
**Molekulargenetische Charakterisierung von
Streptococcus gallolyticus subsp. *gallolyticus*:
Vergleichende Genomanalyse und Evaluation von
Stammtypisierungsmethoden**

Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

**Fakultät für Chemie
Universität Bielefeld**

vorgelegt von
Dennis Hinse
aus Hameln

Bielefeld / Bad Oeynhausen

Februar 2012

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. med. Knabbe und Prof. Dr. med. Kleesiek
am Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin,
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen,
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum,
in Bad Oeynhausen,
in der Zeit von Oktober 2008 bis Februar 2012.

Danksagung

Viele Personen haben mich auf dem Weg zum Gelingen dieser Arbeit unterstützt, allen möchte ich für die Unterstützung danken und einige hier namentlich erwähnen.

Herrn Prof. Dr. med. Cornelius Knabbe und Herrn Prof. Dr. med. Knut Kleesiek danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Juniorprof. Dr. rer. nat. Hartmut Niemann (Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie) möchte ich für die Bereitschaft danken, diese Dissertation als Gutachter zu betreuen und zu beurteilen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn OA PD Dr. rer. nat. Jens Dreier für die Betreuung während der gesamten Doktorarbeit. Seine Kompetenz, Geduld und Diskussionsbereitschaft haben maßgeblich zu dem Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Für ihre ständige Hilfsbereitschaft und wertvollen Ratschläge möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Tanja Vollmer bedanken.

Meine Kollegen Melanie Weinstock, Doris Hendig, Christina Roch, Patricia Kuzaj, Mareike Dabisch-Ruthe, Christoph Lichtenberg, Jan Weile, Benjamin Müller und Marlen Ewald danke ich für die schöne Arbeitsatmosphäre im Institut, die vielfältige Unterstützung und die lustigen Momente.

Meinen Kolleginnen Kirstin Potthast, Anke Straeten-Barnbeck, Renate Josting, Conja Dickhoff, Cigdem Yilmaz, Bärbel Kammel und Birgitt Drawe danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung jeglicher Art danken, ohne die weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre.

Ein ganz lieber Dank gilt Isabel für die einzigartige Unterstützung, ihr Verständnis und ihre immerwährende Geduld.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Taxonomie der Streptokokken	3
2.2	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	4
2.2.1	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> als Pathogen	7
2.2.2	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> in der infektiösen Endokarditis	8
2.2.3	Assoziation von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> mit Neoplasien des Kolons	10
2.3	Virulenzfaktoren von Streptokokken	12
2.4	Grundlagen der Genomsequenzierung.....	14
2.5	Grundlagen der DNA-Chip Technologie.....	15
3	Ergebnisse	17
3.1	Identifikation und Nachweis von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	17
3.1.1	Molekulargenetische Identifikation mittels <i>sodA</i> DNA-Sequenzierung.....	18
3.1.2	MALDI-TOF-MS Identifizierung.....	20
3.1.3	<i>Real-time</i> PCR zum Nachweis von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	24
3.1.4	Prävalenz von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im humanen Gastrointestinaltrakt	26
3.2	Molekulardiagnostische Charakterisierung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	29
3.2.1	rep-PCR Klassifizierung	29
3.2.2	RAPD-PCR / ERIC-PCR Analyse.....	38
3.2.3	Klassifizierung mittels MLST.....	43
3.2.4	Korrelation der Charakterisierungsmethoden	48
3.3	Genomsequenzierung und Analyse von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	50
3.3.1	Allgemeine Genomeigenschaften	52
3.3.2	Detektion und Analyse potentieller Virulenzgene	53
3.3.3	Vergleichende Genomanalyse.....	55
3.3.4	Plasmid pSGG1	60
3.4	Analyse der Verbreitung von Virulenz-assoziierten Genen mittels Microarray-Experimenten.....	64
3.4.1	Etablierung eines DNA-Microarrays	64
3.4.2	Ergebnisse des Microarray-Screenings	68
3.4.3	Bestätigung der Microarray-Experimente durch konventionelle PCR	82

4	Diskussion.....	83
4.1	Identifikation und Nachweis von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	83
4.1.1	Molekulargenetische und MALDI-TOF-MS basierte Identifikation von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	84
4.1.2	Nachweis von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> im humanen Fäzes	87
4.2	Transmission von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	90
4.2.1	Molekulardiagnostische Charakterisierung von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	90
4.3	Genomsequenzierung und Analyse von <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	96
4.4	Analyse der Verbreitung von Virulenz-assoziierten Genen mittels Microarray-Experimenten	100
4.5	Ausblick	105
5	Methoden.....	107
5.1	Mikrobiologische Methoden	107
5.1.1	Anzucht und Kultivierung von Bakterien	107
5.1.2	Herstellen einer Kryokultur	107
5.1.3	Bindung an Kollagenoberflächen.....	107
5.1.4	Analyse der Tetracyclin Suszeptibilität	108
5.2	Molekulargenetische Methoden	108
5.2.1	Nukleinsäureextraktion aus Reinkulturen	108
5.2.2	Nukleinsäureextraktion mit dem <i>UltraClean Microbial DNA Isolation Kit</i>	109
5.2.3	DNA-Extraktion aus humanem Fäzes.....	109
5.2.4	Isolierung von Gesamt-DNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion	110
5.2.5	Plasmid-DNA Extraktion mit dem <i>NucleoBond PC Kit</i>	111
5.2.6	Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration	112
5.2.7	PCR im Block-Thermocycler.....	112
5.2.8	<i>Real-time</i> PCR Analyse	113
5.2.9	Aufreinigung von DNA mit dem <i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	114
5.2.10	Genomisches Fingerprinting (RAPD-PCR / ERIC-PCR).....	115
5.2.11	Genomisches Fingerprinting rep-PCR Analyse	116
5.2.12	Analyse von PCR–Amplifikaten mittels Kapillargelelektrophorese	116
5.2.13	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	117
5.2.14	Agarosegelelektrophorese	118
5.2.15	Transfer von DNA-Fragmenten mittels Vakuum (<i>Southern Blot</i>).....	118
5.2.16	<i>Southern</i> -Hybridisierung.....	119

5.2.17	Detektion des kolorimetrischen Nachweises	120
5.3	DNA-Sequenzierung (Cycle Sequencing)	120
5.3.1	Aufreinigung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung	121
5.3.2	Sequenzierung mit dem <i>BigDye Terminator Kit</i>	121
5.3.3	Reinigung von Sequenzieransätzen mittels Sephadex G50 Gelfiltration	121
5.3.4	Analyse der DNA-Sequenzierungsprodukte mittels Kapillargelelektrophorese ...	122
5.4	MALDI-TOF-MS Analyse	123
5.4.1	Probenvorbereitung	123
5.4.2	Aufnahme der Spektren	123
5.4.3	Analyse und Interpretation der Spektren	124
5.5	Genomsequenzierung	124
5.5.1	Genom-Sequenzierung und Lückenschluss	124
5.5.2	Annotation des Genom.....	125
5.5.3	Berechnung des phylogenetischen Stammbaums	125
5.5.4	GC <i>skew</i> Analyse	125
5.6	Microarray	126
5.6.1	Lineare Multiplex-PCR.....	126
5.6.2	Prozessieren des Microarrays.....	127
5.6.3	Hybridisierung des Microarrays.....	127
5.6.4	Detektion mittels Streptavidin-Cy3	128
5.6.5	Messung im Microarrayscanner und Analyse der Daten	128
6	Material und Geräte	129
6.1	Bakterienstämme	129
6.2	Enzyme.....	131
6.3	Reagenzien.....	132
6.4	Puffer und Lösungen	133
6.5	Nährmedien	134
6.5.1	Medienzusätze.....	134
6.6	Testkits.....	135
6.7	Oligonukleotide	136
6.8	DNA-Größenmarker	139
6.9	Software.....	139
6.10	Geräte.....	140
6.11	Sonstige Materialien	141

7	Abkürzungen.....	142
8	Literatur	143
9	Anhang.....	153

1 Zusammenfassung

Streptococcus gallolyticus subsp. *gallolyticus* ist ein fakultativ pathogenes Bakterium, das schwerwiegende Erkrankungen wie die infektiöse Endokarditis, Meningitis und Sepsis in Mensch und Tier verursachen kann. Der Organismus wird im humanen Gastrointestinaltrakt als putativer Kommensale nachgewiesen, zeigt jedoch eine starke Assoziation mit kolorektalen Karzinomen. Unklar ist, ob eine Transmission zwischen Mensch und Tier möglich ist und inwiefern Tierpopulationen ein Reservoir für dieses Pathogen darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst alle in einer Streptokokken-Stammsammlung vorhandenen Isolate tierischer und humaner Herkunft, mittels *sodA* DNA-Sequenzierung und MALDI-TOF-MS, identifiziert. Die erhaltenen Daten zeigten eine ausgezeichnete Korrelation und wurden für eine phylogenetische Analyse der Stämme verwendet.

Die bestehende Taxonomie wurde bestätigt und es konnten 18 Stämme aus verschiedenen Stammsammlungen als taxonomisch falsch hinterlegt identifiziert werden. Weiterhin wurde die Voraussetzung geschaffen, um eine zuverlässige und kosteneffiziente Identifizierung des *S. bovis* / *S. equinus* Komplexes mittels der in der Routinediagnostik verwendeten MALDI-TOF-MS Methode zu ermöglichen.

Ferner wurde in dieser Arbeit das Genom eines hochvirulenten humanen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolats sequenziert und analysiert. Es wurden entscheidende, für die bakterielle Pathogenität verantwortliche, Virulenzfaktoren identifiziert und *in silico* mit anderen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genomen verglichen. Darunter befinden sich putative Hämolyse, Kollagenadhäsine und Pilusproteine, die alle maßgeblich an der Infektionskaskade beteiligt sind. Erstmals konnte das Plasmid pSGG1 beschrieben werden, welches Träger einer Tetracyclinresistenz ist. Diese Informationen tragen zum Verständnis der Pathogenese von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bei und dienen als fundamentale Grundlage für weitere durchgeführte Forschungsvorhaben.

Ausgehend von den gesammelten Genominformationen wurde in weiteren Arbeiten ein *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* spezifischer Microarray entwickelt. Dieser sogenannte „GalloChip“ detektiert 203 für Virulenz- und Antibiotikaresistenzproteine kodierende Gene und wurde erfolgreich für die Charakterisierung des vorhandenen Stammkollektivs eingesetzt. Die ermittelten Daten lassen unter anderem Rückschlüsse auf die Kollagenbindungsfähigkeit und damit die putative Virulenz zu.

Erstmalig wurde eine *real-time* PCR basierte Methode zum Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Stuhlproben etabliert und angewendet. Erste Daten weisen auf eine hohe Kolonisierungsrate des humanen Gastrointestinaltraktes hin und unterstreichen den Bedarf einer umfassenden Studie zur Prävalenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Durch die Etablierung einer ERIC-PCR, einer rep-PCR und der erstmaligen Entwicklung eines *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* spezifischen MLST-Schemas konnten Stämme in charakteristische Cluster eingeordnet werden. Es wurde gezeigt, dass keine signifikanten wirtsspezifischen Populationen nachweisbar sind. Damit konnte die Grundlage geschaffen werden, um epidemiologische Zusammenhänge zu analysieren und Infektionsketten zu erkennen.

Abstract

The facultative pathogen *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* is able to cause several serious diseases, including infective endocarditis, meningitis and sepsis in animals and humans. It can be identified as a commensal in humans, but equally has a strong association with colorectal cancer. A transfer from animals to humans is not proven up to now and whether infected animals might be a potential reservoir for this pathogen is still elusive.

Within this work the identification of an existing collection of *Streptococcus* strains with human and animal origin, by use of *sodA* DNA-sequencing and MALDI-TOF-MS, was performed. The respective data show an excellent correlation and were used for phylogenetic analysis. The current taxonomy was confirmed and, furthermore, 18 strains from different collections were updated because of a previous false taxonomy classification. In addition, the preconditions for reliable and cost-efficient MALDI-TOF-MS routine diagnostic identification for the *S. bovis* / *S. equinus* complex were created.

Moreover, the genome of a high virulent human *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolate was sequenced and analyzed. Important virulence factors for bacterial pathogenicity could be identified, including putative genes coding for hemolysins, collagen-adhesins and pilusproteins, which are known to mediate infection processes. For the first time the presence of the plasmid pSGG1 was shown, carrying genes for tetracycline resistance. These results will lead to a better understanding of the pathogenesis of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* and provides fundamental information for further projects.

Based on acquired genetic data, a *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* specific qualitative microarray has been established. The “GalloChip” is able to detect 203 virulence and antibiotic resistance genes and was used for typing the established strain collection. The obtained data show correlation to collagen binding ability and therefore lead to estimation of putative virulence.

A *real-time* PCR based method for detecting *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in human feces was established, too. First results of screening experiments present a high prevalence in human gastrointestinal tracts and underline the need for an extensive study of prevalence of *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. With establishing an ERIC-PCR, a rep-PCR and for the first time a *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* specific MLST-scheme, strains could be characterized and grouped in clusters. No evidence for host- or geographic related specific clustering of strains occurred. The development of these methods provides the basics for analyzing the epidemiological connections and infection chains.

2 Einleitung

2.1 Taxonomie der Streptokokken

Erstmalig beobachtete Theodor Billroth vor über 100 Jahren das Auftreten kettenförmiger Kokken in Wunden und benannte diese als *Streptococcus* (*S.*) (aus dem Griechischen *streptos* = Kette und *kokkos* = Beere oder Samen) (Billroth 1874). Die nah verwandten Streptokokken und Enterokokken wurden lange zusammen als Genus *Streptococcus* geführt, konnten aber durch moderne diagnostische Methoden als getrennte Genera identifiziert werden (Schleifer *et al.* 1984; Ludwig *et al.* 1985).

Streptokokken sind nicht sporulierend, weisen eine Größe von 0,5 – 1,25 µm auf und liegen in Paaren oder Ketten vor. Charakteristische biochemische Eigenschaften für die meisten Streptokokken sind die homofermentative Verstoffwechslung von Milchsäure, die fehlende Synthese von Hämin und Chinonen, sowie Aerotoleranz trotz Fehlen einer intakten Atmungskette. Die Streptokokken zählen zu den fakultativ anaeroben grampositiven Kokken und bilden zusammen mit *Lactococcus*, *Okadaella* und *Lactovum* die Familie der Streptococcaceae in der Abteilung der Firmicutes. Streptokokken lassen sich durch Kultivierung auf Blutagar in α -, β - und γ -hämolyzierende Spezies unterteilen, wobei die α -Hämolyse für vergrünende, teil-hämolyzierende Streptokokken, die β -Hämolyse für komplett-hämolyzierende und die γ -Hämolyse für nicht hämolyzierende Streptokokken charakteristisch ist (Brown 1919). Dabei beruht die partielle Hämolyse auf der Sezernierung von Wasserstoffperoxid, welches Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert und damit einen grünlichen Hof bilden kann. Eine feinere systematische Einteilung erfolgte aufgrund zellwandständiger Polysaccharide, der C-Substanz, in die durch Lancefield definierten Serotypen (Lancefieldklassen) A bis E und später A bis V (Lancefield 1933; Bridge *et al.* 1983; Kayser *et al.* 1998). Die spezifischen Vertreter der Lancefield-Einteilung sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Bisher wurden mehr als 40 *Streptococcus*-Spezies identifiziert, welche als human-, tier oder apathogen beschrieben sind und teilweise, wie zum Beispiel *Streptococcus gordonii*, kommensale Charakteristika besitzen. Streptokokken sind in Erde, Wasser, Milchprodukten und anderen Nahrungsmitteln, sowie Pflanzen nachweisbar. Sie sind für eine Vielzahl an humanen Erkrankungen wie Tonsillitis (*S. pyogenes*), Karies (*S. mutans*), bakterielle

Lungenentzündung (*S. pneumoniae*), sowie Meningitis, Erysipel, nekrotisierende Fasziiitis, Endokarditis und viele weitere Infektionen verantwortlich (Hardie *et al.* 1997). Es lassen sich sechs durch 16S rDNA Analyse genetisch determinierte Hauptgruppen von Streptokokken unterscheiden. Diese sind *S. pyogenes*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. bovis*, *S. anginosus* und *S. mutans* (Kawamura *et al.* 1995).

Tabelle 2-1: Historische Einteilung der Streptokokken in Lancefield Gruppen.

Lancefield Gruppe	Spezies
A	<i>S. pyogenes</i>
B	<i>S. agalactiae</i>
C	<i>S. equi</i> , <i>S. zooepidemicus</i> , <i>S. equisimilis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. animalis</i>
D	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>S. bovis</i> , <i>S. gallolyticus</i>
E	<i>S. uberis</i> , <i>S. infrequens</i>
F	Nicht näher bestimmt
G	<i>S. anginosus</i>
H	<i>S. sanguis</i> , <i>S. dysgalactiae</i>
K	<i>S. salivarius</i>
M	Nicht näher bestimmt
N	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. raffinolactis</i>
O-S	Nicht näher bestimmt
Q	<i>S. avium</i>

2.2 *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Eine Differenzierung der Lancefield Gruppe D Streptokokken erfolgte zunächst in Mannitol-fermentierende (*S. equinus*, *S. bovis* Biotyp I), nicht Mannitol-fermentierende und β -Glucuronidase negative (*S. bovis* Biotyp II/1), sowie nicht Mannitol-fermentierende und β -Glucuronidase positive Streptokokken (*S. bovis* Biotyp II/2).

Die von Facklam aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften typisch und atypisch genannten Varianten von *S. bovis* wurden später von Parker und Ball ebenfalls als Mannitol-fermentierende (*S. equinus*, *S. bovis* Biotyp I) und nicht Mannitol-fermentierende (*S. bovis* Biotyp II) charakterisiert (Facklam 1972; Parker *et al.* 1976).

Osawa *et al.* stellten später fest, dass aufgrund ihrer Eigenschaften Tannin zu hydrolysieren und Gallussäure zu decarboxylieren die Spezies *S. bovis* Biotyp I als neue Spezies *S. gallolyticus* geführt werden sollte (Osawa *et al.* 1995). Zeitgleich entdeckten Brooker *et al.* Tannin-tolerante Stämme und benannten sie als *Streptococcus caprinus* (Brooker *et al.* 1997). Phänotypische und genotypische Vergleiche zeigten, dass *S. gallolyticus* und *S. caprinus* identisch sind, demnach wurden sie 1997 unter der Spezies *S. gallolyticus* zusammengefasst (Sly *et al.* 1997).

Eine taxonomische Klassifizierung auf genetischer Basis mittels DNA-DNA Hybridisierung zeigte, dass die Gruppe D Streptokokken in sechs verschiedene DNA-Gruppen unterteilt werden können. Gruppe 1 beinhaltet *Enterococcus (E.) faecalis* (NCDO 581), Gruppe 2 die Spezies *E. faecium* (NCDO 942) und die Spezies *E. durans*, Gruppe 3 bildet sich aus den mit dem *type strain* NCDO 596 verwandten *S. durans* Stämmen. Die Gruppe 4 wird gebildet aus den mittlerweile zu den Enterokokken gehörenden *E. casseliflavus* (ehemals *S. casseliflavus*), die 5. Gruppe besteht aus *E. avium* (ehemals *S. avium*). Die letzte Gruppe beinhaltet aus Hühnern isolierte *S. bovis* Stämme (Farrow *et al.* 1983).

Die erstmalige Beschreibung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* erfolgte 2003 von Schlegel *et al.*. Auf Basis von DNA-DNA Hybridisierungs-Experimenten, sowie 16S rDNA Analysen und phänotypischer Eigenschaften benannte er *S. bovis* Biotyp I als *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. bovis* Biotyp II/2 als *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. Weiterhin gliederte er den bis dahin eigenständigen *S. macedonicus* als *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* ein (Schlegel *et al.* 2003). Eine Darstellung der Taxonomie und deren Historie ist in Abb. 2-1 dargestellt.

