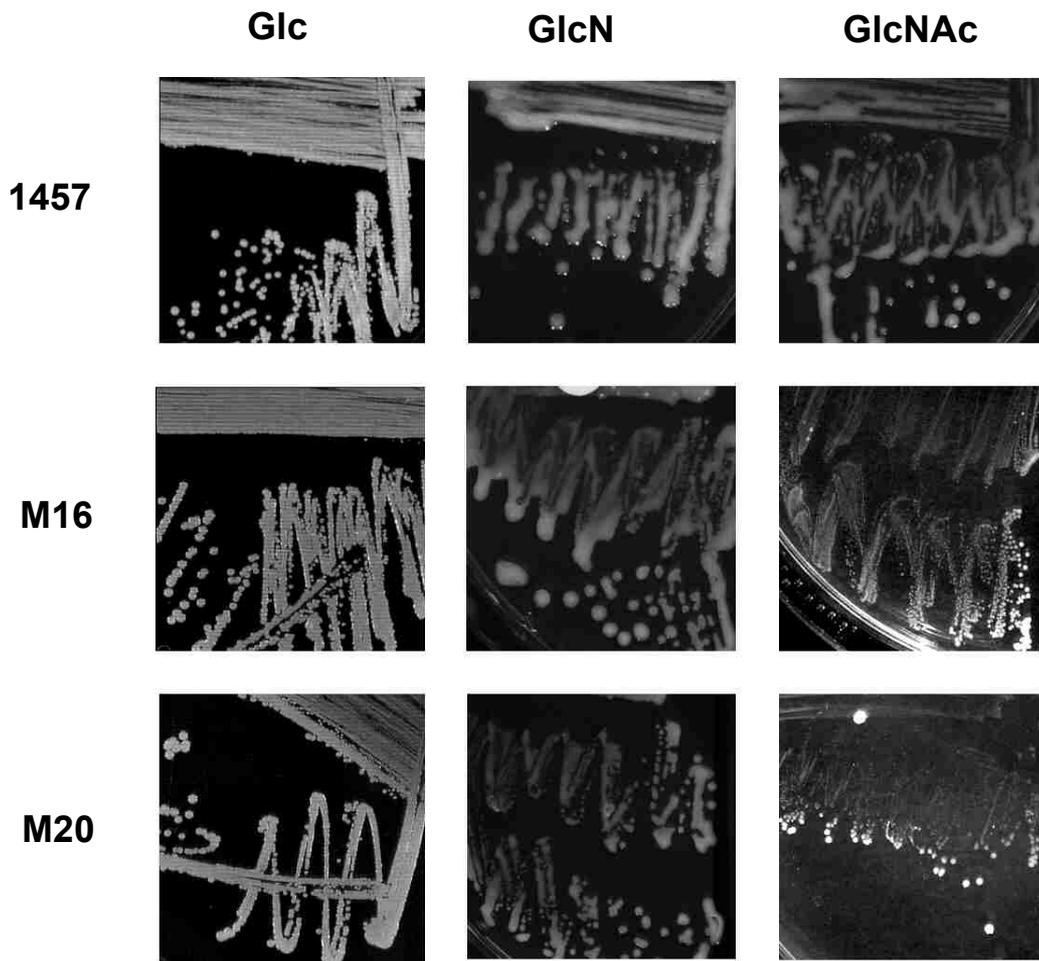


Abb. 3.2: Mukoide und mukoid-negative Zellen von *S. epidermidis* 1457 und den Mutanten M16 und M20. Abgebildet sind Ausschnitte von PYØ-Agarplatten, die mit je 0,4 % (w/v) der angegebenen Zucker supplementiert waren.

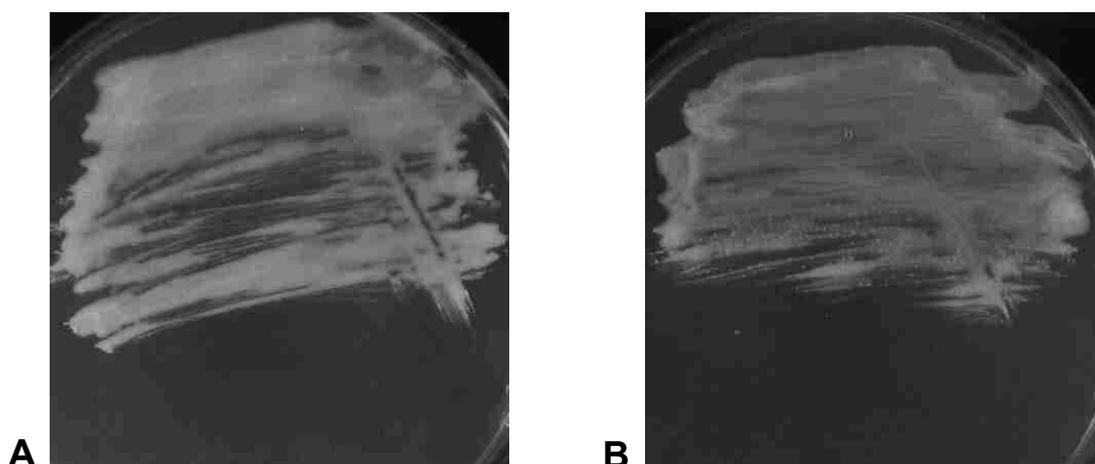


Abb. 3.3: Extrem mukoide Zellen von *S. epidermidis* 1457. Auf TSBØ-Agar, supplementiert mit 0,4 % (w/v) Glucosamin und 0,1 % (w/v) Alanin (**A**) bzw. Lysin (**B**). Das Wachstum scheint gehemmt, da in der zweiten und dritten Öse keine Kolonien zu sehen sind.

3.1.2 Biofilmbildung unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren

S. epidermidis 1457 und die Mutanten M16 und M20 wurden in 96-Loch Nunc-Zellkulturplatten in einem semiquantitativen Test mit dem Medium und den Zuckern, die den mukoiden Phänotyp induzieren, auf ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung getestet. Dieses wurde verglichen mit dem Standardtestmedium für den Biofilmtest TSB_{BBL} (Tab. 3.7).

Mit GlcNAc, wenn die Mutanten M16 und M20 keinen mukoiden Phänotyp exprimierten, bildeten sie eine deutlich geringere Biofilmmenge als der Wildtyp. Mit Glucosamin, wenn sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten einen mukoiden Phänotyp exprimierten, bildeten alle Stämme die gleiche Biofilmmenge. Auch mit Glucose, die keinen mukoiden Phänotyp induziert, bildeten alle Stämme ungefähr gleiche Mengen an Biofilm. Die Biofilmmenge, die für *S. epidermidis* 1457 mit Glucose ermittelt wurde, ist insgesamt geringer als die Mengen, die mit Glucosamin und GlcNAc gemessen wurden. Unter den Standardbedingungen für den Biofilmtest mit TSB_{BBL} zeigten der Wildtyp und die Mutanten M16 und M20 keine Unterschiede und bildeten einen starken Biofilm mit $A_{570} \geq 2.5$. Keiner der Stämme bildete Biofilm mit PYØ ohne Zuckerzusatz. Mutante 1457-M11 mit inaktivierten *icaADBC* Genort ist nicht in der Lage einen Biofilm zu bilden.

Tab. 3.7: Biofilmbildung unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren, verglichen mit Standardtestbedingungen

Stamm	TSB _{BBL} Biofilm*	PYØ + Glc**		PYØ + GlcN		PYØ + GlcNAc	
		mukoid	Biofilm	mukoid	Biofilm	mukoid	Biofilm
1457	2,5	-	1,27	+	1,58	+	1,65
M16	2,5	-	1,27	+	1,56	-	0,88
M20	2,5	-	1,15	+	1,64	-	0,79
1457-M11	0,04	-	0,05	-	0,17	-	0,05

* Die Biofilmbildung ist angegeben als A_{570}

** Zucker: 0,4 % (w/v): (+) mukoid, (-) mukoid-negativ

3.1.3 Quantifizierung von PIA unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren

Es hatte sich gezeigt, dass nur die Stämme einen mukoiden Phänotyp exprimierten, die einen intakten *icaADBC* Genort haben. Da die Enzyme dieses Genortes verantwortlich für die Synthese des Exopolysaccharids PIA sind, wurde die PIA-Menge unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren, quantifiziert. Für die Korrelation der PIA-Menge mit dem mukoiden Phänotyp wurde PIA von mukoiden Bakterienzellen von den Agarplatten gewonnen. Um die PIA-Menge mit dem Biofilmtest vergleichen zu können, wurde PIA aus biofilmbildenden Bakterienzellen gewonnen, die in statischer Flüssigkultur am Boden von Nunc-Zellkulturpetrischalen gewachsen waren. Dieses entsprach den Testbedingungen in den 96-Loch Nunc-Zellkulturplatten. Die PIA-Menge wurde in einem semiquantitativen Koagglutinationstest mit einem anti-PIA-Antiserum ermittelt.

3.1.3.1 PIA-Menge der Zellen von der Agarplatte

Auf PYØ-Agarplatten mit Glucosamin oder GlcNAc exprimierten alle Stämme signifikant mehr PIA, wenn sie einen mukoiden Phänotyp zeigten. Mit Glucose, wenn kein mukoider Phänotyp exprimiert wird, wurde am wenigsten PIA produziert (Abb. 3.4). Der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 bildete mit Glucosamin am meisten PIA und zwar 128-mal (7 Titerstufen) mehr als mit Glucose. Mit GlcNAc bildete er 64-mal (6 Titerstufen) mehr PIA als mit Glucose.

Die beiden Mutanten M16 und M20 exprimierten mit GlcNAc, wenn sie mukoid-negativ waren, signifikant weniger PIA als der Wildtyp und zwar 32- (5 Titerstufen) bzw. 16-mal (4 Titerstufen) weniger. Mit Glucosamin, wenn sie wie der Wildtyp auch mukoid waren, produzierten sie zwar 2 Titerstufen weniger PIA als der Wildtyp, allerdings immer noch 32-mal mehr PIA als mit Glucose. Die beiden Mutanten exprimierten mit Glucose dieselbe Menge PIA wie der Wildtyp. Die Kontrollmutante 1457-M11 produzierte keine nachweisbaren Mengen an PIA.

Erstaunlicherweise korreliert der mukoider Phänotyp auf den mit Glucosamin und GlcNAc supplementierten Agarplatten mit der Bildung sehr großer Mengen von PIA, einem schon bekannten Faktor der Glykokalyx von *S. epidermidis*.

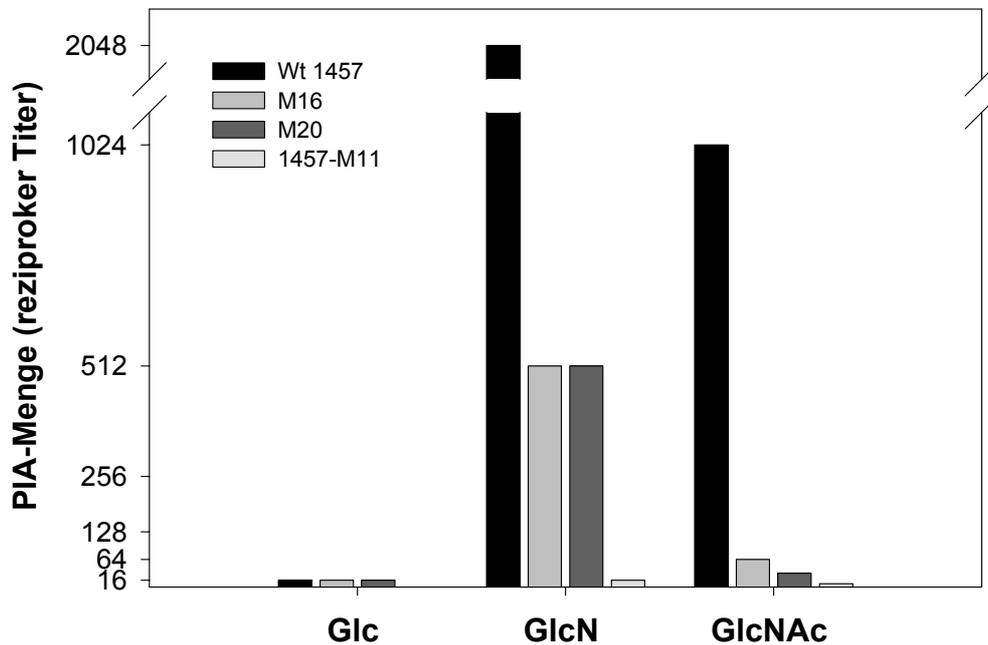


Abb. 3.4: PIA-Menge von *S. epidermidis* 1457, M16, M20 und 1457-M11 von Agarplatten in Abhängigkeit vom Zucker. Die PIA-Menge wurde im Koagglutinationstest ermittelt und ist angegeben als reziproker Titer. Zellen wurden von PYØ-Agarplatten gewonnen, die mit 0,4 % (w/v) der angegebenen Zucker supplementiert waren.

3.1.3.2 PIA-Menge der Zellen aus statischer Flüssigkultur

Auch unter Biofilmttestbedingungen in statischer Flüssigkultur in der Zellkulturschale bildeten die Zellen mit dem Medium und den Zuckern, die auf Agarplatten den mukoiden Phänotyp induzierten, signifikant mehr PIA als unter nicht induzierenden Bedingungen (Abb. 3.5). Mit PYØ supplementiert mit Glucosamin exprimierte der Wildtyp 8-mal mehr PIA als mit Glucose. Mit GlcNAc bildete er 4-mal mehr PIA als mit Glucose.

Die Mutanten M16 und M20 produzierten 2- bzw. 4-mal weniger PIA als der Wildtyp mit GlcNAc, wenn sie mukoid-negativ sind und eine verminderte Biofilmbildung zeigten. Die Mutanten und der Wildtyp bildeten gleiche Mengen PIA und Biofilm mit Glucose und mit Glucosamin.

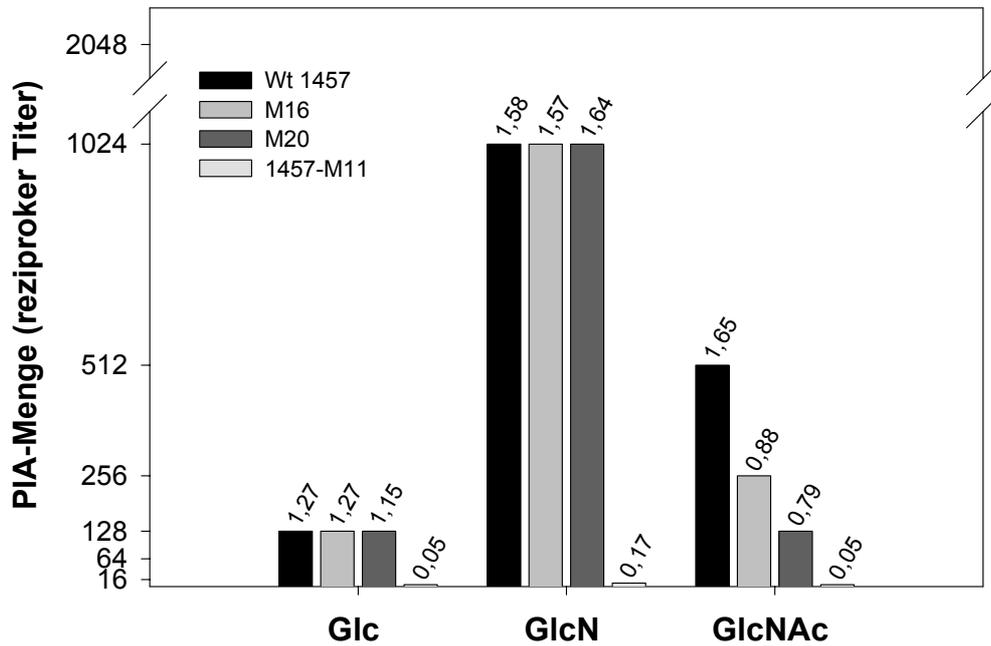


Abb. 3.5: PIA-Menge von *S. epidermidis* 1457, M16, M20 und 1457-M11 aus statischer Flüssigkultur in Abhängigkeit vom Zucker. Die PIA-Menge wurde im Koagglutinationstest ermittelt und ist angegeben als reziproker Titer. Bakterienzellen wurden in Zellkulturschalen mit PYØ-Medium kultiviert, das mit 0,4 % (w/v) der angegebenen Zucker supplementiert war. Die Zahlen über den Balken geben die Biofilmmengen unter den entsprechenden Bedingungen in A_{570} an (aus Tab. 3.7).

Das bedeutet, dass auch im flüssigen Medium unter den Bedingungen, die auf den Agarplatten einen mukoiden Phänotyp induzieren, eine sehr große Menge PIA gebildet wird. Die beiden Aminozucker Glucosamin und GlcNAc begünstigen die Bildung von PIA.

3.2 Genotypische Charakterisierung der Mutanten

Um den genetischen Hintergrund für die phänotypischen Beobachtungen zu ermitteln, wurde die Region um die Insertionsstelle des Transposons kloniert und sequenziert.

Es war gezeigt worden, dass die Tn917-Insertionsstellen in den Mutanten M16 und M20 auf zwei unterschiedlich großen (M16: 23,8 kb; M20: 10,9 kb), nicht miteinander verbundenen *Bgl*III Fragmenten liegen (Rohde 2001). Eine Analyse durch Pulsfeldgelelektrophorese hatte ergeben, dass die beiden Transposon-Insertionsorte auch auf zwei voneinander unabhängigen *Sma*I Fragmenten liegen (Rohde 2001). Daher befinden sich die Transposoninsertionen auf zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Genorten. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Transposoninsertionsstellen an von *icaADBC* unabhängigen Genorten liegen (Rohde 2001).

Zunächst musste mittels Restriktionsanalyse ein ausreichend großes, das Transposon beinhaltende Fragment gefunden werden, um alle eventuell betroffenen Gene zu erfassen. Dieses Fragment wurde autoligiert, mit Primern aus dem Transposon heraus amplifiziert und anschließend in den pCR[®]-XL.TOPO Vektor kloniert, in dem es sequenziert wurde. Mit der ermittelten Sequenz wurden Homologiesuchen vorgenommen, um aufgrund der Homologie zu bekannten Genen auf ihre mögliche funktionelle Bedeutung zu schließen.

3.2.1 Klonierungsstrategien

Aufgrund der Restriktionsanalyse ergaben sich zwei unterschiedliche Klonierungsstrategien für die beiden Mutanten M16 und M20 (Abb. 3.6 und Abb. 3.7).

Für die Mutante M16 wurde durch Restriktionsspaltung mit *Mlu*I ein Enzym gefunden, welches das Transposon nicht spaltet und ein 9,2 kb großes Fragment ergab. Der Doppelansatz mit *Sal*I, welches das Transposon ungefähr in der Mitte spaltet, ergab, dass dieses Fragment beidseitig vom Transposon genügend groß ist, jeweils etwa 2,0 kb (Abb. 3.6).

Ein vergleichbares Fragment konnte für die Mutante M20 nicht gefunden werden. Deshalb wurden hier die Restriktionsenzyme *Kpn*I und *Nsi*I verwendet, die das Transposon spalten. Mit dem resultierenden 5,4 kb (3,9 kb ohne Tn917) großen *Kpn*I-Fragment wurde die Region 5'-aufwärts vom Transposon und mit dem 6,5 kb (4,3 kb ohne Tn917) großen *Nsi*I-Fragment die Region 3'-abwärts vom Transposon erfasst (Abb. 3.7). Die Fragmente

wurden amplifiziert und kloniert. Die resultierenden Plasmide pkkm16-5, pkkm20kpn-10 und pkkm20nsi-1 wurden anschließend sequenziert.

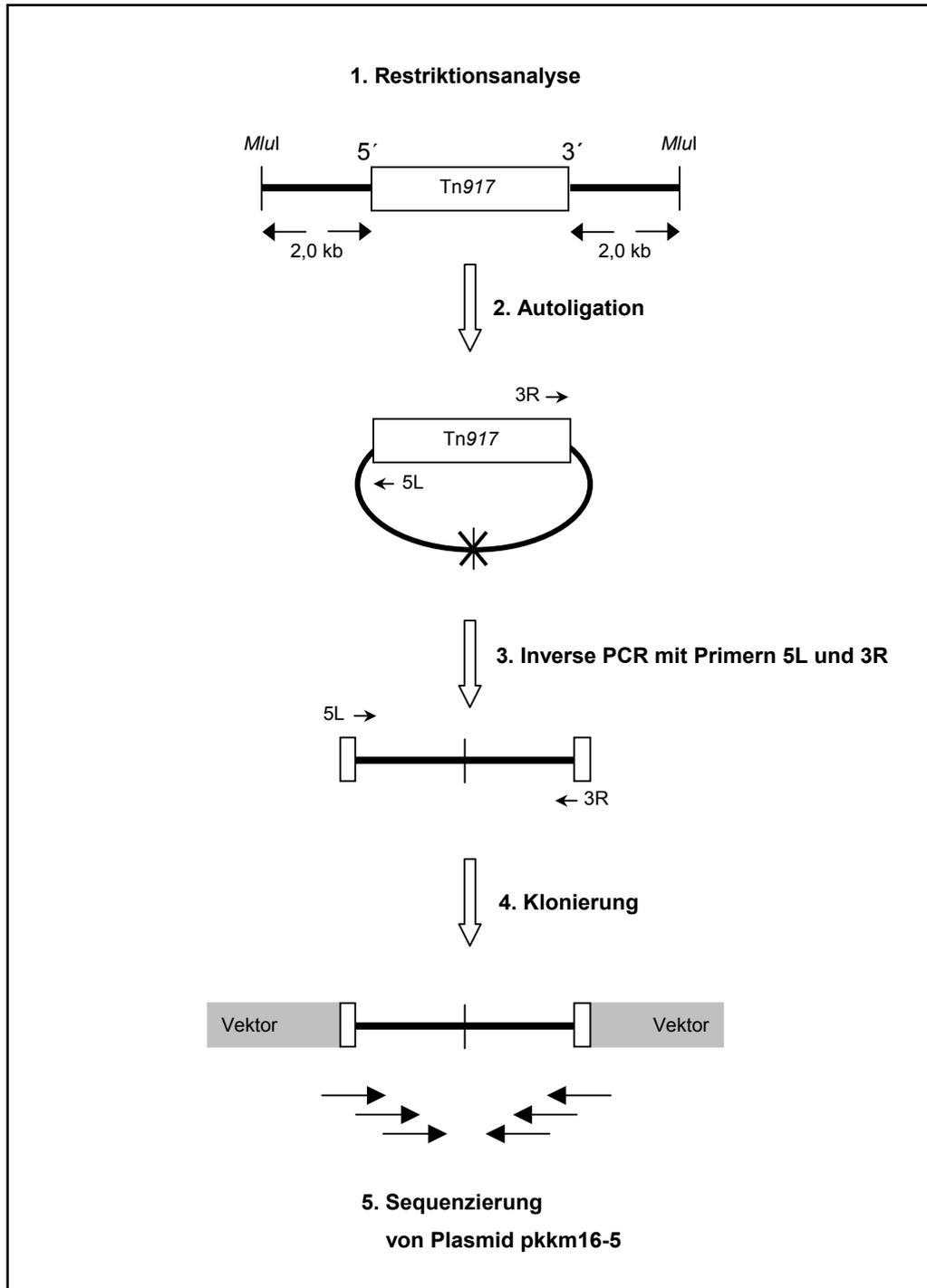


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Transposoninsertionsstelle in der Mutante M16

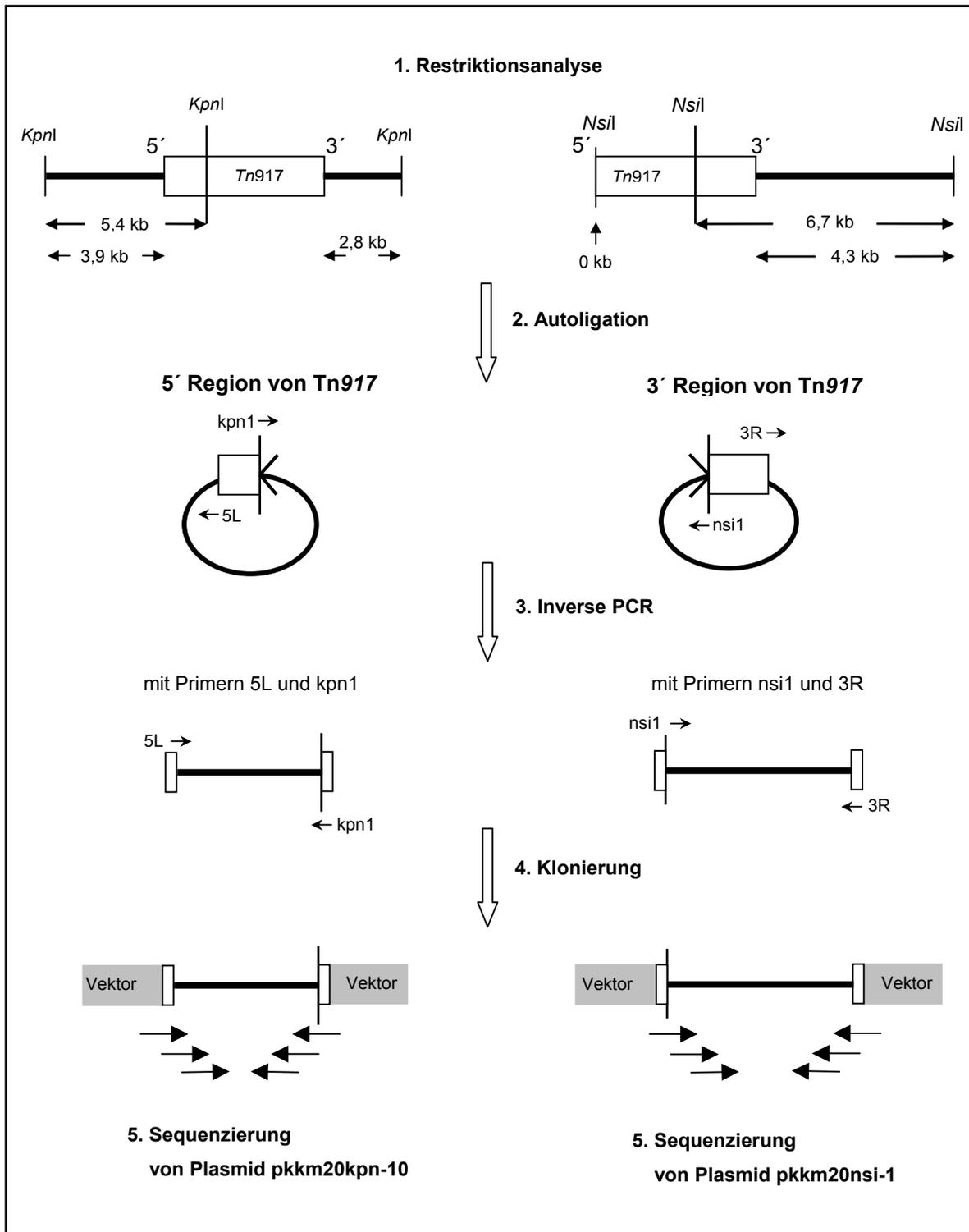


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die Transposon-insertionsstelle in der Mutante M20

Um zu kontrollieren, dass die klonierten Fragmente aus den Mutanten den richtigen Abschnitten im Wildtyp und den Mutanten entsprechen, wurde chromosomale DNA aus *S. epidermidis* 1457 und den Mutanten M16 und M20 mit dem für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzym gespalten. Dies wurde zusammen mit dem Produkt aus der Inversen PCR auf ein Gel aufgetragen und geblottet. Als Sonde wurde das jeweilige aus der Klonierung resultierende, zur Sequenzierung verwendete Plasmid eingesetzt (Abb. 3.8 A, B, C).

Die Restriktionsanalyse der DNA aus der Mutante M16 mit dem Enzym *MluI* hatte ergeben, dass das Fragment mit Transposon eine Größe von ca. 9,2 kb hat (Abb. 3.6). Demnach muss das Fragment in *S. epidermidis* 1457 um die Größe des Transposons, 5,2 kb, kleiner sein. Das PCR-Produkt umfasst den unbekanntem Bereich zwischen den Schnittstellen. Es sollte demnach ungefähr die gleiche Größe wie das Fragment im Wildtyp haben. Die Abb. 3.8 A zeigt, dass das PCR-Produkt auf der Höhe des Fragments im Wildtyp liegt und das Fragment in der Mutante M16 um 5,2 kb größer ist. Das beweist, dass das zur Sequenzierung eingesetzte Plasmid pckm16-5 dem richtigen Abschnitt im Wildtyp und der Mutante M16 entspricht.

Die 5'-Region von Tn917 in der Mutante M20, gespalten mit *KpnI*, wurde mit dem Transposon auf 5,4 kb kartiert (Abb. 3.7). Das PCR-Produkt umfasst nur die Region 5'-aufwärts von Tn917 und muss um die Größe des Transposons bis zur *KpnI* Spaltstelle, das sind ca. 1,5 kb, kleiner sein. Wie in Abb. 3.8 B zu sehen ist, trifft dies zu. Die Größe des Fragments aus der Mutante M20 wurde hier auf 5,5 kb kartiert und das PCR-Produkt auf 3,9 kb. Das Fragment im Wildtyp sollte 3,9 kb (5'-aufwärts von Tn917) addiert mit 2,8 kb (3'-abwärts von Tn917), also 6,7 kb groß sein (Abb. 3.7). In Abb. 3.8 B ist eine schwache Bande, gekennzeichnet durch einen Pfeil, auf der Höhe der Bande der Mutante M20 zu erkennen. Dies ist eine Abweichung, die auf die Methode der Restriktionsanalyse zurückzuführen ist. Es ist aber deutlich gezeigt, dass das sequenzierte Plasmid pckm20kpn-10 den richtigen Bereich aus der Mutante M20 umfasst.

Die 3'-Region von Tn917 in Mutante M20, gespalten mit *NsiI*, wurde mit dem Transposon auf 6,5 kb kartiert (Abb. 3.7). Das PCR-Produkt, bestehend aus der Region 3'-abwärts von Tn917 muss um die Größe des Transposons bis zur *NsiI*- Spaltstelle, das sind 2,2 kb, kleiner sein. Das Fragment im Wildtyp muss ebenso groß sein wie das PCR-Produkt, da mit diesem Restriktionsenzym der Bereich 5'-aufwärts von Tn917 auf 0 kb kartiert wurde. Die Abb. 3.8 C bestätigt dies und die spätere Sequenzierung konnte eine Spaltstelle für

NsiI unmittelbar vor dem Transposon nachweisen. Für das sequenzierte Plasmid *pkkm20nsi-1* wurde damit gezeigt, dass es den richtigen Abschnitten im Wildtyp und der Mutante M20 entspricht.

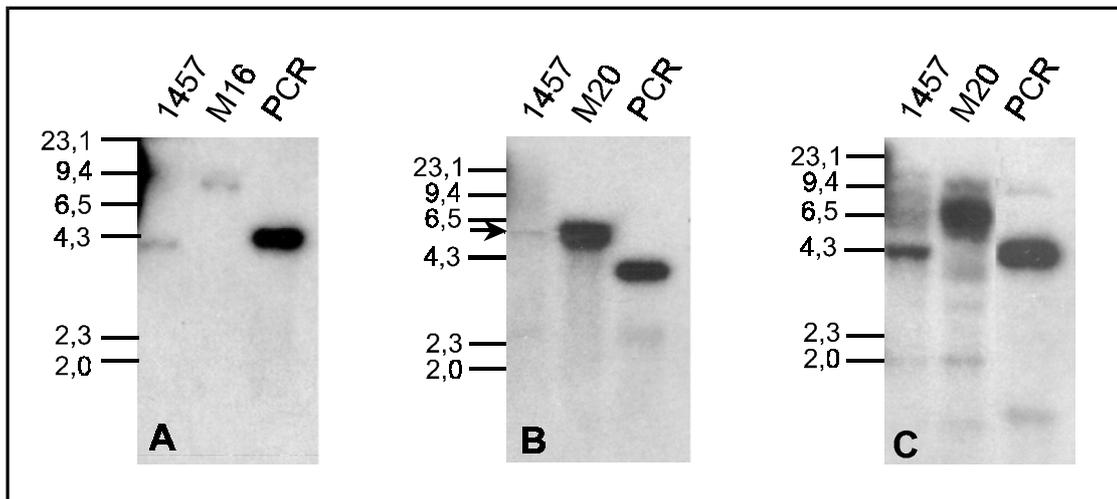


Abb. 3.8: Vergleich der klonierten Fragmente mit den Fragmenten aus Wildtyp und Mutanten und dem Produkt der inversen PCR in der Southern Blot Hybridisierung.