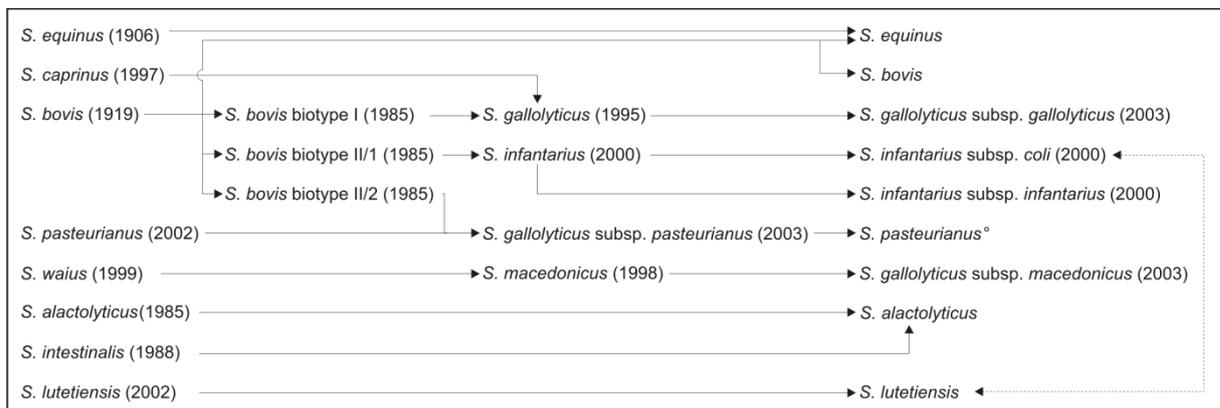


Abb. 2-1: Übersicht der Änderungen in der Taxonomie der Streptokokken. Die gepunktete Linie verdeutlicht, dass *S. lutetiensis* und *S. infantarius* subsp. *coli* synonym zu behandeln sind. ° = *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* und *S. pasteurianus* sind synonym zu behandeln.

Das makroskopische Erscheinungsbild von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zeigt, dass die Koloniegröße nach 24 h Wachstum auf Blutagar-Platten bei 37 °C zirka 1 mm im Durchmesser beträgt, wobei die Kolonien unpigmentiert, α -hämolytisch oder γ -hämolytisch sind (Abb. 2-2).

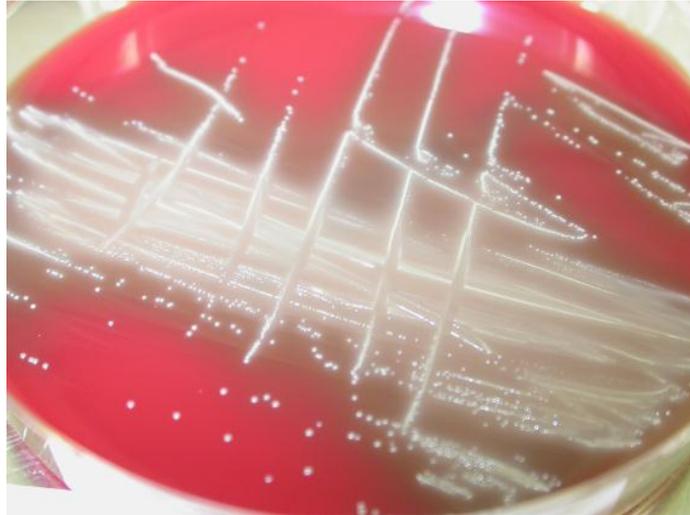


Abb. 2-2: Kolonien von *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auf einer Blutagar-Platte.

Die unbeweglichen, nicht-sporulierenden Zellen sind kokkenförmig, grampositiv und wachsen meist in Paaren oder kurzen Ketten. Die Charakterisierung auf Basis der Stoffwechselprodukte zeigt, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Leucin-Aminopeptidasen, Alanyl-Phenylalanyl-Prolin, Acetoin und Arylamidase synthetisiert. Die Art ist Katalase-negativ, fakultativ anaerob und wächst in MRS-Medium ohne Gasproduktion. Die Produktion von β -Galactosidase, β -Glucuronidase, β -Mannosidase und β -Glucosidase ist variabel, genauso wie die Hydrolyse von Aesculin. Meistens wird α -Galactosidase gebildet, selten jedoch Pyrrolidonyl, Arylamidase oder alkalische Phosphatase. Arginin, Harnsäure und Hippursäure können nicht hydrolysiert werden.

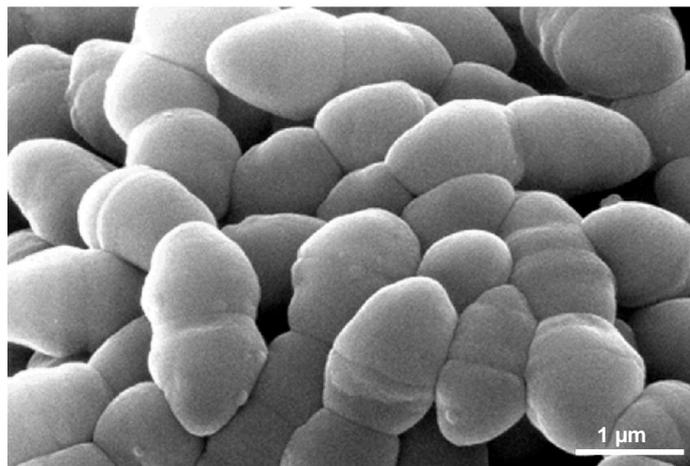


Abb. 2-3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Maßstab: 1 μ m. Quelle: (O'Donovan *et al.* 2001).

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* kann Säuren aus Laktose, Maltose, Saccharose und Glykogen, jedoch nicht aus Arabitol, Tagatose, Ribose, Sorbitol oder Cyclodextrin synthetisieren.

Die phänotypische Besonderheit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Vergleich zu nah verwandten Spezies ist die Fähigkeit zur Decarboxylierung von Gallussäure zu Pyrogallol, sowie die Tannase-Aktivität, welche eine Hydrolyse von Methlygallat ermöglicht. Weiterhin ist eine Fermentation von Mannitol, Trehalose und Inulin zu beobachten (Osawa *et al.* 1995; Schlegel *et al.* 2003).

Mit Hilfe moderner Methoden kann eine Reinkultur von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mittels DNA-Sequenzierung des 16S rDNA Genes bis auf die Speziesebene detektiert werden. Für die Identifizierung der Subspezies, respektive des Biotyps, ist die DNA-Sequenzierung der manganabhängigen Superoxiddismutase (*sodA*) oder des DNA Reparatur Proteins (*recN*) die am besten diskriminierende Methode (Glazunova *et al.* 2010).

Eine weitere, seit wenigen Jahren eingesetzte Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen ist das MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry*). MALDI-TOF-MS wurde ursprünglich als Methode zur Charakterisierung von Molmassen, Molmassenverteilungen, Monomereinheiten und Endgruppen von Polymeren und Oligomeren entwickelt. Sie basiert auf einer Kokristallisation von einer Matrix und der zu analysierenden Substanz, die mit einem hochenergetischen Laserimpuls angeregt und von der Trägeroberfläche abgelöst und beschleunigt wird. Als Matrix werden zumeist kleine organische Moleküle eingesetzt, die die verwendete Wellenlänge stark absorbieren. Ein nachgeschaltetes TOF-MS trennt die Bestandteile der zu analysierenden Substanz auf und detektiert diese. Die Methode lässt sich auf unbehandelte Reinkulturen von Mikroorganismen anwenden und wird demnach auch als *whole cell mass spectrometry* (WCMS) bezeichnet. Dabei werden hauptsächlich die sehr diversen ribosomalen Bestandteile der Zelle detektiert und die resultierenden Massen-Fingerabdrücke mit einer Datenbank abgeglichen, um eine eindeutige Identifizierung zu ermöglichen (Dieckmann *et al.* 2008; Nagy *et al.* 2009; Seng *et al.* 2009).

2.2.1 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als Pathogen

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* ist natürlicher Inhabitant des Gastrointestinaltraktes von Mensch und Tier. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* tritt als Kommensale, Opportunist oder

Infektionserreger auf. Der überwiegende Teil der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate wird im Kot von Beuteltieren und Wiederkäuern, aber auch von Säugetieren wie Pferden, Schweinen, Hunden, Meerschweinchen und Schafen nachgewiesen. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist ein Erreger der Mastitis, von der insbesondere Milchkühe betroffen sind (Sasaki *et al.* 2004). Bei Vögeln wird *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* hauptsächlich bei Tauben nachgewiesen und führt zu schwerwiegenden Erkrankungen wie akuter Sepsis (Baele *et al.* 2000). Sporadisch dokumentiert sind Funde in Nahrungsmitteln wie Milch oder Rohmilchkäse (Tsakalidou *et al.* 1998; Randazzo *et al.* 2006).

Die humanen Isolate stammen meist aus Explantaten, Blut- oder Stuhlkulturen. Es ist bisher unbekannt, inwiefern *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu der transienten oder persistenten Darmflora des Menschen gehört. Die Nachweisrate im menschlichen Stuhl liegt zwischen 2,5 und 15 %, wobei diese Daten sich nicht auf dezidiert ausgelegte Studien stützen können (Sillanpää *et al.* 2009). Eindeutige Studien gibt es bezüglich der Assoziation zwischen dem Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* als kausativer Erreger der infektiösen Endokarditis (IE) und dem Auftreten von Neoplasien im Gastrointestinaltrakt (Gold *et al.* 2004; Alazmi *et al.* 2006; Boleij *et al.* 2009; Abdulmir *et al.* 2011). Weitere durch den Erreger verursachte Erkrankungen sind Sepsis und Meningitis, insbesondere bei Säuglingen (Headings *et al.* 1978; Grant *et al.* 2000; White *et al.* 2002).

2.2.2 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in der infektiösen Endokarditis

Die α -hämolisierenden Streptokokken (Viridans-Gruppe) sind die am häufigsten nachgewiesenen Pathogene bei IE-Patienten ohne intravenösen Drogenabusus. Untersuchungen haben gezeigt, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in 24 % der Streptokokken-Endokarditiden als kausatives Pathogen identifiziert werden konnte (Sillanpää *et al.* 2008). Insbesondere in Südeuropa hat die Anzahl der *Streptococcus* D Endokarditiden in den letzten Jahren erheblich zugenommen (Hoen *et al.* 2005; Tripodi *et al.* 2005). So ist der Prozentsatz der durch *S. bovis* verursachten Endokarditiden von 10,9 % vor 1989 auf 23,3 % nach 1989 gestiegen und betrug in Frankreich 2005 56,7 %, im Rest von Europa 9,4 % und in den USA 6 % (Hoen *et al.* 2005).

2.2.2.1 Pathogenese der infektiösen Endokarditis

Die Voraussetzung für die Entstehung der bakteriell bedingten infektiösen Endokarditis ist die Adhäsion im Blutstrom zirkulierender Bakterien an das Endokard. Nachfolgend ist die

bakterielle Kolonisation und Persistenz entscheidend für das weitere Fortschreiten des Krankheitsbildes.

Im Wesentlichen kann zwischen zwei grundlegenden Kolonisierungsmechanismen unterschieden werden. Einerseits ist intaktes Endothelgewebe resistent gegen die Kolonisierung zirkulierender Bakterien und kann ausschließlich durch virulente oder invasive (z. B. *Staphylococcus aureus*), sowie parasitierende (z. B. *Coxiella burnetii*) Pathogene besiedelt werden. Bei einer IE ohne vorhergehende Klappenschädigung muss der Erreger durch spezielle Oberflächenproteine (Adhäsine) in der Lage sein intaktes Endothelgewebe zu besiedeln und zu penetrieren (Kayser *et al.* 1998). Andererseits können vorgeschädigte Herzklappen sowohl durch invasive als auch durch nicht-invasive Pathogene kolonisiert werden. Dabei können durch endotheliale Läsionen Proteine der extrazellulären Matrix (ECM), sowie darunterliegender Stromazellen an der Zelloberfläche des Endothels exponiert werden und damit als Adhäsionslokus für Pathogene fungieren. Die Rekrutierung von Fibrin und Thrombozyten zum geschädigten Gewebe führt zu einer nicht-bakteriellen thrombotischen Endokarditis (NBTE) (Allen *et al.* 2002; Leask *et al.* 2003).

Mithilfe zelleigener Oberflächenmoleküle, den MSCRAMMs (*microbiol surface components recognizing adhesive matrix molecules*), können mikrobielle Pathogene sowohl an freiliegende Proteine der ECM als auch an die NBTE adhären. Es folgt die Gewebebesiedlung mit Erregerreplikation, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst wird. In der weiteren Krankheitsentwicklung breitet sich der Entzündungsprozess in das benachbarte Gewebe aus. Die durch Fibrinanlagerungen wachsende endokardiale Vegetation hüllt auch die Mikroorganismen vollständig ein, wodurch diese vor der körpereigenen Abwehr geschützt werden. Schließlich kann es zu einer hämatogenen Streuung des infektiösen Prozesses kommen (Ramirez-Ronda 1978; Herzberg *et al.* 1997; Moreillon *et al.* 2002).

Eine bislang ungeklärte Frage ist der Ursprung der im Blut zirkulierenden Bakterien. Da *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ein Habitant des Gastrointestinaltraktes ist, wird davon ausgegangen, dass der Erreger durch aktive oder passive Translokation der Darmwand in die Blutbahn übergeht. Boleij *et al.* zeigten, dass eine *in vitro* Translokation durch Epithelzellen möglich ist und postulieren dieses als Eintrittspforte in den Blutkreislauf, um damit die Voraussetzung für die Entstehung einer IE zu schaffen (Boleij *et al.* 2011).

Am Herz- und Diabeteszentrum NRW wurden bereits umfassende Studien zur Invasion und Adhäsion verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate an die endotheliale Zelllinie EA.hy926 durchgeführt. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* weist demnach ein stammabhängiges Potential zur Adhäsion und Invasion an die humane Endothelzelllinie EA.hy926 auf. Abweichend von dieser Beobachtung konnte ein Stamm identifiziert werden, der keine Invasion zeigt. Weiterhin konnte *in vitro* die Bindung an verschiedene Komponenten der Proteine der ECM gezeigt werden. Dabei wurde die stärkste Bindung an Kollagen I, II und IV, gefolgt von Fibrinogen, Tensacin und Laminin festgestellt (Vollmer *et al.* 2010). Des Weiteren konnte ein stammdivergentes Potential zur Biofilmbildung an Polyesteroberflächen aufgezeigt werden, sowie der Nachweis der putativen Virulenzfaktoren *fimB* (Fibrinogen-bindendes Protein B), *gtf* (Glycosyltransferase) und *pilB* (Pilusprotein B) erbracht werden (Hinse 2008).

In weiteren Arbeiten wurde die Fähigkeit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zur Stimulation der Immunantwort auf Basis der Interleukine analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im endothelialen Zellkulturmodell keine Stimulation des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β und nur eine sehr geringe Stimulation von TNF- α verursacht. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche, stammabhängige Stimulation von TNF- α durch periphere mononukleäre Zellen nach Vollblutstimulation mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nachgewiesen werden (Weinstock 2010). Ergänzend wurde ein molekulargenetisches System entwickelt, welches in Zukunft *knockout*- und Komplementationsexperimente in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ermöglichen soll (Dederer 2009).

2.2.3 Assoziation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit Neoplasien des Kolons

Eine Assoziation von spezifischen Bakterien und humanen Karzinomen ist lange bekannt, deren Mechanismen sind aber nach wie vor weitestgehend unklar. Es wird vermutet, dass 15 % der weltweit auftretenden Krebserkrankungen durch Infektionen ausgelöst werden (Pisani *et al.* 1997). So ist *Helicobacter pylori* sowohl ein Verursacher von Magenkarzinomen, als auch von Lymphomen im Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) (Crowe 2005). *Chlamydomphila pneumoniae* ist ein Kausativ für Lungenkarzinome und es wird angenommen, dass *Salmonella typhi* Gallenblasen-Karzinome verursacht (Littman *et al.* 2004).

Das kolorektale Karzinom ist die am dritthäufigsten auftretende Krebsart in Industrienationen und wird meist bei über 50-Jährigen diagnostiziert. Die Überlebensrate ist stark abhängig von dem Zeitpunkt der Erstdiagnose. So liegt die 5-Jahres Überlebensrate bei Entdeckung des Karzinoms in einem frühen Stadium bei über 90 % und sinkt bei regionaler Metastasierung auf 40 – 65 %. Erfolgt die Diagnose erst im Stadium der distalen Metastasierung, so liegt die Überlebensrate bei 10 % (Mager 2006).

Im Jahr 1951 beobachteten McCoy und Mason erstmals einen direkten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von bakterieller Endokarditis und Kolonkarzinomen (McCoy *et al.* 1951). 1974 wurde eine Verbindung zwischen *S. bovis* (nach alter Nomenklatur) und kolorektalen Neoplastomen hergestellt. Untersuchungen ergaben, dass 25 – 80 % der Patienten, die eine *S. bovis* Bakteriämie zeigten, einen kolorektalen Tumor aufwiesen. Die Inzidenz von *S. bovis* und gastrointestinalen Neoplasien wurde mit 18 – 62 % angegeben (Leport *et al.* 1987; Zarkin *et al.* 1990). Problematisch bei der Betrachtung der Zusammenhänge ist jedoch die Variation der taxonomischen Bezeichnung der zugrundeliegenden Spezies. Viele Publikationen verwenden die Bezeichnung *S. bovis* ohne Angabe des entsprechenden Biotyps, so dass ein eindeutiger Rückschluss auf die Spezies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nicht möglich ist. Neuere Publikationen mit genauer taxonomischer Bezeichnung verweisen allerdings eindeutig auf die Assoziation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit kolorektalen Karzinomen. Daher wird auch in dem aktuellen Übersichtsartikel von Boleij *et al.* davon ausgegangen, dass auch in früheren Arbeiten mit *S. bovis* Biotyp I (demnach *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*) gearbeitet wurde (Boleij *et al.* 2011).

Zwar zeigten Studien im Rattenmodell, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* die Karzinogenese direkt fördert (Ellmerich *et al.* 2000), jedoch ist davon auszugehen, dass ein multifaktorieller Prozess nötig ist, um eine Ausbildung von Tumoren zu induzieren. Eine Studie von Boleij *et al.* zeigte, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im direkten Vergleich zu anderen Pathogenen eine geringe Adhäsionsfähigkeit an Epithelzellen und keinerlei Internalisierungspotential besitzt. Jedoch konnte eine parazelluläre Translokation der Epithelmembran ohne Stimulation von Interleukin-8 oder -1 β beobachtet werden (Boleij *et al.* 2011).

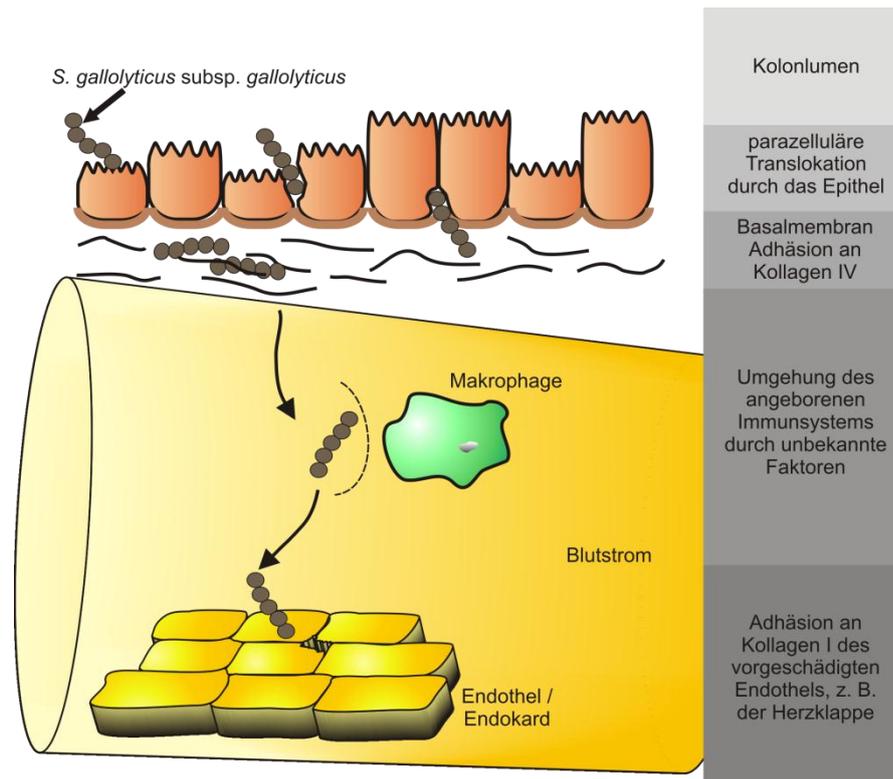


Abb. 2-4: Putative Pathogenese von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Modifiziert nach (Boleij et al. 2011).

Zusammen mit den postulierten Fähigkeiten der Umgehung des angeborenen Immunsystems, unter anderem durch eine Polysaccharid-Kapsel, und einer ausgeprägten Fähigkeit zur Ausbildung von Biofilmen, besonders an Kollagen IV-Oberflächen, postulierte Boleij die Theorie, dass nach der parazellulären Translokation durch das vorgeschädigte Darmepithel eine Vegetation an einer kollagenreichen ECM der Initiationspunkt für ein Karzinom sein könnte (Abb. 2-4).

2.3 Virulenzfaktoren von Streptokokken

Als Virulenzgene werden Gene bezeichnet, die für Strukturen oder Proteine kodieren, welche zur bakteriellen Adhäsion, Invasion, Penetration oder Destruktion von Geweben beitragen und damit in direktem Zusammenhang mit einer Infektion stehen. Dazu zählen Toxine, Adhäsions- und Invasionsfaktoren, Kapselgene und Hämolyse.

Der erste und damit entscheidende Schritt in der Pathogenese einer Infektion ist die Adhäsion an das Zielgewebe. Viele dieser Interaktionen werden durch bakterielle Oberflächenproteine, so genannte Adhäsine, geleistet. Virulenzfaktoren, die bekanntermaßen bei der Adhäsion von Streptokokken eine Rolle spielen, sind die Glycosyltransferase (*gtf*) und Fruktosyltransferase

(*ftf*), welche zunächst bei Karies bildenden Streptokokken (Gould *et al.* 1975; Scheld *et al.* 1978), sowie mittlerweile auch in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* identifiziert werden konnten (Vollmer *et al.* 2010). Diese Enzyme sind auch an der Matrixproduktion im extrazellulären Umfeld der Bakterien, sowie an der Modulation bakterieller Adhäsionsprozesse an der Oberfläche von Thrombozyten involviert (Vacca-Smith *et al.* 1994). Ein weiterer bekannter Faktor ist die Lipoteichonsäure (LTA), welche bei Grampositiven kovalent an die Glykopeptide der Plasmamembran gebunden vorliegt. Sie ist ein potenter Induktor der inflammatorischen Kaskade und ermöglicht insbesondere Gruppe A Streptokokken an verschiedene Zielgewebe zu adhären (Beachey *et al.* 1976; Courtney *et al.* 1992). Die ersten für Streptokokken beschriebenen Adhäsionsfaktoren sind hingegen die M-Proteine (Ellen *et al.* 1972). Es handelt sich hierbei um multifunktionale Virulenzfaktoren auf der bakteriellen Oberfläche, die unter anderem eine anti-phagozytische Wirkung vermitteln. Dadurch wird das Überleben der Bakterien in der Gegenwart von neutrophilen Granulozyten begünstigt (Fischetti 1989; Staali *et al.* 2003). Bisher konnten noch keine M-Proteine in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nachgewiesen werden.

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor in der Pathogenese ist die Polysaccharidkapsel. Als äußerste Hülle eines Bakteriums kann sie zahlreiche Interaktionen initiieren. Sie beeinflusst unter anderem die Adhäsion an Zielgewebe und den Schutz vor dem angeborenen Immunsystem des Wirtes (Marques *et al.* 1992; Hyams *et al.* 2010). Lin *et al.* und Rusniok *et al.* konnten zeigen, dass eine Polysaccharidkapsel auch in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* vorhanden ist (Rusniok *et al.* 2010; Lin *et al.* 2011).

Zusätzliche adhäsionsbeeinflussende Faktoren sind Pilusproteine, welche im *in vitro* Modell die Bindung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an Kollagen, die Biofilmbildung und die Virulenz im experimentellen Modell beeinflussen können (Danne *et al.* 2011). Außerdem übernehmen sie bei der Resistenz gegen Cathelicidin, ein Bestandteil der körpereigenen Immunabwehr, und bei der Adhäsion an endotheliale Zellen eine entscheidende Funktion (Maisey *et al.* 2007; Maisey *et al.* 2008). Auch spezifische Oberflächenproteine, die als MSCRAMMs bezeichnet werden, spielen bei der bakteriellen Adhärenz eine wichtige Rolle (Patti *et al.* 1994). Charakteristisch für diese MSCRAMMs ist das Vorhandensein einer N-terminalen Signalpeptidsequenz, wodurch das Ausschleusen des Proteins aus der Zelle ermöglicht wird, sowie das Auftreten eines C-terminalen Zellwandankermotivs, über das das Protein kovalent in der bakteriellen Zellwand verankert wird. Zielmoleküle dieser potentiellen Bindedomänen sind meist Proteine der ECM auf dem Zielgewebe. Zwölf MSCRAMMs

konnten bereits von Sillanpää *et al.* in einem *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genom identifiziert werden.

2.4 Grundlagen der Genomsequenzierung

Der Begriff Genomsequenzierung oder *full genome sequencing* (FGS) umschreibt die Sequenzierung eines kompletten Genoms eines Organismus innerhalb eines Experiments. Die Sequenzierung eines kompletten Bakteriengenoms kann hilfreich sein, um einen Einblick in die Pathogenese von Erregern zu erlangen. Auch im Hinblick auf Diagnose und Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung können wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden (Morozova *et al.* 2008).

Bereits 1995 wurde die erste vollständige bakterielle Genomsequenz von *Haemophilus influenzae* veröffentlicht (Fleischmann *et al.* 1995). Jedoch konnte sich erst durch die modernen Methoden des *next generation sequencings* (NGS) die Genomsequenzierung in der breiten Forschungsgemeinschaft etablieren. Das Prinzip der NGS basiert dabei immer auf einer ultraparallelen Hochdurchsatzsequenzierung, bei der zyklisch die Basenkomposition von klonalen Amplikons ausgelesen wird. Dazu stehen mittlerweile verschiedene kommerzielle Systeme zur Verfügung. Das 454-System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) basiert auf einer Fragmentierung der *Template*-DNA, mit anschließender Ligation von Adapterfragmenten. Je ein Fragment wird an ein Mikropartikel gebunden und in einer Vertiefung einer *Microkavitäten*-Platte mittels Emulsions-PCR amplifiziert. Die Entschlüsselung der Basensequenz erfolgt über Pyrosequenzierung, bei der sequenziell je eines von vier Desoxynukleotiden während einer PCR-Reaktion inkorporiert wird. Bei jedem Einbau eines Nukleotids wird durch Spaltung ein Pyrophosphat freigesetzt, welches durch eine ATP-Sulfurylase in ATP konvertiert wird. Eine Luziferase erzeugt mit Hilfe von ATP und Luziferin ein Lichtsignal, welches zum Beispiel durch eine CCD-Kamera detektiert wird. Ungebundene Nukleotide und ATP werden durch die Apyrase degradiert und ein neuer Zyklus mit einem anderen Nukleotid beginnt (Elahi *et al.* 2004). Mittlerweile sind neuere NGS-Methoden etabliert worden, die einen weiteren Zeit- und Kostenvorteil mit sich bringen. Dazu zählen die Plattformen PacBio RS (Pacific Biosciences, Menlo Park, USA), Illumina HiSeq 2000 (Illumina, Inc. San Diego, USA) und auch die zukunftssträchtige IonTorrent Technologie (Life Technologie, Guilford, USA), bei der der Einbau von Nukleotiden durch die elektrochemische Detektion von H⁺-Ionen gemessen wird (Mardis 2008; Pareek *et al.* 2011; Rothberg *et al.* 2011).

2.5 Grundlagen der DNA-Chip Technologie

Microarrays können sowohl für die Expressions-Analyse, die Protein- oder Glycom-Analytik als auch den Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen eingesetzt werden. Diese Anwendung ist daher gut geeignet, um spezifische Virulenzmuster zu erkennen und daraus Informationen über die Pathogenese von Infektionen zu erlangen. So konnte unter anderem bei der von Rato *et al.* durchgeführten Typisierung der Virulenzmuster von *S. pyogenes* Isolaten gezeigt werden, dass spezifische humane und tierische Virulenzgene existieren (Rato *et al.* 2011). Auch bei klinisch relevanten diagnostischen Verfahren, zum Beispiel der Resistenzbestimmung bei *Pseudomonas aeruginosa*, können Microarrays einen wertvollen Beitrag leisten. Weile *et al.* entwickelten einen Microarray zur Genotypisierung von Resistenzgenen, der innerhalb von 5 h Rückschlüsse auf das Resistenzprofil von *P. aeruginosa* zulässt (Weile *et al.* 2007).

Die ersten Publikationen über DNA-Microarrays stammen von Fodor *et al.* aus dem Jahr 1993 (Fodor *et al.* 1993), wobei mit photolithographischen Verfahren gearbeitet wurde. Die von Fodor *et al.* entwickelte Technik beruht auf der Immobilisierung eines Initialmoleküls mit einer photolabilen Schutzgruppe auf der Chipoberfläche und einer anschließenden UV-Bestrahlung. Die so gebildete Hydroxylgruppe, welche ein Phosphoramidit-aktiviertes dNTP binden kann, wird unter Zuhilfenahme verschiedener photolithographischer Masken, welche bestimmte Arraypositionen schützt, verlängert, so dass ein bis zu 25 Basen langes Oligonukleotid entsteht. Diese Methode ermöglicht die Synthese von extrem hohen Sondendichten von bis zu 1,8 Mio. Sonden pro Chip.

Die ersten modernen Druckverfahren für Sonden (*Spotting*) wurden 1995 von Schena und Brown beschrieben (Schena *et al.* 1995). Das *Blotting*- oder Kontaktprintingverfahren ist günstiger, flexibler und ermöglicht die Verwendung längerer SONDENSEQUENZEN. Jedoch lässt sich die Sondendichte eines photolithographisch-hergestellten Microarrays nicht erreichen. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Oberflächenspannung, bei der mit feinen Hohladeln ein pico- oder nanoliter-Volumen der gelösten Oligonukleotidsonden aufgenommen wird und mittels Kontakt mit der Chipoberfläche wieder abgegeben wird. Eine Erweiterung dieses Verfahrens ist die Piezotechnologie. Ähnlich wie bei modernen Tintenstrahldruckern wird hierbei mit elektrisch anregbaren Piezokristallen in der Hohladel ein picoliter-Volumen auf den Chip aufgebracht. Um sterische Effekte bei der Bindung von Sonde und *Target* auszuschließen wird meist ein Oligonukleotid-*Spacer* verwendet, um die SONDENSEQUENZ mit einem räumlichen Abstand von ca. 15 dNTPs auf dem Chip zu immobilisieren. Früher

wurden in erster Linie Glasobjektträger für die Immobilisierung der DNA-Sonden verwendet, modernere Verfahren setzen heutzutage vermehrt Polymersubstrate z. B. Epoxysilan als Bindungspartner für die terminale Amino-Gruppe ein.

Der Ablauf eines DNA-Microarrayexperimentes erfolgt prinzipiell immer ähnlich. Zunächst werden in einem oder mehreren Ansätzen die zu detektierenden Zielsequenzen in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dabei kommen spezialisierte Primermixe zum Einsatz, die gewährleisten, dass weder Primer noch Amplifikate untereinander eine Bindung eingehen und die PCR behindern. Weiterhin erfolgt die Markierung der nachzuweisenden DNA-Amplifikate durch den Einbau modifizierter Oligonukleotide. Die Hybridisierung erfolgt anschließend in einem hoch salzhaltigen Puffer bei definierter Temperatur. Die Detektion der nachzuweisenden Zielgene erfolgt in den meisten Anwendungen mittels Fluoreszenz-Detektion. Dabei können fluoreszenzmarkierte dNTPs oder endständig markierte Primer zum Einsatz kommen. Diese werden dann, bei der vor der Hybridisierung erfolgenden PCR, in das zu detektierende Amplifikat eingebaut und können nach der Bindung und diversen Waschschritten auf der Oberfläche des Microarrays mittels Anregung durch einen Laser und gleichzeitiger Detektion durch einen Detektor nachgewiesen werden. Die gebräuchlichsten Fluoreszenz-Farbstoffe für diesen Zweck sind die im trockenen Zustand anregbaren Cyanfarbstoffe Cy3 und Cy5. Eine weitere Möglichkeit, wie sie auch in dieser Arbeit Verwendung fand, ist der sekundäre Nachweis von an dUTPs gekoppelten und bei der PCR eingebauten Biotin-Molekülen durch ein Streptavidin-Cy3-Konjugat. Der Direktnachweis von DNA-Doppelsträngen nach Hybridisierung an der Sonde durch interkalierende Farbstoff ist eine dritte, jedoch selten genutzte Methode (Skena *et al.* 1998; Monecke *et al.* 2005; Weile *et al.* 2009).

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation und Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Die spezifische taxonomische Identifikation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ist ein wichtiger Bestandteil der Forschung, spielt aber auch im Rahmen der Diagnostik eine entscheidende Rolle. So wird bei der Diagnose einer von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* verursachten Endokarditis aufgrund des erhöhten Kolonkarzinomrisikos eine Koloskopie angeraten (Naber *et al.* 2004). Weiterhin kann eine adäquate antibiotische Therapie erst eingeleitet werden, wenn der Erreger zweifelsfrei identifiziert wurde. Oftmals ist eine Anzucht des Erregers aus einer Blutkultur oder aus einem Explantat nicht möglich, da eine antibiotische Vorbehandlung des Patienten zu einer starken Reduktion der vitalen Bakterien führt. Aus diesem Grund setzt sich immer mehr die molekulargenetische Identifizierung von Mikroorganismen durch, da diese auch mit kleinsten Mengen fragmentierter Rest-DNA zerstörter Bakterien ein zuverlässiges Ergebnis liefert. Durchgesetzt hat sich hier die Differenzierung anhand der 16S rDNA-Sequenzanalyse. Diese Methode bietet ein breites Spektrum identifizierbarer Keime, lässt jedoch bei *S. gallolyticus* keinen sicheren Rückschluss auf die Subspezies zu (Glazunova *et al.* 2009; Glazunova *et al.* 2010). Für die genaue taxonomische Einordnung von *S. gallolyticus* und vielen anderen Streptokokken hat sich in der Vergangenheit die Sequenzierung des Gens der manganabhängigen Superoxiddismutase (*sodA*) durchgesetzt (Sasaki *et al.* 2004). Eine weitere, seit wenigen Jahren eingesetzte Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen ist das MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry*). Dabei werden hauptsächlich die sehr diversen ribosomalen Bestandteile der Zelle detektiert und die resultierenden Massen-Fingerabdrücke mit einer Datenbank abgeglichen, um eine eindeutige Identifizierung zu ermöglichen (Dieckmann *et al.* 2008; Nagy *et al.* 2009; Seng *et al.* 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst alle Stämme der vorliegenden *Streptococcus* Stammsammlung mittels *sodA* DNA-Sequenzierung und MALDI-TOF-MS identifiziert. Die erhaltenen Daten wurden für eine phylogenetische Analyse der Stämme verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert (Hinse *et al.* 2011).

3.1.1 Molekulargenetische Identifikation mittels *sodA* DNA-Sequenzierung

Mittels der *sodA* DNA-Sequenzierung wurden 88 *Streptococcus* Stämme unterschiedlicher Herkunft identifiziert und die bisher nicht publizierten Sequenzen von 62 Stämmen in der NCBI Genbank hinterlegt (Hinse *et al.* 2011). Alle zugehörigen Accession-Nummern sind im in Tabelle 9-1 zu finden.

Im Zuge der Identifizierung konnten 18 Stämme aus verschiedenen Stammsammlungen genauer klassifiziert werden, sowie bisher falsch hinterlegte Identifizierungen, in Übereinstimmung mit *sodA* DNA-Sequenzierung und der MALDI-TOF-MS Zuordnung, korrigiert werden. Nachfolgend sind die Korrekturen in Tabelle 3-1 aufgeführt.

Tabelle 3-1: Liste der korrigierten Stammbezeichnungen.

Spezies oder Subspezies	Stammbezeichnung	<i>sodA</i> GenBank Accession-Nummer	In der Stammsammlung hinterlegte taxonomische Identifizierung
<i>S. alactolyticus</i>	CCUG 44480	GU991785	<i>S. lutetiensis</i>
<i>S. bovis</i>	LMG 22781	GU991768	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
<i>S. equinus</i>	LMG 16293	GU991764	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
<i>S. equinus</i>	LMG 16294	GU991765	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
<i>S. equinus</i>	LMG 16295	GU991766	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATCC 49147	FJ617230	<i>S. gallolyticus</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATCC 9809	GU991733	<i>S. gallolyticus</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	DSM 13808	FJ617227	<i>S. gallolyticus</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	DSM 20065	GU991723	<i>S. bovis</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	CCUG 39970T	GU991782	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 14862	GU991756	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 14865	GU991757	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 22784	GU991770	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	CCUG 42618	GU991778	<i>S. bovis</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	CCUG 46074	GU991780	<i>S. gallolyticus</i>
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	CCUG 47736	GU991779	<i>S. equinus</i>
<i>S. lutetiensis</i>	CCUG 41793	GU991777	<i>S. bovis</i>
<i>S. peroris</i>	CCUG 36756	GU991784	<i>S. infantis</i>

Aus den ermittelten *sodA*-Sequenzen wurde zunächst für jeden Stamm aus der *forward* und *reverse* Sequenz eine Konsensus-Sequenz erstellt. Im Anschluss wurde mittels der *MEGA 4 Software* ein multipler Sequenzvergleich durchgeführt und eine phylogenetische Analyse auf Basis der *Maximum Composite Likelihood* Berechnung vorgenommen. Die Distanzverhältnisse der Stämme untereinander wurden in einem UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) Dendrogramm dargestellt (Abb. 3-1). In der Analyse zeigten sich sieben Hauptgruppen. Die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Gruppe, die *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* Gruppe, die *S. infantarius* Gruppe, die *S. lutetiensis* Gruppe, die *S. equinus* Gruppe, die *S. bovis* Gruppe sowie die *S. alactolyticus* Gruppe. Für *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* konnte keine signifikante distanzierte Gruppe identifiziert werden.



Abb. 3-1: Phylogenetischer Stammbaum (UPGMA) von 88 *Streptococcus* Stämmen, basierend auf den *soda* DNA-Sequenzen. Die Einheit des Maßstabes gibt divergente Basen pro Nukleotid an.

Die Ähnlichkeit der *sodA* DNA-Sequenzen innerhalb der jeweiligen Gruppe betrug durchschnittlich 99,5 % und war in jedem Fall größer als 98,9 % (*S. bovis* Gruppe). Die Distanz innerhalb einer Gruppe zum korrespondierenden *type strain* betrug durchschnittlich 0 bis 0,0088 (maximal 0,031 *S. infantarius* subsp. *infantarius*) (Abb. 3-2).

Spezies / Subspezies-Gruppe	Distanz zum <i>type strain</i>		MW Inter-Gruppen Distanz					
	MW ± SD	Maximum	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
(1) <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	0.0000 ¹							
(2) <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	0.0088 ± 0.0065	0.0200	0.020					
(3) <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	0.0035 ± 0.0041	0.0100	0.054	0.043				
(4) <i>S. equinus</i>	0.0035 ± 0.0017	0.0050	0.238	0.247	0.260			
(5) <i>S. bovis</i>	0.0080 ± 0.0063	0.0150	0.237	0.244	0.248	0.018		
(6) <i>S. lutetiensis</i>	0.0037 ± 0.0029	0.0070	0.239	0.232	0.222	0.121	0.119	
(7) <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	0.0080 ± 0.0129	0.0310	0.206	0.212	0.220	0.146	0.148	0.119

¹ = kein Unterschied der *sodA* Sequenzen

Abb. 3-2: Evolutionäre Divergenz der *sodA* Sequenzen.

Aufgrund der kontinuierlichen Erweiterung des vorhandenen Kollektivs konnten nicht alle verfügbaren Stämme in der phylogenetischen Analyse berücksichtigt werden. Eine Liste mit allen in dieser Arbeit verwendeten Stämmen und deren mittels *sodA*-Sequenzierung taxonomisch eindeutig festgelegten Bezeichnungen findet sich in Tabelle 6-1.

3.1.2 MALDI-TOF-MS Identifizierung

Die in dieser Arbeit durchgeführte Identifizierung von *Streptococcus*-Stämmen mittels MALDI-TOF-MS wurde zusammen mit der Firma AnagnosTec (Potsdam, Deutschland) am *AXIMA Confidence Instrument* (Shimadzu, Japan) unter der Zuhilfenahme der *SARAMIS Software* (AnagnosTec, Potsdam, Deutschland) durchgeführt. Es wurden Massen-Spektren von 88 Stämmen erstellt und in *Cluster* geordnet. Dazu wurden Übernachtskulturen von Bakterienreinkulturen auf Blutagarplatten (BioMérieux, Nürtingen, Deutschland) angezogen und eine kleine Menge Zellmaterial auf einem Stahlträger mit der Matrix verdünnt und trocken gelassen. Die detaillierte Vorgehensweise wird in 5.4 beschrieben. Die Ergebnisse sind als Dendrogramm in Abb. 3-3 dargestellt.