A: Aufgetragen ist chromosomale DNA von *S. epidermidis* 1457 und der Mutante M16, jeweils gespalten mit *MluI*, und das zur Klonierung verwendete PCR-Produkt, hybridisiert mit Plasmid *pkkm16-5*.

B: Aufgetragen ist chromosomale DNA von *S. epidermidis* 1457 und der Mutante M20, jeweils gespalten mit *KpnI*, und das zur Klonierung verwendete PCR-Produkt, hybridisiert mit Plasmid *pkkm20kpn-10*. Der Pfeil kennzeichnet eine schwache Bande.

C: Aufgetragen ist chromosomale DNA von *S. epidermidis* 1457 und der Mutante M20, jeweils gespalten mit *NsiI*, und das zur Klonierung verwendete PCR-Produkt, hybridisiert mit Plasmid *pkkm20nsi-1*.

Die Zahlen kennzeichnen Lage und Größe des Größenstandards in kb. Abbildungen der Autoradiographien sind in Originalgröße wiedergegeben.

3.2.2 Sequenzierung - Homologiesuche

Die aus der Klonierung resultierenden Plasmide *pkkm16-5*, *pkkm20kpn-10* und *pkkm20nsi-1* wurden durch *primerwalking* mittels der in Tab. 2.3 beschriebenen Primer sequenziert. Die Sequenz für den Genbereich in der Mutante M20 wurde aus den Sequenzen von *pkkm20kpn-10* und *pkkm20nsi-1* zusammengesetzt. Gleichzeitig wurden Homologiesuchen in den Datenbanken von NCBI und EMBL durchgeführt. Da sich für beide Mutanten aufgrund der Homologien jeweils ein von dem Transposon betroffener ORF als interessant erwies, wurden beide DNA-Stränge dieses ORFs mit beiden Strängen sequenziert und korrigiert. Von den weiter angrenzenden Bereichen wurden nur ein DNA-

Strang und in der Mutante M20 auch nicht vollständig sequenziert. Inzwischen hatte man begonnen, das gesamte Genom von *S. epidermidis* RP62A zu sequenzieren. Ein Vergleich dieser Sequenz in der TIGR-Datenbank (Stand: 09.07.01) ergab eine Übereinstimmung von 96-100 % für die umliegenden Bereiche, weshalb auf eine vollständige Sequenzierung verzichtet wurde und die hier dargestellten Gesamtbereiche mit Hilfe des VectorNTI-Programms aus dieser Sequenz generiert wurden.

3.2.2.1 Betroffener Genort in Mutante M20

Der in dieser Arbeit mit beiden Strängen sequenzierte Bereich umfasst 2556 bp (Sequenz siehe Anhang, NCBI Accession No.: AF443793). Aufgrund der Homologien und der möglichen Shine-Dalgarno Sequenz an Position (Pos.) 306-310 wurde der Genstart des ORF's an Pos. 322 dieser Sequenz postuliert. Das Ende des ORFs befindet sich an Pos. 2346. Es ergibt sich daraus ein ORF von 2025 bp Länge mit einem abgeleiteten Protein aus 675 Aminosäuren. Das errechnete Molekulargewicht beträgt 73,3 kDa (Abb. 3.9).

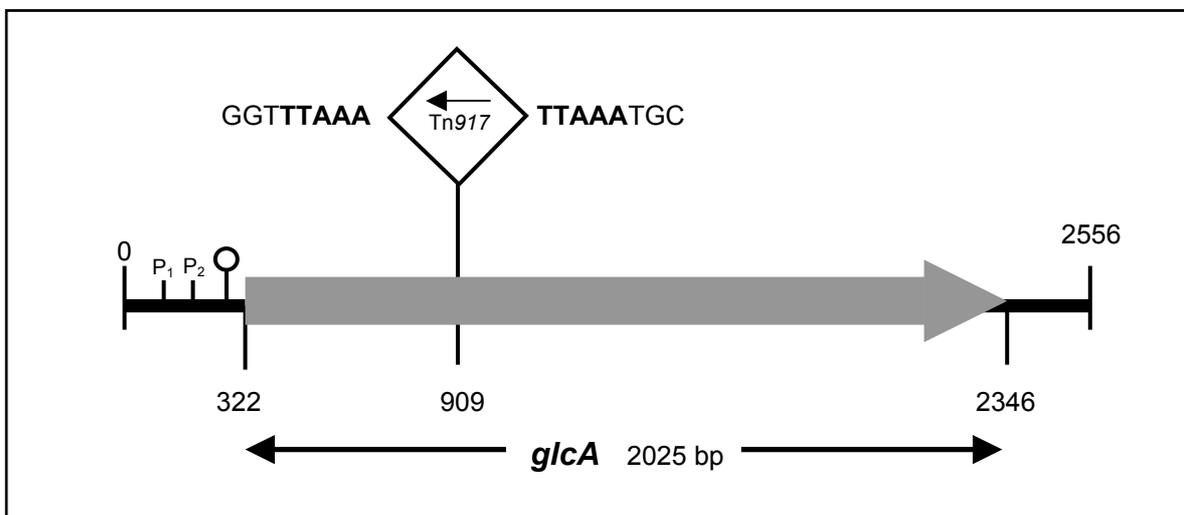


Abb. 3.9: Schematische Darstellung des doppelt sequenzierten Bereichs der Transposoninsertionsstelle in der Mutante M20. Der graue Pfeil gibt den ORF an, P₁ und P₂ sind mögliche Promotoren und der Kreis auf dem Strich symbolisiert einen rho-unabhängigen Terminator. Die Tn917-Insertionsstelle ist angegeben und die verdoppelten Basen sind fett gedruckt. Die Orientierung des Transposons wird durch den Pfeil dargestellt, der die Orientierung des *erm* Gens angibt.

Das Transposon inserierte an Pos. 909, das ist 587 bp nach dem Genstart. Die Orientierung des Transposons wird durch die Leserichtung des *erm* Gens angegeben (Shaw, 1985). Es inserierte hier in der entgegengesetzten Orientierung zur Leserichtung des ORFs. Die

typische aus der Insertion des Transposons Tn917 resultierende Verdoppelung von 5 bp wurde auch hier nachgewiesen. Von Pos. 222-274 wurde die Sequenz eines rho-unabhängigen Terminators ermittelt. Davor weiter aufwärts gelegen, befanden sich zwei mögliche Promotorsequenzen.

Homologien

Die Homologiesuche mit dem sequenzierten ORF ergab Homologien zu Enzymen II (EII) des Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase Systems (PTS) in verwandten gram-positiven Bakterienspezies. Enzyme II sind die substratspezifischen Komponenten des Zuckertransportsystems und die Homologiesuche mit dem hier betroffenen ORF ergab Übereinstimmungen zu Glucose-spezifischen EII-Proteinen (EII^{Glc}) (Tab. 3.8).

Ein Vergleich des ORFs mit der fast vollständigen Sequenz von *S. epidermidis* RP62A in der TIGR-Datenbank ergab eine Übereinstimmung zu einer Sequenz von 99 % auf Nukleotidebene. Es zeigte sich ein Basenaustausch, der allerdings konservativ war, und zu einer 100 % übereinstimmenden Aminosäuresequenz führte.

Tab. 3.8: Homologe Gene zu dem in Mutante M20 vom Transposon getroffenen ORF *glcA*.

Organismus	Gen	Nukleotid-ident.	AS pos.	AS ident.
<i>S. epidermidis</i> ^a		99 %	100 %	100 %
<i>S. aureus</i> ^b	<i>glcA</i>	76 %	84 %	79 %
	<i>ptsG</i>	70 %	81 %	68 %
<i>S. carnosus</i> ^c	<i>glcA</i>	72 %	82 %	75 %
	<i>glcB</i>	66 %	70 %	60 %
<i>B. subtilis</i> ^d	<i>ptsG</i>	61 %	68 %	60 %

AS: Aminosäuren; pos.: ähnliche ; ident.: identische
Prozentangaben beziehen sich auf den gesamten Bereich der jeweiligen Gene.

Quellen der Sequenzen:

^a *S. epidermidis*: Stamm RP62A; TIGR-Datenbank (Stand 09.07.01)
Bereich 187634- 189658

^b *S. aureus glcA*: Stamm Mu50; NCBI Accession No.: AP003358
S. aureus ptsG: Stamm Mu50; NCBI Accession No.: AP003365

^c *S. carnosus glcA* und *glcB*: Stamm TM300; NCBI Accession No.: X93360 und X80415

^d *B. subtilis ptsG*: Stamm 1423; NCBI Accession No.: Z11744 S43329

Hohe Übereinstimmungen fanden sich zu den von Christiansen und Hengstenberg, (Christiansen und Hengstenberg, 1996, 1999) beschriebenen EII Glucose-Transportern *glcA* (72 % Nukleotidentität) und *glcB* (66 %) in *S. carnosus*. Die höchste Übereinstimmung (76 %) besteht zu einem Gen in *S. aureus*, das aufgrund seiner Homologie ebenfalls *glcA* genannt wurde, dessen Funktion aber bisher nicht gezeigt wurde. Bei der Homologiesuche der umgebenden ORFs fand sich in der Sequenz von *S. aureus* ein weiteres EII^{Glc}-Gen, genannt *ptsG*, das 70 % Nukleotidentität aufwies, bei dem aber ebenfalls die Funktion bisher nicht belegt ist.

In den Sequenzen von *S. carnosus* und *S. aureus* finden sich jeweils zwei EII^{Glc}-Gene. Diese haben in den jeweiligen Spezies zueinander Übereinstimmungen von ca. 80 %. In der Gesamtsequenz von *S. epidermidis* RP62A dagegen konnten Homologien zu anderen EII-Genen nur mit Übereinstimmungen von ca. 50 % gefunden werden, was darauf schließen lässt, dass es hier nur ein EII-Gen dieser Art gibt.

Die Homologie zu dem EII^{Glc}-Gen *ptsG* im gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* betrug 61 % (Gonzy-Trebul et al., 1991; Zagorec und Postma, 1992).

Das abgeleitete Protein von GlcA besitzt alle charakteristischen Domänen eines EII-Proteins (Lengeler et al., 1994) in der Anordnung EIICBA. Aufgrund der Homologien wurde der in der Mutante M20 vom Transposon getroffene ORF *glcA* genannt.

Umgebung von *glcA*

Der umgebende Bereich von *glcA* in der Sequenz von *S. epidermidis* RP62A zeigte drei weitere ORFs in der gleichen Orientierung (Abb. 3.10 A). 5'-aufwärts von *glcA* ORF1 mit 687 bp und ORF2 mit 1737 bp und 3'-abwärts von *glcA* ORF3 mit 765 bp.

In der Sequenz von *S. epidermidis* 1457 findet sich ORF3 auch 3'-abwärts in derselben Orientierung. ORF1 und ORF2 finden sich ebenfalls gleich orientiert 5'-aufwärts von *glcA*. Es gibt Hinweise darauf, dass sich zwischen ORF2 und *glcA* möglicherweise ein weiterer ORF befindet. Hier haben ca. 500 Basen 90 % Übereinstimmung zu ORF2 des Insertionselements *IS1272* (Archer et al., 1996). Der Bereich in der Sequenz von *S. epidermidis* 1457 wurde aber nur einfach und nicht vollständig sequenziert und es fehlt sowohl der Start als auch das Ende des entsprechenden ORF's. Aufgrund der Größe des klonierten Fragments ist auszuschließen, dass das vollständige *IS1272* mit einer Größe von 1934 bp hier lokalisiert ist.

Erstaunlicher Weise ergab die Homologiesuche der 5'-aufwärts von *glcA* liegenden ORFs gute Übereinstimmungen auch in der Anordnung zu ORFs in *S. aureus*, die 5'-aufwärts des EII-Gens *ptsG* zu finden sind (Abb. 3.10 B). Dies ist deshalb erstaunlich, da *ptsG* aus *S. aureus* geringere Homologien als *glcA* zu *glcA* aus *S. epidermidis* hat. Der umgebende Bereich von *glcA* in *S. aureus* unterscheidet sich hingegen völlig von dem in *S. epidermidis* (Abb. 3.10 C).

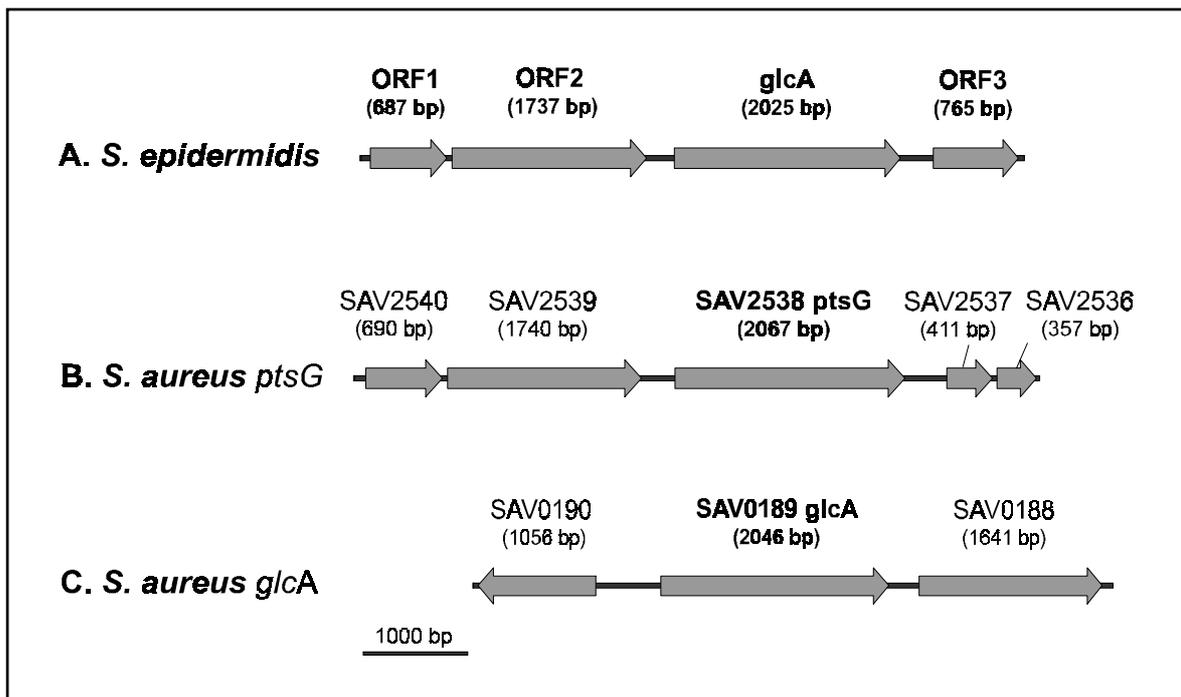


Abb. 3.10: Umliegende Gene von *glcA* in *S. epidermidis* RP62A (A) und im Vergleich zu ähnlichen Genorten in *S. aureus* (B, C). Die grauen Pfeile geben die ORFs an, darüber finden sich die Bezeichnungen der ORFs mit ihren Größen. Quellen der Sequenzen: **A** TIGR-Datenbank, **B** Stamm Mu50; NCBI Accession No.: AP003365, **C** Stamm Mu50; NCBI Accession No.: AP003358

Die Homologien von ORF1 und ORF2 5'-aufwärts von *glcA* in *S. epidermidis* zu den 5'-aufwärts von *ptsG* liegenden ORFs in *S. aureus* betragen auf der Nukleotidebene etwa 80 %. Die im Folgenden gemachten Angaben zu den SAV-Genen stammen aus den Beschreibungen zur Sequenz aus Accession No.: AP003365, die wiederum auf Homologievergleichen basieren und nicht funktionell belegt sind. ORF1 hat Homologie zu SAV2540 (Abb. 3.10 B), das als konserviertes hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion beschrieben wird und ORF2 hat Homologie zu SAV2539 (Abb. 3.10 B), das Ähnlichkeiten zu einer Pyruvat-Oxidase aufweist.

Zu ORF3 von *S. epidermidis* konnten keine Homologien in den Datenbanken gefunden werden und es zeigten sich auch keine Übereinstimmungen zu den SAV-Genen 2537 und 2536 (Abb. 3.10 B).

SAV0190 in entgegengesetzter Orientierung 5'-aufwärts von *glcA* in *S. aureus* (Abb. 3.10 C) wird als konserviertes hypothetisches Protein bezeichnet. SAV0188 in der gleichen Orientierung 3'-abwärts von *glcA* wird als ähnlich zu einer Indol-3-Pyruvat-Decarboxylase beschrieben.

Zur Umgebung der anderen homologen Gene *glcA* und *glcB* von *S. carnosus* ist nur bekannt, dass 5'-aufwärts von den beiden Genen ein Antiterminator *glcT*, der die Transkription von EII Genen reguliert, zu finden ist (Knezevic et al., 2000). In *B. subtilis* ist *ptsG* zusammen in einem Operon mit den beiden allgemeinen PTS-Enzymen EI und HPr organisiert, die 3'-abwärts von *ptsG* liegen (Gonzy-Trebul et al., 1989). 5'-aufwärts des Operons befindet sich auch hier ein die Transkription von *ptsG* regulierender Antiterminator *glcT* (Stülke et al., 1997).

Im Gegensatz dazu finden sich in der unmittelbaren Umgebung von *glcA* in *S. epidermidis* keine weiteren Gene des PTS und auch keine Enzyme, die für den unmittelbaren Katabolismus des entsprechenden Substrats verantwortlich sind.

3.2.2.2 Betroffener Genort in Mutante M16

Der mit beiden Strängen sequenzierte Bereich beträgt 1320 bp (Sequenz siehe Anhang, Accession No.: AF443794). Aufgrund der Homologien und der möglichen Shine-Dalgarno Sequenz an Pos. 271-275 wird der Genstart an Pos. 282 postuliert. Das Ende des ORFs befindet sich an Pos. 1127. Daraus ergibt sich ein ORF von 846 bp Länge mit einem abgeleiteten Protein aus 282 Aminosäuren und einem errechneten Molekulargewicht von 32,8 kDa. Das Transposon inserierte hinter Pos. 392, das ist 110 bp nach dem putativen Genstart in entgegengesetzter Orientierung. Auch hier wurde die aus der Insertion des Transposons Tn917 resultierende Verdoppelung von 5 bp gefunden. Im Bereich von Pos. 105-146 befindet sich die Sequenz eines rho-unabhängigen Terminators und zwischen diesem und dem Genstart ein möglicher Promotor.

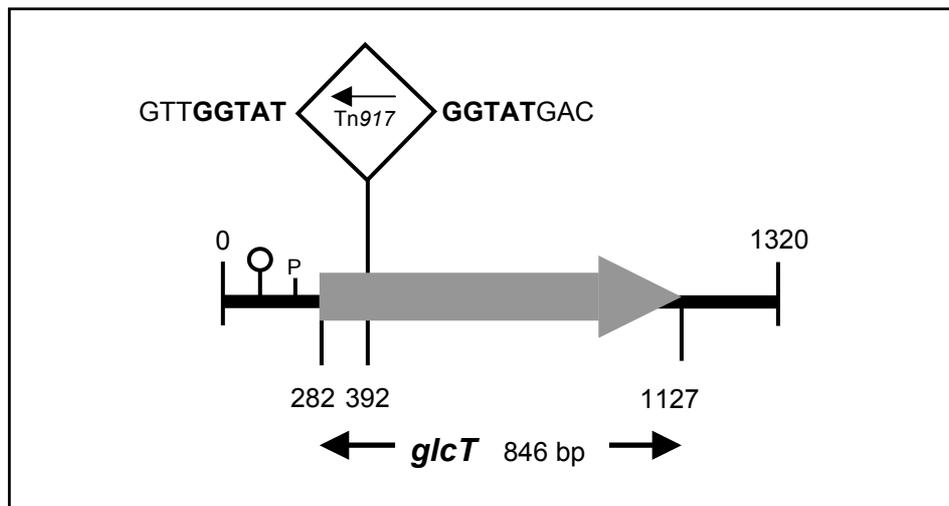


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des doppelt sequenzierten Bereichs der Transposoninsertionsstelle in der Mutante M16. Der graue Pfeil gibt den ORF an, P ist der mögliche Promotor und der Kreis auf dem Strich symbolisiert den rho-unabhängigen Terminator. Die Tn917-Insertionsstelle ist angegeben und die verdoppelten Basen sind fett gedruckt. Die Orientierung des Transposons wird durch den Pfeil dargestellt, der die Orientierung des *erm* Gens angibt.

Homologien

Die Homologiesuche mit dem sequenzierten ORF ergab Homologien zu einem weiteren Bestandteil des PTS, einem transkriptionsregulierenden Antiterminator aus verwandten gram-positiven Arten (Tab. 3.9). Dieser Antiterminator reguliert im PTS die Transkription seines zugehörigen EII-Gens.

In der Gesamtsequenz von *S. epidermidis* RP62A der TIGR-Datenbank fand sich eine Sequenz mit 99% Homologie, bei der eine Base ausgetauscht war. Auch hier handelt es sich um einen konservativen Austausch, der zu einer 100 % identischen Aminosäuresequenz führt. Es besteht eine hohe Homologie (65 % auf Nukleotidebene) zu *glcT* aus *S. carnosus*, dem von Knezevic beschriebenen Antiterminator (Knezevic et al., 2000). Die höchste Homologie (69 %) besteht auch hier zu einem Gen *glcT* aus *S. aureus*, das aufgrund seiner Homologie so benannt ist, dessen Funktion aber nicht experimentell bewiesen ist. Die Übereinstimmungen zu *glcT* aus *B. subtilis* (Bachem und Stülke, 1998) betragen 50 % auf Nukleotidebene. Aufgrund seiner Homologie wurde der in der Mutante M16 vom Transposon betroffene ORF *glcT* genannt.

Tab. 3.9: Homologe Gene zu dem in Mutante M16 vom Transposon getroffenen ORF *glcT*

Organismus	Gen	Nukleotid-ident.	AS pos.	AS ident.
<i>S. epidermidis</i> ^a		99 %	100 %	100 %
<i>S. aureus</i> ^b	<i>glcT</i>	69 %	72 %	61 %
<i>S. carnosus</i> ^c	<i>glcT</i>	65 %	69 %	59 %
<i>B. subtilis</i> ^d	<i>glcT</i>	50 %	50 %	37 %

AS: Aminosäuren; pos.: ähnliche; ident.: identische
 Prozentangaben beziehen sich auf den gesamten Bereich der jeweiligen Gene.

Quellen der Sequenzen:

^a *S. epidermidis* : Stamm RP62A; TIGR-Datenbank (Stand 09.07.01)
 Bereich 98045- 98890

^b *S. aureus glcT*: Stamm Mu50; NCBI Accession No.: AP003362

^c *S. carnosus glcT*: Stamm TM300; NCBI Accession No.: Y14029

^d *B. subtilis glcT*: Stamm 1423; NCBI Accession No.: Y11193

Umgebung von *glcT*

In der Umgebung von *glcT* in *S. epidermidis* RP62A wurden drei weitere ORFs in der gleichen Orientierung ermittelt: 5'-aufwärts von *glcT* ORF1 mit 2256 bp und ORF2 mit 1308 bp, 3'-abwärts von *glcT* ORF3 mit 1227 bp (Abb. 3.12 A). In der Sequenz von *S. epidermidis* 1457 entsprach der Bereich von dem vollständigen ORF 2 und *glcT* bis in ORF 3 hinein zu 100 % dem hier abgebildeten.

Bei der Homologiesuche zeigten diese drei ORFs ca. 80 % Nukleotidhomologie zu den umliegenden ORFs von *glcT* in *S. aureus* (Abb. 3.12 B). Auch die Anordnung und Orientierung der ORFs ist entsprechend. Die im Folgenden gemachten Angaben zu den SAV-Genen stammen aus den Beschreibungen zur Sequenz aus Accession No.: AP003362, die wiederum auf Homologievergleichen basieren und bisher nicht funktionell bestätigt wurden.

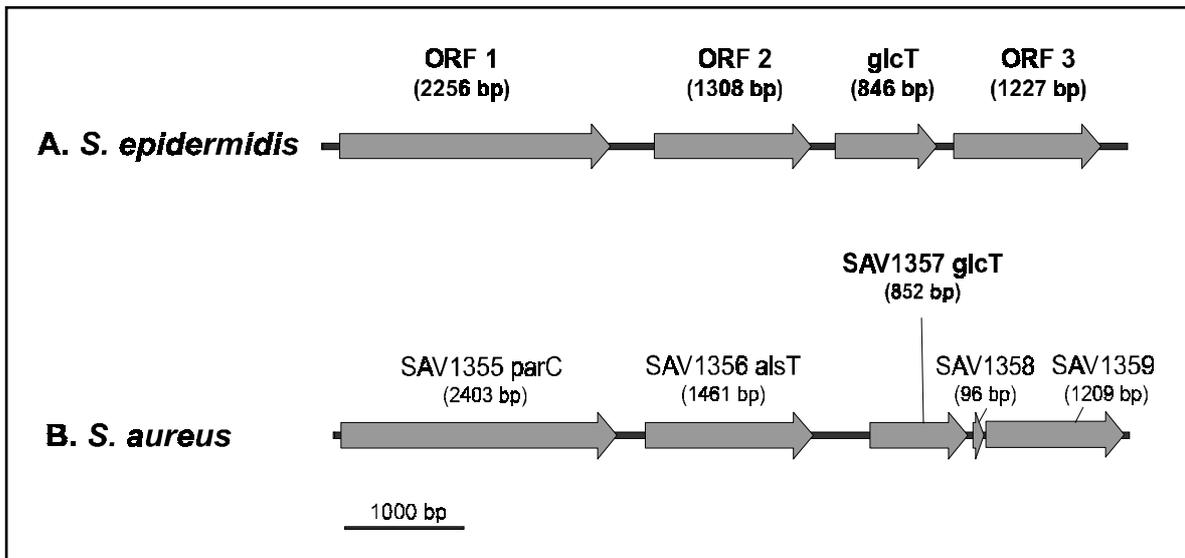


Abb. 3.12: Umliegende Gene von *glcT* in *S. epidermidis* RP62A (**A**) und im Vergleich zu einem ähnlichen Genort in *S. aureus* (**B**). Die grauen Pfeile geben die ORFs an, darüber finden sich die Bezeichnungen der ORFs mit ihren Größen. Quellen der Sequenzen: **A** TIGR-Datenbank, **B** Stamm Mu50; NCBI Accession No.: AP003362

ORF1 zeigt Übereinstimmungen zu SAV1355, das *parC* genannt wurde und dessen Produkt als Topoisomerase IV Untereinheit A beschrieben wird. ORF2 hat Homologien zu SAV1356 *alsT* und zu *alsT* aus *B. subtilis*, bei dem eine Funktion als Natrium-Alanin Symport Protein T aufgrund einer für Natrium-Alanin Symporter typischen Aminosäureabfolge angegeben wird (Rose und Entian, 1996). ORF3 zeigt Übereinstimmungen zu SAV1359, das als konserviertes hypothetisches Protein bezeichnet wird und keine weiteren Homologien zu Proteinen mit bekannter Funktion aufweist. SAV1358 ist ein sehr kleiner ORF, der möglicherweise nicht für ein Gen codiert oder dessen Sequenz noch zu SAV1359 gehören könnte.

Wie unter 3.2.2.1 erwähnt, befinden sich die Antiterminatoren *glcT* von *S. carnosus* und *B. subtilis* jeweils 5'-aufwärts von dem *glcA* bzw. *ptsG* Gen.

3.2.3 Sequenzanalyse

RAT-Sequenz

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die phänotypisch gleichen Beobachtungen der Mutanten M16 und M20 auf Insertion des Transposons in zwei unterschiedliche, voneinander unabhängige Genorte beruhen. Es wurden zwei Gene getroffen, die hohe Homologien zu Genen des PTS besitzen. In der Mutante M20 wurde mit *glcA* ein EII-Gen getroffen, das für das zuckerspezifische Transportprotein des Systems codiert. In der Mutante M16 wurde mit *glcT* ein Antiterminator-Gen getroffen, das ein transkriptionsregulierendes Element ist und im Falle des PTS die Transkription des zugehörigen EII-Gens reguliert (Stülke et al., 1997; Langbein et al., 1999; Knezevic et al., 2000). Es stellt sich jetzt die Frage, ob der inaktivierte Antiterminator *glcT* in der Mutante M16 verantwortlich ist für die Regulation der Expression von *glcA*, das in der Mutante M20 inaktivierte Gen. Antiterminatoren erkennen sogenannte RAT-Sequenzen (*ribonucleic antiterminator*; Aymerich und Steinmetz 1992). Diese RAT-Sequenzen überlappen die Sequenzen für rho-unabhängige Terminatoren. Wie der Terminator ist eine RAT-Sequenz durch einen *inverted-repeat* gekennzeichnet. Ein Indiz für die Regulation des *glcA* Gens durch *glcT* wäre, wenn die RAT-Sequenz vor dem *glcA* Gen zu finden ist. In Abb. 3.13 wird der Bereich 5'-aufwärts von *glcA* im Detail dargestellt. Dieser Bereich wurde aus der Mutante M20 sequenziert und zur Kontrolle nochmals aus dem Wildtyp *S. epidermidis* 1457 amplifiziert, kloniert und sequenziert.

Mit einem Abstand von 12 bp zu *glcA* findet sich eine mögliche Shine-Dalgarno Sequenz (RBS) zur Bindung des Ribosoms mit typischer GA Basenabfolge (Abb. 3.13). Von Pos. 222-274 findet sich ein *inverted-repeat* gefolgt von 7 Thymidin, was charakteristisch für rho-unabhängige Terminatoren ist (Lewin, 1997). Diese Sequenz wird überlappt von einem weiteren, kürzeren *inverted-repeat*, wobei es sich um die gesuchte RAT-Sequenz handelt. Ihr Vorhandensein deutet auf eine Regulation des *glcA* Genes durch Antitermination hin. Vor der RAT-Sequenz weiter 5'-aufwärts gelegen fanden sich zwei mögliche Promotoren mit den für Sigmafaktor A - abhängige Promotoren typischen konservierten Sequenzboxen (Abb. 3.13).

Der hier dargestellte Bereich entspricht zu 100 % der in der TIGR-Datenbank für *S. epidermidis* RP62A veröffentlichten Sequenz.

glcA in *S. carnosus* und *ptsG* in *B. subtilis* entspricht (Langbein et al., 1999). Beide möglichen Strukturen in *S. epidermidis* unterscheiden sich deutlich von den schon beschriebenen.

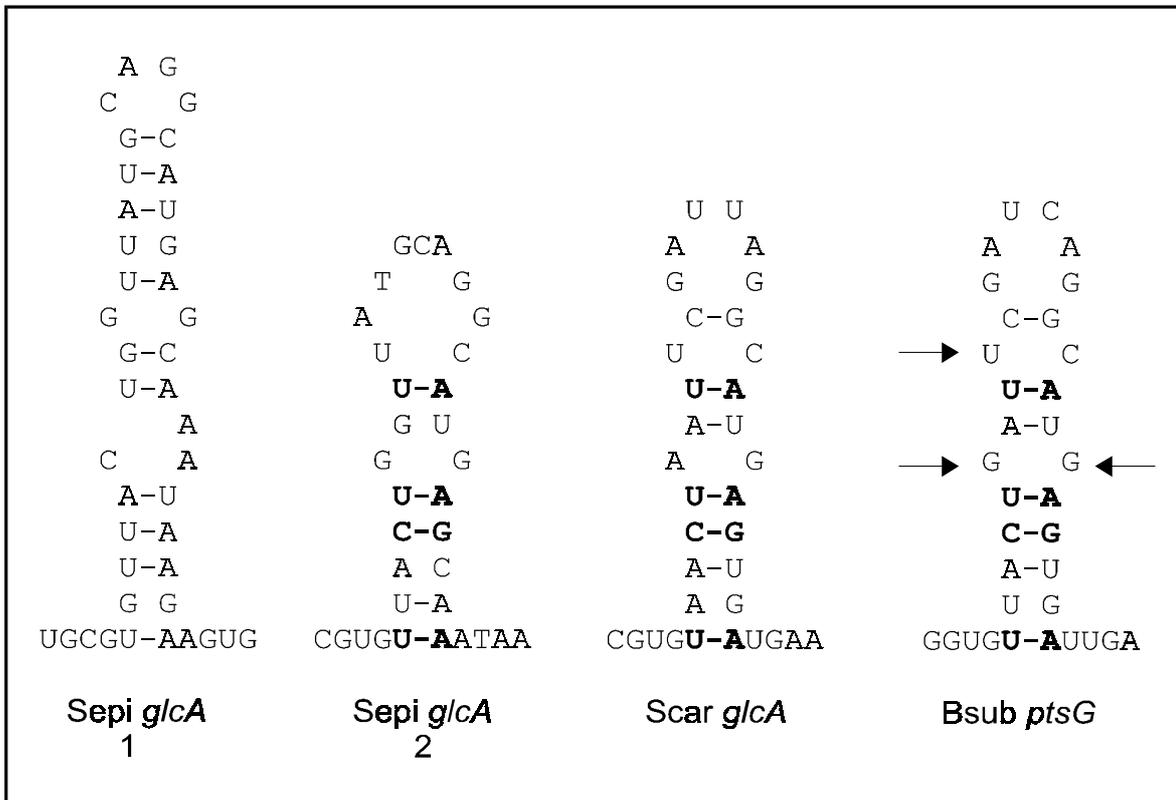


Abb. 3.14: Mögliche Sekundärstrukturen der RAT-Sequenzen vor *glcA* aus *S. epidermidis* 1457 (Sepi *glcA* 1 und 2) und Vergleich mit schon beschriebenen vor *glcA* aus *S. carnosus* (Scar *glcA*) und vor *ptsG* aus *B. subtilis* (Bsub *ptsG*). Fett dargestellt sind konservierte Basenpaarungen. Die Pfeile zeigen in *B. subtilis* für die Bindung des Antiterminators wichtige Basen, was experimentell durch gerichtete Mutagenese nachgewiesen wurde.