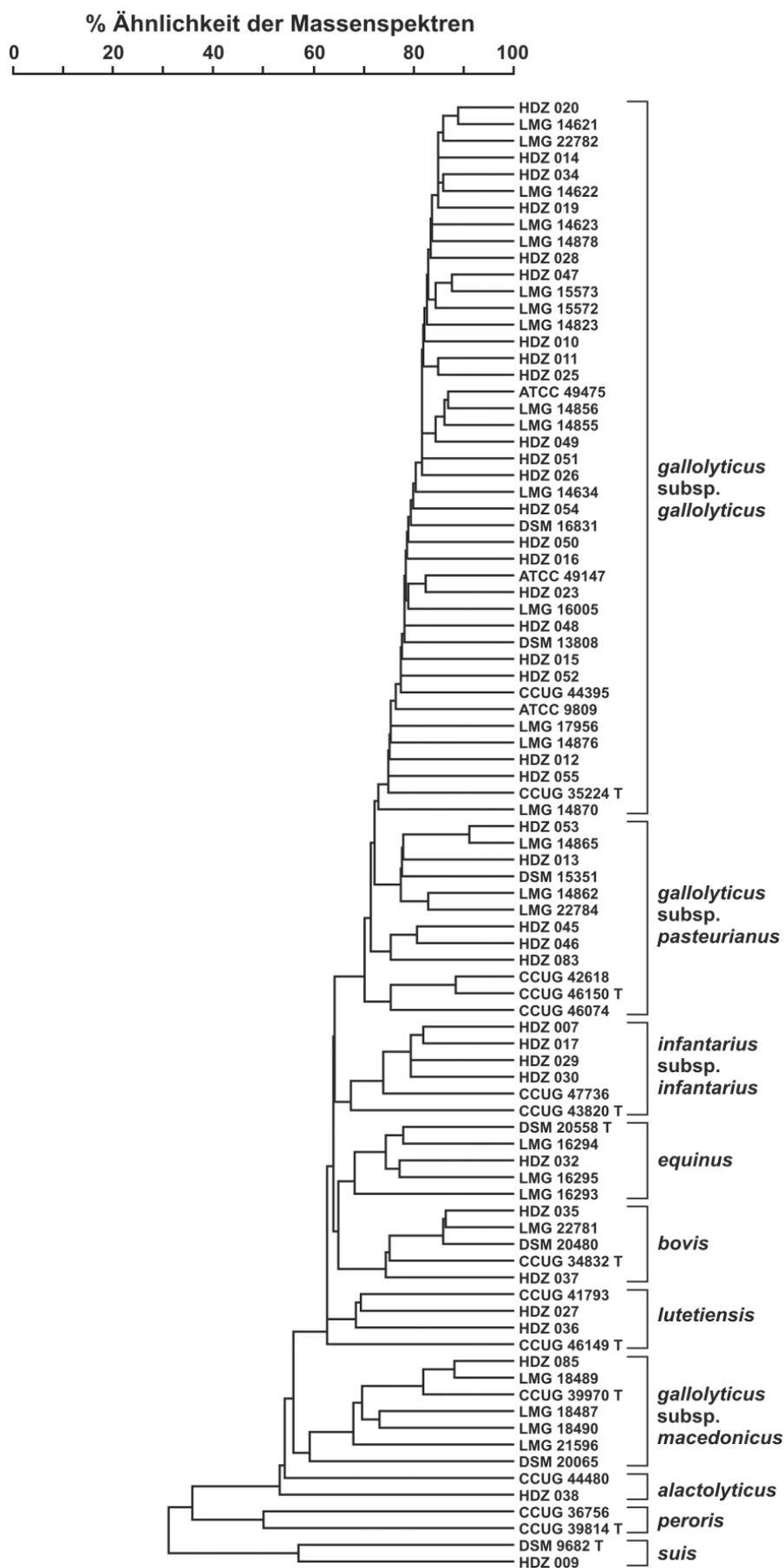


Abb. 3-3: Dendrogramm der MALDI-TOF-MS Analyse aus 88 *Streptococcus* Stämmen. Stamm-Ähnlichkeiten sind als prozentuale Ähnlichkeit der Massenspektren zueinander aufgetragen.

Bei den MALDI-TOF-MS Analysen zeigte sich eine Gruppen-Trennung zwischen den mittels *sodA*-Sequenzierung zweifelsfrei identifizierten Isolaten von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *S. equinus*, *S. bovis*, *S. lutetiensis*, *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. alactolyticus*, *S. peroris* und *S. suis*. Es konnte jedoch keine signifikante Trennung zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* mittels der MALDI-TOF-MS Methode erfolgen. *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* Isolate präsentierten sich als drei kleinere Sub-Cluster in direkter taxonomischer Nähe zu *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Im Vergleich zu anderen Studien (Poyart *et al.* 2002; Schlegel *et al.* 2003) konnten mittels WCMS-Analyse, die Spezies *S. bovis* und *S. equinus* signifikant in zwei Cluster mit deutlich unterschiedlichen Massenspektren unterteilt werden. Die Variation der Stämme bei wiederholten Messungen betrug >80 % und ist damit geringer als die Variation innerhalb des Clusters. Daher ist eine eindeutige Zuordnung der Stämme zu dem jeweiligen Cluster möglich.

In Abb. 3-4 ist beispielhaft die Überlagerung verschiedener Massenspektren von unterschiedlichen Spezies dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich charakteristische Peakmuster zeigen, zum Beispiel m/z 6224 für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, m/z 5594 für *S. infantarius* subsp. *infantarius* oder m/z 6086 für *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. Auch in allen Spektren vorhandene Muster sind zu finden. So ist der Peak bei m/z 5968 mit hoher Wahrscheinlichkeit der großen ribosomalen Untereinheit L33 zuzuordnen. Er ist auch bei *in silico* Vergleichen der Spezies *S. suis* und *S. thermophilus* wiederzufinden. Der Peak bei m/z 6224 in den Spezies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* ist wahrscheinlich dem ribosomalen Protein L30 zuzuordnen. Mit einem Aminosäureaustausch (zum Beispiel Ile zu Val) geht ein Massenverlust von 14 Da einher, daher könnte der Peak in *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* bei m/z 6210 ebenfalls dem Protein L30 entsprechen.

Eine Differenzierung verschiedener Stämme innerhalb einer Spezies oder Subspezies war aufgrund der relativ hohen Variabilität innerhalb des Clusters nicht möglich. Daher sind nur extrem diverse Isolate innerhalb einer Spezies zu determinieren. Hervorzuheben ist hier der Stamm LMG 14870, der in der MALDI-TOF-MS Analyse das für die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Gruppe untypischste Muster zeigte.

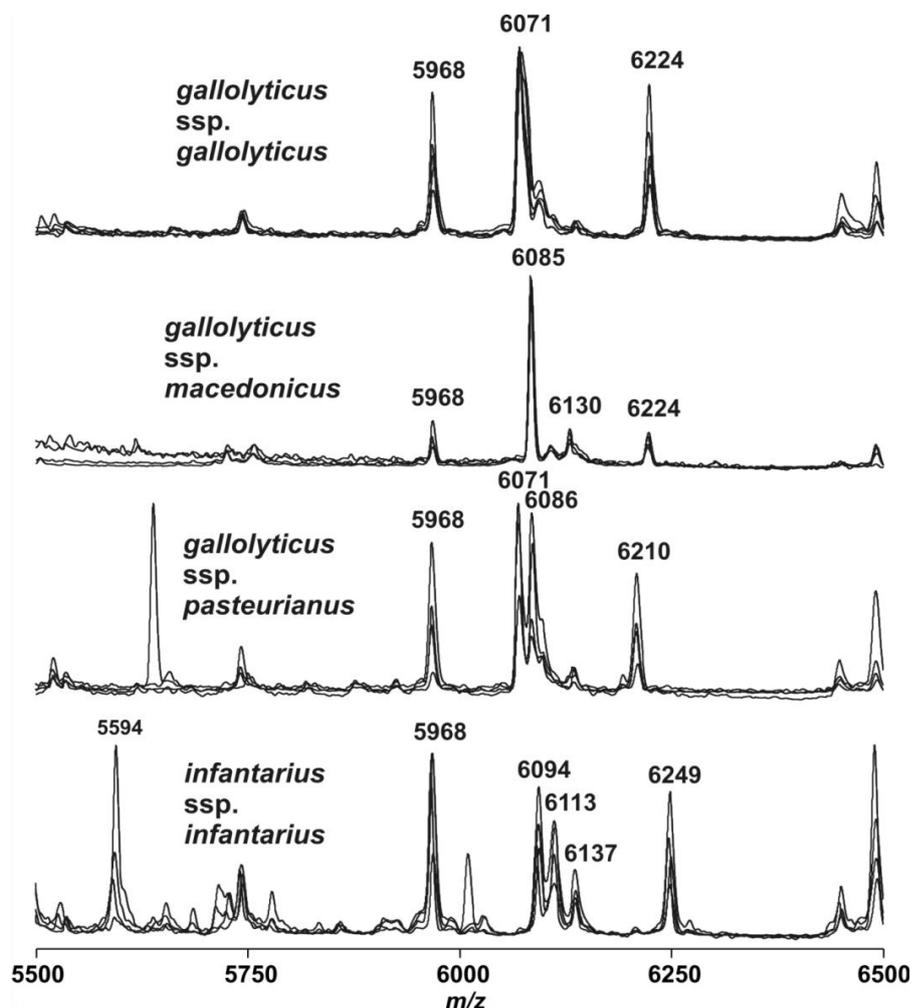


Abb. 3-4: Ausschnitt verschiedener Massenspektren von *Streptococcus* Subspezies Reinkulturen. Vier zufällig gewählte Spektren wurden übereinandergelegt und die durchschnittlichen m/z -Werte bestimmt. *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*: CCUG 39970 T, LMG 18487, LMG 18489, LMG 21596; *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*: HDZ 014, LMG 14623, LMG 14878, LMG 16005; *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*: DSM 15351, HDZ 053, LMG 14862, LMG 22784; *S. infantarius* subsp. *infantarius*: HDZ 007, HDZ 017, HDZ 029, HDZ 030.

Eine Liste mit allen für die jeweilige Spezies / Subspezies spezifischen m/z -Werten befindet sich im Anhang (

Tabelle 9-2). Die erstellten Massenspektren jedes Clusters wurden zu Superspektren zusammengefasst und in die Datenbank der *SARAMIS Software* aufgenommen. Damit wurde eine signifikante Erweiterung des Identifikationsspektrums des Systems erzielt und für Forschung und kommerzielle Nutzung zur Verfügung gestellt.

Das AnagnosTec System, bestehend aus dem *AXIMA Confidence Instrument* und der *SARAMIS Software*, wird seit April 2010 von BioMérieux unter dem Namen Vitek MS vertrieben.

3.1.3 Real-time PCR zum Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Die Identifizierung einer Reinkultur von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* erfolgt in der Regel mittels der in 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Methoden der *sodA* DNA-Sequenzierung oder MALDI-TOF-MS Typisierung. Für den Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* aus komplexen Probenmaterialien wie Fäzes sind diese Methoden jedoch nicht geeignet. Im humanen Gastrointestinaltrakt befinden sich mehr als 10^{14} Bakterien, zirka 200 verschiedener Spezies, unter anderem auch mehrere Streptokokkus Spezies oder nah Verwandte (Beckmann *et al.* 2000). Daher würde eine Amplifikation des *sodA*-Gen Fragments mittels PCR eine Mischung aus *sodA*-Sequenzen mehrerer Spezies produzieren, die in der anschließenden Sequenzierungsreaktion nicht zu differenzieren wären. Auch die MALDI-TOF-MS Methode detektiert bei Fäzes als Ausgangsmaterial nicht zuzuordnende Peaks, die auf verschiedene Bakterienspezies, sowie sonstige Stuhl-Begleitstoffe zurückzuführen sind. Weiterhin reicht die Bakterienmasse aus einer Stuhlprobe nicht für eine Detektion aus.

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit ein spezifisches Nachweissystem für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu entwickeln, welches auch für komplexe Probenmaterialien verwendbar ist. Ein Zielgen für den spezifischen Nachweis ist das Gen, welches für das Enzym Tannase kodiert (*tanA*). Die Tannase (EC 3.1.1.20) ist ein Enzym, welches *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* befähigt Gallotannine (Tannin) zu Gallussäure umzusetzen und damit eine Bioverfügbarkeit der Substanz herstellt. Mit der Kodierung des Tannase-Gens grenzt sich *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* phänotypisch von verwandten Streptokokken ab. Zwar besitzen auch andere Organismen das *tanA* Gen, jedoch zeigten Datenbankvergleiche, dass sich die bisher publizierten Nukleinsäuresequenzen deutlich von dem *tanA*-Gen des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* unterscheiden oder nicht in Fäkalien vorkommen (Tabelle 3-2). Im Gegensatz dazu sind die Sequenzen der bereits publizierten *tanA*-Gensequenzen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* komplett identisch.

Tabelle 3-2: Beispiel für die Bindungsabilitäten des *forward*-Primers der *tanA* Amplifikation.

Accession-Nummer	Beschreibung	Max score ¹	Total score ²	Query coverage ³	E value ⁴	Max ident ⁵
AP012053.1	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC 43143 DNA, complete genome	40,1	66,4	100 %	0,060	100 %
FR824043.1	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> ATCC BAA-2069 complete chromosome sequence, strain ATCC BAA-2069	40,1	40,1	100 %	0,060	100 %
FN597254.1	<i>Streptococcus gallolyticus</i> UCN34 complete genome	40,1	66,4	100 %	0,060	100 %
FN667741.1	<i>Xenorhabdus bovienii</i> SS-2004 chromosome, complete genome	36,2	88,7	100 %	0,93	100 %
CP001965.1	<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> ES-1, complete genome	34,2	34,2	85 %	3,7	100 %
CP002780.1	<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DSM 2154, complete genome	32,2	32,2	80 %	15	100 %
CP002614.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. UK-1, complete genome	32,2	137	95 %	15	100 %
CP002487.1	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. 4/74, complete genome	32,2	137	95 %	15	100 %

¹= Je höher der *Score* desto höher ist auch der Ähnlichkeitsgrad der untersuchten mit der hinterlegten Sequenz. ²= Summe der *Scores*, die auf eine Sequenz zutrifft. ³= Prozentuale Deckung der untersuchten Sequenz zur hinterlegten Sequenz. ⁴= Die Anzahl der Treffer mit dem angegeben *Score* kann in einer Datenbank dieser Größe erwartet werden. ⁵= Maximale Identität der Sequenz zum Datenbankeintrag.

Auf Basis der zuvor dargestellten Eigenschaften von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde in dieser Arbeit ein *real-time* PCR-System entwickelt, welches als Amplifikationsprodukt eine Region des *tanA*-Genes nutzt. Die Position der Primer und der Sonde sind in Abb. 3-5 dargestellt.

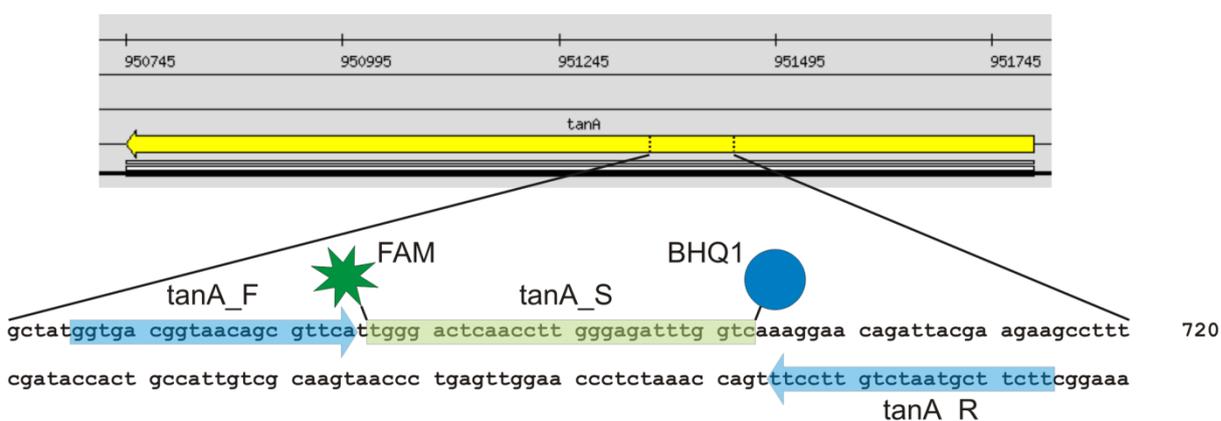


Abb. 3-5: Position der Primer (blau) und der Sonde (grün) innerhalb des *tanA*-Genes des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes ATCC BAA-2069.

Die entwickelte *real-time* PCR basiert auf dem System der *TaqMan*-Sonden (auch Hydrolyse-Sonden), wobei zweifachmarkierte Sonden verwendet wurden.

Zunächst wurde das *real-time* PCR-System in DNA-Verdünnungsreihen aus Reinkulturoisolaten auf seine Sensitivität geprüft und optimiert. Dabei zeigte sich die beste analytische Sensitivität unter Verwendung der *Platinum Taq Polymerase* (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) und einer Primerkonzentration von 200 nM, sowie einer Sondenkonzentration von 100 nM. Die analytische Spezifität wurde mit Hilfe nahverwandter Streptokokken getestet, dabei konnten keine Kreuzamplifikation nachgewiesen werden. Es konnte eine Sensitivität von 0,1 pg/ μ L *Template* DNA pro PCR-Ansatz nachgewiesen werden. Dies entspricht unter Berücksichtigung der Genomgröße von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* einer analytischen Sensitivität von 40 Kopien pro PCR-Ansatz.

3.1.4 Prävalenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im humanen Gastrointestinaltrakt

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* kann im menschlichen Gastrointestinaltrakt ohne eine pathologische Manifestation als Kommensale vorkommen (Klein *et al.* 1977). Jedoch ist bestätigt, dass mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* infizierte Menschen ein höheres Risiko für Neoplasien im Kolon aufweisen (Burns *et al.* 1985; Boleij *et al.* 2011). Wie und auf welchem Wege die Übertragung des Bakteriums stattfindet ist gänzlich unbekannt. Dabei können Tröpfchen- oder Schmierinfektion von Mensch zu Mensch oder auch zoonotische Infektionsketten diskutiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Methode zum spezifischen Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in menschlichem Fäzes. Weiterhin sollte die Methode angewendet werden, um die Prävalenzrate der Kolonisierung des humanen Gastrointestinaltraktes zu bestimmen. Dazu sollten Stuhlproben von Patienten aus dem Herz- und Diabeteszentrum NRW mittels *real-time* PCR (siehe 3.1.3) auf die Anwesenheit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet werden.

3.1.4.1 Optimierung der DNA-Isolierung aus Fäzes und Bestimmung der Nachweisgrenze

Zunächst wurden verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, um die Extraktion bakterieller DNA aus Stuhlproben zu optimieren. Es zeigte sich bei Inokulations-Experimenten, dass die Erweiterung des *PSP Spin Stool DNA Kits* (Invitek, Berlin, Deutschland) mit einer vorgeschaltete mechanische Lyse mittels *Precellys Glas/Keramik-Kit SK38* Reaktionsgefäßen

(Peqlab, Erlangen, Deutschland) die analytische Sensitivität erhöht. Dazu wurde eine Übernachtskultur von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 um den Faktor 1×10^{-5} und 1×10^{-6} mit PBS verdünnt und nach dem Probenplan (Tabelle 3-3) in Stuhlproben inokuliert. Der Titer der verdünnten Kultur wurde anschließend durch Ausplattieren auf BHI-Platten quantifiziert. Die Konzentration der Übernachtskultur betrug 1.79×10^9 KbE/mL.

Die nachfolgend durchgeführte *real-time* PCR zeigte, dass technische Replikate in der Doppelbestimmung mit 18 KbE nachweisbar waren, eine Probe mit 9 KbE und die Proben mit 2 KbE hingegen nicht mehr nachweisbar waren. Die Ergebnisse des *real-time* Experiments sind in Abb. 3-6 und die entsprechenden CT-Werte in Tabelle 3-3 dargestellt. Die als interne Kontrolle verwendete Amplifikation von Lambda-DNA war in keiner Probe inhibiert, dies ist in Abb. 3-7 dargestellt.