Abb. 3.15 zeigt ein Alignment der RAT-Sequenz vor *glcA* aus *S. epidermidis* 1457 mit anderen RAT-Sequenzen vor EII^{Glc}-Genen in verwandten gram-positiven Spezies. Die RAT-Sequenzen vor *ptsG* in *B. subtilis* und *glcA* in *S. carnosus* sind bereits beschrieben (Langbein et al., 1999). Die Bereiche vor *ptsG* und *glcA* in *S. aureus* wurden auch untersucht, dabei fanden sich ebenfalls die typischen rho-unabhängigen Terminatoren und entsprechende diese überlappende RAT-Sequenzen. Diese wurden ebenfalls mit

Es zeigte sich, dass die RAT-Sequenz vor *glcA* in *S. epidermidis* nahezu identisch zur RAT-Sequenz vor *ptsG* in *S. aureus* ist (Abb. 3.15). Die Umgebung dieses Gens hatte auch die größten Übereinstimmungen zu dem Bereich um *glcA* in *S. epidermidis*. Zu den

anderen RAT-Sequenzen bestehen größere Unterschiede. Allerdings zeigten sich mehrere stark konservierte Bereiche in allen verglichenen RAT-Sequenzen.

Die Sequenzen, die für die Bildung des *inverted-repeats* der RAT-Sequenz entscheidend sind, werden in der Literatur auf den Bereich zwischen den beiden Linien in Abb. 3.15 begrenzt (Langbein et al., 1999). Da sich davor die bei allen hier verglichenen Sequenzen gefundene Basenabfolge GTG befindet, können diese Basen mit zu dem charakteristischen Bereich gezählt werden.

<i>B. subtilis ptsG</i>	CGGTG	TTACTGA	-TTCGAT	-CAGGCATGAGTGA	TTGAGG	
<i>S. carnosus glcA</i>	ACGTG	TAACTAA	-TTCGAT	-TAGGCATGAGTGA	TGAAGT	
<i>S. epidermidis glcA</i>	GCGTG	TTACTGG	-TT--	-ATGCAGGCATGAGCAA	ATAAGA	
<i>S. aureus ptsG</i>	GCGTG	TTACTGG	-TA--	-ATGCAGGCATGAGCAA	ACAACC	
<i>S. aureus glcA</i>	ACGTG	TTACTAAG	TAAGAT	-TAGGCATGAGTTA	AATTA	
Konsensus BglG/SacY	GGW	TTG	TKACT	GVVHWMRGC	AGGCAARACCT	RAMA

Abb. 3.15: Alignment von RAT-Sequenzen vor EII^{Glc} -Genen in verwandten grampositiven Spezies. Abgesetzt dazu die Konsensus-RAT-Sequenz der Vertreter der BglG/SacY -Familie (Nukleinsäurecode, siehe Anhang). Die senkrechten Linien begrenzen den in der Literatur als konserviert angegebenen Bereich. Übereinstimmungen sind grau hinterlegt. Die Pfeile zeigen in *B. subtilis* durch Mutation nachgewiesene, für die Bindung des Antiterminators wichtige Basen. (-) Platzhalter, dort ist keine Base vorhanden. Die Sequenzen stammen aus den unter Tab. 3.8 genannten Quellen.

Vergleicht man die konservierten Bereiche mit den Sekundärstrukturen kann eine Paarung erstaunlicherweise nur noch von vier Basenpaaren festgestellt werden (in Abb. 3.14 fett dargestellt). Langbein et al. (1999, 2000) haben in *B. subtilis* Basen der RAT-Sequenz mutiert. Dabei stellten sie fest, dass bei gleichzeitiger Mutation in zwei Positionen (Pfeile in Abb. 3.14 und Abb. 3.15) keine Bindung des Antiterminators an die RAT-Sequenz erfolgte. Diese Positionen liegen in *S. carnosus* und *B. subtilis* in den ungepaarten Bereichen des *stem-loops* (Langbein et al., 1999). In der zweiten RAT-Sekundärstruktur von *S. epidermidis* (Abb. 3.14 Sepi *glcA* 2) würden diese Basen ebenfalls in die ungepaarten Bereiche des *stem-loops* fallen. Da diese für die Bindung des Antiterminatorproteins offensichtlich wichtige Bereiche sind, ist diese Sekundärstruktur wahrscheinlicher, auch wenn sie energetisch instabiler ist als die erste (Sepi *glcA* 2).

Erstmalig wurde die RAT-Sequenz von Aymerich und Steinmetz (1992) beschrieben. Sie fanden hohe Übereinstimmungen dieser Sequenzen vor Genen der BglG/SacY-Familie.

Die Gene des *bgl*-Operons in *E. coli* sind in den Katabolismus aromatischer β -Glucoside involviert (Schnetz et al., 1987), die des *sac*-Regulons in *B. subtilis* in den Katabolismus von Saccharose (Steinmetz et al., 1989). Vergleicht man die hier gefundenen konservierten Bereiche der RAT-Sequenzen mit den schon beschriebenen der BglG/SacY-Familie (Aymerich und Steinmetz, 1992; van Tilbeurgh et al., 1997) finden sich nur noch wenige Übereinstimmungen.

Vergleich von Antiterminatorproteinen

Als Regulatoren weisen Antiterminatorproteine, kurz als Antiterminatoren bezeichnet, spezifische Domänen auf, die für ihre Funktion entscheidend sind. Abb. 3.16 zeigt ein Alignment der näher charakterisierten Antiterminatoren GlcT aus *B. subtilis* und *S. carnosus* und der Sequenz von GlcT aus *S. epidermidis* 1457 sowie der Sequenz des in *S. aureus* gefundenen Antiterminators GlcT.

Die Bereiche für die einzelnen Domänen wurden anhand der für *B. subtilis* beschriebenen Bereiche kenntlich gemacht (Bachem und Stülke, 1998). Die Sequenzen wurden in diesen Abschnitten, die auch im gesamten Protein die größten Übereinstimmungen haben, verglichen. Generell lässt sich feststellen, dass die Übereinstimmungen zwischen den Staphylokokken-Spezies untereinander größer sind als zu *B. subtilis*.

Für die Antiterminatoren GlcT aus *B. subtilis* und *S. carnosus* wurde gezeigt, dass sie N-terminal eine Domäne von 60 Aminosäuren besitzen, die für die Bindung an die RNA entscheidend ist (Bachem und Stülke, 1998; Knezevic et al., 2000). Diese Domäne wird RBD (RNA-binding domain) oder in den klassischen Vertretern der BglG/SacY-Familie CAT-Domäne (Co-AntiTerminator) genannt (Manival et al., 1997). Manival et al. (1997) konnte für SacY und Declerck et al. (1999) für LicT zeigen, dass bestimmte Aminosäuren in Verbindung mit der RNA treten. SacY und LicT sind typische Antiterminatoren der BglG/SacY-Familie, zu der auch, wenn auch nicht so hoch konserviert, die hier untersuchten Antiterminatoren gehören. Acht von 11 dieser Aminosäuren wurden auch in den hier untersuchten Sequenzen gefunden (Abb. 3.16).

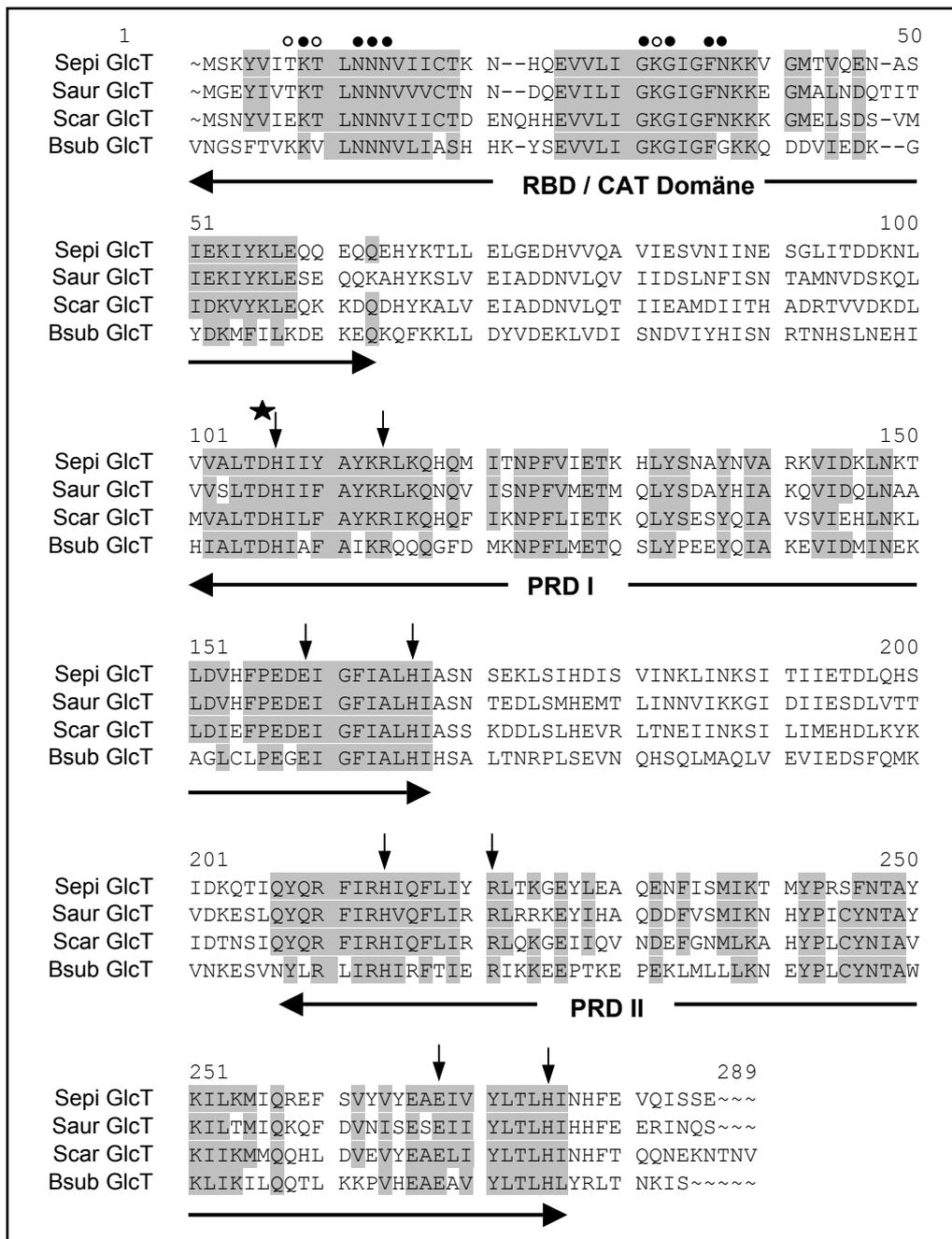


Abb. 3.16: Alignment von homologen Antiterminatoren mit ihren funktionellen Domänen. Die horizontalen Pfeile geben die Abschnitte der Domänen in *B. subtilis* (Bsub) an. Grau hinterlegt sind konservierte Regionen in den Domänen.

RBD/CAT: RNA-Bindungsdomäne. Punkte kennzeichnen Aminosäuren (AS), die für die Bindung an die RNA entscheidend sind. Schwarze Punkte kennzeichnen AS, die identisch mit schon beschriebenen sind. Weiße Punkte geben die Positionen weiterer AS an, die hier nicht identisch mit den beschriebenen sind.

PRD I und PRD II: PTS-Regulationsdomänen. Vertikale Pfeile kennzeichnen charakteristische, hoch konservierte AS in den PRDs. Pfeil mit Stern: für diese AS wurde die Phosphorylierung in *B. subtilis* und *S. carnosus* (Scar) gezeigt.

(Sepi) *S. epidermidis*, (Saur) *S. aureus*, AS-code: siehe Abkürzungsverzeichnis (-,~) Platzhalter: keine Base; Quellen der Sequenzen: wie unter Tab. 3.9 benannt.

Zwei weitere konservierte Domänen, die sogenannten PRDs (*PTS-regulation domain*), sind für die Regulation des PTS durch Phosphorylierung verantwortlich. Diese findet man häufig dupliziert (Stülke et al., 1998). Die Pfeile über PRD I und PRD II geben die typischen konservierten Aminosäuren dieser Domänen an: Histidin an den Positionen 107 und 214 dieses Alignments, Arginin an Positionen 114 und 221 und Glutaminsäure an den Positionen 159 und 268. Nicht in allen PRDs aber in sehr vielen, so auch hier, findet man ein weiteres Histidin an Positionen 166 bzw. an Position 275 (Stülke et al., 1998). Diese charakteristischen Aminosäuren sind in allen verglichenen Sequenzen konserviert.

Sowohl für *B. subtilis* als auch für *S. carnosus* konnte die Phosphorylierung des Histidin an Position 107 dieses Alignments in PRD I gezeigt werden (Bachem und Stülke, 1998; Knezevic et al., 2000). Auch dieses Histidin ist in den Sequenzen von *S. epidermidis* und *S. aureus* vorhanden.

3.3 Expression der betroffenen Gene

Da nun der Bereich der Transposoninsertion im Genom bekannt war, sollte aufgrund von RNA-Transkriptionsanalysen im Northern-Blot untersucht werden, welche Gene von der Transposoninsertion beeinflusst sind. Es sollte bewiesen werden, welche Gene inaktiviert sind und unter welchen Bedingungen diese transkribiert werden.

Zunächst musste der Zeitpunkt der Expression der Gene ermittelt werden. Aufgrund der Homologien zu Proteinen des Glucosetransports wurde vermutet, dass *glcT* und *glcA* auch eine Funktion im Glucosetransport haben. Da die Proteine, die für den Transport bestimmter Substrate benötigt werden, auch durch diese induziert werden (Postma und Lengeler, 1985; Lengeler et al., 1994) wurde angenommen, dass *glcA* als möglicher Glucosetransporter und *glcT* als sein möglicher Regulator zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase in glucosehaltigem Medium exprimiert werden. Um dies zu überprüfen, wurde ein Blot verwendet, auf dem RNA aus Zellen von *S. epidermidis* 1457 aufgetragen war, die in TSBØ-Medium mit 0,25 % (w/v) Glucose 3, 6, 10 und 14 Stunden gewachsen waren (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. S. Dobinsky). Dieser wurde mit einer Sonde für *glcA* (m20kr.7) hybridisiert (nicht abgebildet). Es wurde ein Signal zwischen der 16S und der 23S RNA bei ungefähr 2,2 kb nur nach 3 und 6 Stunden, also früh und mittel-exponentiell festgestellt.

Aufgrund der vorangestellten Vermutung und dieser Beobachtung wurden die RNA-Extraktionen für die nachfolgenden Experimente aus PYØ-Medium 3-4 Stunden nach Induktion durch verschiedene Zucker durchgeführt.

3.3.1 Expression von *glcT*

Es wurde zunächst die Expression des Antiterminatorgens *glcT* untersucht. In dieses Gen inserierte Tn917 in der Mutante M16. Da Antiterminatorproteine nur in geringer Menge in der Zelle vorhanden sind, waren diverse Optimierungsversuche notwendig, um diese Ergebnisse zu erzielen.

Die Expression von *glcT* wurde in PYØ supplementiert mit Glucose untersucht. Es wurde ein schwaches Signal auf Höhe von ca. 2,3 kb detektiert. Dieses Signal ist im Wildtyp und in der Kontrolltransposonmutante 1457-M11, aber nicht in der Mutante M16 zu finden (Abb. 3.17 A).

Wenn der Antiterminator die Expression des EII-Gens *glcA* reguliert, könnte es sein, dass er zeitlich vor dem EII-Gen exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde zusätzlich RNA aus dem Wildtyp *S. epidermidis* 1457 und der Mutante M16 aus PYØ mit Glucose, in 15 minütigen Abständen unmittelbar nach Inokulation der Bakterien extrahiert. Auch hier ist im Wildtyp *S. epidermidis* 1457 ein Signal auf Höhe von ca. 2,3 kb zu finden, das in der Mutante M16 nicht gefunden wird. Es ist keine vermehrte Expression von *glcT* nach Induktion mit Glucose über den beobachteten Zeitraum festzustellen (Abb. 3.17 B).

Mit einer anderen Oligonukleotid-Sonde (m16.12) und einer DNA-Sonde, die aus dem vollständigen Gen von *glcT* bestand, konnte mit PYØ und Glucose auch ein Signal in dieser Größe für den Wildtyp *S. epidermidis* 1457 gefunden werden (nicht abgebildet). Da kein Transkript in der Mutante M16 in dieser Größe zu finden war, sprechen diese Ergebnisse zusammen dafür, dass das detektierte Transkript spezifisch für *glcT* ist.

In der Mutante M16 bewirkt die Transposoninsertion den Verlust eines Transkripts, das *glcT* beinhaltet, mit einer Größe von 2,3 kb. Mittels RT (Reverse-Transkription)-PCR (2.19.2) konnte in mehreren Experimenten kein Signal mit Primern, die einen Bereich von ORF2 und *glcT* umfassen (Abb. 3.12), gefunden werden. Da sich vor *glcT* ein rho-unabhängiger Terminator befindet, beinhaltet dieses Transkript vermutlich den nachfolgenden ORF 3 (Abb. 3.12). Rein rechnerisch würde dies eine Größe von 2,21 kb ergeben.

Zusammenfassend lassen die genannten Beobachtungen darauf schließen, dass ORF2, der postulierte Natrium-Alanin Symporter, und *glcT* nicht co-transkribiert werden. Dies wird insbesondere durch die Terminatorsequenz vor *glcT* gestützt.

Damit ist gezeigt, dass in der Mutante M16 ein Transkript von ca. 2,3 kb, welches das vollständige *glcT*-Transkript und sehr wahrscheinlich ORF3 (Abb. 3.12) beinhaltet, nicht mehr nachzuweisen ist. Der durch die Transposoninsertion hervorgerufene Phänotyp der Mutante M16 resultiert damit aus dem Verlust der Genprodukte von *glcT* und möglicherweise ORF3.

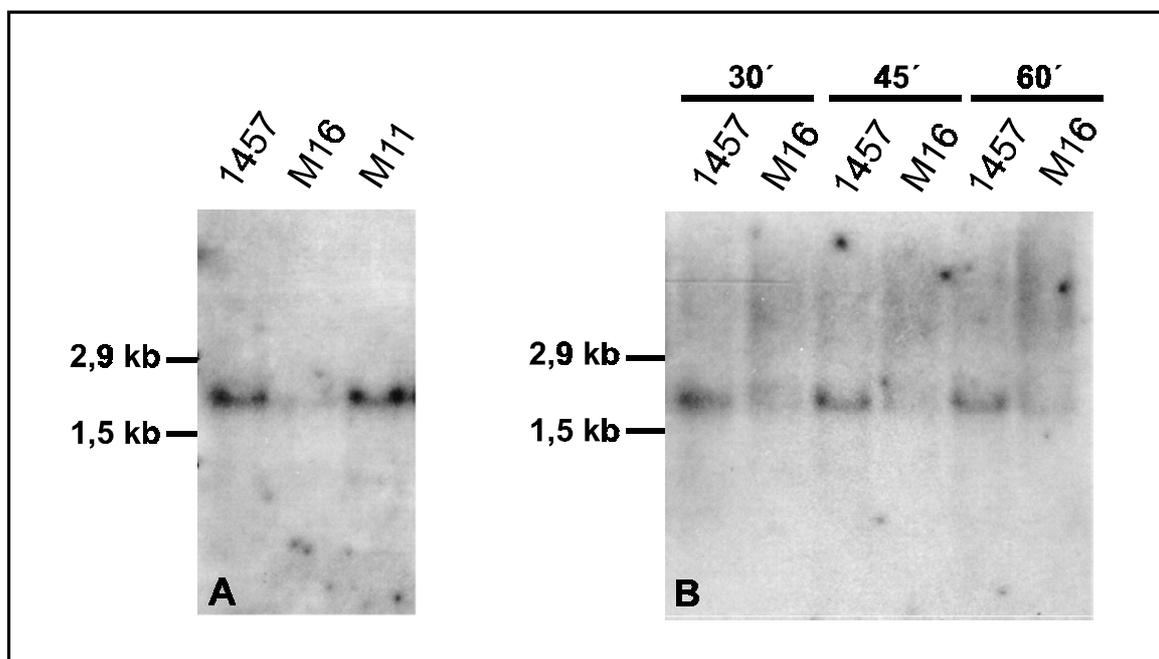


Abb. 3.17: Nachweis der Transkription von *glcT* in der Northern Blot Hybridisierung.

A RNA wurde extrahiert aus *S. epidermidis* 1457 und den Mutanten M16 und 1457-M11 (M11), nach Wachstum für 3-4 h in PYØ mit 0,4 % (w/v) Glucose. Hybridisiert wurde mit einer *glcT* spezifischen Sonde (m16r.4).

B RNA extrahiert aus *S. epidermidis* 1457 und der Mutante M16, die 30, 45 oder 60 min in PYØ mit 0,4 % (w/v) Glucose gewachsen waren, hybridisiert mit einer *glcT* spezifischen Sonde (m16r.4).

Die Zahlen geben Lage und Größe der 23S und 16S RNA an. Abbildungen der Autoradiographien sind in Originalgröße wiedergegeben.

3.3.2 Expression von *glcA*

Von den Transkriptionsanalysen zu *glcA* wurde die Klärung mehrerer Fragestellungen erwartet. Zum einen sollte gezeigt werden, welche Gene in der Mutante M20 von der Transposoninsertion betroffen sind. Zum anderen sollte gezeigt werden, ob *glcT* tatsächlich

der aufgrund desselben Phänotyps und der vorhandenen RAT-Sequenz vor *glcA* vermutete Transkriptionsregulator von *glcA* ist. Weiterhin sollte anhand der Transkription eine Induktion des Transporters durch mögliche Substrate nachgewiesen werden.

Sowohl in PYØ mit Glucose als auch mit GlcNAc findet sich in *S. epidermidis* 1457 und in der Kontrollmutante 1457-M11 ein Transkript auf Höhe von 2,4 kb. Dieses ist weder in der Mutante M20 noch in Mutante M16 nachzuweisen (Abb. 3.18).

Ein Transkript in dieser Größe konnte schon in den zu Beginn des Kapitels (3.3) genannten Experimenten nachgewiesen werden. Auch mit einer DNA-Sonde, die einen ca. 1000 bp langen Abschnitt des *glcA*-Gens beinhaltet, wurde in *S. epidermidis* 1457 ein solches Transkript gefunden (nicht abgebildet). Da in dem hier gezeigten Experiment kein Transkript in Mutante M20 in einer Größe von 2,4 kb zu finden war, ist von einem spezifischen Signal auszugehen.

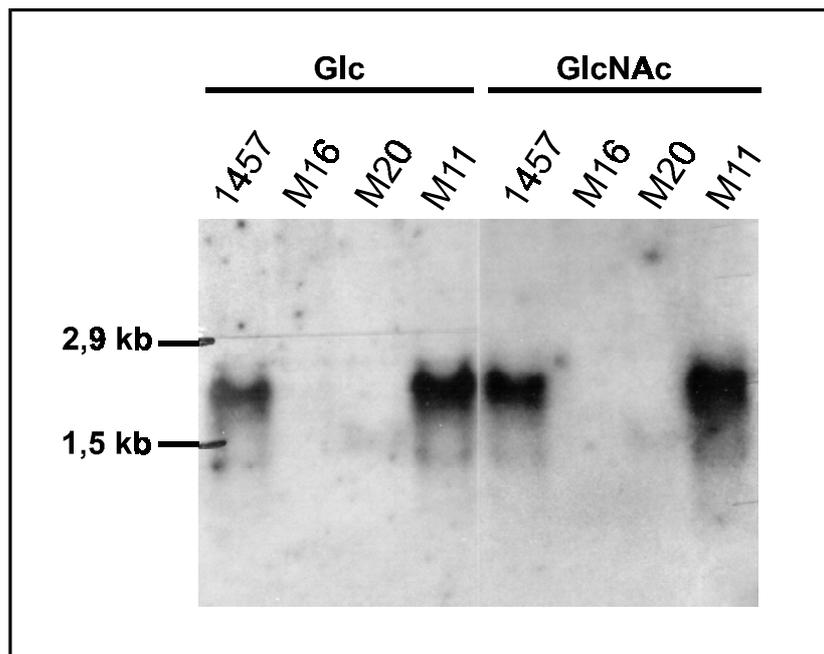


Abb. 3.18: Nachweis der Transkription von *glcA* in *S. epidermidis* 1457 und den Mutanten M16, M20 und 1457-M11 (M11) in der Northern Blot Hybridisierung. RNA wurde extrahiert aus Zellen, die 3-4 h in PYØ mit 0,4 % (w/v) Glucose bzw. GlcNAc gewachsen waren. Hybridisiert wurde mit einer *glcA* spezifischen Sonde (m20kr.7). Die Zahlen geben Lage und Größe der 23S und 16S RNA an. Abbildungen der Autoradiographien sind in Originalgröße wiedergegeben.

Da das *glcA*-Gen eine Größe von 2025 bp hat und die möglichen Promotoren mit einem Abstand von ungefähr 300 bp 5'-aufwärts vor *glcA* liegen (Abb. 3.13), zeigt die Größe des Transkripts von 2,4 kb, dass *glcA* monocistronisch transkribiert wird. Es wird demnach

nicht in einem Operon mit umliegenden Genen transkribiert. Dies passt zu der Beobachtung, dass die umliegenden Gene von *glcA* nicht in einem funktionellen Zusammenhang dazu stehen (Abb. 3.10).

Da sich 5'-aufwärts vom *glcA*-Gen eine Terminatorsequenz befindet, würde die Transkription an dieser abbrechen, so dass kein Transkript von *glcA* erhalten wird. Die RAT-Sequenz, welche die Terminationssequenz überlappt, gibt einen Hinweis darauf, dass die Transkription durch Antitermination reguliert wird. Das bedeutet, dass eine Transkription von *glcA* nur erfolgt, wenn ein intakter Antiterminator den Abbruch der Transkription verhindert. Das Fehlen des Transkripts von *glcA* in der Mutante M16, in der der Antiterminator GlcT inaktiviert ist, ist damit ein eindeutiger Beweis dafür, dass GlcT die Transkription von *glcA* reguliert. Das bestätigt die zuvor aufgrund des gleichen Phänotyps und der vor *glcA* vorhandenen RAT-Sequenz getroffenen Vermutungen.

Die Spezifität des Zuckertransporters *glcA* sollte anhand von Northern-Blot-Analysen untersucht werden. Da die EII-Gene in der Regel durch ihr Substrat von extern induziert werden (Lengeler et al., 1994), wurde das Wachstum der Bakterien mit unterschiedlichen Zuckern induziert (Abb. 3.19). Es wurde eine Erhöhung der Transkriptmenge bei Zusatz des spezifischen Zuckers im Vergleich zu PYØ erwartet. Es zeigte sich allerdings, dass die Transkriptmenge in allen untersuchten Ansätzen gleich war. Bei Zusatz von 0,4 % (w/v) Glucose, GlcNAc oder Fructose zu PYØ wurde im Vergleich zu PYØ keine Steigerung der Transkriptmenge beobachtet.

Offensichtlich wird *glcA* bereits in PYØ exprimiert und eine Erhöhung der Zuckerkonzentration auf 0,4 % (w/v) verändert die Transkriptmenge nicht.

Da keine Unterschiede in der Transkription mit unterschiedlichen Zuckern festzustellen waren, konnte anhand dieser Versuche die Spezifität des Transporters für bestimmte Zucker nicht ermittelt werden.

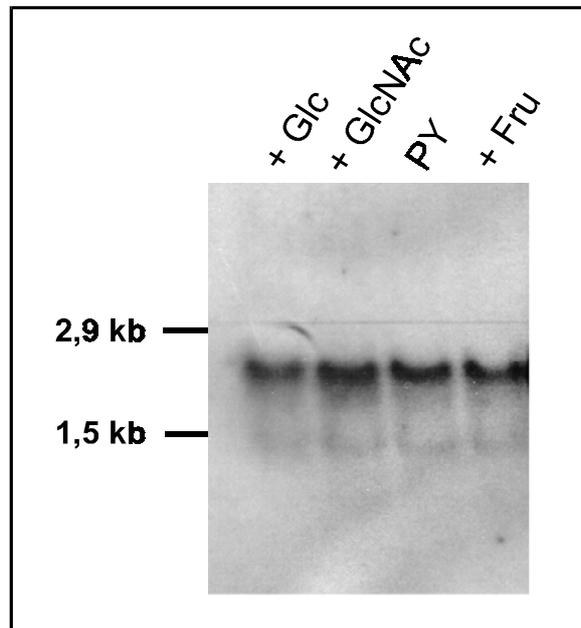


Abb. 3.19: Nachweis der Induktion von *glcA* im Wildtyp *S. epidermidis* 1457 durch unterschiedliche Zucker in der Northern-Blot-Hybridisierung. Die RNA wurde extrahiert aus Zellen, die 3-4 h in PYØ (PY) oder PYØ mit 0,4 % (w/v) der entsprechenden Zucker gewachsen waren. Hybridisiert wurde mit einer *glcA* spezifischen Sonde (m20kr.7). Die Zahlen geben Lage und Größe der 23S und 16S RNA an. Die Abbildung der Autoradiographie ist in Originalgröße wiedergegeben.

Es konnten keine Northern-Blot-Analyse für RNA aus Zellen, die mit PYØ und Glucosamin gewachsen waren, durchgeführt werden. Die extrahierte RNA schien modifiziert zu sein und zeigte ein verändertes Laufverhalten im Agarose-Formaldehydgel. Eine Vielzahl unterschiedlicher Extraktionsmethoden wurden getestet, wie z.B. zusätzliche Lithium-Chlorid und Phenol Fällungen, sowie DNase Verdau, allerdings ohne Erfolg. Diese Zellen akkumulierten in Flüssigkultur dermaßen stark, dass das Medium nahezu klar war und nur wenige sehr große Zellaggregate zu sehen waren. Auch eine Behandlung der Zellen mit Ultraschall nach der ersten Zentrifugation führte nur zu einer kurzzeitigen reversiblen Trennung der Zellen, was keinerlei Einfluß auf die Qualität der RNA hatte.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass der durch die Transposoninsertion hervorgerufene Phänotyp von Mutante M20 durch die Inaktivierung von *glcA* verursacht wird. Das Gen wird monocistronisch transkribiert und wird schon in PYØ exprimiert. Die Inaktivierung von *glcT* in Mutante M16 führte ebenfalls zu einem Verlust des Transkripts von *glcA*, was beweist, dass GlcT die Transkription von *glcA* reguliert.

3.3.3 Expression von *icaADBC*

Die Mutanten M16 und M20 wiesen im Vergleich zum Wildtyp mit Glucosamin und GlcNAc eine verminderte PIA-Expression auf (Abb. 3.4, Abb. 3.5). Da die Gene, die für die PIA-Bildung essentiell sind, im *icaADBC*-Genort organisiert sind, sollte festgestellt werden, ob die Inaktivierung der beiden PTS-Gene die Transkription des *ica*-Genortes beeinflusst.