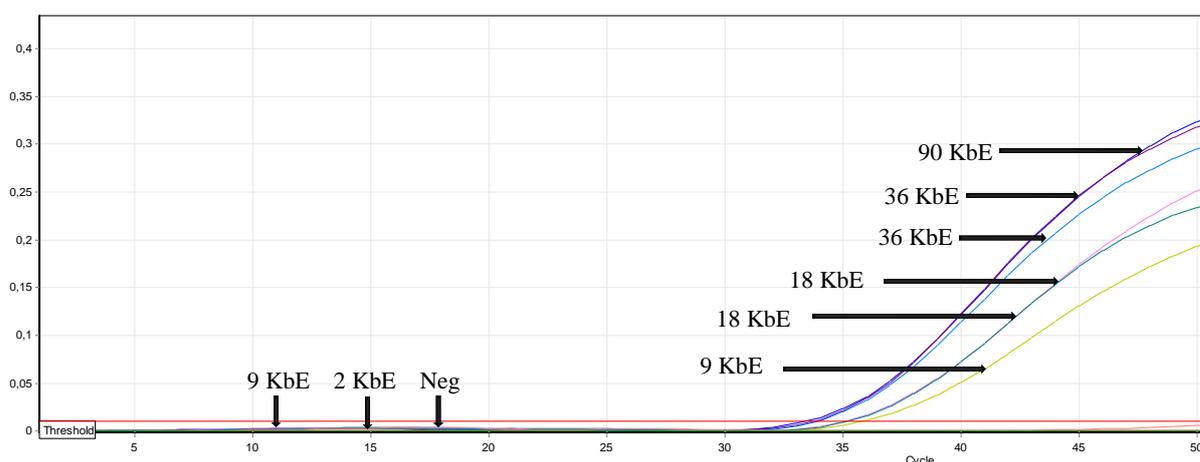


Abb. 3-6: Quantitative Analyse des *real-time* Experimentes zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze.

Tabelle 3-3: Probenplan und ermittelte CT-Werte der quantitativen Analyse des *real-time* PCR-Experimentes zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze. Es wurden pro Probe ca. 150 mg humaner Fäzes verwendet.

Nr.	KbE pro Probe	CT-Wert
1	90	33,43
2	36	33,74
3	36	33,93
4	18	35,12
5	18	35,18
6	9	35,86
7	9	negativ (< 50)
8	2	negativ (< 50)
9	0	negativ (< 50)

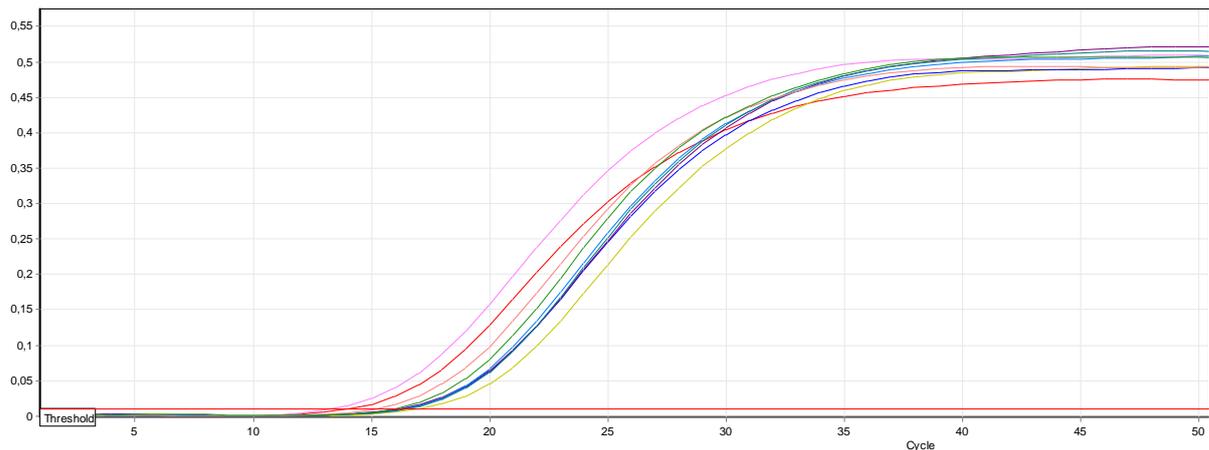


Abb. 3-7: Darstellung der internen Kontrolle des *real-time* PCR-Experimentes zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze.

3.1.4.2 Untersuchung der Prävalenz

Die in dieser Arbeit vorgenommene Untersuchung der Prävalenz der gastrointestinalen Besiedlungen mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* erfolgte mit der in 3.1.3 beschriebenen Methode. Als Probenmaterial wurde Restmaterial von im Herz- und Diabeteszentrum NRW untersuchten Stuhlproben verwendet, die im Rahmen des Hygienescreenings auf pathogene Mikroorganismen entnommen wurden. Es konnten 12 von 59 getesteten Stuhlproben positiv auf das Vorhandensein von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet werden. Daher wurde die Prävalenzratio mit 0,20 angegeben und demzufolge sind 20,37 Infektionen pro 100 Patienten zu erwarten.

3.2 Molekulardiagnostische Charakterisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Im Folgenden wurden verschiedene molekulargenetische Charakterisierungsmethoden etabliert und verglichen, um ein optimales System zur Typisierung von Subpopulationen und Verwandtschaftsverhältnissen innerhalb der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Spezies zu ermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Charakterisierung des vorhandenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammkollektivs durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob auf genetischen Informationen basierende *Cluster*zuordnungen mit dem Stammursprung oder phänotypischen Charakteristika korrelieren. Weiterhin sollte mit diesen Methoden getestet werden, ob Aussagen zu epidemiologischen Fragestellungen in Bezug auf Infektionsketten oder zoonotische Zusammenhänge analysiert werden können.

3.2.1 rep-PCR Klassifizierung

Die rep-PCR (*repetitive sequence based PCR*) ist eine Methode zur Erstellung eines genomischen Fingerabdrucks und ermöglicht eine DNA-basierte Charakterisierung innerhalb einer Spezies oder Subspezies. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich stammeigene Variabilitäten verschiedener Isolate einer Spezies darstellen und Verwandtschaftsverhältnisse zwischen unterschiedlichen Stämmen aufzeigen. Nützlich ist diese Anwendung bei der Analyse epidemiologischer Zusammenhänge oder Infektionsketten (Olive *et al.* 1999). Die Primer der rep-PCR binden dabei in repetitiven chromosomalen Elementen, die zufällig verteilt im Bakteriengenom liegen. Befinden sich zwei dieser Elemente in räumlicher Nähe, so wird der dazwischenliegende Bereich amplifiziert. Da diese Bereiche für den Organismus nicht essentiell sind, ist die Lokalisations- und Sequenz-Variabilität höher als in hochkonservierten kodierenden Regionen. Daher besteht ein hohes Diskriminierungspotential. Die auf den zu testenden Organismus angepassten Primer amplifizieren für jeden Stamm spezifische DNA-Fragment-Mixe, die sich in einer anschließenden Elektrophorese auftrennen und bioinformatisch verarbeiten lassen (Del Vecchio *et al.* 1995). Die entsprechende Banden-Muster aus verschiedenen Stämmen lassen sich mittels eines bioinformatischen Algorithmus vergleichen, um genomische Distanzen oder *Cluster*-Ausprägungen darzustellen (siehe Abb. 3-8).

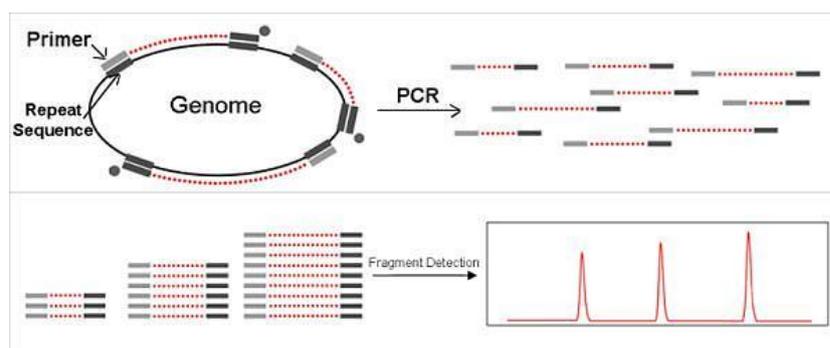


Abb. 3-8: Funktionsweise der rep-PCR (Quelle: www.biomerieux-diagnostics.com).

Die Firma BioMérieux (Nürtingen, Deutschland) hat das beschriebene System kommerzialisiert und bietet für 30 verschiedene Taxa unter dem Handelsnamen *DiversiLab Kits* zur Typisierung an (Stand 02/2012). Die Detektion und bioinformatische Auswertung der Amplifikatmuster erfolgt dabei mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und der Software *BioNumerics* (AppliedMath, Sint-Martens-Latem, Belgien). Hierbei wird ein *micro fluidic labchip* (Lab-on-a-Chip) eingesetzt, der auf dem Prinzip der Kapillargelelektrophorese basiert und eine hohe Automatisierung und qualitativ hochwertige und objektive Analysen ermöglicht.

Es wurden 69 verschiedene *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und jeweils ein *S. bovis*, ein *S. equinus*, ein *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* und ein *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* Stamm analysiert. Zunächst wurde mit dem für das *DiversiLab* System empfohlenen *UltraClean Microbial DNA Isolation Kit* (Mo Bio, Carlsbad, USA) die DNA isoliert und auf 35 ng/ μ L verdünnt, um eine standardisierte Amplifikation für alle Stämme zu gewährleisten. Die in der Kapillargelelektrophorese erhaltenen Daten zeigten, aufgrund verschiedener Laufeigenschaften unterschiedlicher Proben, Varianzen bei den Elektrophoresemustern (Abb. 3-9 a). Diese Varianzen wurden bioinformatisch mittels eines globalen Versatzes mit linearer Dehnung / Kompression ausgeglichen (Abb. 3-9 b). Mit den korrigierten Daten wurde auf Basis der Pearson-Korrelation ein UPGMA Dendrogramm erstellt (Abb. 3-10). Es ist ersichtlich, dass die beiden als *Outgroup* mitgeführten *S. bovis* und *S. equinus* Stämme sich anhand ihres Amplifikatmusters deutlich von den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen abheben.

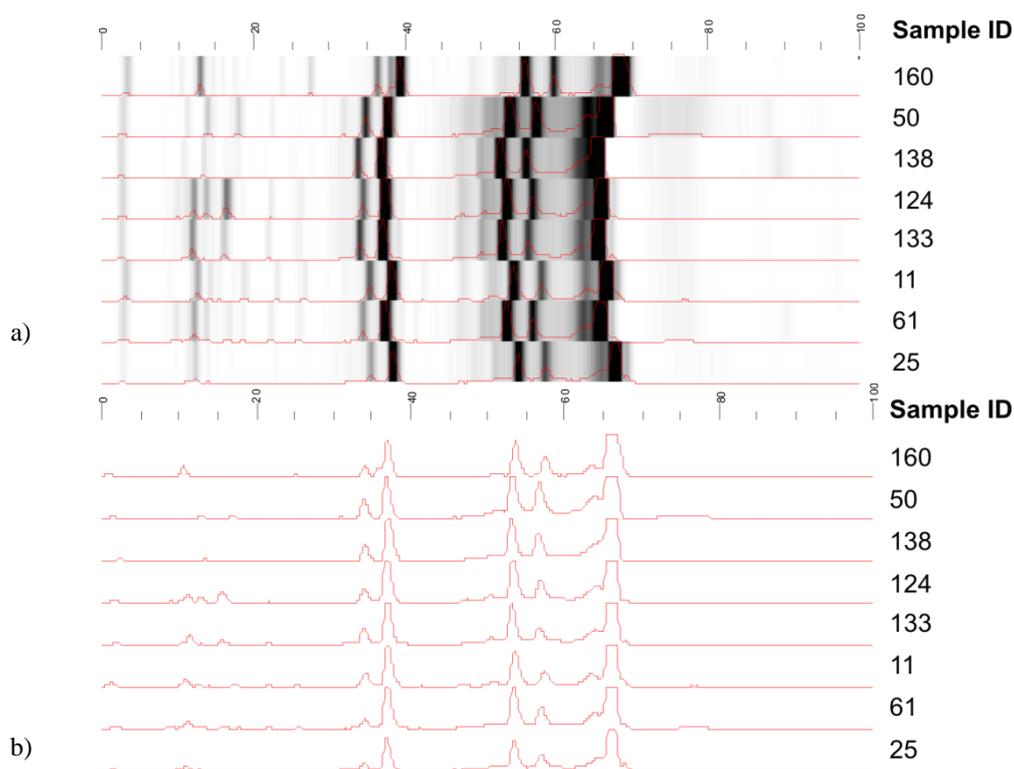


Abb. 3-9: Beispielhafte Ergebnisse und Korrektur einer elektrophoretischen Auftrennung von mittels *DiversiLab Streptococcus Kit* amplifizierten Produkten. a) Die mittels Chipgelelektrophorese gewonnenen Daten lassen sich bioinformatisch in Elektropherogramme umschreiben (rote Linie). Die scheinbare Diversität der Isolate resultiert aus Abweichungen in der Elektrophorese. b) Nach einer *Alignment*-basierten Korrektur der Kurven ist das Ergebnis homogener.

Die Stämme LMG 18487 (*S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*) und DSM 15351 (*S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*) differenzieren sich nicht. Weiterhin befindet sich der Stamm LMG 14870 ebenfalls weit außerhalb der übrigen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme. Dies ist kongruent zu den mittels *sodA*-Sequenzierung und MALDI-TOF-MS Analyse erzielten Ergebnissen, bei denen Stamm LMG 14870 ebenfalls ein deutlich abweichendes Muster zeigte (vergl. 3.1.2). Phänotypisch zeigte dieser Stamm jedoch keine Besonderheiten.

In der durchgeführten Analyse zeigten 34 Stämme unterschiedlichster Herkunft eine Übereinstimmung von mehr als 97 %. Dies würde nach Berechnung der *DiversiLab Software* bedeuten, dass diese Stämme klonal identisch sind, was jedoch aufgrund der vorliegenden Informationen über die Stammursprünge nahezu ausgeschlossen werden kann. Zur Bestimmung von *Clustern* innerhalb des Dendrogramms wurde die Schwelle von 94 % Übereinstimmung definiert. Somit konnten sechs *Cluster* (I – XI) mit mehr als zwei berücksichtigten Stämmen definiert werden (Abb. 3-10).

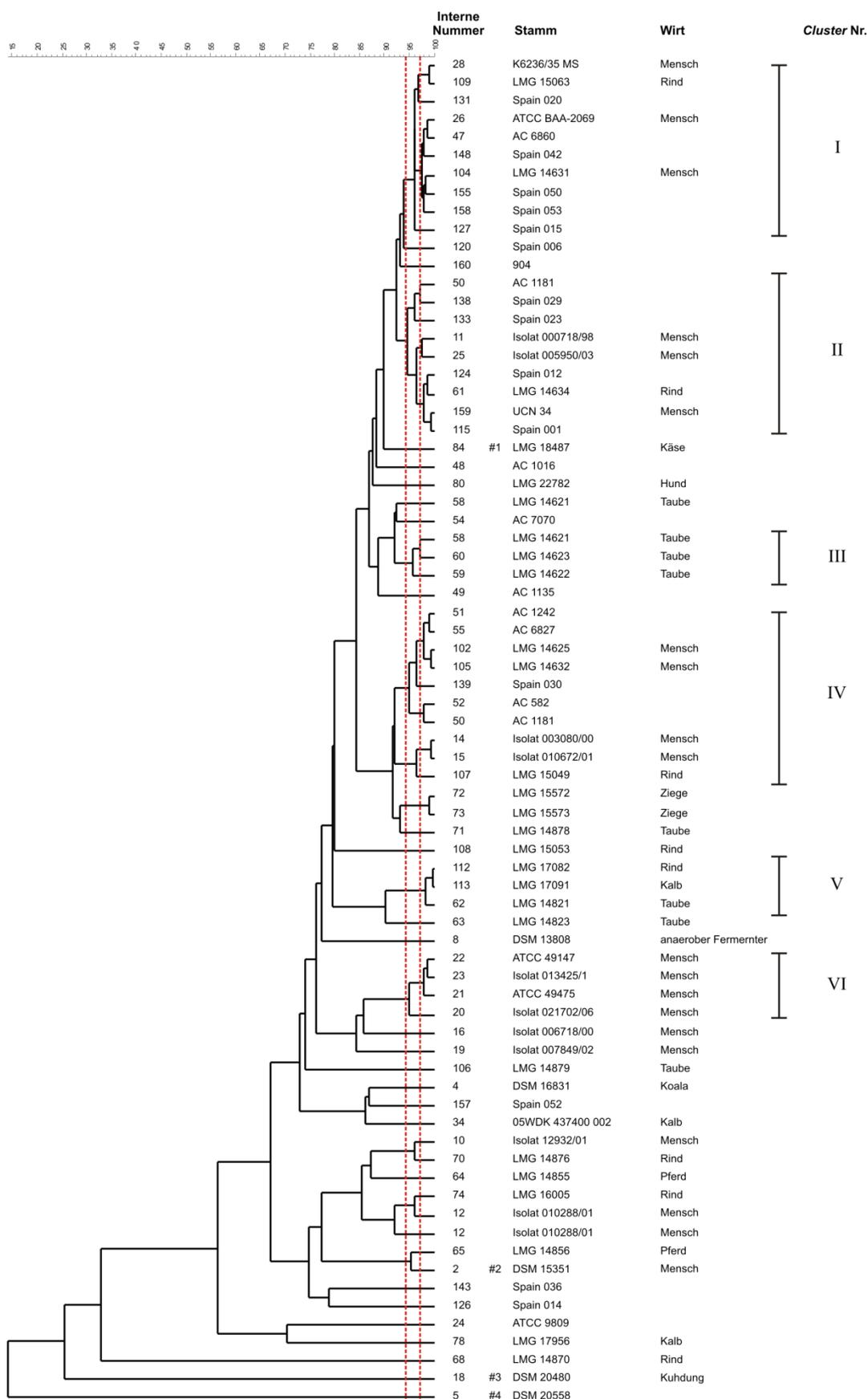


Abb. 3-10: UPGMA Dendrogramm der mittels des *DiversiLab Streptococcus Kit* ermittelten Diversitäten von 68 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen. #1 = *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, #2 = *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, #3 = *S. bovis*, #4 = *S. equinus*. Rote Linien bei 97 % (potentiell identische Stämme) und 94 % (*Cluster*grenze).

Cluster I besteht aus zehn Stämmen, von denen ein Stamm tierischen und drei humanen Ursprungs sind. Dem *Cluster II* gehören neun Stämme an, von denen einer tierischen und drei humanen Ursprungs sind. Der *Cluster III* besteht aus drei Isolaten, welche mit fortlaufenden Bezeichnungen aus Tauben isoliert wurden. Im *Cluster IV* befinden sich zehn Isolate, von denen nur eines tierischen Ursprungs ist. *Cluster V* besteht aus drei Tierisolaten und *Cluster VI* aus vier humanen Isolaten. Demnach lassen sich von 72 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten 39 in *Cluster* unterteilen (54 %), die jeweils eine Übereinstimmung von mindestens 94 % aufweisen. Es gibt keine großen, eindeutigen Gruppen von humanen oder tierischen Isolaten, lediglich Häufungen von Stämmen eines wirtsspezifischen Ursprungs in bestimmten Gruppen.

Betrachtet wurden außerdem die Vergleiche aller *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme untereinander. Dazu wurde eine Matrix mit den prozentualen Werten aller Stammvergleiche erstellt (Abb. 3-11). Die Werte der Matrix für alle *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme wurden in Kategorien unterteilt und in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 3-12). Bei einer guten Diskriminierung sollte der errechnete Mittelwert möglichst klein und die Standardabweichung möglichst groß sein. Die minimale Übereinstimmung beträgt 10,65 % (zwischen Stamm LMG 17082 und Stamm LMG 14870). Es lässt sich erkennen, dass das Maximum der Vergleiche eine Übereinstimmung zwischen 79 und 84 % aufweist. Jedoch zeigen 1,9 % der Stammvergleiche eine Übereinstimmung größer als 97 %. Etwa 10 % der Vergleiche zeigen eine Übereinstimmung von unter 55 %. Der Mittelwert aller Vergleiche beträgt $76,4 \pm 14,9$ % Übereinstimmung.

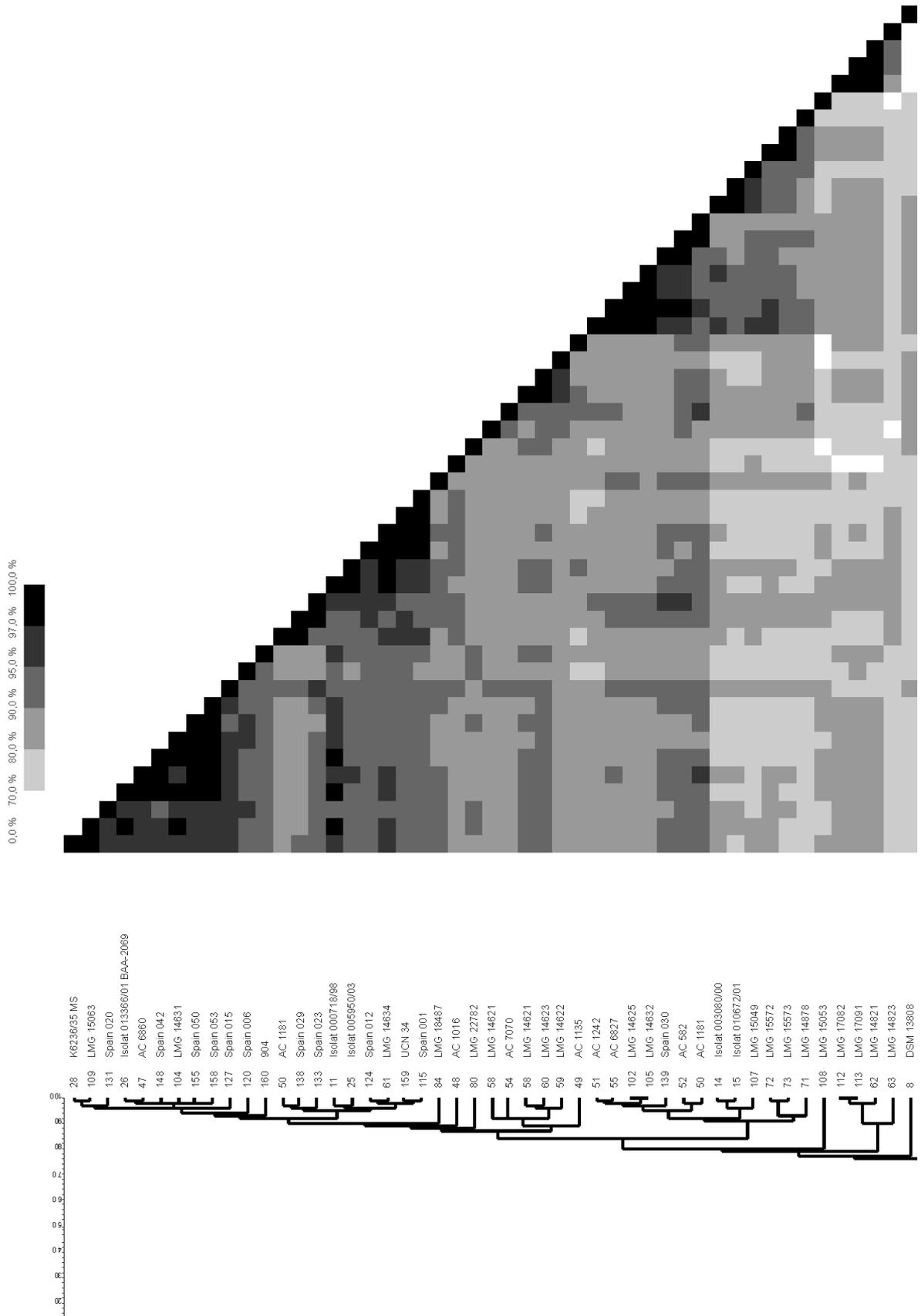


Abb. 3-11: Beispielhafte Darstellung einer Matrix mittels des *DiversiLab Streptococcus Kit* ermittelten Stammunterschieden in Prozent. Die prozentualen Werte sind als Graustufenskalerung dargestellt.

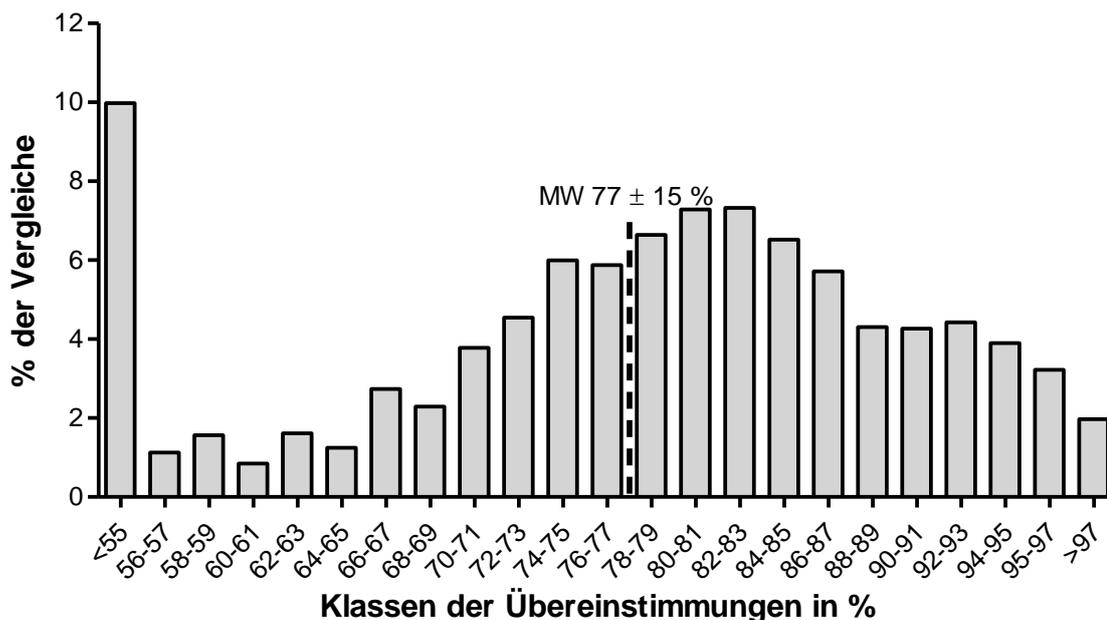


Abb. 3-12: Prozentuale Verteilung der Vergleiche aller *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme untereinander bei Verwendung des *DiversiLab Streptococcus Kits*. Einteilung in Kategorien. Bei einer guten Diskriminierung sollte der errechnete Mittelwert möglichst klein sein.

Da die Diskriminierung bei Verwendung des *DiversiLab Streptococcus Kits* zu gering war, wurde eine weitere Testreihe mit dem *DiversiLab Enterococcus Kit* durchgeführt. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und Enterokokken wurde die Anwendbarkeit des Kits erwartet. Es wurde mit einer Auswahl von 24 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen und einem *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* Stamm analog zum *Streptococcus Kit* verfahren. Das berechnete Dendrogramm ist in Abb. 3-13 dargestellt. Elf der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme haben eine Ähnlichkeit von mindestens 97 % zueinander und es konnte ein *Cluster* mit acht Stämmen identifiziert werden. Dieser *Cluster* ist nicht mit einem *Cluster* aus dem *DiversiLab Streptococcus Kit* vergleichbar. Lediglich die Stämme AC 582 und AC 1181, sowie LMG 15573 und LMG 15572 zeigen in beiden Analysemethoden klare Ähnlichkeiten zueinander.

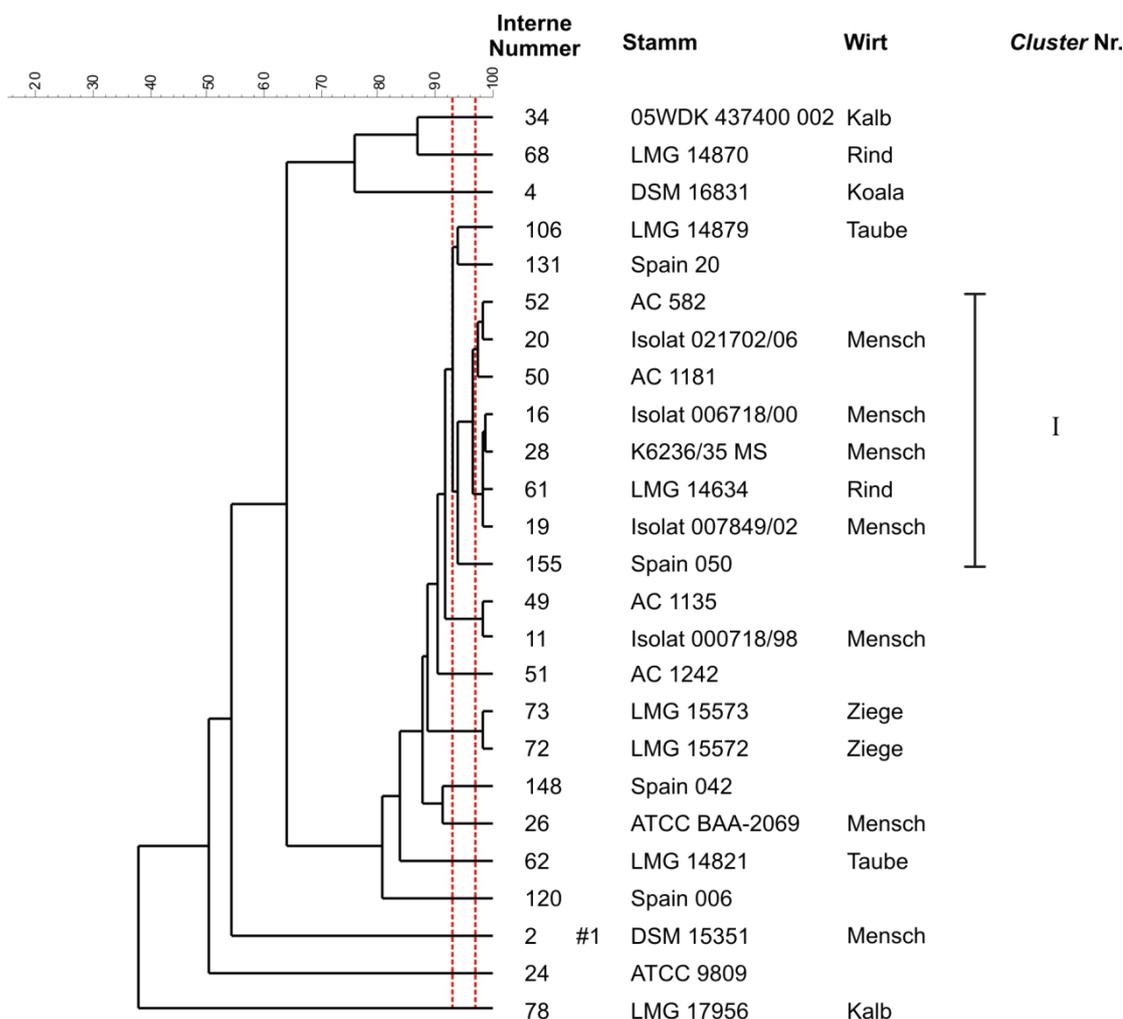


Abb. 3-13: Dendrogramm der mittels des *DiversiLab Enterococcus Kit* ermittelten Diversitäten von 24 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen. #1 = *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*. Rote Linien bei 97 % (potentiell identische Stämme) und 94 % (*Clustergrenze*).

Bei der Analyse der Vergleiche der Stämme untereinander (Abb. 3-14) zeigt sich im Gegensatz zum *DiversiLab Streptococcus Kit* eine Verschiebung des Maximums der Übereinstimmung auf 90 – 93 %. Jedoch haben auch 18 % der Vergleiche einen Wert kleiner 55 %. Der Mittelwert aller Vergleiche beträgt 77 ± 18 % Übereinstimmung, ist also nahezu identisch zum *DiversiLab Streptococcus Kit* und ebenfalls als nicht ausreichend diskriminativ zu klassifizieren.

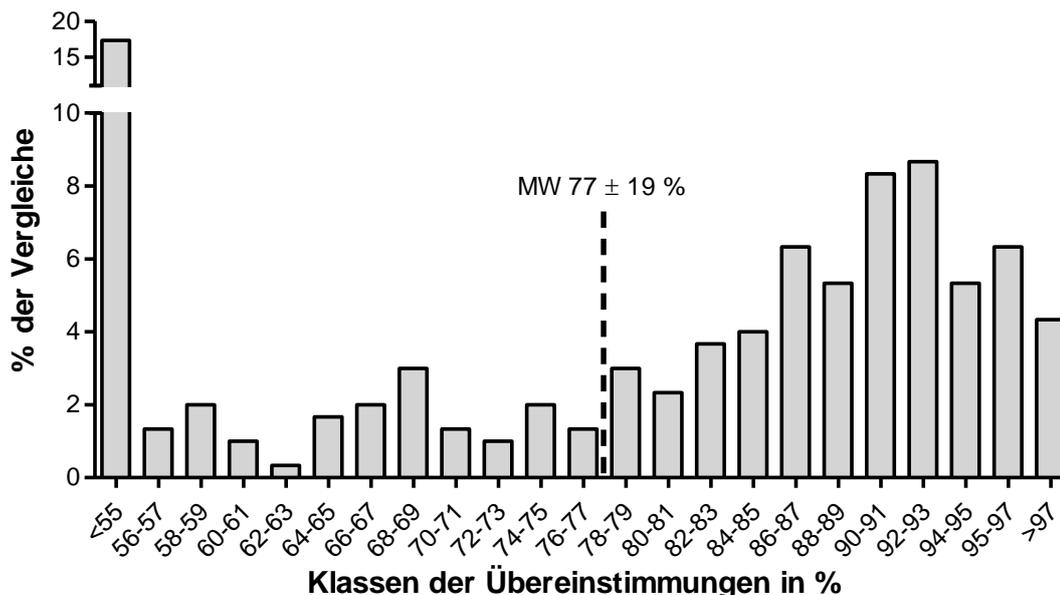


Abb. 3-14: Prozentuale Verteilung der Vergleiche aller *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme untereinander bei Verwendung des *DiversiLab Enterococcus Kits*. Einteilung in Kategorien. Bei einer guten Diskriminierung sollte der errechnete Mittelwert möglichst klein sein.

In der Publikation von Healy *et al.* konnte gezeigt werden, dass der Standardfehler der *DiversiLab* Analyse bei 2,3 % liegt. Damit postulierte er, dass es sich bei Stämmen, die eine Ähnlichkeit von mehr als 97 % zeigen, um gleiche Stämme handeln kann (Healy *et al.* 2005). Um zu evaluieren wie hoch der Standardfehler innerhalb des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*-Kollektives zu erwarten ist, wurden zwei Stämme mehrfach extrahiert, von den Extrakten mehrfach PCR-Produkte amplifiziert und in unterschiedlichen Läufen analysiert (Abb. 3-15). Es lässt sich erkennen, dass die maximale Distanz der Amplifikatmuster bei Stamm AC1242 81,3 % und bei Stamm ATCC 9809 90,4 % Übereinstimmung beträgt. Die durchschnittliche Distanz beider Stämme beträgt $92,8 \pm 5,5\ %$ und liegt damit für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* deutlich höher als die Werte von Healy.

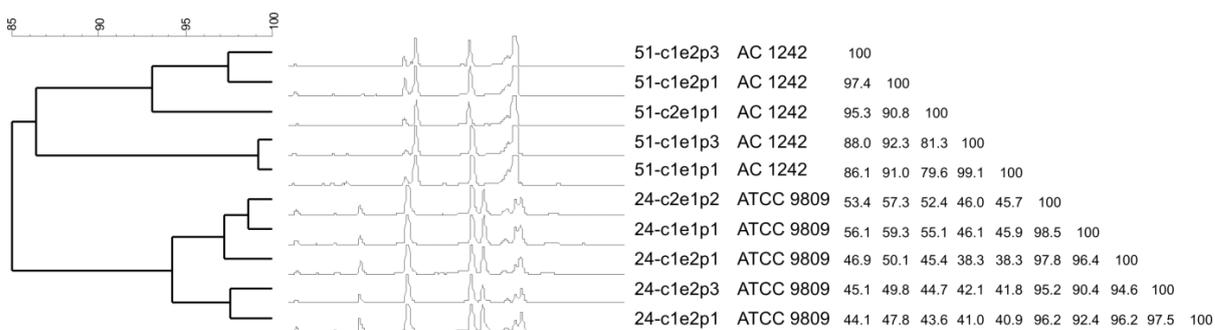


Abb. 3-15: Methodenüberprüfung von *DiversiLab Streptococcus Kit* Analysen mit dem Stämmen AC 1242 und ATCC 9809. Der Schlüssel hinter der internen Nummer ist der Index der c = Chip; e = Extraktion, p = PCR-Reaktion.

3.2.2 RAPD-PCR / ERIC-PCR Analyse

Das Prinzip der RAPD-PCR (*random amplified polymorphic DNA*) oder ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) ähnelt stark der rep-PCR (vergl. 3.2.1). Ein wesentlicher Unterschied bei der RAPD-PCR ist jedoch die Verwendung von einem kurzen nicht auf den Organismus abgestimmten, arbiträren Primer von 8-12 Nukleotiden Länge, der unspezifisch und zufällig im Genom verteilt bindet. Erstmals zeigten Williams *et al.*, dass RAPD-Analysen eingesetzt werden können um charakteristische DNA-Amplifikate zu erzeugen, die eine Klassifizierung innerhalb einer Spezies ermöglichen (Williams *et al.* 1990). Die ERIC-PCR basiert hingegen auf spezifischen Primern, welche in den intergenischen Regionen der Chromosomen von Enterobakterien, Neisserien und anderen Bakterien binden. Die Regionen weisen eine Länge von 124-127 Nukleotiden auf und liegen auf einem Chromosom in variabler Häufigkeit vor (Hulton *et al.* 1991).

Bisherige Experimente (Hinse 2008) zeigten, dass sich der RAPD-Primer OPM6 und der ERIC2-Primer eignen, um Klassifizierungen in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* durchzuführen. Ein gravierender Nachteil war bislang die stark subjektive Auswertung der Agarosegel-Bandenmuster und deren Interpretation bezüglich der Clusterzugehörigkeit. Durch den Einsatz einer Chipgelelektrophorese am Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und einer bioinformatischen Auswertung analog zur *DiversiLab* rep-PCR konnte eine objektive Auswertung der RAPD-PCR Analyse erfolgen.

Es wurde zunächst evaluiert wie hoch die optimale DNA-Menge und -Konzentration für die RAPD / ERIC-PCR sein sollte, um eine effiziente Analyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer zu erhalten. Anschließend wurde unter Verwendung des ERIC2-Primers eine ERIC-PCR Analyse von 65 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen und je eines *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. bovis* und eines *S. equinus* Stammes durchgeführt (Abb. 3-16). Dabei zeigten 34 Stämme eine Übereinstimmung von 97 % oder mehr. Es konnten acht Cluster identifiziert werden, davon vier Cluster mit jeweils drei Stämmen (I, II, VI, VII), ein Cluster mit fünf Stämmen (V), ein Cluster mit sechs Stämmen (III), ein Cluster mit elf Stämmen (IV) und ein Cluster mit 13 Stämmen (VIII). Der große Cluster VIII setzte sich stark von den übrigen Stämmen ab und beinhaltet, bis auf einen Stamm unbekannter Herkunft, ausschließlich Stämme tierischen Ursprungs. Die Stämme der Spezies *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*, *S. equinus* und *S. bovis* grenzen sich deutlich von den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen ab. Der *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* Stamm trennt sich hingegen nicht gut ab.