Dazu wurde RNA aus Bakterien extrahiert, die unter denselben Bedingungen angezogen waren, bei denen die Inaktivierung von *glcA* und *glcT* gezeigt wurde. Hybridisiert wurde mit einer *icaC* spezifischen Sonde (Abb. 3.20). Ein gleich starkes Signal ist auf der Höhe von 3,6 kb für *S. epidermidis* 1457 und die Mutanten M16 und M20 zu detektieren. Dieses entspricht der Größe des *icaADBC*-Operons. In Mutante 1457-M11, in der das *ica*-Operon durch Transposoninsertion inaktiviert ist, ist kein Transkript auf dieser Höhe festzustellen. Dies bedeutet, dass zum untersuchten Zeitpunkt, zu dem kein Transkript von *glcT* bzw. *glcA* in den Mutanten M16 und M20 zu detektieren war (Abb. 3.17, Abb. 3.18), dies ohne Einfluss auf die Transkription des *icaADBC*-Operons bleibt.

Auch hier konnte leider keine RNA aus PYØ mit Glucosamin gewonnen werden.

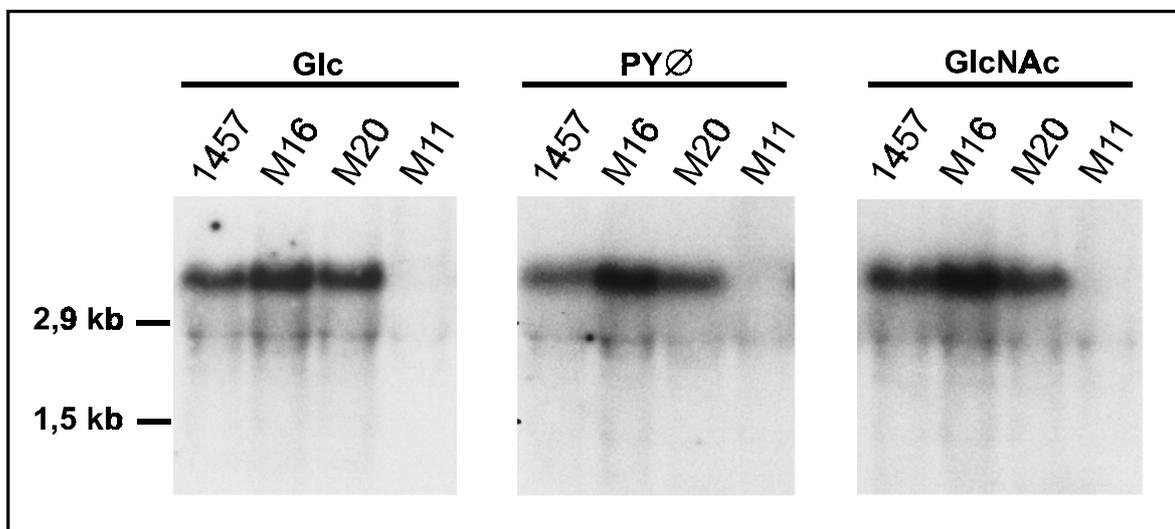


Abb. 3.20: Nachweis eines *icaADBC* spezifischen Transkripts aus *S. epidermidis* 1457 und den Mutanten M16, M20 und 1457-M11 (M11) in der Northern-Blot-Hybridisierung. RNA wurde extrahiert aus Zellen, die 3-4 h in PYØ oder PYØ mit 0,4 % (w/v) der angegebenen Zucker gewachsen waren. Hybridisiert wurde mit einer *icaADBC* spezifischen Sonde (*icaC*).

Die Zahlen geben Lage und Größe der 23S und 16S RNA an. Abbildungen der Autoradiographien sind in Originalgröße wiedergegeben.

3.4 Transportstudien

Die Sequenzierung der Transposoninsertionsregionen und die Northern-Blot-Analyse hatten ergeben, dass in den Mutanten M16 und M20 zwei Gene, die Homologien zu Genen des PTS haben, inaktiviert sind. In Mutante M20 ist dies ein für den spezifischen Transport des Zuckers verantwortliches EII-Protein GlcA, in Mutante M16 ist dies ein *glcA* regulierender Antiterminator GlcT.

In den folgenden Experimenten sollte die Funktion der beiden Gene im Zuckertransport experimentell belegt werden. Weiterhin sollte festgestellt werden, für welche Substrate der Transporter spezifisch ist. Aus diesem Grund wurden Transportstudien mit radioaktiv markierten Zuckern durchgeführt. Dabei wurde die Aufnahme der Zucker in ganze Zellen bestimmt, was innerhalb eines kurzen Zeitraumes geschah, um die Metabolisierung der Zucker zu vermeiden. Da die Northern-Blot-Analyse ergeben hatte, dass nach 3-4 Stunden der Transporter exprimiert wird (Abb. 3.18), wurden die Zellen auch für diese Experimente aus PYØ-Medium 3-4 h nach Induktion mit dem entsprechenden Zucker gewonnen. Die Transportraten werden angegeben in nmol Zucker pro Milligramm zelluläres Protein pro Minute. Mittels Hitzeinaktivierung von Kontrollzellen wurde ausgeschlossen, dass die Zucker von außerhalb an den Zellen haften.

Aufgrund der Homologien zu EII^{Glc}-Genen und deren Antiterminatoren wurde eine Funktion von *glcA* und *glcT* im Glucosetransport vermutet. Die Mutanten M16 und M20 besaßen im Vergleich zum Wildtyp *S. epidermidis* 1457 eine deutlich verminderte Aufnahmerate für Glucose (Abb. 3.21 A). Die Kontrollmutante 1457-M11 zeigt die gleiche Aufnahme wie der Wildtyp. Die Transportrate von *S. epidermidis* 1457 betrug 16,72 nmol mg⁻¹ min⁻¹. Die Raten der Mutanten M16 und M20 waren mit 1,5 nmol mg⁻¹ min⁻¹ um den Faktor 11 geringer (Tab. 3.10). Dies bestätigt die Vermutung, dass *glcA* und *glcT* in den Glucosetransport involviert sind.

Da *S. epidermidis* 1457 mit Glucosamin und GlcNAc ein mukoiden Phänotyp exprimierte, wurden diese beiden Zucker ebenfalls untersucht.

In Gegenwart von Glucosamin, wenn die Mutanten M16 und M20 auch mukoid sind, zeigten sie wie mit Glucose eine deutliche verminderte Aufnahme im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.21 B). Die Transportrate des Wildtyps war 3,39 nmol mg⁻¹ min⁻¹, die Transportraten der Mutanten M16 und M20 waren 0,5 nmol mg⁻¹ min⁻¹. Die Raten der

Mutanten sind damit signifikant um den Faktor 6 vermindert (Tab. 3.10). Die Kontrollmutante 1457-M11 zeigte Transportraten ähnlich denen des Wildtyps.

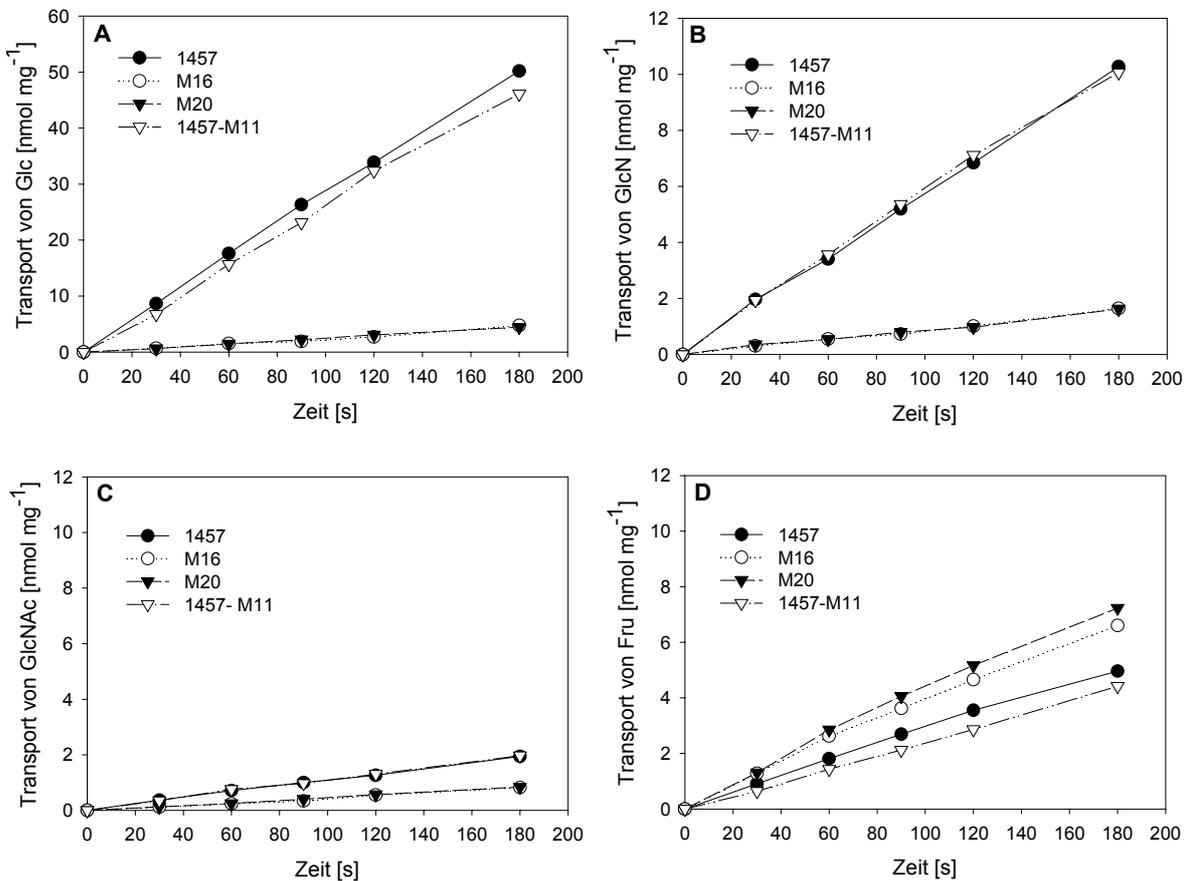


Abb. 3.21: Transport unterschiedlicher Zucker in Abhängigkeit von der Zeit durch *S. epidermidis* 1457 und die Mutanten M16, M20 und 1457-M11. Angegeben sind die Mittelwerte aus mind. 3 Versuchen mit 2 parallelen Ansätzen. Transport von (A) Glucose, (B) Glucosamin, (C) GlcNAc und von (D) Fructose. Zu beachten ist die abweichende Skalierung in A.

Tab. 3.10: Transportraten unterschiedlicher Zucker von *S. epidermidis* 1457 und Mutanten, [nmol mg⁻¹ min⁻¹]

Zucker	1457	M16	M20	1457-M11
Glc	16,72	1,53	1,51	15,67
GlcN	3,39	0,53	0,52	3,36
GlcNAc	0,63	0,28	0,28	0,64
Fru	1,67	2,19	2,42	1,48

Mit GlcNAc waren die beiden Mutanten M16 und M20 mukoid-negativ, deshalb wurden für diesen Zucker ebenfalls signifikant verringerte Transportraten für diese Mutanten erwartet. Erstaunlicherweise transportierte der Wildtyp GlcNAc im Vergleich zu den anderen Zuckern mit geringer Rate. Die beiden Mutanten M16 und M20 transportieren geringfügig weniger GlcNAc als der Wildtyp (Abb. 3.21 C). Die Transportrate für den Wildtyp und die Kontrollmutante 1457-M11 betrug $0,6 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, die Raten der Mutanten M16 und M20 waren mit $0,28 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ um ungefähr die Hälfte geringer (Tab. 3.10). Dies kann allerdings nicht als signifikant gelten, da die Fehlerabweichungen bei diesen niedrigen Werten sehr hoch sind.

Fructose wird in der Regel von EII-Proteinen der Mannitol-Fructose Familie, einer anderen Familie als der EII^{Glc}-Familie, transportiert (Postma et al., 1993). In gram-positiven Organismen wurde der Transport von Fructose über Enzyme II dieser Familie vor allem in Laktobazillen gezeigt (Saier et al., 1996; Taranto et al., 1999; Chaillou et al., 2001). Aus diesem Grund sollte der Transport von Fructose als Negativ-Kontrolle bestimmt werden. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede auf andere Transportdefekte zurückzuführen sind.

In allen untersuchten Stämmen waren die Transportraten für Fructose ähnlich (Abb. 3.21 D). Die Transportrate des Wildtyps betrug $1,67 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. In den Mutanten M16 und M20 waren sie mit $2,19$ und $2,42 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ sogar etwas erhöht im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 3.10). Dies zeigt, dass die verminderten Transportraten der anderen Zucker durch spezifische Inaktivierung von *glcA* und dem dazugehörigen Antiterminator *glcT* verursacht sind. Die Mutante 1457-M11 zeigte in etwa die gleichen Transportraten für die untersuchten Zucker wie der Wildtyp.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die beiden phänotypisch gleichen Mutanten M16 und M20 auch gleiche Transportraten aufweisen. Dieses beweist, dass das inaktivierte GlcA Protein und der zugehörigen Antiterminator die vermutete Funktion im Zuckertransport haben. Da beide Mutanten nahezu identische Werte aufweisen ist dies ein weiteres Indiz dafür, dass GlcT tatsächlich der Antiterminator von *glcA* ist und die phänotypischen Unterschiede in beiden Mutanten auf den Verlust des Zuckertransportproteins GlcA zurückzuführen sind. GlcT und GlcA sind damit involviert in den spezifischen Transport von Glucose und Glucosamin. Für den spezifischen Transport von GlcNAc kann anhand dieser Daten keine Aussage getroffen werden.

3.5 Wachstum mit GlcNAc

Die Transportversuche hatten gezeigt, dass der Wildtyp *S. epidermidis* 1457 im Vergleich zu den anderen Zuckern nur geringe Mengen GlcNAc transportiert. Dieses ist erstaunlich, da mit diesem Zucker einen mukoider Phänotyp mit vermehrter PIA-Produktion exprimiert wird. Aus diesem Grund sollte das Wachstum von *S. epidermidis* 1457 mit GlcNAc näher untersucht werden.

3.5.1 Säurebildung auf Purple-Agar

Auf Purple-Agar, der den Säureindikator Bromkresolpurpur enthält, wurde das Wachstum mit 1 % (w/v) GlcNAc bis zu 48 h ermittelt. Bei keinem der Stämme konnte ein Farbumschlag, der auf Säureproduktion schließen lässt, festgestellt werden (Tab. 3.11). Mit Glucose war in diesem Test bei allen untersuchten Stämmen Säurebildung schon nach 24 h festzustellen. Mit Glucosamin zeigte nach 24 h keiner der Stämme Säurebildung. Während *S. epidermidis* 1457 und Mutante 1457-M11 nach 48 h Säure bildeten, konnte dies bei den Mutanten M16 und M20 nicht nachgewiesen werden. Für diese hatten die Transportstudien gezeigt, dass sie im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Transportrate von Glucosamin haben, was hier offensichtlich eine geringere Säurebildung zur Folge hat.

Tab. 3.11: Säurebildung auf Purple-Agar
24 h / 48 h

Stamm	Glc	GlcN	GlcNAc
1457	+ / +	- / +	- / -
M16	+ / +	- / -	- / -
M20	+ / +	- / -	- / -
1457-M11	+ / +	- / +	- / -

(+) Säurebildung, angezeigt durch Gelbfärbung

(-) keine Säurebildung, keine Gelbfärbung

3.5.2 ID 32 Staph System zur Identifizierung von Staphylokokken

Im Staphylokokken Identifikationssystem ID 32 Staph (API, bioMérieux) wird Wachstum mit GlcNAc unter aeroben Bedingungen durch Säureproduktion nachgewiesen. *S. epidermidis* 1457 zeigte hier ein negatives Testergebnis (Tab. 3.12 grau hinterlegt). Die

Mutanten M16 und M20 haben im ID 32 - Staph dieselben Testergebnisse wie der Wildtyp *S. epidermidis* 1457, mit einer Ausnahme: die Mutante M16 zeigt im Gegensatz zum Wildtyp auch mit Turanose ein negatives Testergebnis.

Tab. 3.12: Ergebnisse ID 32 Staph (bioMérieux)

Test / Substrat	1457	M16	M20
UREase	+	+	+
ArgininDiHydrolase	+	+	+
OrnithinDeCarboxylase	-	-	-
ESCulin (Hydrolyse)	-	-	-
GLUcose	+	+	+
FRUctose	+	+	+
MaNosE	-	-	-
MALtose	+	+	+
LACtose	-	-	-
TREhalose	-	-	-
MANnit	-	-	-
RAFfinose	-	-	-
RIBose	-	-	-
CELlobiose	-	-	-
NITrat (Reduktion)	+	+	+
Acetoinproduktion	+	+	+
β GALactosidase	-	-	-
Arginin Arylamidase	-	-	-
ALK. Phosphatase	+	+	+
Pyrrolidonyl Arylamidase	-	-	-
NOVObiocin (Resistenz)	-	-	-
SACcharose (Säurebildung)	+	+	+
N-Acetyl-Glucosamin (Säurebildung)	-	-	-
TURanose (Säurebildung)	+	-	+
ARAbinose (Säurebildung)	-	-	-
β GlucURonidase	-	-	-

(+) positive Reaktion (-) negative Reaktion

3.5.3 Wachstumskurven

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass *S. epidermidis* 1457 nicht in der Lage ist aus GlcNAc Säure zu bilden, wohingegen er dies aus Glucose kann. Das Wachstum von *S. epidermidis* 1457 in PYØ mit GlcNAc wurde nun anhand der Optischen Dichte in

statischer Kultur untersucht. Es wurde mit dem Wachstum in PYØ ohne Zuckerzusatz und in PYØ mit Glucose verglichen (Abb. 3.22).

Es sind nur die Wachstumskurven von *S. epidermidis* 1457 dargestellt, da die Kurven der Mutanten M16 und M20 jeweils nur einen geringfügigen nicht signifikant verringerten Kurvenverlauf im Vergleich zum Wildtyp zeigten. Eine Wachstumskurve mit Glucosamin konnte nicht dargestellt werden, da die Messung der Optischen Dichte aufgrund von äußerst starkem Verklumpen der Zellen nicht möglich war.

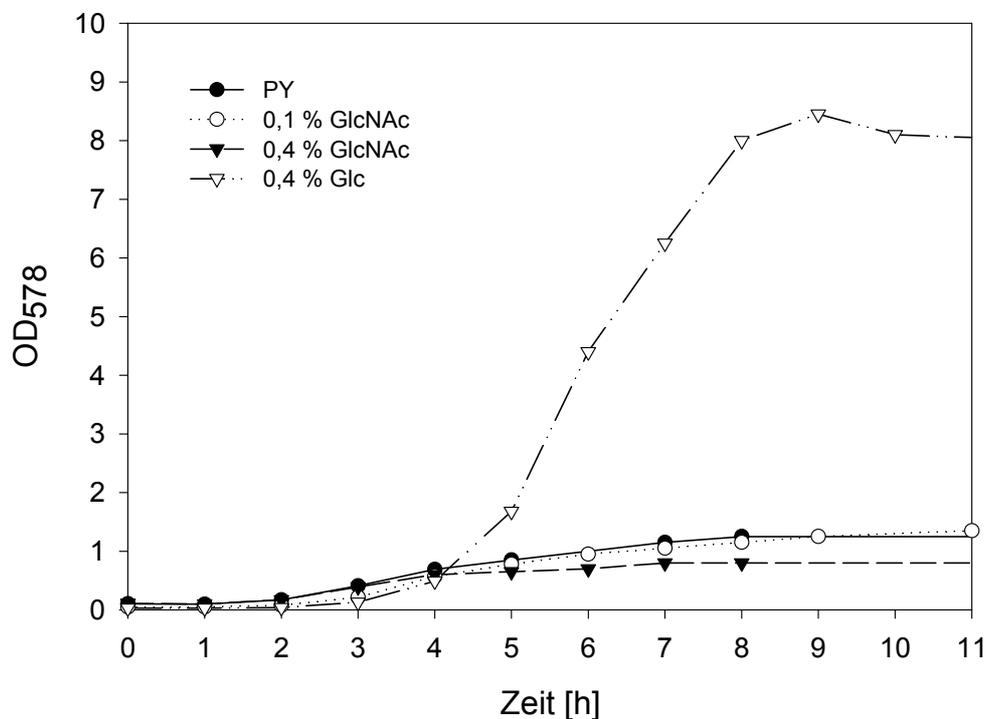


Abb. 3.22: Wachstum von *S. epidermidis* 1457 in PYØ (PY) und in PYØ mit Zusatz der angegebenen Zucker mittels OD₅₇₈ in Abhängigkeit von der Zeit

Das Wachstum in PYØ mit Glucose führte zu einem starken Anstieg der Optischen Dichte bis zu einem Endwert von ca. 8. Verglichen dazu verlief die Kurve von PYØ ohne Zuckerzusatz deutlich flacher und endete schon bei einer OD₅₇₈ von ca. 1,8. Das Wachstum mit PYØ und 0,4 % (w/v) GlcNAc dagegen führte zu keiner signifikanten Veränderung der Optischen Dichte verglichen zu PYØ. Die Wachstumskurven von PYØ und PYØ mit 0,4 % (w/v) GlcNAc waren nahezu identisch. Dies zeigt, dass, wie erwartet, Glucose zum Wachstum genutzt werden kann, während in den Ansätzen mit GlcNAc

offensichtlich nur die Bestandteile aus PYØ verwertet werden können. Die zusätzliche Zugabe von GlcNAc bleibt ohne Einfluss auf das Wachstum.

In den Ansätzen mit 0,4 % (w/v) GlcNAc konnte man eine Verklumpung der Zellen nach ca. 8 h beobachten, dann mussten die Zellen einmal 30 sec. mit Ultraschall behandelt werden, um die OD₅₇₈ bestimmen zu können.

Um einen Hemmeffekt durch GlcNAc auszuschließen, der von Cramton et al. (2001b) in *S. epidermidis* RP62A mit GlcNAc-Konzentrationen von 0,25 % (w/v) beobachtet wurde, wurde das Wachstum zusätzlich mit 0,1 % (w/v) GlcNAc getestet. Der Kurvenverlauf stieg leicht an, was auf eine geringe Hemmung hindeuten könnte. Eine signifikante Veränderung im Vergleich zu PYØ konnte allerdings nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass *S. epidermidis* 1457 GlcNAc nicht im Energiestoffwechsel verwerten kann. Erstaunlicherweise führt dieser Zucker trotzdem zur Expression eines mukoiden Phänotyps mit vermehrter PIA-Produktion.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, den mukoiden Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 näher zu charakterisieren und den genetischen Hintergrund der mukoid-negativen Mutanten M16 und M20 zu ermitteln.

Es konnte gezeigt werden, dass ein mukoider Phänotyp am besten auf PYØ-Agar, der mit Glucosamin oder GlcNAc supplementiert war, exprimiert wird. Die Mutanten M16 und M20 waren mukoid-negativ auf PYØ-Agar mit GlcNAc, sie sind jedoch weiterhin mukoid auf PYØ-Agar mit Glucosamin. Die Biofilmbildung der Mutanten war mit PYØ und GlcNAc deutlich vermindert. Ein mukoider Phänotyp konnte nur von *S. epidermidis* Stämmen mit einem intakten *icaADBC* Genort gebildet werden. Dieser Genort ist für die Synthese des interzellulären Polysaccharid Adhäsins PIA verantwortlich. Die Quantifizierung von PIA unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren, ergab eine Korrelation des mukoiden Phänotyps mit der Expression sehr großer Mengen von PIA.

Die genetische Analyse der Transposoninsertionsstellen der Mutanten M16 und M20 offenbarte die Inaktivierung zweier Gene des bakteriellen Zuckertransportsystems PTS. In der Mutante M20 wurde ein EII-Glucose-Transporter und in der Mutante M16 ein die Transkription dieses Transporters regulierender Antiterminator inaktiviert. Für diese Gene konnte eine Funktion im spezifischen Transport von Glucose und Glucosamin bewiesen werden. Eine Funktion im spezifischen Transport von GlcNAc konnte dagegen nicht eindeutig gezeigt werden. Allerdings wurde GlcNAc nur in sehr geringen Mengen in den Wildtyp transportiert und kann nicht im Energiestoffwechsel verwertet werden. Dies ist äußerst erstaunlich, da *S. epidermidis* 1457 mit GlcNAc einen mukoiden Phänotyp bildet, der mit der Expression großer Mengen PIA korreliert.

4.1 Korrelation des mukoiden Phänotyps mit Expression großer Mengen PIA

Ein mukoider Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 konnte nur auf PYØ mit Zusatz der Aminosucker Glucosamin oder GlcNAc exprimiert werden. Am besten war dies bei Konzentrationen von 0,4 % (w/v) zu sehen. Mit dieser Konzentration war schon im Vorfeld gearbeitet worden (Krokotsch, 1998; Nedelmann, 1997).

Der mukoide Phänotyp von *Pseudomonas aeruginosa* wird durch Alginat-Überproduktion verursacht, dem von Pseudomonaden gebildete Exopolysaccharid (Boucher et al., 1997).

Mukoide Stämme von *S. aureus* sind ebenfalls gekennzeichnet durch ein Exopolysaccharid (EPS) in Form einer Kapsel (Lee und Lee, 2000). Skandinavischer Sauermilch werden mukoide Stämme von *Lactococcus lactis* als Starterkulturen zugesetzt, um durch die von ihnen gebildeten Polysaccharide die Konsistenz dieser Produkte zu beeinflussen (Cerning, 1990).

Demnach ist ein mukoider Phänotyp häufig mit der Produktion von Exopolysacchariden verbunden. Der mukoide Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 wurde untersucht, um neue Erkenntnisse zur Zusammensetzung der Glykokalyx zu gewinnen. Da bekannt war, dass *S. epidermidis* 1457 als EPS PIA bildet, wurde zunächst überprüft, ob es einen Zusammenhang mit diesem gibt. Die Experimente offenbarten, dass der mukoide Phänotyp, der auf der Agarplatte beobachtet wurde, tatsächlich mit der Bildung sehr großer Mengen von PIA korreliert war (Abb. 3.4). Auch die PIA-Quantifizierung von Zellen, die unter den gleichen Bedingungen in statischer Flüssigkultur angezogen worden waren, zeigte eine vermehrte PIA-Menge mit den Aminosuktern Glucosamin und GlcNAc (Abb. 3.5).

Dass es sich bei der mukoiden Substanz tatsächlich um PIA handelt, wird durch die Tatsache unterstützt, dass nur *S. epidermidis* Stämme einen mukoiden Phänotyp exprimieren können, die einen für die PIA-Synthese verantwortlichen intakten *icaADBC* Genort haben. Die mitgeführte Transposonmutante 1457-M11 von *S. epidermidis* 1457, bei der das *icaADBC* Operon inaktiviert war, konnte keinen mukoiden Phänotyp exprimieren (Tab. 3.5).

Damit konnte die anfängliche Annahme, dass die Expression des mukoiden Phänotyps ein von der Biofilmbildung abgekoppelter Mechanismus ist (Nedelmann, 1997), nicht bestätigt werden. Zwar wird der mukoid-negative Phänotyp durch Transposoninsertionen in Genorte verursacht, die bisher noch nicht in Zusammenhang mit der Biofilmbildung gebracht wurden. Allerdings ist das überexprimierte PIA ein Faktor, der in der akkumulativen Phase der Biofilmbildung essentiell ist. Unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren, wurde eine leicht vermehrte Biofilmbildung im Vergleich zu den nicht mukoid-induzierenden Bedingungen gemessen (Tab. 3.7). Ebenso wurde unter Biofilmtestbedingungen eine stark vermehrte PIA-Bildung festgestellt (Abb. 3.5). Das zeigt, dass die vermehrte PIA-Bildung unter Bedingungen, die den mukoiden Phänotyp induzieren, auch mit einer vermehrten Biofilmbildung einher geht. Deshalb lassen sich Biofilmbildung und Expression eines mukoiden Phänotyps nicht voneinander trennen.

Das „schleimige“ Aussehen eines mukoiden Phänotyps wird hauptsächlich durch Einlagerung großer Mengen von bis zu 97 % Wasser in die EPS-Substanz verursacht (Zhang et al., 1998). Ein mukoider Phänotyp von *S. epidermidis* wurde durch Zugabe der beiden Aminozucker Glucosamin und GlcNAc, die beide Hauptbestandteile von PIA sind (Mack, 1996a), induziert. Des Weiteren konnte der Phänotyp durch peptonhaltige Medien oder durch Zugabe von Glucosamin und Aminosäuren induziert werden (3.1.1.1-3.1.1.3).

Wie oben dargelegt, ist die Bildung eines mukoiden Phänotyps häufig mit der Produktion von EPS gekoppelt. Die Induktion des mukoiden Phänotyps beeinflusst damit auch immer die Produktion von EPS. Verschiedene Faktoren sind bekannt, die dies beeinflussen. So hängt die Menge der EPS-Synthese von der Verfügbarkeit bestimmter Zucker innerhalb und außerhalb der Zellen, von der Verfügbarkeit von anderen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen oder weiteren Nährstoffen ab (Sutherland, 2001). Eine Untersuchung der EPS-Produktion von *Lactobacillus delbrueckii* in chemisch definierten Medium ergab, dass anaerobe Bedingungen, ein kontrollierter pH-Wert von 6.0, eine Temperatur von 42°C und die Zugabe von Calcium-Chlorid, Adenin, Xanthin oder Uronsäure sich positiv auf die EPS-Synthese auswirkten (Petry et al., 2000). Für *Lactococcus lactis* untersuchte man gezielt die Regulation der EPS-Produktion durch die Zuckerquelle und verglich EPS-Produktion aus Glucose mit Fructose. Dabei stellte sich heraus, dass Glucose die bevorzugte Zuckerquelle war (Looijestijn et al., 1999).

Für *S. epidermidis* förderten anaerobe Bedingungen (Cramton et al., 2001a) oder Eisenlimitierung im Medium (Deighton und Borland, 1993) die Schleim-, bzw. PIA-Bildung. Auch die Faktoren, die in dieser Arbeit nachweislich den mukoiden Phänotyp und damit die EPS-Bildung beeinflussen, sind Umweltfaktoren. Offensichtlich sind die beiden Aminozucker Glucosamin und GlcNAc gute Substrate für die Synthese von PIA. Diese Beobachtung machten auch Cramton et al. (2001b). Ein mukoider Phänotyp konnte nur auf Medien, die Pepton und damit große Mengen Aminosäuren enthielten, induziert werden (Tab. 3.1). Durch Zugabe von Aminosäuren und Glucosamin zu Medium, das den mukoiden Phänotyp nicht induziert, wurde ebenfalls ein mukoider Phänotyp beobachtet (Tab. 3.4, Abb. 3.3). Damit scheinen Aminosäuren ebenfalls ein gutes Substrat für die Bildung von PIA zu sein. Möglicherweise kommt es deshalb bei der Bildung des mukoiden Phänotyps auf die Aminogruppe und damit auf die verfügbare Stickstoffmenge an. Offensichtlich wird die PIA-Bildung durch große Mengen Stickstoff begünstigt.

Für den mit Aminosäuren induzierten mukoiden Phänotyp (Abb. 3.3) wurde eine Korrelation mit PIA nicht gezeigt, sie kann jedoch aufgrund der phänotypischen Gemeinsamkeiten vermutet werden. Der experimentelle Nachweis von PIA bei den mukoiden Zellen, die auf PYØ mit Glucosamin oder GlcNAc gewachsen waren, erfolgte mit Hilfe eines immunologischen Tests. In diesem Koagglutinationstest wurde ein gegen gereinigtes PIA gerichtetes Kaninchenantiserum eingesetzt. Für die Reaktivität mit dem Antiserum ist die β -anomerische Form und die Acetylierung der Zucker von PIA notwendig (Mack et al., 1996a). Da nicht bekannt ist, ob weitere Domänen von PIA als Antikörperbindungsstelle fungieren, könnte sich das „mukoide PIA“ strukturell von dem von Mack et al. (1996a) beschriebenen PIA unterscheiden. Dieser Schluss liegt nahe, da zur Verfügung stehende Substrate die Zusammensetzung der EPS beeinflussen (Sutherland, 2001). Auch für *Lactococcus lactis* wurde eine Variation der EPS-Zusammensetzung in Abhängigkeit von der Zuckerquelle beobachtet. Die Komponenten der EPS blieben hier zwar gleich, aber die relative Menge der einzelnen Monosacharide änderte sich in Abhängigkeit von den Zuckern im Medium (Petry et al., 2000). Deshalb könnte PIA von Zellen, die mit Glucosamin und GlcNAc oder den Aminosäuren als Substrat gewachsen waren, modifiziert sein. Diese Frage könnte nur durch eine Strukturanalyse des „mukoiden PIA“ geklärt werden.