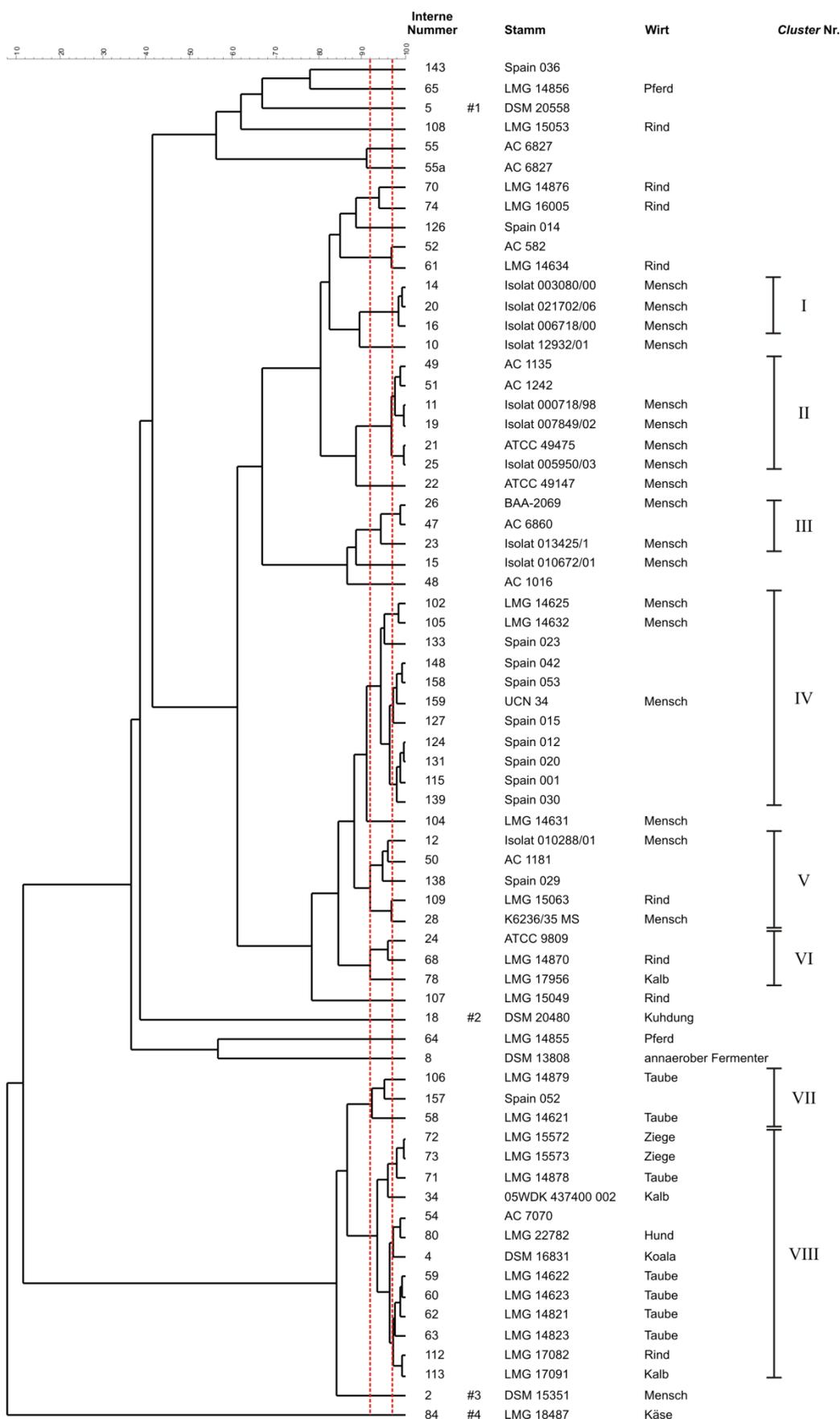


Abb. 3-16: Dendrogramm der mittels ERIC-PCR Analyse und dem ERIC2 Primer ermittelten Diversitäten von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen. #1 = *S. equinus*, #2 = *S. bovis*, #3 = *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, #4 = *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus*. Rote Linien bei 97 % (potentiell identische Stämme) und 94 % (Clustergrenze).

Die prozentuale Verteilung der Unterschiede aller *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme untereinander zeigt eine weit bessere Differenzierung als mit der *DiversiLab* rep-PCR. Der Mittelwert der Übereinstimmung liegt bei $45,6 \pm 32,7 \%$ (Abb. 3-17). Die hohe Standardabweichung von 32,71 % zeigt ein gutes Diskriminierungspotential. Ein signifikantes Maximum der Klassen der Übereinstimmung gibt es nicht.

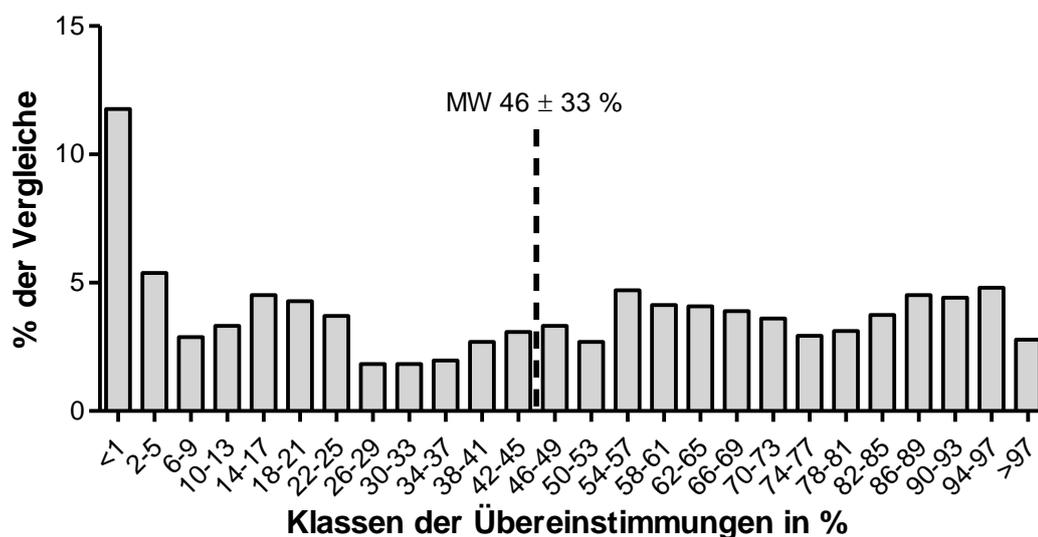


Abb. 3-17: Prozentuale Verteilung der Vergleiche aller *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme untereinander bei Verwendung des ERIC2 Primers. Einteilung in Klassen der Übereinstimmung.

In einem weiteren Versuch wurden 45 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme mit dem Primer OPM6 einer RAPD-PCR Analyse unterzogen. Dabei zeigten 25 Stämme eine Ähnlichkeit von mehr als 97 % und es konnten fünf *Cluster* identifiziert werden (Abb. 3-18). *Cluster* I beinhaltet acht Stämme, *Cluster* II vier, *Cluster* III und IV jeweils drei Stämme und *Cluster* V acht Stämme. Eine Korrelation von wirts- oder geografischem-Ursprung zu *Clustern* konnte nicht gezeigt werden. Die Analyse der prozentualen Verteilung aller Stammvergleiche untereinander zeigte einen Mittelwert von $50,7 \pm 31,7 \%$. Die Diskriminierungsfähigkeit liegt auf vergleichbarem Niveau mit der ERIC2-PCR. Ein Maximum in der prozentualen Verteilung der Vergleiche ist nicht erkennbar (Abb. 3-19). Bei einem Vergleich der *Cluster* beider Primersystem untereinander zeigt sich lediglich Ähnlichkeiten im OPM6 *Cluster* V und ERIC2 *Cluster* II.

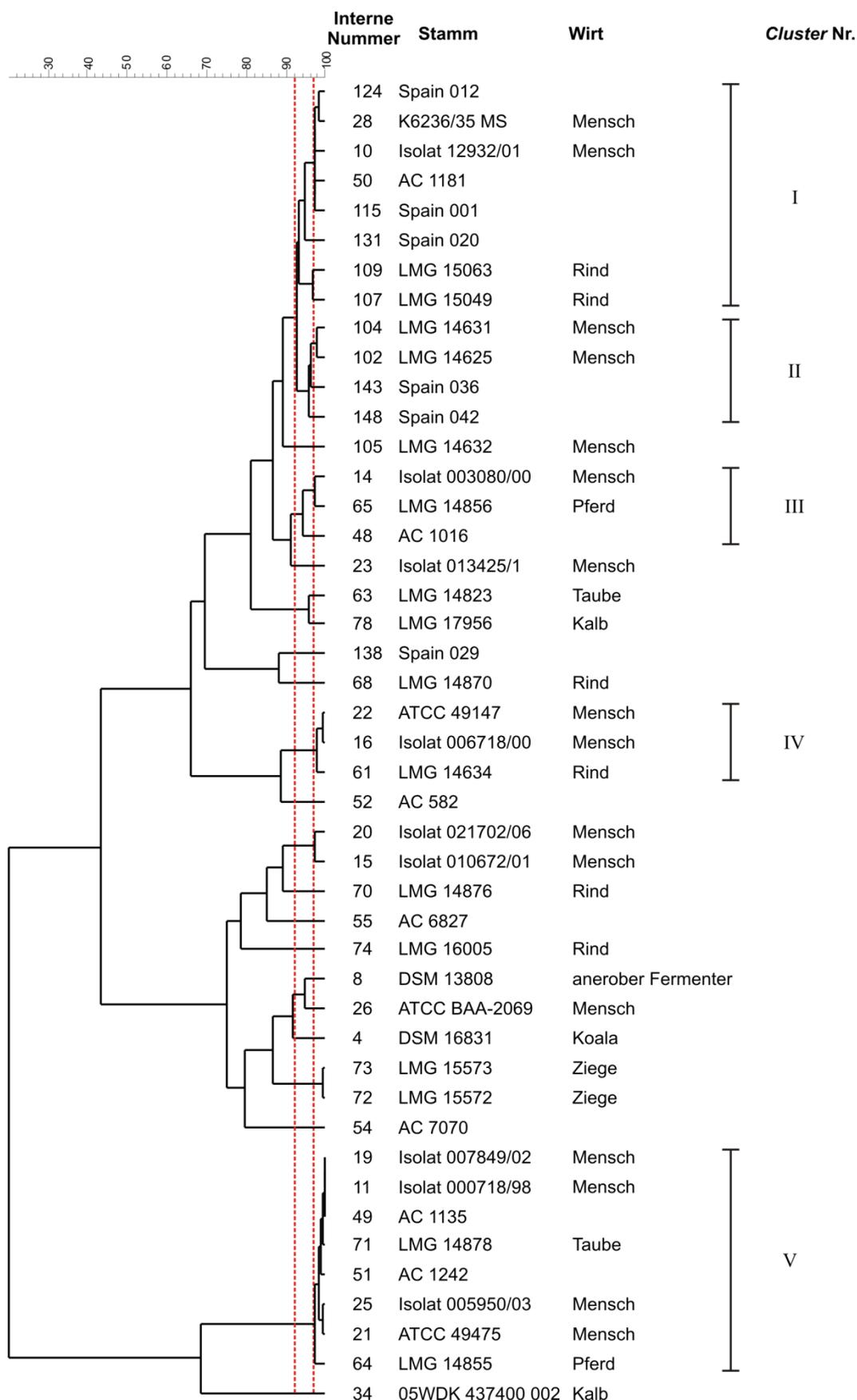


Abb. 3-18: Dendrogramm der mittels RAPD-PCR Analyse und dem OPM6 Primer ermittelten Diversitäten von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen. Rote Linien bei 97 % (potentiell identische Stämme) und 94 % (Clustergrenze).

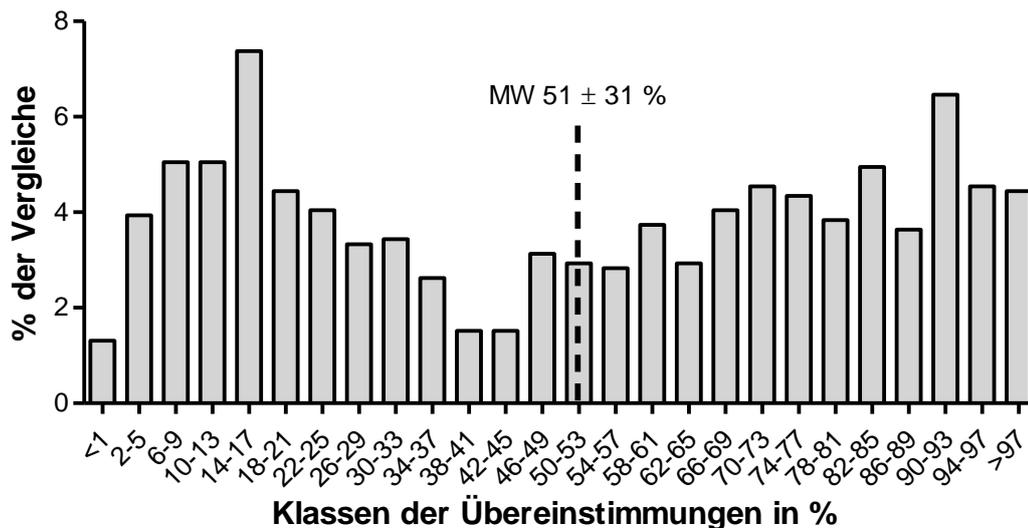


Abb. 3-19: Prozentuale Verteilung der Vergleiche aller *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme untereinander bei Verwendung des OPM6 Primers in der RAPD-PCR Analyse. Einteilung in Kategorien. Bei einer guten Diskriminierung sollte der errechnete Mittelwert möglichst klein sein.

Die Aufarbeitung des Mittelwerts und der Standardabweichung aller *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Vergleiche dient als Maßstab für die Diskriminierungsfähigkeit des jeweiligen Systems (Tabelle 3-4). Hierbei ist die ERIC-PCR mit dem ERIC2-Primer den anderen Methoden überlegen.

Tabelle 3-4: Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichung der prozentualen Übereinstimmung aller Stammvergleiche untereinander.

System	Mittelwert in %	Standardabweichung in %
<i>DiversiLab Streptococcus Kit</i>	76,4	14,9
<i>DiversiLab Enterococcus Kit</i>	76,7	18,8
ERIC-PCR ERIC2-Primer	45,6	32,7
RAPD-PCR OPM6-Primer	50,7	31,7

3.2.3 Klassifizierung mittels MLST

Multilocus sequence typing (MLST) ist eine DNA-sequenzbasierte Methode der Diskriminierung von Isolaten einer Spezies oder Subspezies. Dabei werden zirka 500 bp große DNA-Fragmente von üblicherweise sieben Haushaltsgenen amplifiziert, sequenziert und jeder vorkommenden Sequenzvariante eine spezifische Allelnummer zugeordnet. Die Kombination oder das Profil aller Allelnummern eines Isolates definiert die *sequence type* (ST)-Nummer (Maiden *et al.* 1998). Die Methode wurde unter anderem entwickelt, um eine globale Überwachung epidemiologischer Ausbrüche zu gewährleisten, da Sequenzdaten schnell und ohne subjektive Einflüsse generiert, ausgewertet und übermittelt werden können (Urwin *et al.* 2003). Diese Vorteile wurden genutzt um eine *online* verfügbare Datenbank-*Software* zu entwickeln, auf der Schemata, Allelnummern und ST's von 20 Spezies (Stand 01/2012) hinterlegt sind (<http://pubmlst.org>, <http://www.mlst.net>).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmalig ein MLST-Schema für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* etabliert und die vorhandene Stammsammlung damit differenziert werden. Dazu wurde eine Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie am Hospital Ramón y Cajal in Madrid initiiert. Die Etablierung der PCR-Systeme für die sieben Haushaltsgene sollte zwischen den Kooperationspartnern aufgeteilt werden. Daher wird nachfolgend nur die Entwicklung und Anwendung von vier Haushaltsgenen zur Diskriminierung gezeigt.

Zur Etablierung wurden zunächst die vollständig publizierten Genomsequenzen von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* herangezogen und mittels der *EDGAR Software* (Blom *et al.* 2009) alle Gene identifiziert, die unterschiedliche Sequenzen besitzen und größer als 500 bp sind. Anschließend wurden aus dem Gen-Pool manuell die Haushaltsgene definiert und für 19 Gene Primer konzipiert. Mittels Gradienten-PCR wurde für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 eine gemeinsame *Annealing*-Temperatur für alle Gene definiert, sowie Primersysteme, die keine oder mehrere Amplifikate zeigten, verworfen. Im nächsten Schritt wurden neun verschiedene *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate, die in der *sodA*-Sequenzierung eine hohe Diversität zeigten, mit den verbliebenen Primersystemen getestet. Beispielfhaft ist dies in Abb. 3-20 gezeigt. Das Primersystem *NPH* (*Nucleoside-Triphosphatase*) kann nur in sechs getesteten Isolaten ein Amplifikat erzeugen und wurde daher verworfen. Das Primersystem *uvrA*, welches im *Excinuclease ABC*-Untereinheit A Bereich kodiert, erzeugte hingegen in allen getesteten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten ein Amplifikat der erwarteten Größe.

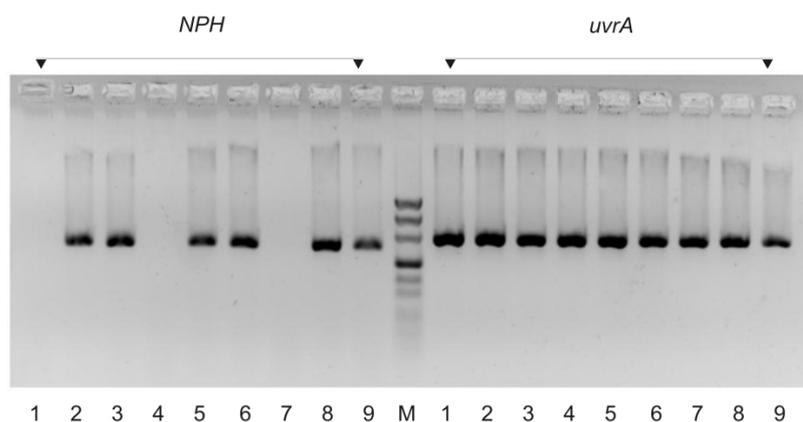


Abb. 3-20: Amplifikationsprodukte der Primersysteme *NPH* und *uvrA* mit neun verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten. Spur 1: DSM 16831, Spur 2: Isolat 003080, Spur 3: Isolat 021702, Spur 4: LMG 14870, Spur 5: Spain 020, Spur 6: Spain 029, Spur 7: Spain 036, Spur 8: Spain 042, Spur 9: Spain 050, Spur M: pUC-Mix Marker 8.

Es konnten zehn Primersysteme identifiziert werden, die die Kriterien der gleichen *Annealing*-Temperatur, des korrektes Amplifikats und der Amplifikation in neun *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten erfüllten (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Auflistung der Primersysteme, die die Kriterien der *Annealing*-Temperatur, korrektes Amplifikat und Amplifikation in neun *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten erfüllten.

#	Locus tag in NCBI Nucleotide Database	Gen	Größe in bp	Gen Funktion
1	SGGBAA2069_c04560	<i>p20</i>	493	Acyl-CoA N-Acetyltransferase
2	SGGBAA2069_c05200	<i>trpD</i>	643	Anthranilat Phosphoribosyltransferase
3	SGGBAA2069_c07540	<i>glgB</i>	950	Glykogen verzweigendes Enzym
4	SGGBAA2069_c08050	<i>rmlB</i>	606	dTDP-Glukose 4,6-Dehydratase
5	SGGBAA2069_c09980	<i>bglA1</i>	825	6-Phospho-β-Glucosidase
6	SGGBAA2069_c11400	<i>gor</i>	906	Gluthation Reduktase
7	SGGBAA2069_c13360	<i>nifS</i>	859	Cystein Desulfurase
8	SGGBAA2069_c14190	<i>malm</i>	562	Maltodextrin Phosphorylase
9	SGGBAA2069_c16810	<i>NAD</i>	432	NAD-abhängige Oxidoreduktase
10	SGGBAA2069_c18560	<i>uvrA</i>	675	Excinuklease ABC Untereinheit A

Mit den genannten Primersystemen wurden von zehn *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten Amplifikate in *forward* und *reverse* Richtung sequenziert und unter Zuhilfenahme der Software *Bionumerics 6.6* (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgien) die identifizierten Sequenzunterschiede analysiert. Dazu wurden die Enden der Sequenzen an den in Tabelle 3-6 gezeigten *Trimming*sequenzen beschnitten.

Tabelle 3-6: *Trimming*sequenzen für die Auswertung in der *Bionumeric Software*.

Gen	Start <i>Trimming</i> sequenz	Stop <i>Trimming</i> sequenz
<i>nifS</i>	AGGTTTTCCAGCTTTTGATGAA	AACGATGATGTGTTTGCCATA
<i>glgB</i>	ATCCGCTTGGGATGAGTTGG	CTGATATCATGATGATTGCT
<i>bglA1</i>	CCAGAAGGAACAATACT	GGTGTGATATGCTTGGT
<i>uvrA</i>	TTTTTGTAACCACGAATCTT	TCAACGACAATCAAGGTGTT

Beispielhaft sind vier der resultierenden UPGMA-Dendrogramme in Abb. 3-21 dargestellt.