4.2 GlcA, ein EII^{Glc}-Transporter und Zucker-spezifisches Element des PTS

Durch eine genetische Analyse der Mutanten M16 und M20 konnte gezeigt werden, dass zwei unterschiedliche Gene des Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase Systems (PTS) inaktiviert wurden. Es handelt sich dabei um einen EII^{Glc}-Transporter *glcA* und den diesen regulierenden Antiterminator *glcT*. Dies bestätigt die Kartierungen und eine erste Ansequenzierung der Insertionsstelle, die vor Beginn dieser Arbeit gezeigt hatten, dass die Transposoninsertionen in von *icaADBC* unabhängigen Genorten lagen (Knobloch, 2000; Rohde, 2001).

Das Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase System (PTS)

Das PTS ist ein in Eubakterien weit verbreitetes System zum Transport einer Vielzahl von Zuckern in die Bakterienzelle, wobei sie Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängig phosphoryliert werden. Das PTS hat aber auch eine Bedeutung in der Signaltransduktion (Lee

et al., 2000) und Chemotaxis von Bakterien (Lux et al., 1999), ebenso im Stickstoffmetabolismus sowie in der Regulation einer Vielzahl metabolischer Stoffwechselwege (Stülke und Hillen, 2000). Es besteht in der Regel aus drei charakteristischen Komponenten: Enzym I (EI) katalysiert die Dephosphorylierung von PEP zu Pyruvat und überträgt dabei das Phosphat auf das zweite charakteristische Histidin-haltige Protein (HPr). Von HPr wird das Phosphat über die dritte, den Zucker transportierende Komponente, Enzym II (EII), auf den Zucker übertragen (Abb. 4.1). EI und HPr werden auch die allgemeinen Proteine des PTS genannt. Sie sind lösliche Enzyme, die im Cytoplasma der Zellen lokalisiert sind. EII-Proteine sind dagegen die spezifischen Komponenten des PTS. Sie sind membranständig und auf den Transport bestimmter Zucker spezialisiert. So gibt es pro Zelle eine Vielzahl unterschiedlicher, auf den Transport bestimmter Zucker spezialisierte EII-Proteine (Postma et al., 1993).

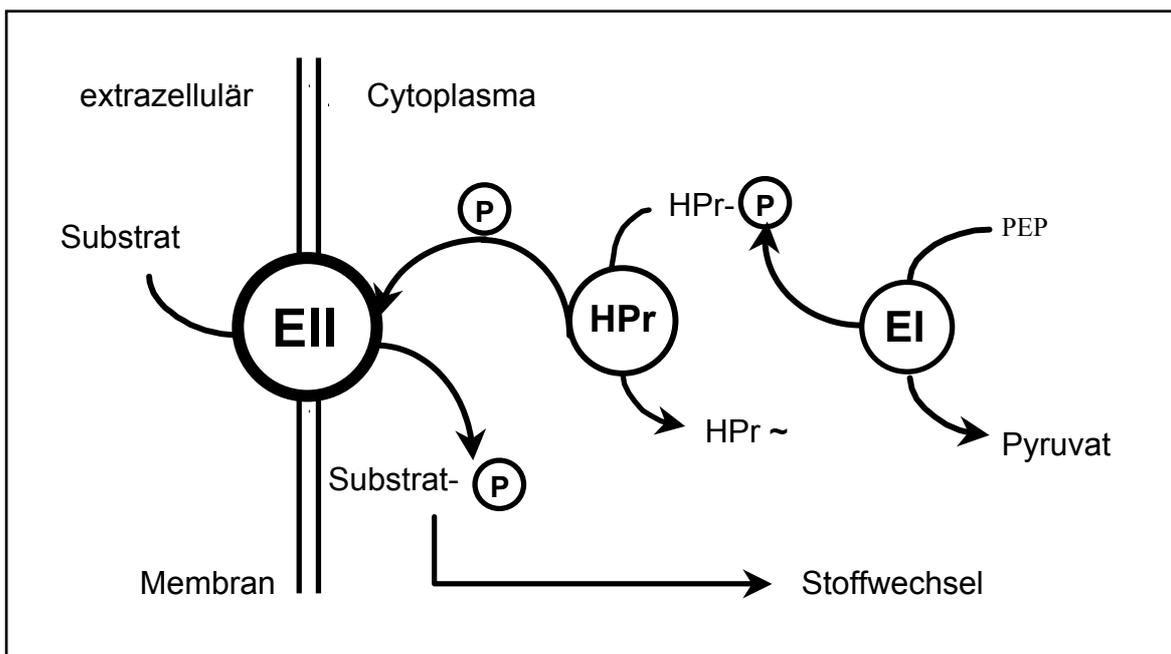


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise und Phosphorylierungen des PTS (Postma und Lengeler, 1985)

4.2.1 Enzyme II (EII)

Das hier gefundene Gen *glcA* codiert für ein typisches Enzym II. Diese bestehen aus drei charakteristischen Domänen: EIIA ist eine hydrophile Domäne aus ca. 100 Aminosäuren mit einem konservierten Histidin, das von HPr-P phosphoryliert wird. EIIB ist ebenfalls eine hydrophile Domäne aus ca. 100 Aminosäuren mit einem konservierten Cystein, das

von der EIIA-Domäne phosphoryliert wird und häufig mit der dritten Domäne EIIC verbunden ist. EIIC ist der membranständige Bereich mit ca. 350 Aminosäuren, die 6-8 potentielle Transmembranhelices und eine große hydrophile Schleife ausbilden können (Lengeler et al., 1994). Über diese Domäne erfolgt der Transport der Zucker und die Phosphorylierung derselben. Die drei Domänen können frei oder über bestimmte „linker“ miteinander verbunden sein. So steht in *E. coli* die Domäne EIIA alleine und wurde aus historischen Gründen *crr* genannt. Die beiden anderen Domänen sind miteinander verbunden und als EIICB durch das Gen *ptsG* codiert (Erni und Zanolari, 1986; Buhr et al. 1994). In dem hier gefundenen Gen *glcA* in *S. epidermidis* sind diese 3 Domänen in der Anordnung EIICBA miteinander verbunden. Dieses entspricht der Anordnung in den homologen Genen *glcA* und *glcB* in *S. carnosus* (Christiansen und Hengstenberg, 1996) sowie *ptsG* in *B. subtilis* (Zagorec und Postma, 1992). Die charakteristischen Phosphorylierungsstellen in *glcA* sind ebenso wie in *S. carnosus* vorhanden. Des Weiteren bestehen hohe Übereinstimmungen zu den strukturgebenden Sequenzen, die zum Modell der von Christiansen und Hengstenberg (1999) beschriebenen EIIC Domäne von *S. carnosus* führen.

4.2.2 Substratspezifität

Aufgrund ihrer Substrate werden Enzyme II in unterschiedliche Familien eingeteilt, wobei diese strukturelle Gemeinsamkeiten haben. Es gibt vier beschriebene Familien: die Glucose-Saccharose-, die Mannitol-Fructose-, die Laktose-Cellobiose- und die Mannose-Familie. Diese sind jeweils benannt nach ihrem Hauptsubstrat, welches das PTS induziert. Sie sind aber auch in der Lage, noch andere Zucker zu transportieren (Lengeler et al., 1994).

Transport von Glucose und Glucosamin

Das EII-Gen *glcA* in *S. epidermidis* hat hohe Homologien zu Genen, die für EII-Proteine der Glucose-Saccharose-Familie codieren (Tab. 3.8). Transportstudien mit radioaktiv markierten Zuckern zeigten, dass *glcA* und *glcT* in den spezifischen Transport von Glucose und Glucosamin involviert sind (3.4). Da diese Zucker typische Substrate der Glucose-Saccharose-Familie sind (Postma et al., 1993), bestätigt sich die aufgrund der Homologiesuchen vermutete Einordnung von *glcA* in diese Familie.

Für die homologen Transporter GlcA und GlcB in *S. carnosus* wurde gezeigt, dass Glucose ein Substrat ist, während Glucosamin nicht getestet wurde (Christiansen und Hengsten-

berg, 1999). Für PtsG von *B. subtilis* ist Glucose ebenfalls ein Substrat (Gonzy-Treboul et al., 1991), während es für Glucosamin ein spezifisches PTS zu geben scheint. Dies wird angenommen, da eine *ptsG*-Mutation das Wachstum mit Glucosamin nicht beeinflusst (Reizer et al., 1999). Aufgrund von Homologien wurde ein Gen *gamP* in *B. subtilis* gefunden, das in einem Gencluster zusammen mit anderen Enzymen für den Katabolismus von Glucosamin lokalisiert ist und für den spezifischen Transport von Glucosamin verantwortlich zu sein scheint (Reizer et al., 1999).

Transport von GlcNAc

Da sich die Mutanten M16 und M20 in der Ausprägung des mukoiden Phänotyps nur mit GlcNAc vom Wildtyp unterschieden, wurde erwartet, dass *glcA* und *glcT* auch in den Transport von GlcNAc involviert sind. Erstaunlicherweise wurde aber nur ein schwacher Transport von GlcNAc in die Wildtypzelle ermittelt. Die Mutanten M16 und M20 transportierten scheinbar noch weniger GlcNAc in die Zelle, allerdings kann dies bei den niedrigen Werten nicht mehr als signifikant gelten (3.4). Es kann deshalb keine Aussage darüber getroffen werden, ob GlcNAc aktiv als spezifisches Substrat über den inaktivierten Transporter GlcA transportiert wird oder nicht.

Christiansen und Hengstenberg (1999) halten GlcNAc nicht für ein Substrat von den homologen Enzymen GlcA und GlcB in *S. carnosus*. In *B. subtilis* wurde durch Homologievergleiche ein EII-Gen *nagP* entdeckt, das allerdings nur aus den beiden Domänen EIICB besteht und dessen Funktion nicht belegt ist. Eine Mutation in *ptsG* von *B. subtilis* beeinflusst den Transport von GlcNAc nicht. Dies spricht dafür, dass es in *B. subtilis* ein eigenes PTS für GlcNAc gibt, in das *nagP* involviert ist (Reizer et al., 1999). Nur in den gram-negativen Bakterien *Escherichia coli* (Peri und Waygood, 1988; Rogers et al., 1988) und *Klebsiella pneumoniae* (Vogeler und Lengeler, 1991) wurden bisher zwei GlcNAc spezifische Enzyme II, jeweils NagE genannt, funktionell beschrieben. Diese besitzen alle drei Domänen und gehören auch zur Glucose-Saccharose-Familie.

Um nachzuweisen, dass *glcA* aus *S. epidermidis* auch in den Transport von GlcNAc involviert ist, wurde versucht, den *E. coli* Stamm LR2-168dG::KanR ($\Delta ptsG manXYZ nagE$) (Mukhija und Erni, 1996), der einen nachgewiesenen Transportdefekt für GlcNAc besitzt, in trans mit *glcA* zu komplementieren. Obwohl die Gene *glcA* und *glcB* aus *S. carnosus* in einem pUC-Vektor stabil in *E. coli* K12 exprimiert werden konnten (Christiansen und Hengstenberg, 1999), gelang die Komplementierung des GlcNAc

transportdefizienten Stammes mit *glcA* aus *S. epidermidis* leider nicht. Dies lag möglicherweise daran, dass der ausgewählte pBluescript II-SK Vektor (pUC-Derivat, Fa. Stratagene) zu den Plasmiden gehört, die in hoher Kopienzahl in der Zelle vorkommen. Da eine Überexpression von membrangebundenen PTS-Proteinen häufig zu letalen Schäden an der Wirtszelle führt (Lengeler et al., 1994), könnte dies ein Grund für die negativen Ergebnisse sein. Auch gelang es nicht, *ptsG* aus *B. subtilis* stabil in *E. coli* zu etablieren (Zagorec und Postma, 1992).

4.2.3 Alternative Transportwege

Die Transportstudien haben ergeben, dass der Transport von Glucose und Glucosamin in den Mutanten M16 und M20 deutlich vermindert aber nicht völlig inhibiert ist. Dies deutet darauf hin, dass es noch alternative, *glcA* unabhängige Transportwege für diese Zucker in die Zelle gibt.

In *S. carnosus* gibt es zwei PTS-abhängige Glucose-spezifische Enzyme II (Christiansen und Hengstenberg, 1999) und auch in der Sequenz von *S. aureus* konnten zwei sehr ähnliche EII^{Glc}-Gene gefunden werden (Tab. 3.8, Abb. 3.10). Zwei solche PTS-abhängige Glucose-Permeasen scheint es in *S. epidermidis* nicht zu geben. In der nahezu vollständigen Sequenz von *S. epidermidis* RP62A in der TIGR-Datenbank, gibt es bislang keinen Hinweis auf einen zweiten Transporter dieser Art, da alle weiteren homologen EII-Gene Übereinstimmungen von nur ca. 50 % aufwiesen (3.2.2.1).

Da vor allem Glucose eine bevorzugte Quelle von Kohlenstoff und Energie ist, was durch die mit Abstand höchsten Transportraten in *S. epidermidis* 1457 unterstützt wird, werden sehr wahrscheinlich noch andere, PTS unabhängige Transportwege für diese Zucker vorhanden sein. So wurde auch in *Staphylococcus xylosus* ein alternatives Glucose-Aufnahmeprotein *glcU* gefunden (Fiegler et al., 1999).

Es werden außerdem vermutlich weitere EII-Proteine mit einem anderen Hauptsubstrat den Transport von Glucose und Glucosamin übernehmen können. Im Modell zur Funktion des Transports der Zucker über die EIIC-Domäne besteht eine bewegliche und eine unbewegliche Form der EIIC-Domäne. Substrate mit einer hohen Affinität bewirken eine Konformationsänderung in die unbewegliche Form, bei der das Substrat zwischenzeitlich in EIIC festgehalten wird. Dadurch kann es zu effektiven Kopplung von Transport und Phosphorylierung mittels der beiden anderen Domänen EIIBA kommen. Substrate mit einer niedrigen Affinität können diese Konformationsänderung nicht bewirken und

gelangen so ähnlich einer „erleichterten Diffusion“ in die Zelle (Lengeler et al., 1994). Dieser Schritt ist nicht mit einer Phosphorylierung des Substrats verbunden.

Durch Mutationen kann es zur Verschiebung der Substrataffinitäten von EII-Proteinen kommen (Lengeler et al., 1994). Aus diesem Grund könnten andere EII-Proteine zusätzlich zu ihrem Substrat Glucose oder Glucosamin transportieren.

Der Transport von Fructose wurde als Spezifitätskontrolle ermittelt, da Fructose in der Regel von EII-Proteinen der Mannitol-Fructose Familie transportiert wird. Hierbei zeigte sich, dass in den Mutanten M16 und M20 der Transport von Fructose sogar leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp ist (3.4). Hier könnte es durch den Wegfall des GlcA Proteins für den Transport von Glucose zur Veränderung der Substrataffinität eines anderen EII-Proteins gekommen sein. Dieses könnte nun Fructose zusätzlich als Substrat mit niedriger Affinität zu dem intakten putativen Haupt EII^{Fru}-Protein in die Zellen der Mutanten M16 und M20 transportieren.

Möglicherweise gelangt GlcNAc über GlcA auch als Substrat mit niedriger Affinität mittels „erleichterter Diffusion“ in die Zellen von *S. epidermidis* 1457. Dies könnte die leicht verminderten Transportraten von GlcNAc der Mutanten M16 und M20 erklären. Da bei der erleichterten Diffusion das Substrat nicht phosphoryliert wird, müsste der Beweis eines aktiven Transports von GlcNAc über GlcA über den Nachweis der Phosphorylierung von GlcNAc durch GlcA erfolgen. Ein weiteres Indiz, das gegen einen aktiven Transport von GlcNAc spricht, ist die Tatsache, dass *S. epidermidis* 1457 GlcNAc nicht im Energiestoffwechsel verwerten kann (3.5).

4.3 Antiterminator GlcT ist Transkriptionsregulator des EII-Gens *glcA*

Durch die Northern Blot Analysen konnte bewiesen werden, dass GlcT als Antiterminator die Transkription von *glcA* reguliert. Denn in der Mutante M16, in der *glcT* inaktiviert ist, fehlte das Transkript von *glcA* (Abb. 3.18). Dies bestätigte die aufgrund der gleichen phänotypischen Merkmale beider Mutanten und der vor *glcA* vorhandenen RAT-Sequenz (Abb. 3.13) getroffenen Vermutungen.

Gene für Antiterminatoren sind oft mit ihren Zielgenen verbunden (Stülke et al., 1997). Auch die homologen Gene *glcT* in *S. carnosus* (Christiansen und Hengstenberg, 1999; Knezevic et al., 2000) und *B. subtilis* (Stülke et al., 1997) befinden sich unmittelbar vor dem regulierten EII^{Glc}-Gen. In *S. epidermidis* 1457 wurde hiermit erstmalig für das PTS

zeigt, dass sich ein Antiterminator auf einem von seinem Zielgen unabhängigen Genort befindet.

In *S. aureus* scheint eine ähnliche Organisation der Gene wie in *S. epidermidis* vorzuliegen. Auch hier fand sich in der Sequenz ein homologes Gen *glcT*, das auf einem anderen Genabschnitt als die möglicherweise regulierten EII^{Glc} -Gene *glcA* oder *ptsG* liegt (3.2.2.1 und 3.2.2.2).

Termination

GlcT ist ein sogenannter Antiterminator, der die Termination der Transkription verhindert. In Bakterien gibt es zwei Möglichkeiten, die zur Beendigung der Transkription führen können, und somit regulativ auf die Genexpression wirken. (i) Bei den rho-abhängigen Terminatoren bindet das Rho-Protein an eine *rut* (*rho-utilisation*) Stelle des sich bildenden Transkripts, tritt dann als eine Art Co-Faktor mit der RNA Polymerase in Verbindung und bewirkt so die Termination (Henkin, 1996). (ii) Bei rho-unabhängigen Terminatoren handelt es sich um intrinsische Terminatoren, die aus einem G+C reichen *stem-loop* bestehen, dem eine Reihe Us folgt. Beiden Möglichkeiten gemeinsam ist, dass die RNA-Polymerase zunächst die RNA-Synthese verzögert, es so zu einer Destabilisierung des Komplexes kommt und die Polymerase anschließend abfällt (Henkin, 1996). Im Modellorganismus der gram-positiven Bakterien, *B. subtilis*, scheint die rho-abhängige Termination eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Henkin, 2000).

Antitermination

Eine Antitermination kann entsprechend der Terminationsmöglichkeiten ebenfalls in zwei prinzipiellen Arten geschehen: (i) Bei der rho-abhängigen Termination wird die Polymerase so modifiziert, dass der Terminator überlesen wird, was am besten für den lytischen Zyklus des Phagen λ beschrieben ist (Ruthberg, 1997). (ii) Für rho-unabhängige Terminatoren wurden mehrere Möglichkeiten der Antitermination beschrieben. Eine Reihe von Aminosäure-Biosynthese Operons und Aminoacyl-tRNA Synthetase Genen in gram-positiven Bakterien gehören zur T-Box Familie, bei denen die Antitermination durch Interaktion von tRNA mit der mRNA bewirkt wird. Am besten untersucht ist hier die Regulation des *trp* Operons in *Lactococcus lactis* (Henkin, 1994; Raya et al., 1998; van de Guchte et al., 2001).

Der andere gut untersuchte rho-unabhängige Mechanismus ist der, bei dem ein Protein an die mRNA bindet. Dieses Protein erkennt in der mRNA die sogenannte RAT-Sequenz,

welche die Sequenz des Terminations-*stem-loops* überlappt (Abb. 4.2 A). Die RAT-Sequenz bildet einen kleineren alternativen *stem-loop* aus, der vom Antiterminatorprotein (AT) stabilisiert wird. Dieses verhindert die Ausbildung des eigentlichen Terminations-*stem-loops* (Aymerich und Steinmetz, 1992). Die Polymerase fällt nicht ab und kann die Transkription fortsetzen (Abb. 4.2 B).

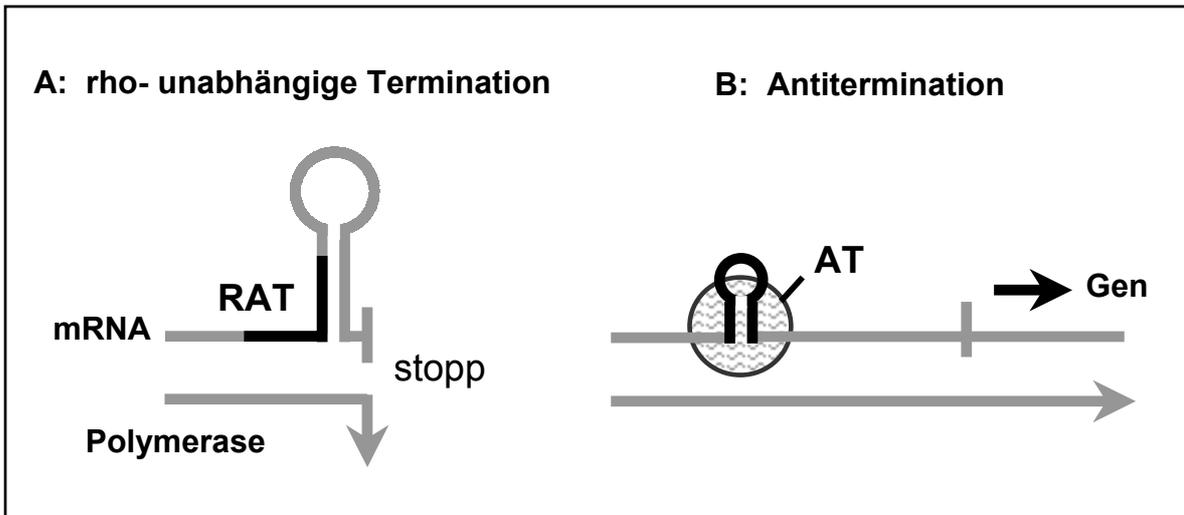


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der rho-unabhängigen Termination und Antitermination.

A Bei der rho-unabhängigen Termination bildet die mRNA einen Terminations-*stem-loop*. An diesem fällt die Polymerase ab und beendet die Transkription. Wird der Terminator durch Antitermination reguliert, findet man die spezifische RAT-Sequenz, die den Terminations-*loop* überlappt (schwarz dargestellt).

B Diese RAT-Sequenz kann einen alternativen, kleineren *stem-loop* ausbilden, der durch das Antiterminatorprotein (AT, Kreis mit grauen Wellen) stabilisiert wird. Dadurch wird die Ausbildung des großen Terminations-*stem-loops* verhindert und die Polymerase kann das Gen transkribieren.

Dieses Prinzip wurde als erstes für die Antiterminatoren BglG des *bgl*-Operons von *E. coli* (Houman et al., 1990) und SacY und die *sac* Regulons von *B. subtilis* (Crutz et al., 1990) beschrieben. Antiterminatoren mit derselben Wirkungsweise werden deshalb zur BglG/SacY-Familie zugehörig beschrieben.

Inzwischen konnte man für BglG aus *E. coli* nachweisen, dass es zusätzlich zur RNA auch mit der Polymerase interagiert (Nussbaum-Shochat und Amster-Choder, 1999). Ein anderes Antiterminatorprotein, das in Verbindung mit der mRNA tritt, ist GlpP von *B. subtilis*. Dieses unterscheidet sich deutlich von bisher beschriebenen Antiterminatoren, allerdings ist der genaue Mechanismus noch nicht bekannt (Glatz et al., 1998).

Bindung Antiterminator - RNA

Der hier beschriebene Antiterminator GlcT von *S. epidermidis* 1457 gehört wie die homologen GlcT Proteine von *B. subtilis*, *S. carnosus* und *S. aureus* zur BglG/SacY-Familie. In *S. epidermidis* 1457 ist die N-terminale RBD/CAT Domäne, die für die Bindung an die mRNA verantwortlich ist, hoch konserviert zu den beschriebenen in *B. subtilis* und *S. carnosus* (Bachem und Stülke, 1998; Knezevic et al., 2000). Es finden sich in dieser Domäne 8 von 11 Aminosäuren (Abb. 3.16), für die eine Interaktion mit der RNA nachgewiesen wurde (Manival et al., 1997; Declerck et al., 1999). Aus diesem Grund kann auch hier von einem entsprechenden Mechanismus ausgegangen werden.

Für die homologen Proteine erfolgt die Bindung an die RNA als Dimer (Langbein et al., 1999; Declerck et al., 1999; Knezevic et al., 2000), wobei die RBD/CAT Domäne entscheidend ist. Knezevic (2000) und Declerck (1999) vermuteten, dass es noch einen weiteren Bereich geben muss, der die Dimerisierung bewirkt. Dies konnte kürzlich von Van Tilbeurgh bestätigt werden, der eine Dimerisierung auch für die PRD Domänen zeigen konnte (Van Tilbeurgh et al., 2001).

Die Bindung des Proteins an die RNA erfolgt an der RAT-Sequenz. Die RAT-Sequenzen von GlcT von *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. carnosus* und *B. subtilis* sind untereinander sehr ähnlich, unterscheiden sich jedoch deutlich von denen der BglG/SacY-Familie (Abb. 3.15). Für die Bindung müssen sowohl die RAT-Sequenz als auch die RBD/CAT Domäne aufeinander abgestimmt sein (Declerck et al., 1999). Aus diesem Grund sind die Unterschiede möglicherweise eine Anpassung speziell für die Transkriptionsregulation der Glucose-Transportenzyme, die sich auch in den RBD/CAT Domänen wiederfinden. Hier zeigte sich, dass nicht alle Aminosäuren, für die bisher eine Bindung an die RNA nachgewiesen werden konnte, auch in den hier untersuchten RBD/CAT Domänen zu finden sind (Abb. 3.16). Aus diesen Gründen kann man die untersuchten RAT-Sequenzen und Antiterminatoren GlcT der hier untersuchten Stämme als eine Art Glucose-Unterfamilie von der BglG/SacY-Familie abgrenzen.

Regulation der Antiterminatoraktivität in Abhängigkeit vom PTS

Eine Regulation der Aktivität der hier beschriebenen Antiterminatoren erfolgt über PTS-abhängige Phosphorylierung. Beim Transport durch die Membran wird das Phosphat vom EII-Protein auf das Substrat übertragen. Der Antiterminator ist nicht phosphoryliert und

damit aktiv (Abb. 4.3 A). Er verhindert die Termination der Transkription, so dass die Polymerase das regulierte Gen transkribieren kann (Abb. 4.2 B).

In Abwesenheit des Substrats wird das Phosphat statt auf das Substrat auf den Antiterminator übertragen und dieser so inaktiviert (Abb. 4.3 B). Es kann sich ein Terminations-*loop* ausbilden und die Transkription des regulierten Gens wird verhindert. (Abb. 4.2 A). Hierbei ist allerdings noch ungeklärt, ob das Phosphat vom phosphorylierten EII-Protein oder von HPr auf den Antiterminator übertragen wird (Bachem und Stülke, 1998) (Abb. 4.3 B).

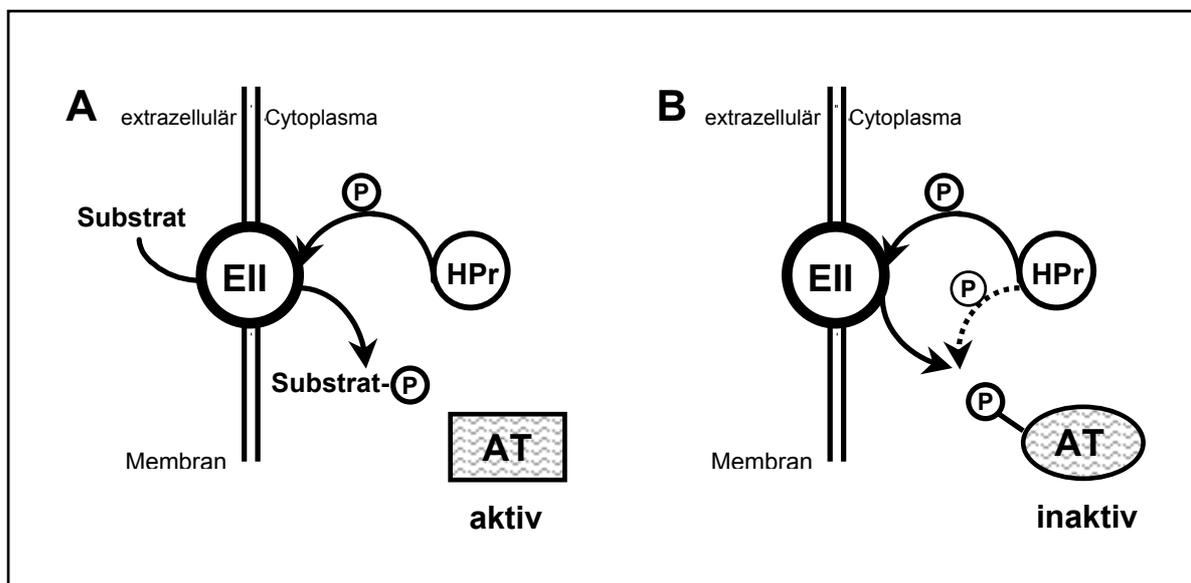


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Antiterminatoraktivität in Abhängigkeit vom PTS. **A** Wenn das Substrat vorhanden ist, wird das Phosphat über das PTS vom EII auf das Substrat übertragen. Der Antiterminator (AT) ist aktiv: das regulierte Gen wird transkribiert.

B In Abwesenheit des Substrats wird das Phosphat vom PTS auf den AT übertragen und dieser so inaktiviert. Die Transkription wird vor dem regulierten Gen am Terminations-*loop* beendet. Unklar ist bisher, ob das Phosphat vom EII-Protein oder von HPr (unterbrochene Linie) direkt auf den AT übertragen wird.

Die Antiterminatorproteine haben charakteristische, hoch konservierte, meist duplizierte Domänen, PRDs, an denen die Aktivität der Antiterminatoren PTS-abhängig über Phosphorylierung beeinflusst wird (Stülke et al., 1998). Diese beiden Domänen mit ihren charakteristischen Phosphorylierungsstellen finden sich auch in GlcT von *S. epidermidis* 1457. Auch dies weist hier auf eine entsprechende Regulation an diesen Stellen durch Phosphorylierung hin (Abb. 3.16).

Regulation anderer Gene

Da Antiterminatoren als Proteine die Transkription regulieren, bietet dieses die Möglichkeit eventuell noch andere Gene als das *glcA* Gen mit entsprechender RAT-Sequenz zu regulieren. Dieses erscheint möglich, da Antiterminatoren oft in der Lage sind, mehrere RAT-Sequenzen an unterschiedlichen Genen oder Operons zu erkennen (Declerck et al., 1999). Auch der Antiterminator GlcT von *S. carnosus* ist in der Lage, an die RAT-Sequenz vor *ptsG* in *B. subtilis* zu binden und die Termination zu verhindern (Knezevic et al., 2000). Einen Hinweis darauf, dass dies auch im hier untersuchten Fall so sein könnte, zeigen die Untersuchungen mit dem ID 32 Staph System (Tab. 3.12). Der einzige Unterschied zwischen der Mutante M16 und M20 ist, dass die Mutante M16 nicht in der Lage ist, Turanose zu verwerten. Dies könnte darauf hindeuten, dass *glcT* möglicherweise auch Gene des Turanosemetabolismus reguliert.

Eine sehr interessante Frage ist, ob *glcT* direkt die Transkription des *icaADBC* Operons beeinflussen kann. Da vor dem *icaADBC* Genort kein rho-unabhängiger Terminator mit RAT-Sequenz zu finden ist (Accession No.: U433366), schließt dies eine direkte Interaktion mit dem Antiterminator aus. Auch durch die Northern Blot Analyse konnte keine Veränderung der Transkription in der Mutante M16 im Vergleich zu den anderen Stämmen festgestellt werden (Abb. 3.20).

4.4 Expression von *glcT* und *glcA*

Da Antiterminatoren nur in geringen Konzentrationen in der Zelle vorkommen (Knezevic et al., 2000), konnte erst nach diversen Optimierungsversuchen ein Transkript von *glcT* nachgewiesen werden. Dieses war deutlich größer als *glcT* und umfasste deshalb ein weiteres Gen, wahrscheinlich den darauffolgenden ORF 3 (Abb. 3.17, Abb. 3.12). Da von Stülke et al. bisher im Northern Blot noch kein Transkript des Antiterminatorgens *glcT* aus *B. subtilis* nachgewiesen werden konnte (persönliche Mitteilung, 2001) gelang hiermit erstmalig die Darstellung der Transkription eines Antiterminatorgens.

Vor *glcA* und *glcT* befinden sich Sigmafaktor A abhängige klassische putative Promotoren. Für die Expression von *glcA* ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, in jedem Fall der Antiterminator GlcT notwendig. Im Gegensatz zu den meisten EII-Genen, die zusammen mit den Strukturgenen für ihren korrespondierenden Katabolismus angeordnet sind (Lengeler et al., 1994), steht *glcA* in *S. epidermidis* nicht im funktionellen Zusammenhang

zu umliegenden Genen. Aus diesem Grund und wegen der ermittelten Transkriptgröße von 2,4 kb wird *glcA* vermutlich monocistronisch transkribiert (Abb. 3.10, Abb. 3.18).

EII-Transporter werden in der Regel durch ihr externes Substrat induziert (Postma und Lengeler, 1985; Lengeler et al., 1994). Auch für das homologe Gen *ptsG* in *B. subtilis* wurde eine Induktion durch Glucose gezeigt (Stülke et al., 1997). Durch die Transportversuche wurde für *S. epidermidis* 1457 nachgewiesen, dass Glucose ein Substrat für GlcA ist (3.4), obwohl eine Induktion des Gens durch Zusatz von Glucose zu PYØ nicht gezeigt werden konnte (Abb. 3.19). Eine Transkription von *glcA* erfolgte schon in PYØ-Medium ohne Zuckerzusatz. Es wurde keine Veränderung der Transkriptmenge von *glcA* bei Zusatz von Glucose, GlcNAc oder Fructose beobachtet (Abb. 3.19).

Dies könnte darin begründet sein, dass es sich bei dem hier verwendeten PYØ-Medium um ein Komplexmedium handelt, das aus Pepton und Hefeextrakt besteht (2.6.4). Da Hefeextrakt ein Lyophilisat aus einem vollständigen Organismus ist, kann man vermuten, dass Glucose darin vorhanden ist. Die Überprüfung des Mediums mit einem Test auf Hexosen (Phenol-Schwefelsäure-Assay; Chaplin, 1986) bestätigte diese Vermutung. Es wurde ein Anteil von 0,5 mg/ml Hexose in PYØ ermittelt. Unter der Annahme, dass es sich hierbei hauptsächlich um Glucose handelt, entspräche dies einer Glucosekonzentration von 2,75 mM. Diese Menge scheint auszureichen, um die Transkription maximal zu induzieren, da bei Erhöhung der Zuckerkonzentration auf 0,4 % (w/v) (22 mM) keine Erhöhung der Transkriptmenge erreicht wurde. Auch bei *B. subtilis* konnte kein Unterschied in der Transkriptmenge von *ptsG* zwischen 0,1 % (5,5 mM) und 1,0 % (w/v) (55 mM) Glucose festgestellt werden (Stülke et al., 1997). Der Nachweis der Induktion von *ptsG* in *B. subtilis* geschah allerdings in chemisch definierten CSK-Medium ohne komplexe Medienbestandteile (Martin-Verstraete et al., 1990). Der Nachweis der Induktion des *glcA* Gens von *S. epidermidis* 1457 kann vermutlich ebenfalls nur in chemisch definiertem Medium erfolgen. Dies ist für *S. epidermidis* allerdings sehr problematisch, da derzeit kein geeignetes Medium zur Verfügung steht und *S. epidermidis* sehr anspruchsvoll im Nährstoffbedarf, vor allem an Vitaminen und Aminosäuren, ist (Gretler et al., 1954; Emmett und Kloos, 1975).

In *B. subtilis* wurde bei Zugabe von Fructose zum CSK-Medium keine Expression von *ptsG* festgestellt (Stülke et al., 1997). Im Gegensatz dazu wurde in *S. epidermidis* 1457 bei Zusatz von Fructose keine Veränderung des Transkriptionslevels von *glcA* beobachtet. Dies obwohl Fructose, wie durch die Transportstudien gezeigt, über ein anderes EII-

Protein transportiert wird (3.4). Dies könnte darin begründet sein, dass im Ansatz mit Fructose, wie dargelegt, noch Glucose aus dem PYØ-Medium vorhanden ist. Da Glucose eine bevorzugte Quelle für Kohlenstoff und Energie ist, wird diese ebenfalls in die Zelle transportiert werden, was die Expression von *glcA* in diesem Ansatz erklären würde. *S. epidermidis* 1457 kann Fructose allerdings ähnlich gut verwertet werden wie Glucose, denn die Wachstumskurven mit Glucose und Fructose unterscheiden sich nicht (nicht gezeigt). Da deutlich mehr Fructose (22 mM) als Glucose (~2,75 mM) im Ansatz vorhanden ist, könnte man einen Repressionseffekt durch Fructose auf den Glucose spezifischen Transport vermuten (Chambliss, 1993). Offenbar ist dies hier aber nicht der Fall.

Die beiden Gene *glcA* und *glcT* sind in den Transport von Zuckern involviert und haben damit eine essentielle Bedeutung in der Beschaffung von Zentralmetaboliten des Stoffwechsels. Aus diesem Grund ist eine Regulation auf vielfältige Weise möglich. Durch Anwesenheit der Substrate im Medium kann es zum einen zu der schon genannten Induktion spezifischer Operons kommen, zum anderen kann dies aber auch eine Repression bestimmter Gene, CCR (*carbon catabolite repression*), bewirken (Chambliss, 1993). Diese kann über globale Regulatoren erfolgen, wie z.B. das CcpA (*catabolite control protein A*), über intrazelluläre Verfügbarkeit bestimmter Katabolite, oder Operon-spezifische Regulatoren, welche die Induktion überlagern (Stülke und Hillen, 2000). Inwieweit andere Mechanismen als die zuvor diskutierten hier eine Rolle spielen, kann anhand der bisher erhobenen Daten allerdings nur spekuliert werden.

4.5 Verwertung von GlcNAc

Da *S. epidermidis* 1457 mit GlcNAc zwar einen mukoiden Phänotyp und damit eine vermehrte PIA-Menge exprimiert, diesen Zucker allerdings nur in geringen Mengen in die Zelle transportiert, wurde das Wachstum mit GlcNAc näher untersucht (3.5).

Über den genauen Metabolismus von GlcNAc in *S. epidermidis* ist bisher in der Literatur nichts beschrieben. Eine Vielzahl von Kohlenhydraten, darunter Glucose, wird von Staphylokokken aerob unter Säureproduktion verbraucht. Das Hauptprodukt aus Glucose unter aeroben Bedingungen ist Acetat (Kloos und Schleifer, 1986).

Die Säureproduktion von *S. epidermidis* 1457 aus Glucose und Glucosamin konnte durch den Farbumschlag auf den Purple-Agar Platten nachgewiesen werden, während keine Säurebildung aus GlcNAc beobachtet werden konnte (Tab. 3.11). Auch im Staphylo-

kokken-Identifikationssystem ID 32-Staph (API; bioMérieux) wird ein standardisierter biochemischer Test für die Säureproduktion aus GlcNAc benutzt, um *S. epidermidis* von anderen Staphylokokken-Spezies abzugrenzen. In diesem Test konnte *S. epidermidis* 1457 GlcNAc ebenfalls nicht verwerten (Tab. 3.12). Die Wachstumskurve mit GlcNAc zeigte einen Verlauf wie mit PYØ ohne Zuckerzusatz. Das heißt, dass der Zusatz von GlcNAc ohne Einfluss auf das Wachstum bleibt, da offensichtlich nur die Bestandteile aus PYØ zum Wachstum genutzt werden konnten (Abb. 3.22). Da nur maximal 10 % aller *S. epidermidis*-Stämme in der Lage sind, GlcNAc zu verwerten (Kloos und Bannermann, 1999), kann aus diesen Fakten geschlossen werden, dass *S. epidermidis* 1457 GlcNAc nicht im Energiestoffwechsel metabolisieren kann.

Die Stoffwechselwege für die Aminozyklerverwertung und Synthese sind am besten in *E. coli* untersucht (White und Pasternak, 1967; Plumbridge et al., 1993; Plumbridge und Vimr, 1999). Frühe Studien von White und Pasternak schlagen für *B. subtilis* einen ähnlichen Weg vor (Bates und Pasternak, 1965; White, 1968). Eine Metabolisierung von GlcNAc im Energiestoffwechsel beginnt dabei zunächst mit der Deacetylierung zu Glucosamin-6-Phosphat. (Vergleich der folgenden Umsetzungen Abb. 4.4). Es folgt eine Deaminierung zu Glucose-6-Phosphat, das dann in die Glykolyse eingeschleust wird. Das deacetylierte Glucosamin-6-Phosphat dient gleichzeitig als Vorstufe für UDP-GlcNAc, das als Vorstufe in der Zellwandsynthese von Staphylokokken benötigt wird (De Lencastre et al., 1994; Tomasz, 2000; Van Heijenoort, 2001). Einen weiteren Beweis dafür, dass GlcNAc von *S. epidermidis* nicht im Energiestoffwechsel verwertet wird, könnte in Zukunft der enzymatische Nachweis der initialen Reaktion, die Deacetylierung, liefern.

4.6 Expression des *icaADBC*-Operons

Da in den Mutanten M16 und M20 der Transport von Glucose und Glucosamin nachweislich vermindert ist, sollte hier geklärt werden, inwieweit sich dies auf die Transkription des *ica*-Operons auswirkt. Dies codiert für die Enzyme, die für die Synthese von PIA notwendig sind. Weiterhin stellte sich die Frage, ob die Überproduktion von PIA bei Zugabe von GlcNAc eine Veränderung der Transkriptmenge zur Folge hat.

Es zeigte sich, dass die Transkriptmenge von *icaADBC* in PYØ ohne Zuckerzusatz und mit Glucose oder GlcNAc sowohl im Wildtyp als auch in den beiden Mutanten gleich ist (Abb. 3.19). Von Dobinsky wurde in glucosehaltigem TSB-Medium für *S. epidermidis*

1457 zur gleichen Wachstumsphase, früh bis mittelexponentiell, ebenfalls ein maximales *icaADBC* Transkript nachgewiesen (Dobinsky und Mack, unveröffentlicht). Es scheint sowohl in die Mutanten genügend Glucose transportiert worden zu sein als auch in PYØ ausreichende Mengen von Glucose vorhanden zu sein, um das Operon zu transkribieren. Für PYØ ist die Anwesenheit von Glucose schon diskutiert wurden und anhand der Transportstudien ist zu sehen, dass in den Mutanten der Glucosetransport nicht völlig inhibiert ist. Die Inaktivierung der Glucosetransportgene *glcA* und *glcT* hat also zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Transkription von *icaADBC*.

Obwohl mit GlcNAc eine vermehrte PIA-Expression einher geht, konnte eine vermehrte Expression des *ica*-Operons mit diesem Zucker nicht gezeigt werden. Ein ähnliches Ergebnis wurde für *Lactococcus lactis* erhalten. Auch hier war die Transkription des *eps*-Operons, das dort die Biosynthesegene für die EPS codiert, unabhängig von der Zuckerquelle (Looijestijn et al., 1999).

4.7 Hypothesen für die Biosynthese von PIA mit unterschiedlichen Substraten

In dieser Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Zucker auf die Synthese des Exopolysaccharids PIA untersucht. Mit Glucosamin und GlcNAc wurde im Vergleich zu Glucose viel mehr PIA gebildet. Die Expression des für die PIA-Bildung verantwortlichen Operons blieb mit allen untersuchten Zuckern gleich. Diese Fakten deuteten darauf hin, dass es in Abhängigkeit vom Substrat mehrere Wege zur Synthese von PIA gibt.

Die Biosynthese von Exopolysacchariden vollzieht sich grundsätzlich in mehreren Stufen (Sutherland, 1982; Cerning, 1990): (i) Zunächst müssen intrazellulär EPS-Vorstufen, die Nukleotid-Zucker, gebildet werden. (ii) Mehrere dieser Vorstufen werden dann zu einer sogenannten *repeat-unit* verknüpft, was häufig auf membranverankerten Lipid-carriern geschieht. (iii) Die *repeat-units* werden durch die Membran transportiert und (iv) extrazellulär erfolgt der Zusammenbau (Polymerisierung) der *repeat-units* zum endgültigen Polysaccharid. Die Schritte (i) und (ii) der Biosynthese von EPS sind auch für die Zellwandsynthese essentiell, weshalb EPS-Synthese und Zellwand-Synthese um die Vorstufen konkurrieren (Sutherland, 1982).

Für die Synthese von PIA ist bisher bekannt, dass UDP-GlcNAc als Vorstufe mittels der Genprodukte von *icaAD*, die zusammen eine N-Acetyl-Glucosaminyltransferase-Aktivität haben, zu Oligomeren zusammen gebaut werden. Dabei scheint ein Lipid-carrier allerdings keine Rolle zu spielen (Gerke et al., 1998). Der Transport dieser Oligomere durch die Membran ist noch nicht geklärt. Möglicherweise bewirkt dies IcaC als membranständiges Protein. Allerdings zeigt IcaC keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen (Heilmann et al., 1996b). Für die Synthese von längeren Oligomeren ist IcaC in jedem Fall notwendig (Gerke et al., 1998). Auch über die extrazelluläre Polymerisation ist nichts weiter bekannt, eventuell spielt hier IcaB eine Rolle, da dies ein sekretiertes Protein ist (Heilmann et al., 1996b).

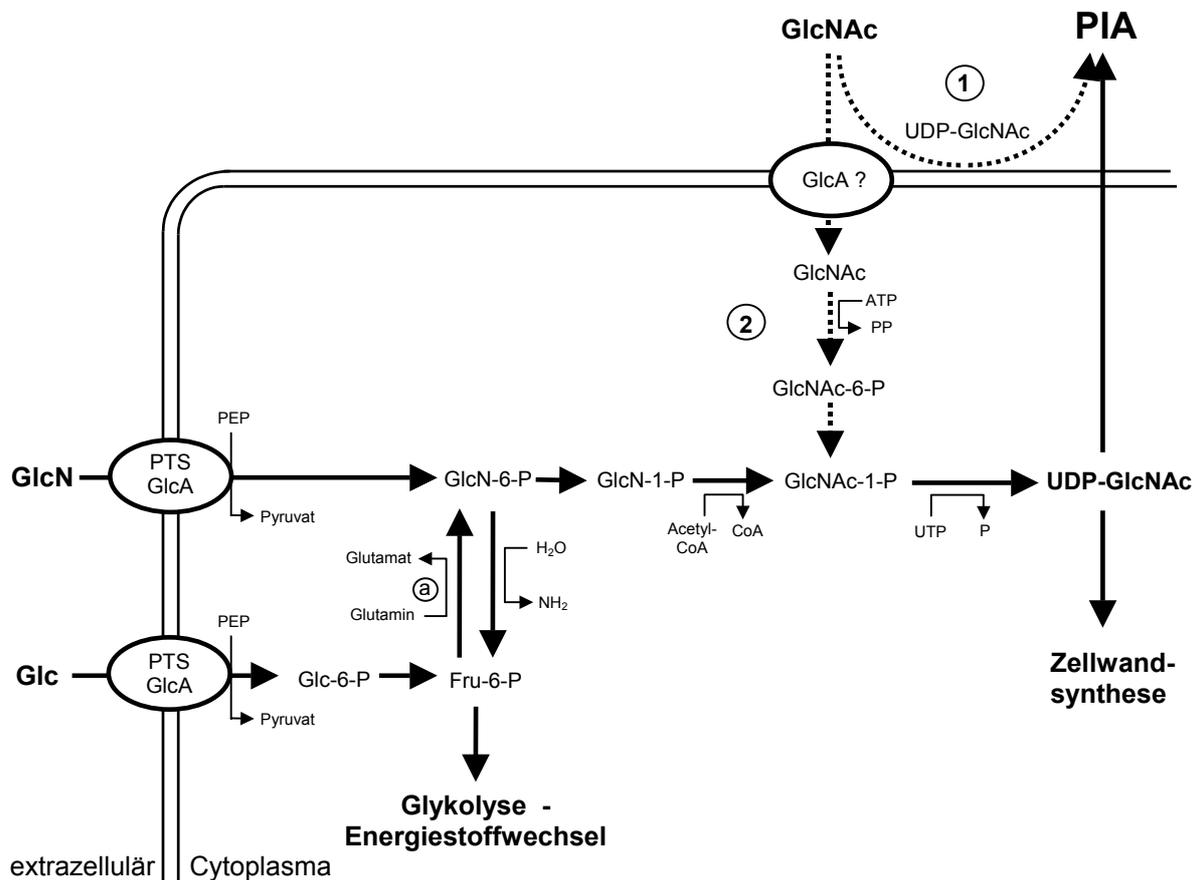


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der Verstoffwechslung von Glucose und Glucosamin in *S. epidermidis* 1457 und hypothetische Wege (1 und 2, unterbrochene Linien) für die Umsetzungen von GlcNAc in der Biosynthese von PIA. **a)** Transaminierung durch Glucosamin-6-Phosphat Synthase. Dieser Schritt wird negativ reguliert durch extrazelluläres Glucosamin und GlcNAc (Plumbridge et al., 1993). Das Schema wurde erstellt in Anlehnung an Plumbridge et al. (1993), White (1968) und Michal (1992).

In Abhängigkeit vom Zucker sind mehrere Stoffwechselwege für die Biosynthese von PIA denkbar (Abb. 4.4). Dabei wird vorausgesetzt, wie von Gerke et al. (1998) gezeigt, dass UDP-GlcNAc die Vorstufe für PIA ist. Es wird angenommen, dass die Synthese von PIA aus UDP-GlcNAc für alle Zucker gleich ist.

4.7.1 Glucose als Substrat

Glucose wird PTS abhängig über GlcA in die Zelle transportiert und wird wie in Abb. 4.4 dargestellt zu UDP-GlcNAc umgebaut. Dieses wird in der Zellwandsynthese benötigt und wird in PIA eingebaut. Parallel dazu wird Glucose natürlich im Energiestoffwechsel benötigt. PIA wird wahrscheinlich immer dann auf diesem Weg produziert, wenn Glucose im Überschuss vorhanden ist und keine anderen Kohlenhydrate zur Verfügung stehen. Diese These wird gestützt durch die Tatsache, dass Dobinsky in TSB-Medium mit Glucose ein Transkript des *icaADBC*-Operons in *S. epidermidis* 1457 in der früh- und mittel-exponentiellen Wachstumsphase beobachten konnte. Gleichzeitig konnte auch eine PIA-Synthese nachgewiesen werden (Dobinsky und Mack, unveröffentlicht). Ist Glucose nicht oder nicht ausreichend vorhanden, wird vermutlich der Weg des Energiestoffwechsels und der Zellwandsynthese bevorzugt (Sutherland, 1982). In TSB-Medium mit Glucose-limitierung konnte eine Transkription des *ica*-Operons erst in der spät-exponentiellen und stationären Wachstumsphase gezeigt werden. Allerdings konnte zu keinem Zeitpunkt eine PIA-Synthese nachgewiesen werden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass alle zur Verfügung stehenden Nukleotid-Zucker im Energiestoffwechsel und der Zellwandsynthese benötigt werden (Dobinsky und Mack, unveröffentlicht).

4.7.2 GlcNAc als Substrat

GlcNAc ist das interessanteste Substrat. Im Vergleich zu Glucose und Glucosamin werden geringere Mengen von diesem Zucker in die Zellen transportiert und GlcNAc kann nicht im Energiestoffwechsel verwertet werden. Trotzdem werden große Mengen PIA damit synthetisiert.

Zwei Möglichkeiten für den Einbau von GlcNAc in PIA sind denkbar: (i) GlcNAc wird außerhalb der Zelle durch UTP aktiviert und so direkt in das Exopolysaccharid eingebaut (Abb. 4.4 -1) oder (ii) das wenige GlcNAc, das in die Zelle gelangt, wird dort unmittelbar durch UTP aktiviert und dann in PIA eingebaut (Abb. 4.4 -2).

(i) Ein extrazellulärer Einbau erscheint möglich, da auf der Oberfläche gram-positiver Bakterien Enzyme der Glykolyse gefunden wurden. In nahezu allen Streptokokken wurden die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), die Phosphoglycerat-Kinase, die Triosephosphat-Isomerase, die Phosphoglycerat-Mutase und die α -Enolase auf der Zelloberfläche gefunden (Fischetti, 2000). Diese Enzyme sind multifunktionell. Am besten charakterisiert ist zum einen die GAPDH von Streptokokken, die auch eine Funktion in der Bindung von Fibronectin, Lysozym und den Cytoskelettproteinen Aktin und Myosin hat (Pancholi und Fischetti, 1992; 1993). Zum anderen wurde die α -Enolase gut untersucht, diese kann auch Plasminogen binden (Pancholi und Fischetti, 1998). Interessanterweise bilden alle fünf Enzyme einen Komplex, der Energie in Form von ATP produzieren kann (Fischetti, 2000). Da auf der Oberfläche von Staphylokokken, auch von *S. epidermidis*, ebenfalls eine GAPDH gefunden wurde (Modun und Williams, 1999), könnten wie auch in den Streptokokken weitere Enzyme vorhanden sein, die die Bereitstellung von Energie ermöglichen. Mit dieser Energie könnte eine Aktivierung von GlcNAc erfolgen. Möglicherweise bewirken Oberflächenenzyme auch die Polymerisierung der UDP-GlcNAc *repeat-units*. Man kann weiter spekulieren, dass IcaB als sekretiertes Protein an einem extrazellulärem Einbau beteiligt ist.

(ii) Die GlcNAc-Moleküle, die in die Zelle aufgenommen werden, gelangen vermutlich über GlcA als Substrate mit geringer Affinität mittels erleichterter Diffusion in die Zelle. Da dabei das Substrat nicht phosphoryliert wird, ist in der Zelle zunächst eine ATP-abhängige Phosphorylierung von GlcNAc nötig (Abb. 4.4 -2). Es folgt eine Isomerisierung und anschließend die Aktivierung zu UDP-GlcNAc, das in PIA eingebaut werden kann.

Um zu überprüfen, ob dieses ein möglicher Weg für die Synthese von PIA mit GlcNAc als Substrat ist, wurde abgeschätzt, ob sich die hineintransportierten GlcNAc-Moleküle in PIA wiederfinden (Tab. 4.1). Dazu wurde die Titerstufe, die bei der Quantifizierung von PIA ermittelt wurde, mit der Hexosaminmenge korreliert. Die Hexosaminmenge in PIA wurde dann mit der Menge der transportierten Zuckermoleküle verglichen.

Im Folgenden werden die Voraussetzungen und Annahmen für die Berechnungen dargelegt. Der verwendete Koagglutinationstest hatte eine Sensitivität von $0,28 \text{ nmol ml}^{-1}$ Hexosamin (Krokotsch, 1998). Die Sensitivitätsbestimmung basierte auf einem Hexosaminassay, bei dem acetylierte Hexosamine zunächst deacetyliert wurden (Hancock und Poxton, 1988). Es wurden die PIA-Titer verwendet, die für die Zellen aus stationärer

Flüssigkultur ermittelt worden waren (Abb. 3.5). Dies geschah, da diese Bedingungen am ehesten mit denen der Transportversuche verglichen werden können. Für die Transportversuche wurde eine Proteinmenge bei einer OD_{578} von 3,0 von ca. 0,3 mg/ml ermittelt. Da für die PIA-Bestimmung die OD_{578} auf 2,5 eingestellt wurde, wird hier von derselben Proteinmenge ausgegangen.

Tab. 4.1: Vergleich der Hexosaminmenge in PIA mit GlcNAc als Substrat und der Menge in die Zellen transportierter GlcNAc-Moleküle [nmol mg^{-1}]

Stamm	Stationäre Flüssigkultur nach 20 h		Agarplatte nach 48 h	
	Hexosamin in PIA	transportiertes GlcNAc*	Hexosamin in PIA	transportiertes GlcNAc**
1457	476	769	943	1814
M16	237	342	59	806
M20	118	342	29	806

*unter der Annahme eines konstanten Transports über 20 Stunden oder

** über 48 Stunden aus den Transportraten (Tab. 3.10) berechnet

In stationärer Flüssigkultur ergibt sich bei einem reziproken PIA-Titer von 512 für den Wildtyp *S. epidermidis* 1457 nach 20 Stunden eine Hexosaminmenge von 476 nmol mg^{-1} in PIA (Tab. 4.1). Unter der Annahme, dass die Aufnahme der Zucker über 20 Stunden konstant bleibt, errechnet sich mittels der Transportraten (Tab. 3.10) eine aufgenommene GlcNAc-Menge von 769 nmol mg^{-1} nach 20 Stunden. Das bedeutet, dass mehr GlcNAc-Moleküle in die Zellen gelangen als in PIA wiedergefunden werden. Es könnten demnach alle in die Zelle transportierten GlcNAc-Moleküle in PIA eingebaut werden.

Mit demselben Rechenmodell wurde auch für die Mutanten M16 und M20 die Hexosaminmenge in PIA und die transportierte GlcNAc-Menge nach 20 Stunden berechnet und verglichen (Tab. 4.1). Auch hier zeigte sich, dass mehr GlcNAc-Moleküle in die Zelle transportiert wurden als in PIA wiedergefunden werden.

Aufgrund des Wachstumsverlaufs in einer statischen Kultur, bei der die Zellen nach einer bestimmten Zeit in die stationäre Phase eintreten, ist die Aufnahme der Zucker über 20 Stunden vermutlich nicht konstant. Für die folgende Berechnung wird angenommen, dass die Zellen nach 8 Stunden die stationäre Phase erreichen (Vergleich Wachstums-

kurven Abb. 3.22) und ab da weniger transportieren. Bei einem konstanten Transport über 8 Stunden errechnet sich aus den Transportraten für den Wildtyp *S. epidermidis* 1457 eine Menge von 302 nmol mg^{-1} aufgenommenes GlcNAc. Nach 20 Stunden wird in PIA eine Hexosaminmenge von 476 nmol mg^{-1} gefunden. Auch unter dieser Annahme kann man davon ausgehen, dass innerhalb der nächsten 12 Stunden soviel GlcNAc in die Zelle transportiert wird, dass es in PIA eingebaut werden kann.

Wenn man diese Berechnungen auch für die Zellen von den Agarplatten vornimmt, ergibt sich ebenfalls, dass annähernd alle hineintransportierten Moleküle in PIA wiedergefunden werden (Tab. 4.1). Allerdings sind diese Berechnungen grobe Annäherungen. Der konstante Transport über die Zeit ist anzuzweifeln und die Bedingungen auf den Agarplatten sind nicht mit denen in Flüssigkultur zu vergleichen.

Mit allen Rechenmodellen wurde ermittelt, dass die GlcNAc-Moleküle, die in die Zellen transportiert wurden, ausreichen, um daraus PIA zu bilden. Diese Daten deuten daraufhin, dass eine Aktivierung von GlcNAc durch UTP innerhalb der Zelle erfolgen kann.

4.7.3 Glucosamin als Substrat

Glucosamin wird ebenfalls PTS abhängig über GlcA in die Zelle transportiert (Abb. 4.4). Es kann sowohl im Energiestoffwechsel verwertet werden als auch gleichzeitig direkt zu UDP-GlcNAc umgebaut werden. Experimentell konnte aufgrund der sehr starken Verklumpungen der Zellen mit diesem Zucker leider weder Wachstumskurven ermittelt werden, noch gelang es, geeignete RNA zu extrahieren. Doch zeigten die Transportstudien, dass Glucosamin in deutlich größeren Mengen als GlcNAc in die Zellen transportiert wird und es zeigte sich auf Purple-Agar Platten ein Farbumschlag, der auf Verwertung von Glucosamin im Energiestoffwechsel schließen lässt (Tab. 3.11). Berechnet man für den Wildtyp wie für GlcNAc die Wiederfindung von hineintransportierten Glucosamin in PIA, stellt man fest, dass deutlich mehr Glucosamin in die Zelle transportiert wird als in PIA wiedergefunden wird. Auch dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass Glucosamin im Energiestoffwechsel genutzt wird.

4.8 Mögliche Ursachen der phänotypischen Beobachtungen

Diese Arbeit begann mit der Beobachtung eines mukoiden Phänotyps auf der Agarplatte. Dieser Phänotyp konnte im Wildtyp *S. epidermidis* 1457 nur mit den beiden Amino-

zuckern Glucosamin und GlcNAc induziert werden. Die Mutanten M16 und M20 waren mit Glucosamin mukoid, mit GlcNAc mukoid-negativ. Es stellte sich heraus, dass der mukoid Phänotyp mit der Expression großer Mengen PIA einher ging. Es soll nun versucht werden, diese phänotypischen Beobachtungen mit Hilfe der im Laufe der Arbeit gewonnenen und zuvor diskutierten Erkenntnisse zu erklären.

Expression eines mukoiden Phänotyps auf der Agarplatte

Die Expression eines mukoiden Phänotyps von *S. epidermidis* 1457 ist sehr wahrscheinlich abhängig von der PIA-Menge pro Zelle. Erst ab Titerstufen von 512, die einer Hexosaminmenge von 471 nmol mg⁻¹ Protein entsprechen, wird ein mukoider Phänotyp beobachtet (Tab. 4.2). Mit einer Titerstufe von 64, das entspricht einer Hexosaminmenge von ungefähr 59 nmol mg⁻¹, wird kein mukoider Phänotyp beobachtet. Zwischen 59 und 471 nmol mg⁻¹ liegt eine Grenze, ab welcher der mukoid Phänotyp sichtbar wird.

Tab. 4.2: Expression eines mukoiden Phänotyps in Abhängigkeit vom PIA-Titer und der sich daraus ergebenden Hexosaminmenge pro mg Protein

Stamm	Glc			GlcN			GlcNAc		
	mukoid	Hexosamin [nmol mg ⁻¹]	PIA- Titer*	mukoid	Hexosamin [nmol mg ⁻¹]	PIA- Titer	mukoid	Hexosamin [nmol mg ⁻¹]	PIA- Titer
1457	-	15	16	+	1886	2048	+	944	1024
M16	-	15	16	+	471	512	-	59	64
M20	-	15	16	+	471	512	-	29	32

* Titer sind mit reziproken Werten angegeben. (+) mukoid (-) mukoid-negativ

Vermehrte PIA-Synthese mit Glucosamin und GlcNAc

Mit Glucosamin wird sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten ein mukoider Phänotyp exprimiert. Im Vergleich zu den anderen Zuckern wird mit Glucosamin am meisten PIA synthetisiert. Glucosamin kann wie zuvor dargelegt, sowohl für die Synthese von PIA als auch im Energiestoffwechsel verwertet werden. Der Schritt, aus UDP-GlcNAc PIA zu synthetisieren, ist energieaufwendig, aber für alle untersuchten Zucker gleich. Unterschiede bestehen in den Umsetzungen der jeweiligen Zucker zu UDP-GlcNAc (Abb. 4.4). Die Synthese von UDP-GlcNAc aus Glucosamin hat gegenüber der Synthese aus Glucose den Vorteil, dass zwei enzymatische Umsetzungen wegfallen. Dies ist eine Isomerisierung

und die Transaminierung zu Glucosamin-6-Phosphat (Abb. 4.4 a). Die Transaminierung könnte der entscheidende Faktor sein, da auch Aminosäuren die Synthese eines mukoiden Phänotyps induzieren. Durch das Vorhandensein großer Mengen Aminosäuren wird diese Umsetzung vermutlich begünstigt, da die Zelle die Aminosäuren nicht neu synthetisieren muss. Zudem wird dieser Schritt durch extrazelluläres Glucosamin und GlcNAc negativ reguliert (Plumbridge et al., 1993). Intrazelluläres Glucosamin-6-Phosphat hat dagegen nur einen äußerst geringen negativen Regulationseffekt. Entgegen der Regulation in der eukaryontischen Zelle weist auch UDP-GlcNAc keinen allosterischen Hemmeffekt auf die Glucosamin-Phosphat-Synthase auf (Plumbridge et al., 1993). Insgesamt steht mit Glucosamin mehr Energie zur PIA-Synthese zur Verfügung als mit GlcNAc, das nicht im Energiestoffwechsel verwertet werden kann. Aufgrund dessen wird mit Glucosamin vermutlich am meisten PIA synthetisiert.

Da GlcNAc nicht im Energiestoffwechsel verwertet werden kann, muss die Zelle in den hier untersuchten Ansätzen zum Energiegewinn auf die Bestandteile aus PYØ zurückgreifen. Durch die Transkription des *glcA*-Gens in diesem Medium und den Hexoseassay konnte gezeigt werden, dass in PYØ Hexosen vorhanden sind (4.4). Bei der Synthese von UDP-GlcNAc aus GlcNAc muss ebenfalls keine Transaminierung mehr erfolgen. Dieser Schritt wird zudem durch die Anwesenheit von externen GlcNAc negativ reguliert (Plumbridge et al., 1993). Im Gegensatz zu Glucosamin fallen aber noch zwei weitere enzymatische Umsetzungen weg. Und auch für die Zellwandsynthese muss UDP-GlcNAc nicht aufwendig aus Glucose synthetisiert werden. Dies könnten Vorteile sein, die eine PIA-Synthese aus GlcNAc gegenüber Glucose begünstigt. Dabei reicht offensichtlich die Hexosemenge in PYØ aus, im Wildtyp genügend Energie zur Verfügung zu stellen, um PIA in den ermittelten Mengen zu produzieren.

Mukoid-negativer Phänotyp der Mutanten M16 und M20 mit GlcNAc – mukoider Phänotyp mit Glucosamin

Die größten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den Mutanten M16 und M20 wurden auf den PYØ-Agarplatten mit GlcNAc beobachtet. Betrachtet man hier in den Mutanten die Wiederfindung von hineintransportierten GlcNAc in PIA unter der Voraussetzung eines konstanten Transports über 48 Stunden, findet man nur einen Bruchteil der Moleküle in PIA wieder (Tab. 4.1). Diese Berechnungen sind nur Annäherungen, denn die Bedingungen auf den Agarplatten sind nicht mit denen in Flüssigkultur zu vergleichen. Es

herrschen hier andere physiologische Voraussetzungen für die Zellen. Möglicherweise ist die Substratverfügbarkeit nicht optimal oder es kommen andere regulative Einflüsse zur Geltung. Dieses wirkt sich offenbar auf die PIA-Synthese aus.

In den Mutanten M16 und M20 ist im Gegensatz zum Wildtyp nachweislich der Transport von Glucose vermindert. Die Mutanten müssen beim Wachstum mit GlcNAc zum Energiegewinn auf Glucose aus dem PYØ-Medium zurückgreifen. Unter der Annahme, dass es sich bei der ermittelten Hexosemenge in PYØ hauptsächlich um Glucose handelt, wurde eine Menge von 2,75 mM ermittelt. Dies ist 10-mal mehr Glucose als in den Transportansätzen (0,2 mM) vorhanden war. Das heißt, man kann auch hier von einem um den Faktor 11 verminderten Transport von Glucose in die Mutanten ausgehen.

Die Transportrate von GlcNAc in die Mutanten ist ebenfalls geringer. Dieses führt insgesamt zu weniger Molekülen, die in PIA eingebaut werden können. Zudem würden das wenige in die Zelle gelangte GlcNAc wegen des Glucose-Mangels wahrscheinlich eher in die Zellwandsynthese als die PIA-Synthese fließen. Aufgrund des verringerten Glucosetransports steht den Zellen insgesamt weniger Energie zur PIA-Synthese bereit. Diese Faktoren scheinen auf den Agarplatten eine größere Auswirkung zu haben als in Flüssigkultur, wo mehr PIA unter den gleichen Bedingungen gebildet wird.

Die Mutanten M16 und M20 sind mit Glucosamin mukoid, obwohl sie einen Defekt im Glucosamintransport haben. Wie bereits ausgeführt kann mit Glucosamin Energie gewonnen werden und Glucosamin kann unter günstigeren Bedingungen zu UDP-GlcNAc umgesetzt werden als Glucose. In die Mutanten M16 und M20 wird in den Ansätzen mit Glucosamin genauso viel Glucose aus PYØ transportiert, wie in den Ansätzen mit GlcNAc. Doch wird mehr Glucosamin als GlcNAc in die Zellen transportiert. Dieses Glucosamin kann zusätzlich energetisch verwertet werden. Dies scheint auszureichen, um auch in den Mutanten genügend Energie für die Synthese von PIA in der beobachteten Menge bereitzustellen.

Zusammenfassend kann damit der mukoid-negative Phänotyp auf den Agarplatten auf einen relativen Energiemangel zurückgeführt werden.

Sicherlich spielen aber noch andere, vor allem regulative Faktoren eine Rolle. Dies können zum einen Faktoren sein, die im allgemeinen Stoffwechsel wirken. Inwieweit sich dabei die Konzentrationen intrazellulärer Metabolite auf die Synthese von PIA auswirken, kann anhand dieser Daten nur spekuliert werden. Es können zum anderen aber auch Regulationsfaktoren wirken, die insbesondere Einfluss auf die PIA-Synthese oder

Biofilmbildung haben. So sind unter 1.3.3 einige beschrieben, deren genaue Wirkungsweise aber nur teilweise bekannt ist (Mack et al., 2000; Knobloch 2000; Bartscht, 2001; Knobloch et al., 2001).

4.9 Ausblick

Der genaue Weg der PIA-Synthese ist nach wie vor nicht geklärt, es haben sich aber in dieser Arbeit einige interessante Aspekte ergeben, deren weitere Untersuchung entscheidende Anhalte geben könnten. Offensichtlich sind Glucosamin und GlcNAc gute Substrate für die PIA-Bildung. Die Frage, die sich jetzt stellt, ist, wo bekommen die Bakterien, diese Kohlenhydrate *in vivo* her? Möglicherweise aus menschlichen Glykoproteinen, in denen in große Mengen GlcNAc vorkommen. Oder aus Glycosaminoglycanen (GAGs) der extrazellulären Matrix von eukaryontischen Zellen. GAGs sind proteinverknüpfte, lange, unverzweigte Polysaccharidketten aus Disaccharideinheiten, wobei GlcNAc häufig einer der Zuckerbestandteile ist (Alberts et al., 1990). Möglicherweise nutzt *S. epidermidis* die Reste, die beim Zelltod anfallen, vielleicht können sie aber auch aktiv GlcNAc aus diesen Verbindungen abspalten. Eine Interaktion von pathogenen Bakterien mit GAGs wurde bereits nachgewiesen (Wadström und Ljungh, 1999). Möglicherweise ist dies ein entscheidender Punkt, der eine PIA-Bildung und damit eine Infektion mit *S. epidermidis* begünstigt.

Dies gilt es in Zukunft zu klären, genauso wie die Fragen, ob GlcNAc aktiv über GlcA transportiert wird oder nicht, wo die Aktivierung von GlcNAc tatsächlich stattfindet und wie der Einbau in PIA verläuft. Eine große Anzahl weiterer mukoid-negativer Mutanten, deren Transposoninsertion weder in *glcA* noch in *glcT* liegt, wurden bereits generiert. Die Analyse dieser Mutanten könnte weitere Anhaltspunkte für die Biosynthese bzw. die Überproduktion von PIA geben. Mit dem Wissen dieser Sachverhalte kann dann eine Strategie entwickelt werden, um in Zukunft Infektionen mit *S. epidermidis* besser therapieren zu können oder gar zu verhindern.

5 Zusammenfassung

Staphylococcus epidermidis gehört zur Flora der menschlichen Haut und ist normalerweise apathogen. Durch seine Fähigkeit zur Besiedlung von Kunststoffoberflächen führt dieser Keim zu Infektionen mit implantierten Fremdkörpern, wie z.B. Kathetern, Herzschrittmachern oder Gelenkprothesen. Dabei ist die Ausbildung eines Biofilms ein wichtiger Pathogenitätsfaktor. Die Mechanismen, die zur Entstehung des Biofilms führen, sind vielfältig und bisher noch nicht vollständig geklärt. Ein entscheidender Faktor dabei ist die Matrix der Biofilme, bestehend aus der Glykokalyx von *S. epidermidis*.

Diese Arbeit untersuchte den für *S. epidermidis* ungewöhnlichen mukoiden Phänotyp, um neue Erkenntnisse zur EPS-Produktion und Glykokalyx zu erhalten. Es wurden Faktoren gesucht, die den mukoiden Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 induzieren. Der genetische Hintergrund der beiden mukoid-negativen Tn917-Transposonmutanten M16 und M20 wurde ermittelt.

Ein mukoider Phänotyp konnte nur auf peptonhaltigen Medien, die mit den Aminoazuckern Glucosamin oder N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) supplementiert wurden, induziert werden. Dabei waren die Mutanten mit GlcNAc mukoid-negativ, mit Glucosamin allerdings weiterhin mukoid. Mit einem Medium, das den mukoiden Phänotyp nicht induziert, wurde durch Zugabe von Aminosäuren und Glucosamin ebenfalls ein mukoider Phänotyp beobachtet. Die Biofilmbildung war in den Mutanten M16 und M20 mit GlcNAc, wenn sie mukoid-negativ waren, vermindert. Es konnten nur die *S. epidermidis*-Stämme einen mukoiden Phänotyp ausprägen, die einen intakten, für die Synthese des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (PIA) verantwortlichen *icaADBC*-Genort aufwiesen.

Der mukoide Phänotyp war korreliert mit der Expression sehr großer Mengen des Polysaccharids PIA. Die Bildung von PIA, dessen Bedeutung für die Biofilmbildung und Pathogenität von *S. epidermidis* bereits belegt wurde, wird damit durch die Aminoazucker Glucosamin und GlcNAc, sowie großer Mengen von Stickstoff begünstigt.

Die Genorte der Transposoninsertionen in den Mutanten M16 und M20 wurden kloniert und sequenziert. Die Transposoninsertionen lagen auf zwei unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Genorten. Es waren zwei in *S. epidermidis* unbeschriebene Gene des Phosphoenolpyruvat: Zucker Phosphotransferase Systems (PTS) betroffen.

In der Mutante M20 wurde *glcA*, welches das Glucose spezifische Enzym II (EII) codiert, getroffen. In der Mutante M16 inserierte Tn917 im Antiterminatorgen *glcT*. Die Inaktivierung dieser Gene wurde durch Genexpressionsanalysen im Northern Blot bewiesen. Dabei konnte erstmalig das Transkript eines Antiterminatorgens dargestellt werden. Das EII-Gen *glcA* wird entgegen vieler anderer EII-Gene monocistronisch transkribiert. Es ist nicht in einem Operon mit anderen Genen des korrespondierenden Zuckerkatabolismus oder anderen PTS-Genen angeordnet.

Antiterminatoren regulieren die Transkription von dazugehörigen EII-Genen, wobei sie die sogenannte RAT (*ribonucleic antiterminator*) Sequenz vor dem EII-Gen erkennen. Bei allen bisher beschriebenen funktionellen Antiterminator-EII Paaren sind die dafür codierenden Gene miteinander verbunden. Mit *glcA* und *glcT* konnte hier erstmals ein Antiterminator-EII Paar beschrieben werden, bei dem die codierenden Gene auf voneinander unabhängigen Genorten lokalisiert sind. Die vor *glcA* zu findende RAT-Sequenz und das fehlende Transkript des EII-Gens *glcA* in der Mutante M16, in der der Antiterminator inaktiviert war, bewies die Interaktion der beiden Gene.

Durch den signifikant verminderten Transport von Glucose und Glucosamin in die Mutanten M16 und M20 konnte eine Funktion von *glcA* und *glcT* im spezifischen Transport dieser beiden Zucker nachgewiesen werden. Da beide Mutanten mit GlcNAc mukoid-negativ waren, wurde ein ebenfalls verminderter Transport für GlcNAc erwartet. Erstaunlicherweise transportierte sogar der Wildtyp nur sehr geringe Mengen dieses Zuckers, obwohl er große Mengen des Polysaccharids PIA damit produzierte. Tests auf Säureproduktion aus GlcNAc und Wachstumskurven mit diesem Zucker ergaben, dass *S. epidermidis* 1457 GlcNAc nicht im Energiestoffwechsel verwerten kann. Wahrscheinlich gelangt GlcNAc über das EII-Protein GlcA als Substrat mit geringer Affinität mittels „erleichterter Diffusion“ in die Zelle. GlcNAc wird vermutlich intrazellulär aktiviert und in PIA eingebaut. Zum Energiegewinn müssen die Bakterien allerdings auf andere Bestandteile des Mediums zurückgreifen. In dem hier verwendeten PYØ-Medium ist nachweislich Hexose vorhanden. Da die Mutanten M16 und M20 eine verminderte Transportrate für Glucose haben, steht ihnen hier weniger Glucose zum Energiegewinn zur Verfügung als dem Wildtyp. Der mukoid-negative Phänotyp der Mutanten M16 und M20 mit GlcNAc ist damit vermutlich auf einen relativen Energiemangel zurückzuführen.

6 Literaturverzeichnis

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J.D. (1990)**
Die extrazelluläre Matrix. In Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson J.D. (eds). *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim: 956-963
- Archer G.L., and Climo M.W. (1994)**
Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci; *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2231-2237
- Archer G.L., Thanassi J.A., Niemeyer D.M., and Pucci M.J. (1996)**
Characterization of IS1272, an insertion sequence-like element from *Staphylococcus haemolyticus*; *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 924-929
- Aymerich S., and Steinmetz M. (1992)**
Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/SacY family; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 10410-10414
- Bachem S., and Stülke J. (1998)**
Regulation of the *Bacillus subtilis* GlcT antiterminator protein by components of the Phosphotransferase System; *J. Bacteriol.* 180: 5319-5326
- Bailey E. M., Constance T. D., Albrecht L. M., and M. J. Rybak (1990)**
Coagulase-negative staphylococci. Incidence, pathogenicity, and treatment in the 1990s. *DICP Ann. Pharmacother.* 24: 714-720
- Baldassarri L., Donelli G., Gelosia A., Voglino M. C., Simpson A. W., and Christensen G. D. (1996)**
Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigene and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infect. Immun.* 64: 3410-3415
- Banerjee S. N., Emori T.G., and Culver D.H. (1991)**
Secular trends in nosocomial primary blood-stream infections in the United States, 1980 - 1989. *Am. J. Med.* 91 (Suppl. 3B): 86-89
- Bartscht K. (2001)**
Adhäsion von *Staphylococcus epidermidis* an Oberflächen: Charakterisierung einer Biofilm-negativen Transposonmutante, Dissertation im Fachbereich Biologie, Universität Hamburg
- Bates C.J., and Pasternak C.A. (1965)**
Further studies on the regulation of aminosugar metabolism in *Bacillus subtilis*; *Biochem. J.* 96: 147-154
- Bernhard P., Gabant P., Bahassi E.M., and Couturier M. (1994)**
Positive selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene; *Gene* 148: 71-74

Birnbaum and Doly (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; Nucleic Acid Res. 7: 1513

Boucher J.C., Mudd M.H., and Deretic V. (1997)

Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection; Infect. Immun. 65: 3838-3846

Boucher J.C., Schurr M.J., and Deretic V. (2000)

Dual regulation of mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* and sigma factor antagonism; Mol. Microbiol. 36: 341-351

Bradford M. M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; Analytical Biochemistry 72: 248-254

Buhr A., Flükiger K., and Erni B. (1994)

The glucose transporter of *Escherichia coli*; J. Biol. Chem. 269: 23437-23443

Cerning J. (1990)

Exocellular Polysaccharides produced by lactic acid bacteria; FEMS Microbiol. Rev. 87: 113-130

Chaillou S., Postma P.W., and Pouwels P.H. (2001)

Contribution of the phosphoenolpyruvate: mannose phosphotransferase system to carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*; Microbiology 147: 671-679

Chambliss G.H. (1993)

Carbon source mediated catabolite repression. In: *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria; Sonnenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (eds); ASM Press, Washington D.C: 213-219

Chaplin M.F. (1986)

Monosaccharides. In: Chaplin M.F., and Kennedy J.F. (eds). Carbohydrate analysis. IRL Press, Oxford: 1-36

Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., and Beachey E.H. (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: 996-1006

Christensen G.D., Barker L.P., Mawhinney T.P., Baddour L.M., and Simpson W.A. (1990)

Identification of an antigenic marker of slime production of *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immun. 58: 2906-2911

- Christiansen I., and Hengstenberg W. (1996)**
Cloning and sequencing of two genes from *Staphylococcus carnosus* coding for glucose-specific PTS and their expression in *Escherichia coli* K-12; Mol. Gen. Genet. 250: 375-379
- Christiansen I., and Hengstenberg W. (1999)**
Staphylococcal phosphoenolpyruvate- dependent phosphotransferase system - two highly similar glucose permeases in *Staphylococcus carnosus* with different glucoside specificity: protein engineering *in vivo* ?; Microbiology 145: 2881-2889
- Cochrane D.M.G., Brown M.R., Anwar H., Weller P.H., Lam K., Costerton J.W. (1988)**
Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. J. Med. Microbiol. 27: 255-261
- Costerton J.W., Stewart P.S., and Greenberg E.P. (1999)**
Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections; Science 284: 1318-1322
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., and Lappin-Scott H.M. (1995)**
Microbial biofilms; Annu. Rev. Microbiol. 49: 711-745
- Cramton S.E., Gerke C., Schnell N.F., Nichols W.W., and Götz F. (1999)**
The intercellular adhesion locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation; Infect. Immun. 67: 5427-5433
- Cramton S.E., Ulrich M., Götz F., and Döhring G. (2001a)**
Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*; Infect. Immun. 69: 4079-4085
- Cramton S.E., Gerke C., and Götz F. (2001b)**
In vitro methods to study staphylococcal biofilm formation; Meth. Enzymol. 336: 239-255
- Crutz A.M., Steinmetz M., Aymerich S., Richter R., and Le Coq D. (1990)**
Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system; J. Bacteriol. 172: 1043-1050
- Cryer D.R., Eccleshall R., and Marmur J. (1975)**
Isolation of yeast DNA; In Prescott, D.M.(ed.), Methods in Cell Biology 12: 39-44
- Davey M.E., and O'Toole G.A. (2000)**
Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics; Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 847-867
- De Lencastre H., De Jonge B.L., Matthews P.R., and Tomasz A. (1994)**
Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*; J. Antimicrob. Chemother. 33: 7-24

Declerck N., Vincent F., Hoh F., Aymerich S., and van Tilbeurgh H. (1999)

RNA recognition by transcriptional antiterminators of the BglG/SacY family: functional and structural comparison of the CAT domain from SacY and LicT; J. Mol. Biol. 294: 389-402

Deighton M., and Borland R. (1993)

Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation; Infect. Immun. 61: 4473-4479

Dobinsky S., and Mack D. (2001)

Efficient method for isolation of RNA from *Staphylococcus epidermidis* biofilm cultures; Meth. Enzymol. 336: 255-262

Edwards K.J., Bond P.L., Gihiring T.M., and Bahnfield J. (2000)

An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage; Science 287: 1796-1799

Emmett M., and Kloos W.E. (1975)

Amino acid requirements of staphylococci isolated from human skin; Can. J. Microbiol. 21: 729-733

Erni B., and Zanolari B. (1986)

Glucose-permease of the bacterial phosphotransferase system; J. Biol. Chem. 261: 16398-16403

Feinberg A.P., and Vogelstein B. (1983)

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific Activity; Anal. Biochem. 132: 6-13

Feinberg A.P., and Vogelstein B. (1984)

A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum; Anal. Biochem. 137: 266-267

Fischetti V.A. (2000)

Surface proteins on gram-positive bacteria. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., and Rood J.I. (eds.). Gram-Positive Pathogens. ASM Press Washington D.C.: 11-24

Fiegler H., Bassias J., Jankovic I., and Brückner R. (1999)

Identification of a gene in *Staphylococcus xylosus* encoding a novel glucose uptake protein; J. Bacteriol. 181: 4929-4936

Fleming H.C. (1993)

Biofilms and environmental protection; Water Sci. Technol. 27: 1-10

Fowler Jr. V.G., Fey P.D., Reller B., Chamis A.L., Corey G.R., and Rupp M.E. (2001)

The intercellular adhesin locus *ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints; Med. Microbiol. Immunol. 189: 127-131

Franson T.R., Sheth N.K., Rose H.D., and Sohnle P.G. (1984)

Scanning electron microscopy of bacteria adherent to intravascular catheters; J. Clin. Microbiol. 20: 500-505

Gacesa P. (1998)

Bacterial alginate biosynthesis - recent progress and future prospects; Microbiology 144: 1133-1143

Gerke C., Kraft A., Süßmuth R., Schweitzer O., and Götz F. (1998)

Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin; J. Biol. Chem. 273: 18586-18593

Gilbert P., Das J., and Foley I. (1997)

Biofilm susceptibility to antimicrobials; Adv. Dent. Res. 11: 160-167

Glatz E., Persson M., and Ruthberg B. (1998)

Antiterminator protein GlpP of *Bacillus subtilis* binds to *glpD* leader mRNA; Microbiology 144: 449-456

Gonzy-Tréboul G., Zagorec M., Rain-Guion M.C., and Steinmetz M. (1989)

Phosphoenolpyruvat: sugar phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH* and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon; Mol. Microbiol. 3: 103-112

Gonzy-Tréboul G., de Waard J.H., Zagorec M., and Postma P.W. (1991)

The glucose permease of the phosphotransferase system of *Bacillus subtilis*: evidence for II^{Glc} and II^{Glc} domains; Mol. Microbiol. 5: 1241-1249

Gretler A.C., Mucciolo P., Evans J.B., and Niven Jr. C.F. (1954)

Vitamin nutrition of the staphylococci with special reference to their biotin requirements; J. Bacteriol. 70: 44-49

Gross M., Cramton S.E., Götz F. und Peschel A. (2001)

Key role of teichonic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces; Infect. Immun. 69: 3423-3426

Hancock I.C., and Poxton I.R. (1988)

General methods, Appendix 1. In: Hancock I.C., and Poxton I.R. (eds). Bacterial cell surface techniques; John Wiley & Sons, Chichester: 269-281

Heilmann C., Gerke C., Pedreau-Remington F., and Götz F. (1996a)

Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. Infect. Immun. 64: 277-282.

Heilmann C., Schweitzer O., Gerke C., Vanittanakom N., Mack D., and Götz F. (1996b)

Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*; Mol. Microbiol. 20: 1083-1091

- Heilmann C., Hussain M., Peters G., and Götz F. (1997)**
Evidence for autolysin-mediated attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface; Mol. Microbiol. 24: 1013-1024.
- Henkin T.M. (1994)**
tRNA-directed transcription antitermination; Mol. Microbiol. 13: 381-387
- Henkin T.M. (1996)**
Control of transcription termination in prokaryotes; Ann. Rev. Genet. 30: 35-57
- Henkin T.M. (2000)**
Transcription termination control in bacteria; Curr. Opin. Microbiol. 3: 149-153
- Henrici A.T. (1933)**
Studies of freshwater bacteria. I.A. direct microscopic technique; J. Bacteriol. 25: 277-287
- Herrmann M., Vaudaux P. E., Pittet D., R. Auckenthaler, Lew P.D., Schumacher-Perdreau F., Peters G., and Waldvogel F.A. (1988)**
Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material; J. Infect. Dis. 158: 693-701
- Herwaldt L.A., Geiss M., Pfaller C., and M.A. (1996)**
The positive predictive value of isolating coagulase-negative staphylococci from blood cultures; Clin. Infect. Dis. 22: 14-20
- Hogt A. H., Dankert J., and Feijn J. (1985)**
Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial; J. Gen. Microbiol. 131: 2485-2491
- Houman F., Diaz-Torres M.R., and Wright A. (1990)**
Transcriptional antitermination in the *bgl* operon of *E.coli* is modulated by a specific RNA binding protein; Cell 62: 1153-1163
- Horstkotte M.A., Knobloch J.K.M., Rohde H., and Mack D. (2001)**
Rapid Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination Test; J. Clin. Microbiol. 39: 3700-3702
- Hussain M., Hastings J. G. M., and White P. J. (1991)**
Isolation and composition of extracellular slime made by coagulase-negative staphylococci in a chemically defined medium; J. Infect. Dis. 163: 534-541
- Hussain M., Hastings J. G. M., and White P. J. (1992)**
Comparison of cell wall teichoic acid with high-molecular-weight slime material from *Staphylococcus epidermidis*; J. Med. Microbiol. 37: 368-375

Hussain M., Herrmann M., von Eiff C., Pedreau-Remington F., and G. Peters (1997)

A 140-kilodalton extracellular protein essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces; *Infect. Immun.* 65: 519-524

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

Kessler S.W. (1981)

Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells; *Meth. Enzymol.* 73: 442-459

Kiel K. (1998)

Charakterisierung von Biozönosen in anaeroben Abwasserreinigungsanlagen von Zuckerfabriken durch stoffwechselphysiologische, chemotaxonomische und molekularbiologische Merkmale; Diplomarbeit im Fachbereich Biologie, Technische Universität Braunschweig

Kleemann K.T., Bannermann T.L., and Kloos W.E. (1993)

Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1318-1321

Kloos W.E. (1986)

Ecology of human skin. In Mardh P.A., and Schleifer K.H. (eds.), *Coagulase-negative staphylococci*. Almqvist and Wiksell International, Stockholm: 37-50

Kloos W.E and Schleifer K.H. (1986)

Staphylococcus. In: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol.2. Williams & Wilkins, Baltimore: 1013

Kloos W.E., and Bannermann T.L. (1994)

Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 117-140

Kloos W.E. (1997)

Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. In: Crossley, K. B., and G. L. Archer (eds). *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York: 113-137

Kloos W.E., and Bannermann T.L. (1999)

Staphylococcus and *Micrococcus*. In: Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., and Tenover F.C., and Tenover R.H. (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington D.C: 264-282

Knezevic I., Bachem S., Sickmann A., Meyer H.E., Stülke J., and Hengstenberg W. (2000)

Regulation of the glucose-specific phosphotransferase system (PTS) of *Staphylococcus carnosus* by the antiterminator Protein GlcT; *Microbiology* 146: 2333-2342

Knobloch J.K.-M. (2000)

Molekulare Charakterisierung von Transposoninsertionsstellen biofilmm negativer und mukoid-negativer *Staphylococcus epidermidis* Mutanten; Dissertation im Fachbereich Medizin, Universität Hamburg

Knobloch J.K.-M., Bartscht K., Sabottke A., Rohde H., Feucht H.H., and Mack D. (2001)

Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress; *J. Bacteriol.* 183: 2624-2633

König C., Schwank S., and Blaser J. (2001)

Factors comprising antibiotic activity against biofilms of *Staphylococcus epidermidis*; *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20: 20-26

Krokotsch A. (1998)

Reinigung und Charakterisierung eines für biofilmbildende *Staphylococcus epidermidis*-Stämme spezifischen Polysaccharids. Dissertation im Fachbereich Medizin, Universität Hamburg

Langbein I., Bachem S., and Stülke J. (1999)

Specific interaction of the RNA-binding domain of the *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator GlcT with its RNA target, RAT; *J. Mol. Biol.* 293: 795-805

Langbein I., Bachem S., and Stülke J. (2000)

Antitermination at the *Bacillus subtilis* *ptsGHI* operon: a regulated protein-RNA interaction. Posterbeitrag zur 1. gemeinsamen Tagung der VAAM, DGHM und ÖGHMP-Microbiology 2000; München 12.-16.03.2000; *Biospektrum Suppl.* 2000

Lee C.Y., and Lee J.C. (2000)

The Staphylococcal Capsule. In: Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A., and Rood J.I. (eds.) *Gram-positive Pathogenes*; ASM Press, Washington D.C.: 361-366

Lee S.J., Boos W., Bouche J.P., and Plumbridge J. (2000)

Signal transduction between a membrane-bound transporter *ptsG*, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*; *EMBO J.* 20: 5353-5361

Lengeler J.W., Jahreis K., and Wehmeier U.F. (1994)

Enzymes II of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport; *Biochim. Biophys. Acta* 1188: 1-28

Lewin B. (1997)

Transcription. Chapter 11; In: *Genes VI*, Oxford University Press, Oxford New York: 287-334

- Looijestijn P.J., Boels I.C., Kleerebezem M., and Hugenholtz J. (1999)**
Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source; Appl. Environm. Microbiol. 65: 5003-5008
- Ludwicka A., Jansen B., Waldström T., and Pulverer G. (1984a)**
Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A. 256: 479-489
- Ludwicka A., Uhlenbruck G., Peters G., Seng P.N., Gray E.D., Jeljaszewicz J., and Pulverer G. (1984b)**
Investigations on extracellular slime produced by *Staphylococcus epidermidis*. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A. 258: 256-267
- Lux R., Munasinghe V.R., Castellano F., Lengeler J.W., Corrie J.E., and Khan S. (1999)**
Elucidation of a PTS-carbohydrate chemotactic signal pathway in *Escherichia coli* using a time-resolved behavioral assay; Mol. Biol. Cell. 4: 1133-1146
- Mack D., Siemssen N., and Laufs R. (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: 2048-2057
- Mack D., Nedelmann M., Krokotsch A., Schwartzkopf A., Heesemann J., and Laufs R. (1994a)**
Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm formation: genetic identification of a hexosamine containing polysaccharide intercellular adhesin; Infect. Immun. 62: 3244-3253
- Mack D., Siemssen N., and R. Laufs (1994b)**
Identification of a cell cluster associated antigen specific for plastic-adherent *S. epidermidis* which is functional related to intercellular adhesion. Zbl. Bakt. Suppl. 26: 411-413
- Mack D., Fischer W., Krokotsch A., Leopold K., Egge H., and Laufs R. (1996a)**
The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation is a linear β (1-6)-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J. Bacteriol. 178: 175-183
- Mack D., Haeder M., Siemssen N., and Laufs R. (1996b)**
Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide adhesin. J. Infect. Dis. 174: 881-884
- Mack D. (1999a)**
Molekulare Mechanismen der Biofilm-Entstehung von *Staphylococcus epidermidis*; Chemother. J. 8: 166-175
- Mack D. (1999b)**
Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. J. Hosp. Infect. 43 (Suppl): S113-125

Mack D., Riedewald J., Rohde H., Magnus T., Feucht H. H., Elsner H.-A., Laufs R., and Rupp M. E. (1999c)

Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect. Immun.* 67: 1004-1008

Mack D., Rohde H., Dobinsky S., Riedewald J., Nedelmann M., Knobloch J. K.-M., Elsner H.-A., and Feucht H. H. (2000a)

Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intracellular adhesin and biofilm formation. *Infect. Immun.* 68: 3799-3806

Mack D., Bartscht K., Dobinsky S., Horstkotte M. A., Kiel K., Knobloch J. K.-M., and P. Schäfer (2000b)

Staphylococcal factors involved in adhesion and biofilm formation on biomaterials; In: An Y.H., and Friedman R.J. (eds.), *Handbook for studying bacterial adhesion: Principles, methods and applications*. Humana Press, Totowa, N.J.: 307-330

Mack D., Bartscht K., Fischer C., Rohde H., de Grahl C., Dobinsky S., Horstkotte M.A., Kiel K., and Knobloch J.K.-M. (2001)

Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation; *Meth. Enzymol.* 336: 215-239

Manival X., Yang Y., Strub M.P., Kochoyan M., Steinmetz M., and Aymerich S. (1997)

From genetic to structural characterization of a new class of RNA-binding domain within the SacY/BglG family of antiterminator proteins; *EMBO J.* 16: 5019-5029

Marrie T.J., and Costerton J.W. (1984)

Scanning and transmission electron microscopy of *in situ* bacterial colonization of intravenous and intra-arterial catheters. *J. Clin. Microbiol.* 19: 687-693

Martin-Vertraete I., Débarbouillé M., Klier A., and Rapaport G. (1990)

Levanase operon of *Bacillus subtilis* includes a fructose-specific phosphotransferase system regulating the expression of the operon; *J. Mol. Biol.* 214: 657-671

McKenney D., Hubner J., Muller E., Wang Y., Goldmann D.A., and Pier G.B. (1998)

The *ica* locus of *S. epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin; *Infect. Immun.* 66: 4711-4720

McKenny D., Pouliot L. K., Wing Y., Murthy V., Ulrich M., Döring G., Lee J.C., Goldmann D.A., and Pier G.B. (1999)

Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 284: 1253-1257

Michal G. (1992)

In Michal G. (ed.) *Biochemical Pathways*, 3rd edition, Part 1; Boehringer Mannheim Biochemica Penzberg

Modun B., and Williams P. (1999)

The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Infect. Immun.* 67: 1086-1092

Mukhija S., and Erni B. (1996)

Purification by Ni²⁺ affinity chromatography, and functional reconstitution of the transporter for N-acetylglucosamine of *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.* 271: 14819-14824

Muller E., Takeda S., Goldmann D.A. and Pier G.B. (1991)

Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials; *Infect. Immun.* 59: 3323-3326

Muller E., Hübner J., Gutierrez N., Takeda S., Goldman D., and Pier G.B. (1993a)

Isolation and characterization of transposon mutants deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect. Immun.* 61: 551-558

Muller E., Takeda S., Shiro H., Goldman D., and Pier G.B. (1993b)

Occurrence of polysaccharide/adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci; *J. Infect. Dis.* 168: 1211-1218

Nassif X., Fournier J.M., Arondel J., and Sansonetti P.J. (1989)

Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid encoded virulence factor; *Infect. Immun.* 57: 546-552

Nedelmann M. (1997)

Genetische Untersuchungen zur Entstehung von adhärennten Biofilmen von *Staphylococcus epidermidis* auf Kunststoffoberflächen; Dissertation im Fachbereich Medizin, Universität Hamburg

Nedelmann M., Sabottke A., Laufs R., and Mack D. (1998)

Generalized transduction for genetic linkage analysis and transfer of transposon insertions in different *Staphylococcus epidermidis* strains; *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 85-92

Nilsson M., Frykberg L., Flock J.I., Pei L., Lindberg M., and Guss B. (1998)

A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*; *Infect. Immun.* 66: 2666-2673

Nobel W.C. (1997)

Staphylococci carriage and skin and soft tissue infection.. In: Crossley K.B., and Archer G.L. (eds). *The staphylococci in human disease*. Churchill Livingstone, New York: 401-412

Nobel W.C., and Naidoo J. (1986)

Coagulase-negative staphylococci as skin commensals; *J. Med. Microbiol.* 22: 287

Novick R. (1993)

Staphylococcus. In: *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria; Sonnenshein A.L., Hoch J.A., Losick R. (eds).; ASM Press, Washington D.C: 17-33

Nussbaum-Shochat A., and Amster-Choder O. (1999)

BglG, the transcriptional antiterminator of the *bgl* system interacts with β 'subunit of the *Escheria coli* RNA polymerase; Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 4336-4341

O'Toole G., Kaplan H.B., and Kolter R. (2000)

Biofilmformation as microbial development; Annu. Rev. Microbiol. 54: 49-79

Paerl H.W., and Priscu J.C. (1998)

Microbial phototrophic, heterotrophic and diazotrophic activities associated with aggregates in the permanent ice cover of Lake Bonney, Antarctica; Microb. Ecol. 36: 221-230

Pancholi V., and Fischetti V.A. (1992)

A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with multiple activity; J. Exp. Med. 1: 415-426

Pancholi V., and Fischetti V.A. (1993)

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme; Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 8154-8157

Pancholi V., and Fischetti V.A. (1998)

α -Enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci; J. Biol. Chem. 273: 14503-14515

Peltola H. (2000)

Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates; Clin. Microbiol Rev. 13: 302-317

Peri K.G., and Waygood E.B. (1988)

Sequence of cloned Enzyme II^{N-acetylglucosamine} of the phosphoenolpyruvate: N-acetylglucosamine phosphotransferase system of *Escherichia coli*; Biochemistry 27: 6054-6061

Petry S., Furlan S., Crepeau M.-J. Cerning J., and Desmazeaud M. (2000)

Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium; Appl. Environm. Microbiol. 66: 3427-3431

Pfaller M.A., and Herwaldt L.A. (1988)

Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. 1: 281-299

Plumbridge J.A., Cochet O., Souza J.M., Altamirano M.M., Calcagno M.L., and Badet B. (1993)

Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12; J. Bacteriol. 175: 4951-4956

Plumbridge J.A., and Vimr E. (1999)

Convergent pathways for utilization of amino sugars N-Acetylglucosamine, N-Acetylmannosamine and N-Acetylneuraminic acid by *Escherichia coli*; J. Bacteriol. 181: 47-54

Postma P.W., and Lengeler J.W. (1985)

Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system of bacteria; Microbiol. Rev. 49: 232-269

Postma P.W., Lengeler J.W. and Jacobson G.R. (1993)

Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system of bacteria; Microbiol. Rev. 57: 543-594

Raad I., Alrahwan A., and Rolston K. (1998)

Staphylococcus epidermidis: emerging resistance and need for alternative agents; Clin. Infect. Dis. 26: 1182-1187

Rachid S., Ohlsen K., Wallner U., Hacker J., Hecker M., and Ziebuhr W. (2000)

Alternative Transcription Factor σ^B is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate; J. Bacteriol. 182: 6824-6826

Raya R., Bardowski J., Andersen P.S., Ehrlich S.D., and Chopin A. (1998)

Multiple transcriptional control of the *Lactococcus lactis trp* operon; J. Bacteriol. 180: 3174-3180

Reizer J., Bachem S., Reizer A., Arnoud M., Saier M.H. and Stülke J. (1999)

Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complement of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*; Microbiology 145: 3419-3429

Roberts I.S. (1995)

Bacterial polysaccharides in sickness and in health; Microbiology 141: 2023-2031

Rogers M.J., Ohgi T., Plumbridge J., and Söll D. (1988)

Nucleotide sequences of the *Escherichia coli nagE* and *nagB* genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase; Gene 62: 197-207

Rohde H. (2001)

Typisierung genetischer Determinanten der *Staphylococcus epidermidis* Biofilmbildung auf Kunststoffoberflächen. Dissertation im Fachbereich Medizin, Universität Hamburg

Rose M., and Entian K.D. (1996)

New Genes in the 170° region of the *Bacillus subtilis* genome encode DNA gyrase subunits, a thioredoxin, a xylanase and an amino acid transporter; Microbiology 142: 3097-3101

Rupp M.E., and Archer G.L. (1992)

Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*; Infect. Immun. 60: 4322-4327

Rupp M.E., and Archer G.L. (1994)

Coagulase-negative staphylococci: Pathogens associated with medical progress; Clin. Infect. Dis. 19: 231-245

Rupp M.E., Ulphani J.S., Fey P.D., Bartscht K., and Mack D. (1999a)

Characterization of the importance polysaccharide intercellular adhesin / hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial based infection in a mouse foreign body infection model. Infect. Immun. 67: 2627-2632

Rupp M. E., Ulphani J. S., Fey P. D., and Mack D. (1999b)

Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin / hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model; Infect. Immun. 67: 2656-2659

Rupp M.E, Fey P.D., Heilmann C., and Götz F. (2001)

Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model; J. Infect. Dis. 183: 1038-1042

Ruthberg B. (1997)

Antitermination of transcription of catabolic operons; Mol. Microbiol. 23: 413-421

Saier M.H., Ye J.J., Klinker S., and Nino E. (1996)

Identification of an anaerobically induced phosphoenolpyruvate dependent fructose-specific phosphotransferase system and evidence for the Embden-Meyerhof glycolytic pathway in the heterofermentative bacterium *Lactobacillus brevis*; J. Bacteriol. 178: 314-316

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Ehrlich H.A. und Arnheim N. (1985)

Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia; Science 230: 1350-1354

Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989)

Molecular cloning - a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, N.Y.

Schaberg D.R., Culver D.H., and Gayens R.P. (1991)

Major trends in the microbial etiology of nosocomial infections; Am. J. Med. 91 (Suppl. 3B): 72-75

Schink B. (1997)

Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation; Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 262-280

Schnetz K., Toloczyki C., and Rak B. (1987)

β -glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence, genetic organization, and possible evolutionary relationship to regulatory components of two *Bacillus subtilis* genes. *J. Bacteriol.* 169: 2579-2590

Schumacher-Pedreau F., Heilmann C., Peters G., Götz F., and Pulverer G. (1994)

Comparative analysis of a biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* and its adhesion-positive, accumulation-negative mutant M7; *FEMS Microbiol. Lett.* 117: 71-78

Schleifer K.H., and Kloos W.E. (1975)

Isolation and Characterization of staphylococci from human skin: I und II; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25: 50ff. and 62ff.

Shaw J.H., and Clewell D.B. (1985)

Complete nucleotide sequence of macrolid-lincosamin streptogramin B-resistance transposon *Tn917* in *Streptococcus faecalis*; *J. Bacteriol.* 185: 782-796

Shuman S. (1994)

Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccina DNA Topoisomerase; *J. Biol. Chem.* 269: 32678-84

Southern E.M. (1975)

Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis; *J. Mol. Biol.* 98: 503-517

Steinmetz M., Le Coq D., and Aymerich S. (1989)

Induction of saccharolytic enzymes by sucrose in *Bacillus subtilis*: evidence for two partially interchangeable regulatory pathways; *J. Bacteriol.* 171: 1519-1523

Stülke J., Martin-Verstraete I., Zagorec M., Rose M., Klier A., and Rapoport G. (1997)

Induction of the *Bacillus subtilis* *ptsGHI* operon by glucose is controlled by a novel antiterminator GlcT; *Mol. Microbiol.* 25: 65-78

Stülke J., Arnoud M., Rapoport G., and Martin-Verstraete I. (1998)

PRD – a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria; *Mol. Microbiol.* 28: 865-874

Stülke J., and Hillen W. (2000)

Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species; *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 849-880

Sutherland I.W. (1982)

Biosynthesis of microbial exopolysaccharides; *Adv. Microb. Physiol.* 23: 79-150

Sutherland I.W. (2001)

Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework; *Microbiology* 147: 3-9

Taranto M.P., Font de Valdez G., and Perez-Martinez G. (1999)

Evidence of a glucose proton motive force-dependent permease and a fructose phosphoenolpyruvate: phosphotransferase transport system in *Lactobacillus reuteri* CRL 1098; FEMS Microbiol. Lett. 181: 109-112

Tenover F.C., and Gaynes R. (2000)

The epidemiology of *Staphylococcus* infections. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., and Rood J.I. (eds.). Gram-Positive Pathogens. ASM Press Washington D.C.: 414-421

Timmerman C.P., Fleer A., Besnier J.M., de Graaf L., Cremers F., and Verhoef J. (1991)

Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. Infect. Immun. 59: 4187-4192

Tojo M., Yamashita N., Goldman D.A., and Pier G.B. (1988)

Isolation and characterization of a polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. 157: 713-722

Tomasz A. (2000)

The staphylococcal cell wall. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., and Rood J.I. (eds.). Gram-Positive Pathogens. ASM Press Washington D.C.: 351-360

Van de Guchte M., Ehrlich S.D., and Chopin A. (2001)

Identity elements in tRNA-mediated transcription antitermination: implication of tRNA D- and T-arms in mRNA recognition; Microbiology 147: 1223-1233

Van Heijenoort J. (2001)

Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan; Glycobiology 11: 25-36

Van Tilbeurgh H., Manival X., Aymerich S., Lhoste J-M, Dumas C., and Kochoyan M. (1997)

Crystal structure of a new RNA-binding domain from the antiterminator protein SacY of *Bacillus subtilis*; EMBO J. 16: 5030-5036

Van Tilbeurgh H., Le Coq D. and Declerck N. (2001)

Crystal structure of an activated form of the PTS regulation domain from the LicT transcriptional antiterminator; EMBO J. 20: 3789-3799

Vaudaux P., Pittet D., Haeberli A., Hugl E., Nydegger U.E., Lew D.P., and Waldvogel F.A. (1989)

Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin, and fibrinogen or fibrin; J. Infect. Dis. 160: 865-875

Veenstra G.J., Cremers F.F., van Dijk H., and Fleer A. (1996)

Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*; J. Bacteriol. 178: 537-541

Vogeler A.P., and Lengeler J.W. (1991)

Comparison of the sequences of the *nagE* operons from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K12: Enhanced variability of the enzyme II^{N-acetylglucosamine} in regions connecting functional domains; Mol. Gen. Genet. 230: 270-276

Wadström T., and Ljungh A. (1999)

Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion. Key events in microbial pathogenicity; J. Med. Microbiol. 48: 223-233

Ward D.M., Ferris M.J., Nold S.C., and Bateson (1998)

A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities; Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1353-1370

White R.J., and Pasternak C.A. (1967)

The Purification and properties of N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase from *Escherichia coli*; Biochem J. 105: 121-125

White R.J. (1968)

Control of amino sugar metabolism in *Escherichia coli* and isolation of mutants unable to degrade amino sugars; Biochem. J. 106: 847-858

Xu K.D., McFeters G.A., and Stewart P.S. (2000)

Biofilm resistance to antimicrobial agents; Microbiology 146: 547-549

Younger J.J., Christensen G.D., Bartley D.L., and Simmons J.C.H. (1987)

Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal for clinical outcome; J. Infect. Dis. 156: 548 - 554

Zagorec M., and Postma P.W. (1992)

Cloning and nucleotide sequence of the *ptsG* gene of *Bacillus subtilis*; Mol. Gen. Genet. 234: 325-328

Zhang X., Bishop P.L., and Kupferle M.J. (1998)

Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers; Water Sci. Technol. 37: 345-348

Ziebuhr W., Heilmann C., Götz F., Meyer P., Straube E., and J. Hacker (1997)

Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *S. epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates; Infect. Immun. 65: 890-896

Ziebuhr W., Krimmer V., Rachid S., Lößner I., Götz F., and J. Hacker (1999)

A novel mechanism of phase variation in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for the control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256; Mol. Microbiol. 32: 345-356

Zuker M. (1989)

Computer prediction of RNA structure; Meth. Enzymol. 180: 262-288

7 Anhang

7.1 Sequenz von *glcA*

Im Folgenden wird die Nukleotidsequenz von *glcA* und umliegenden Bereich dargestellt, diese ist unter NCBI-Accession No. AF443793 veröffentlicht. Über den codierenden Basen für *glcA* sind die Aminosäuren angegeben. Über allen charakteristischen Motiven finden sich die entsprechenden Bezeichnungen.

1	ACTAACAGCT	CAACGAGCTG	AAAATAATCA	AAAAAATAAT	AAAAAAGACA
	TGATTGTCGA	GTTGCTCGAC	TTTTATTAGT	TTTTTTATTA	TTTTTCTGT
51	ATTTCTATAT	TATTTCAATA	GAAATTGTCT	TTTTTACTT	ATCCTGGGAC
	TAAAGATATA	ATAAAGTTAT	CTTTAACAGA	AAAAAATGAA	TAGGACCCTG
101	TTTATGTCCC	ACACTCTTTT	TTATGTAAAA	TTTTCAAAAA	GTATTGTAAA
	AAATACAGGG	TGTGAGAAAA	AATACATTTT	AAAAGTTTTT	CATAACATTT
151	CGCTTTATTG	AATGTGTATA	CTAGATGTAA	ATAAAATCAT	TGCGTGTTAC
	GCGAAATAAC	TTACACATAT	GATCTACATT	TATTTTAGTA	ACGCACAATG
201	TGGTTATGCA	GGCATGAGCA	AATAAGAGTG	TCTATCTTTC	GTGATATGAA
	ACCAATACGT	CCGTA CTCTCGT	TTATTCTCAC	AGATAGAAAG	CACTATACTT
251	ATTGATAGTC	TTATTTGTTC	ATGCTTTTTT	TGTGGCACGT	AAATAAGAAG
	TA ACTATCAG	AATAACAAG	TACGAAAAAA	ACACCGTGCA	TTTATTCTTC
+1	ATAGAGAGGA	ATGAATTGAT	TATGTTTAAA	AAGCTATTTG	GTCAAATGCA
	TATCTCTCCT	TACTTAACTA	ATACAAATTT	TTCGATAAAC	CAGTTTACGT
351	ACGTATCGGT	AAAGCTTTAA	TGTTACCAGT	TGCGATTTTA	CCGGCTGCAG
	TGCATAGCCA	TTTCGAAATT	ACAATGGTCA	ACGCTAAAAAT	GGCCGACGTC
401	GTTGCTATT	AGCAATTGGG	ACTGCGTTTC	AAGGCGAAGC	GTTACAACAT
	CCAACGATAA	TCGTTAACCC	TGACGCAAAG	TTCCGCTTCG	CAATGTTGTA
451	TATCTTCCAT	TTATAAAAAA	TGATATTGTT	CAACAAATCG	CTAATATGCT
	ATAGAAGGTA	AATATTTTTT	ACTATAACAA	GTTGTTTAGC	GATTATACGA
501	TACAGGTGCT	GGTGGTATTA	TATTTGATAA	TCTACCTATT	ATCTTTGCTT
	ATGTCCACGA	CCACCATAAT	ATAAACTATT	AGATGGATAA	TAGAAACGAA
551	TAGGTGTAGC	AATTGGTCTT	GCAGGTGGAG	ATGGTGTAGC	TGCTATTGCT
	ATCCACATCG	TTAACCAGAA	CGTCCACCTC	TACCACATCG	ACGATAACGA
601	GCATTTGTTG	GTTTTATCAT	TTTAAATAAA	ACAATGGGGG	CTTTCTTGCA
	CGTAAACAAC	CAAATAGTA	AAATTTATTT	TGTTACCCCC	GAAAGAACGT

+1	His	Val	Thr	Pro	Asp	Lys	Leu	Ser	Asp	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Ala	Asn	Val	Leu				
651	TGTA	ACTCCA	GATA	AATTAT	CTGAT	CCAAC	TAAT	GGATAT	GCAA	ATGTAT	GCAA	ATGTAT	ACAT	TGAGGT	CTAT	TTAATA	GACT	AGGTTG	ATTAC	TATA	CGTT	TACATA
+1	Leu	Gly	Ile	Pro	Thr	Leu	Gln	Thr	Gly	Val	Phe	Gly	Gly	Ile	Ile	Ile	Gly					
701	TAGG	GATTCC	TACAC	TTCAA	ACAGG	TGTGT	TCCG	GAGGTAT	TATT	ATTGGT	ATCC	CTAAGG	ATGT	GAAGTT	TGTCC	CACACA	AGCCT	CCATA	ATAA	TAACCA		
+1	Ala	Leu	Ala	Ala	Trp	Cys	Tyr	Asn	Lys	Phe	Tyr	Asn	Ile	Thr	Leu	Pro	Ser					
751	GCACT	AGCAG	CCTGG	TGTTA	TAACA	AATTC	TATA	AATATTA	CCTT	ACCATC	CGTG	ATCGTC	GGACC	ACAAT	ATTG	TTTAAAG	ATATT	TATAAT	GGAAT	GGTAG		
+1	Ser	Tyr	Leu	Gly	Phe	Phe	Ala	Gly	Lys	Arg	Phe	Val	Pro	Ile	Met	Met	Ala	Thr				
801	ATAT	TTAGGA	TTCT	TTGCAG	GTAAC	CGTTT	TGTAC	CAATT	ATGAT	GGCAA	TATA	AATCCT	AAGAA	ACGTC	CATTT	GCAAA	ACAT	GGTTAA	TACT	ACC	GTT	
+1	Thr	Thr	Ser	Phe	Ile	Leu	Ala	Phe	Pro	Met	Ala	Ile	Ile	Trp	Pro	Thr	Ile					
851	CAAC	ATCTTT	CATTT	TAGCC	TTTCC	GATGG	CAAT	TATTTG	GCCA	ACGATC	GTTG	TAGAAA	GTA	AATCGG	AAAGG	CTACC	GTTA	AATAAAC	CGTT	GCTAG		
	In917																					
+1	Gln	Asn	Gly	Leu	Asn	Ala	Phe	Ser	Glu	Gly	Leu	Leu	Asp	Ser	Asn	Thr	Gly					
901	CAAA	ACGGT	TAAAT	GCATT	TAGT	GAGGGG	TTATT	AGATT	CAA	ATACAGG	GTTT	TGCCAA	ATTT	ACGTAA	ATCA	CTCCC	AATA	ATCTAA	GTTT	ATGTCC		
+1	Gly	Leu	Ala	Val	Phe	Leu	Phe	Gly	Phe	Ile	Lys	Arg	Leu	Leu	Ile	Pro	Phe	Gly				
951	TTT	AGCTGTA	TTTT	TATTTG	GATTT	TATTAA	GCG	ATTATTA	ATACC	ATTTG	AAAT	CGACAT	AAAA	AATAAC	CTAA	AATAAT	CGCT	AATAAT	TATG	GTA AAC		
+1	Gly	Leu	His	His	Ile	Phe	His	Ala	Pro	Phe	Trp	Phe	Glu	Phe	Gly	Ser	Trp					
1001	GTT	TACATCA	CATTT	TCCAT	GCACC	ATTCT	GGTT	TGAATT	TGGT	TCTTGG	CAA	TGTAGT	GTA	AAAGGTA	CGT	GGTAAGA	CCAA	ACTTAA	ACCA	AGAACC		
+1	Lys	Asn	Ala	Ala	Gly	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Asp	Gln	Arg	Ile	Phe	Ile	Glu					
1051	AAAA	TGCTG	CTGG	AGAGAT	AATT	AGAGGC	GACCA	ACGTA	TTTT	TATTGA	TTTT	TACGAC	GACCT	CTCTA	TAA	TCTCCG	CTGG	TGCAT	AAAA	ATAACT		
+1	Glu	Gln	Ile	Arg	Glu	Gly	Ala	His	Leu	Thr	Ser	Gly	Lys	Phe	Met	Gln	Gly	Glu				
1101	ACAA	TCCGT	GAAGG	TGCTC	ATTT	AACTTC	TGGT	AAATTC	ATGC	AAGGGG	TGTT	TAGGCA	CTTC	CAGAG	TAA	ATTGAAG	ACC	ATTTAAG	TACG	TCCCC		
+1	Glu	Phe	Pro	Val	Met	Met	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Ile	Tyr					
1151	AAT	TCCAGT	CATG	ATGTTT	GGAT	TACCAG	CTGC	AGCATT	GGCT	ATTTAT	TTA	AGGTC	GTA	CTACAAA	CCT	AATGGTC	GACG	TCTGTA	CCG	ATAAATA		
+1	Gln	Thr	Ala	Lys	Pro	Glu	Asn	Lys	Lys	Val	Val	Ala	Gly	Leu	Met	Ile	Ser					
1201	CAA	ACAGCAA	AACC	TGAGAA	TAAG	AAAGTA	GTTG	CAGGTT	TAAT	GATTTT	GTT	TGTCGTT	TTGG	ACTCTT	ATC	TTTCAT	CAAC	GTC	CAA	ATT	ACTAAAG	
+1	Ser	Ala	Ala	Leu	Thr	Ser	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Thr	Glu	Pro	Leu	Glu	Phe	Ser				
1251	TGCT	GCATTA	ACAT	CATTTT	TAACT	GGTAT	TACT	GAA	CA	TTAGA	ATTTCT	ACG	ACGTAAT	TGTA	GTA	AAAA	ATTG	ACCATA	ATG	ACTTGGT	AAT	CTTAAGA

+1	.Ser	Phe	Leu	Phe	Val	Ala	Pro	Phe	Leu	Phe	Val	Ile	His	Ala	Val	Leu	Asp	
1301	CATTCTTATT	TGTAGCACCA	TTCTTATTCG	TAATTCATGC	AGTATTAGAT	GTAAGAATAA	ACATCGTGGT	AAGAATAAGC	ATTAAGTACG	TCATAATCTA								
+1	Gly	Leu	Ser	Phe	Leu	Thr	Leu	Tyr	Leu	Leu	Asn	Val	His	Leu	Gly	Tyr	Thr	
1351	GGTTTATCAT	TCTTGACACT	ATACTTGTTA	AATGTACATT	TAGGATATAC	CCAAATAGTA	AGAACTGTGA	TATGAACAAT	TTACATGTAA	ATCCTATATG								
+1	Thr	Phe	Ser	Gly	Gly	Phe	Ile	Asp	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	Ile	Leu	Pro	Asn	Lys
1401	TTTCTCTGGA	GGATTTATAG	ATTATGTTTT	ATTAGGTATT	CTACCTAATA	AAAGAGACCT	CCTAAATATC	TAATACAAAA	TAATCCATAA	GATGGATTAT								
+1	Lys	Thr	Ala	Trp	Trp	Leu	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Ile	Tyr	Ala	Val	Ile	
1451	AAACAGCATG	GTGGCTTGTC	ATCCCAGTAG	GTATTATTTA	TGCAGTGATT	TTTGTCGTAC	CACCGAACAG	TAGGGTCATC	CATAATAAAT	ACGTCACTAA								
+1	Tyr	Tyr	Phe	Val	Phe	Arg	Phe	Leu	Ile	Val	Lys	Phe	Asn	Tyr	Lys	Thr	Pro	
1501	TACTACTTTG	TATTTAGATT	CCTTATTGTT	AAATTTAACT	ATAAAACACC	ATGATGAAAC	ATAAATCTAA	GGAATAACAA	TTTAAATTGA	TATTTTGTGG								
+1	Pro	Gly	Arg	Glu	Asp	Lys	Lys	Ser	Ser	Val	Thr	Thr	Thr	Ser	Ala	Ser	Gln	Leu
1551	AGGTCGTGAA	GATAAAAAAT	CATCTGTAAC	AACTACATCG	GCTAGTCAAC	TCCAGCACTT	CTATTTTTTA	GTAGACATTG	TTGATGTAGC	CGATCAGTTG								
+1	Leu	Pro	Phe	Asp	Val	Leu	Lys	Ala	Met	Gly	Gly	Lys	Glu	Asn	Ile	Lys	His	
1601	TGCCATTCTGA	TGTTTTGAAA	GCAATGGGTG	GTAAAGAAAA	TATTAAACAT	ACGGTAAGCT	ACAAAACCTT	CGTTACCCAC	CATTTCTTTT	ATAATTTGTA								
+1	Leu	Asp	Ala	Cys	Ile	Thr	Arg	Leu	Arg	Val	Glu	Val	Asn	Glu	Lys	Ser	Lys	
1651	CTAGATGCTT	GTATTACTAG	ACTAAGAGTA	GAAGTAAATG	AAAAATCAAA	GATCTACGAA	CATAATGATC	TGATTCTCAT	CTTCATTTAC	TTTTTAGTTT								
+1	Lys	Val	Asp	Val	Ala	Gly	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Val	Leu	Glu	Val
1701	AGTTGATGTT	GCCGGCCTTA	AATCATPAGG	TGCTTCAGGA	GTACTTGAAG	TCAACTACAA	CGGCCGGAAT	TTAGTAATCC	ACGAAGTCCT	CATGAACTTC								
+1	Val	Gly	Asn	Asn	Met	Gln	Ala	Ile	Phe	Gly	Pro	Lys	Ser	Asp	Gln	Ile	Lys	
1751	TCGGTAACAA	TATGCAAGCT	ATTTTCGGTC	CTAAATCTGA	TCAAATCAAA	AGCCATTGTT	ATACGTTCTGA	TAAAAGCCAG	GATTTAGACT	AGTTTAGTTT								
+1	His	Asp	Met	Ala	Lys	Ile	Ile	Ser	Gly	Glu	Ile	Thr	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	
1801	CATGATATGG	CTAAGATAAT	AAGTGGAGAA	ATTACAAAAC	CAAGTGAAC	GTACTATACC	GATTCATTA	TTACCTCTT	TAATGTTTTG	GTTCACTTTG								
+1	Thr	Thr	Ile	Asp	Glu	Glu	Val	Ser	Asp	Asp	Pro	Val	His	Val	Glu	Asp	Ile	Val
1851	AACAATTGAT	GAAGAAGTGT	CAGATGATCC	TGTACATGTG	GAAGATATTG	TTGTTAACTA	CTTCTTCACA	GTCTACTAGG	ACATGTACAC	CTTCTATAAC								
+1	Val	Glu	Thr	Glu	Ile	Tyr	Ala	Pro	Gly	His	Gly	Glu	Ile	Ile	Pro	Leu	Ser	
1901	TAGAAACAGA	AATTTACGCA	CCTGGACATG	GTGAGATAAT	ACCGTTATCT	ATCTTTGTCT	TTAAATGCGT	GGACCTGTAC	CACTCTATTA	TGGCAATAGA								

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf angefertigt. Für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung der Arbeit möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. D. Mack danken. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danke ich Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. R. Laufs.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. E. Bock als Dissertationsgutachter, sowie den beiden Disputationsgutachtern für die Übernahme dieser Aufgaben bedanken.

Dank gilt ebenso der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die diese Arbeit innerhalb des Projekts: „Untersuchungen zur Glycocalyxbildung von *Staphylococcus epidermidis*“ finanziell unterstützt hat.

Der Abteilung Krankenhaushygiene möchte ich für die Unterstützung bei den Sequenzierungen danken, Frau C. Schlüter für die Erstellung der Fotos. Herrn Prof. Dr. B. Ernie aus Bern danke ich für die Überlassung des GlcNAc transportdefekten *E. coli* Stamms LR2-168dG::KanR.

Bedanken möchte ich mich auch bei der gesamten Staphylokokken-Arbeitsgruppe Sabine Dobinsky, Holger Rohde, Matthias Horstkotte und Johannes Knobloch für die gute Zusammenarbeit, ein angenehmes Arbeitsklima und stets viel Spaß bei der Arbeit. Ein besonderer Dank gilt Katrin Bartscht für die „biologische“ Unterstützung, stetige Diskussionsbereitschaft sowie zahlreiche konstruktive Anregungen.

Allen Korrekturlesern dieser Arbeit und allen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, sei ebenfalls herzlichst gedankt.

Hamburg, im Dezember 2001

Publikationen

D. Mack, K. Bartscht, C. Fischer, H. Rohde, C. de Grahl, S. Dobinsky, M.A. Horstkotte, **K. Kiel**, J.K.M. Knobloch (2001)

Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation; Meth. Enzymol. 336: 215-239

D. Mack, K. Bartscht, S. Dobinsky, M.A. Horstkotte, **K. Kiel**, J.K.M. Knobloch, P. Schäfer (2000)

Staphylococcal factors involved in adhesion and biofilm formation on biomaterials; In: An Y.H. and Friedman H.J. (eds). Handbook for studying bacterial adhesion: Principles, methods and applications. Humana Press, Totowa, N.J.: 307-330

DNA-Sequenzeinträge in der GenBank

K.Kiel, J.K.M. Knobloch and D. Mack (2001)

Staphylococcus epidermidis EII-glucose permease GlcA (*glcA*) gene, complete cds. NCBI Accession-No. AF443793; *Staphylococcus epidermidis* antiterminator GlcT (*glcT*) gene, complete cds. NCBI Accession-No. AF443794

Tagungsbeiträge

K. Kiel, H. Rohde, J.K.M. Knobloch and D. Mack (2001)

Overexpression of PIA in *Staphylococcus epidermidis* is inhibited by inactivation of PTS glucose permease *glcA* or its regulating antiterminator *glcT*; Kurzvortrag zur 53. Tagung der DGHM; Aachen 30.09 – 04.10.2001; Int. J. Med. Microbiol. 291: Suppl. 32 – V88

H. Rohde, K. Bartscht, **K. Kiel**, J.K.M. Knobloch (2001)

Identification of a new polysaccharide intercellular adhesin independent mechanism of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation; Posterbeitrag zur 53. Tagung der DGHM; Aachen 30.09 – 04.10.2001; Int. J. Med. Microbiol. 291: Suppl. 32 – P63

K. Kiel, H. Rohde and D. Mack (2000)

Mucoid-negative phenotype of *Staphylococcus epidermidis* caused by transposon insertions in two unlinked genes of the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system (PTS); Vortrag zu den 5. Borsteler Pathogenitätsgesprächen; Borstel Juli 2000

K. Kiel, J.K.M. Knobloch, H. Rohde, D. Mack (2000)

Mucoid-negative phenotype of *Staphylococcus epidermidis* caused by transposon insertions in two unlinked genes of the PTS; Posterbeitrag zur 1. gemeinsamen Tagung der VAAM, DGHM und ÖGHMP - Microbiology 2000; München 12.-16.03.2000; Biospektrum Suppl. 2000: 56

K. Kiel, M. Köneke, A. Marschall, H. Backhaus, R. Näveke (1998)

Characterization of anaerobic sludge from different wastewater reactors with special focus on the proceeding acidification; Posterbeitrag zur VAAM Frühjahrstagung 1998, Frankfurt am Main 22.- 25.03.1998; Biospektrum Suppl. 1998: PF270

Lebenslauf

Kathrin Kiel, geboren 14.05.1973 in Northeim

Schulbildung

1979 - 1992 Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium in Northeim mit
Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

1992 - 1998 Studium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig

09/1994 Vordiplom

04/1997 - 04/1998 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Technischen
Universität Braunschweig und am Institut für Biochemie und
Pflanzenvirologie, Biologische Bundesanstalt Braunschweig
Thema: „Charakterisierung von Biozönosen in anaeroben Abwasser-
reinigungsanlagen von Zuckerfabriken durch stoffwechselphysio-
logische, chemotaxonomische und molekularbiologische Merkmale“

06/1998 Abschluss als Diplom-Biologin
Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer Zellbiologie und Biochemie

Promotion

09/1998 - 12/2001 Promotionsarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Immunologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Studiumsbegleitend

08/1995 - 07/1998 Diverse Tätigkeiten als wissenschaftliche Hilfskraft in Forschung
und Lehre (Betreuung mikrobiologischer Praktika) am Institut
für Mikrobiologie der TU Braunschweig

SoSe 1999 Teilnahme an Vorlesung und Praktikum Medizinische Mikrobiologie
im Fachbereich Medizin, Universität Hamburg