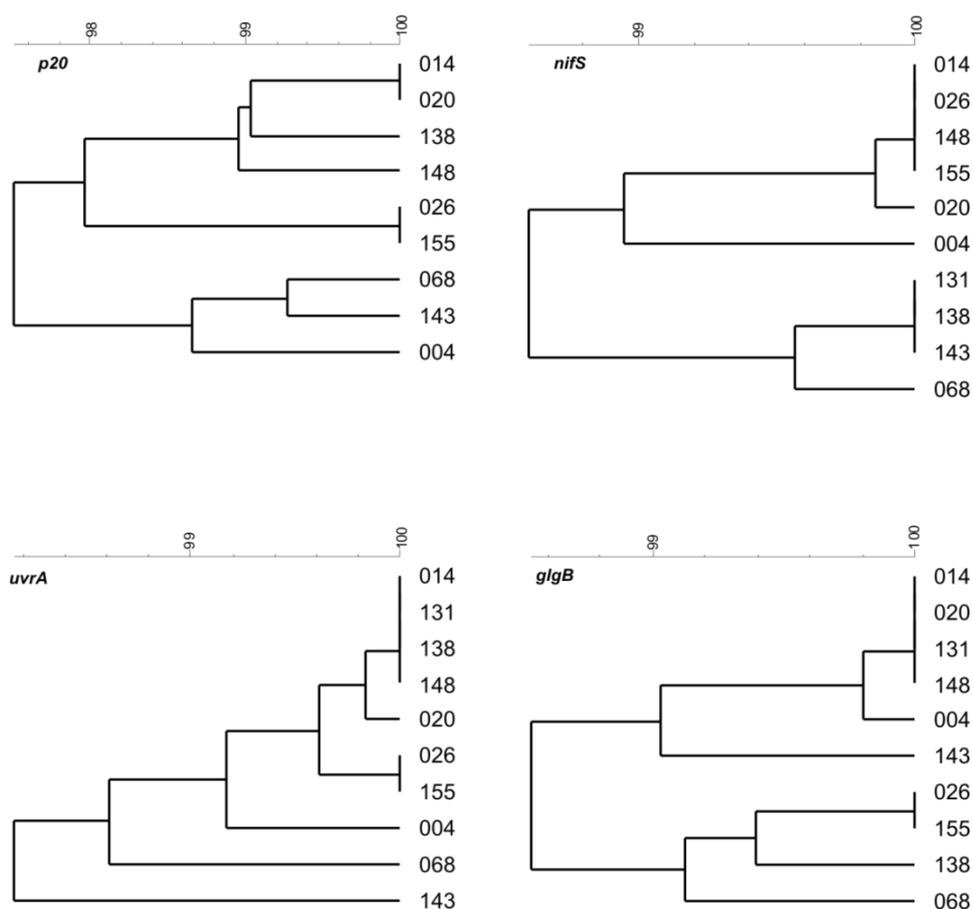


Abb. 3-21: Dendrogramm von zehn verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten, basierend auf dem multiplen Sequenzalignment des jeweiligen Amplifikats. Die X-Achse definiert die prozentuale Ähnlichkeit der Basenabfolge in %.

Diese Auswertung zeigt das Diskriminierungsverhalten in prozentual identischen Basen der jeweiligen Primersysteme. Angelehnt an die Publikation von Ruiz-Garbajosa *et al.* wurden die Primersysteme gewählt, die einen durchschnittlichen Basenunterschied von 2 - 4,5 % erzielten. Demnach wurden die Primersysteme für die Haushaltsgene *p20*, *nifS*, *uvrA* und *glgB* für die MLST-Klassifizierung der kompletten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammsammlung angewendet (Ruiz-Garbajosa *et al.* 2006).

Bei der Anwendung des MLST-Schemas auf 59 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme konnten für *nifS* 20 Alleltypen, für *glgB* 15 Alleltypen, für *p20* 21 Alleltypen und für *uvrA* 22 Alleltypen identifiziert werden. Insgesamt wurden 40 verschiedene ST's identifiziert, wobei ST 3 in fünf Isolaten als häufigster Typ nachgewiesen wurde. ST 7 konnte in vier Stämmen und ST 2, 6 und 12 in jeweils drei Stämmen identifiziert werden. Alle Ergebnisse sind in Abb. 3-22 als UPGMA-Dendrogramm zusammengefasst dargestellt.

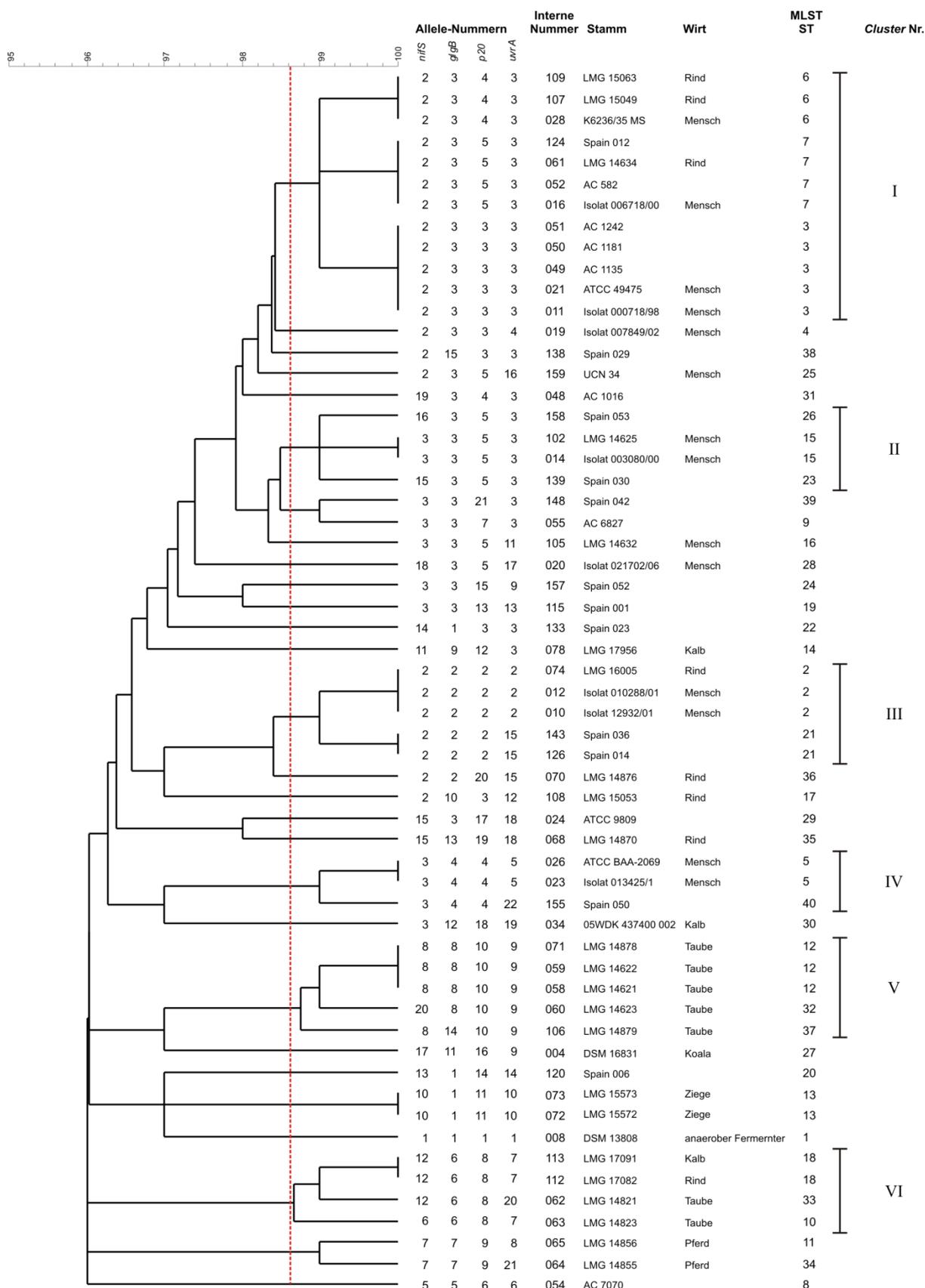


Abb. 3-22: Das Dendrogramm zeigt die Ähnlichkeit von 59 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten bezogen auf die Alleltypen der MLST Analyse. Die Darstellung erfolgt durch UPGMA, die rote Linie gibt die Grenze der Clusterbereiche an. Die rote Linie definiert die Clustergrenze.

Wird in der Analyse, wie von der *Software* berechnet, die 98,6%ige Ähnlichkeit als Schwelle definiert, so lassen sich sechs *Cluster* identifizieren. Der größte *Cluster* I beinhaltet zwölf Stämme, *Cluster* II und VI beinhalten jeweils vier Isolate, *Cluster* II und V jeweils fünf Stämme und *Cluster* IV drei Isolate. Markant sind die *Cluster* V und VI, welche ausschließlich Isolate mit tierischer Herkunft beinhalten.

Eine weitere Darstellungsvariante ist die des *Minimum Spanning Trees* (MST), mit der phylogenetische Zusammenhänge in Populationen abgebildet werden können. Diese Darstellungsform kann Hinweise auf evolutionäre Verläufe und Infektionsketten geben und spiegelt die in den *Clustern* definierten Isolatgruppen aus tierischer Herkunft wieder (Abb. 3-23). Es lässt sich erkennen, dass die als Kreise dargestellten STs mit mehreren Isolaten einen diversen Stammursprung aufweisen und dass mit der verwendeten Anzahl an Stämmen noch kein evolutionärer Verlauf erkennbar ist.

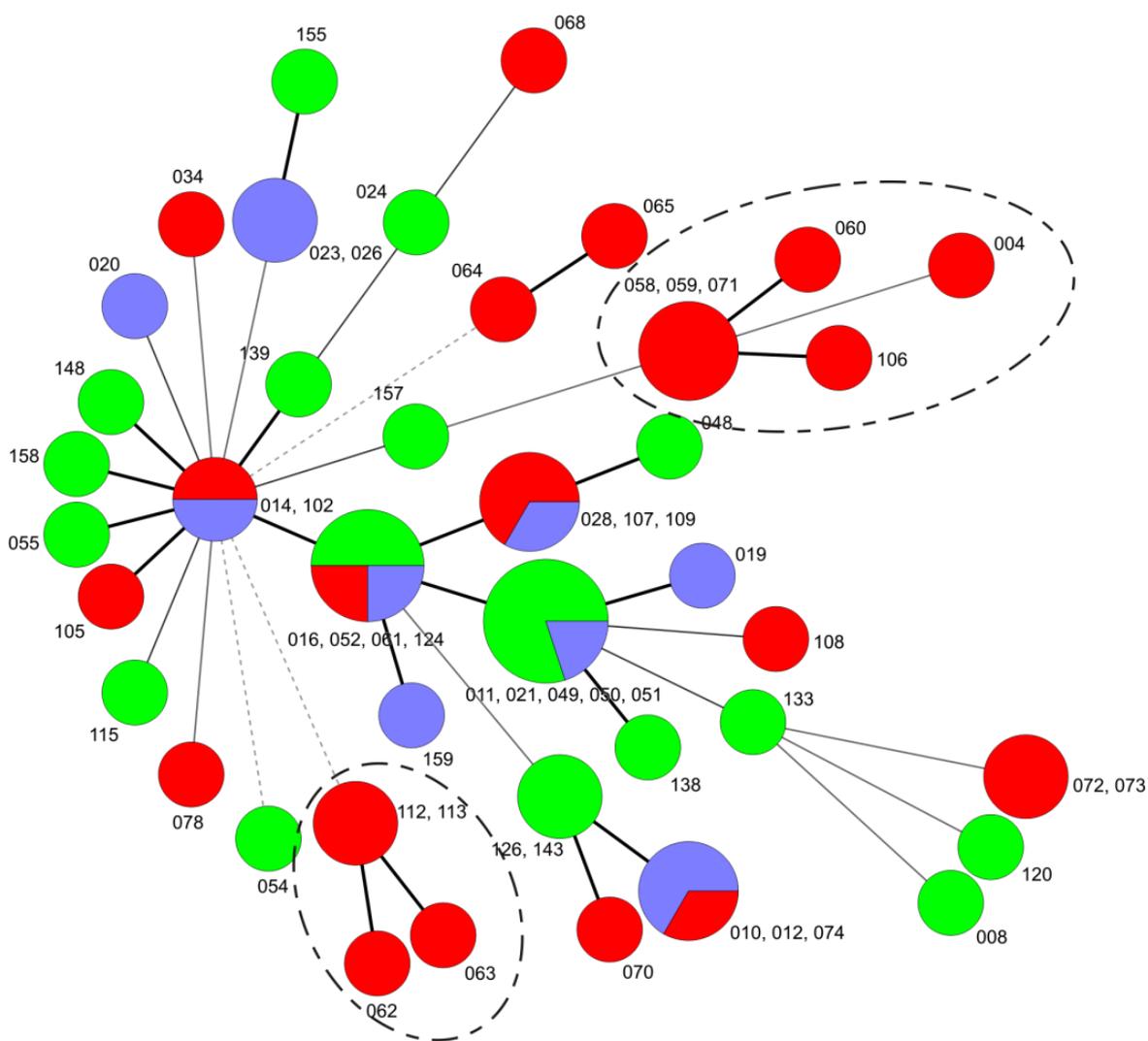


Abb. 3-23: Minimum Spanning Tree (MST) von 59 *S. gallolyticus subsp. gallolyticus* Isolaten bezogen auf die Alleltypen der MLST Analyse. Rot = Isolate tierischer Herkunft, blau = Isolate humaner Herkunft, grün = Isolate unbekannter Herkunft. Gestrichelte Linien definieren Gruppen von Isolaten mit tierischer Herkunft.

3.2.4 Korrelation der Charakterisierungsmethoden

Um eine Aussage über die Korrelation der getesteten Methoden treffen zu können, wurden die *Clusterzugehörigkeiten* der Stämme verglichen. Dazu wurde die MLST-Methode als primäre Ordnung und die rep-PCR (*DiversiLab Streptococcus Kit*) als sekundäre Sortierung gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-7 dargestellt und zeigen, dass die rep-PCR und die ERIC-PCR mit der gleichen Anzahl übereinstimmender *Cluster* mit der MLST-Methodik korrelieren. Eine im Vergleich schlechtere Korrelation zu den MLST-Ergebnissen zeigen die RAPD-PCR Daten. Daher ist nachgewiesen, dass die verwendeten Methoden keine zufälligen *Clusterzuordnungen* ergeben haben, sondern ein realistisches Bild der Stammcharakteristika aufzeigen.

Tabelle 3-7: Vergleich der *Clusterzugehörigkeit* verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme.

Interne Nummer	Stamm	Ursprung	MLST ST	MLST Cluster	ERIC-PCR Cluster	rep-PCR Cluster	RAPD-PCR Cluster
16	Isolat 006718/00	Mensch	7	1	1		4
11	Isolat 000718/98	Mensch	3	1	2	2	5
52	AC 582		7	1	2	4	
21	ATCC 49475	Mensch	3	1	2	6	5
49	AC 1135		3	1	2		5
124	Spain 012		7	1	4	2	1
28	K6236/35_MS	Mensch	6	1	5	1	1
109	LMG 15063	Rind	6	1	5	1	1
50	AC 1181		3	1	5	2	1
61	LMG 14634	Rind	7	1		2	4
51	AC 1242		3	1		4	5
107	LMG 15049	Rind	6	1		4	1
14	Isolat 003080/00	Mensch	15	2	1	4	3
158	Spain 053		26	2	4	1	
102	LMG 14625	Mensch	15	2	4	4	2
139	Spain 030		23	2	4	4	
12	Isolat 010288/01	Mensch	2	3	5		
10	Isolat 12932/01	Mensch	2	3			1
74	LMG 16005	Rind	2	3			
126	Spain 014		21	3			
143	Spain 036		21	3			2
26	BAA-2069	Mensch	5	4	3	1	
23	Isolat 013425/1	Mensch	5	4	3	6	
155	Spain 050		40	4		1	
58	LMG 14621	Taube	12	5	7	3	
106	LMG 14879	Mensch	37	5	7		
59	LMG 14622	Taube	12	5	8	3	
60	LMG 14623	Taube	32	5	8	3	
71	LMG 14878	Taube	12	5	8		5
62	LMG 14821	Taube	33	6	8	5	
63	LMG 14823	Taube	10	6	8	5	
112	LMG 17082	Rind	18	6	8	5	
113	LMG 17091	Kalb	18	6	8	5	
16	Isolat 006718/00	Mensch	7	1	1		4

Interne Nummer	Stamm	Ursprung	MLST ST	MLST Cluster	ERIC-PCR Cluster	rep-PCR Cluster	RAPD-PCR Cluster
25	Isolat 005950/03	Mensch			2	2	5
19	Isolat 007849/02	Mensch	4		2		5
47	AC 6860				3	1	
127	Spain 015				4	1	
131	Spain 020				4	1	1
148	Spain 042		39		4	1	2
115	Spain 001		19		4	2	1
133	Spain 023		22		4	2	
159	UCN34	Mensch	25		4	2	
105	LMG 14632	Mensch	16		4	4	
138	Spain 029		38		5	2	
24	ATCC 9809		29		6		
68	LMG 14870	Rind	35		6		
78	LMG 17956	Kalb	14		6		
157	Spain 052		24		7		
4	DSM 16831	Koala	27		8		
34	05WDK43740 002	Kalb	30		8		
54	AC 7070		8		8		
72	LMG 15572	Ziege	13		8		
73	LMG 15573	Ziege	13		8		
80	LMG 22782	Hund			8		
104	LMG 14631	Mensch				1	2
15	Isolat 010672/01	Mensch				4	
55	AC 6827		9			4	
22	ATCC 49147	Mensch				6	4
8	DSM 13808	Fermenter	1				
48	AC 1016		31				3
64	LMG 14855	Pferd	34				5
65	LMG 14856	Pferd	11				3
70	LMG 14876	Rind	36				
108	LMG 15053	Rind	17				
120	Spain 006		20				

3.3 Genomsequenzierung und Analyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte in Kooperation mit dem CeBiTec Bielefeld erstmalig die komplette Genomsequenz eines *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes identifiziert und mit Fokus auf der Pathogenität analysiert werden. Es wurde zunächst ein Stamm aus einer Blutkultur einer 68-jährigen Patientin mit Aortenklappen-Endokarditis isoliert und bei der *American Type Culture Collection* (ATCC) mit der Stammbezeichnung BAA-2069 hinterlegt. Der ausgewählte Stamm zeigte in vorangegangenen Experimenten ein hohes Adhäsions- und Invasionspotential an Endothelzellen, sowie eine starke Bindungsaffinität an Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM). Weiterhin konnte eine phänotypische Resistenz gegen Oxacillin, Gentamycin, Tobramycin, Tetracyclin, Cotrimoxazol und Rifampicin nachgewiesen werden (Hinse 2008; Vollmer *et al.* 2010). Während der experimentellen Arbeit publizierten Rusniok *et al.* die komplette Genomsequenz des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes UCN34 (Rusniok *et al.* 2010) und Sillanpää *et al.* die unvollständige und fragmentierte Genomsequenz TX20005 (Sillanpää *et al.* 2009).

Die Sequenzierung mit der 454 GS FLX Titanium Technik (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) lieferte 455.842 *reads* mit durchschnittlich 329 bp Leseweite. Die Pyrosequenzierung und Assemblierung ergab ein Genset von 45 *Contigs*, deren Größe von 93 bis 6.600 bp reichte. Das *Mapping* des Genoms wurde gegen das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* UCN34 Genom (GenBank Acc. No.: FN597254) durchgeführt. Verbliebene Lücken wurden mittels konventioneller PCR und Sanger-Sequenzierung geschlossen. Eine verbliebene Lücke erstreckte sich über einen großen, zweifach im Genom vorkommenden Bereich mit der *Contig*abfolge c18-X-c24, die unterbrochen von zwei nicht eindeutig zuzuordnenden *Contigs* (X) ist (Abb. 3-24). Ein Lückenschluss mittels *Primer-walking* oder *long-range-PCR* war in diesem Fall nicht möglich. Die genaue Basenabfolge dieses Bereiches konnte nur mit Hilfe einer *Southern-Hybridisierung* erschlossen werden. Dazu wurde eine auf dem *Contig* c21 befindliche Restriktionsschnittstelle genutzt, um eine spezifische Spaltung für den jeweiligen Bereich zu gewährleisten. Die möglichen Ergebnisse und deren Interpretation sind in Abb. 3-25 dargestellt. Die zwei möglichen Varianten sind c06-c18-c21-c24 / c43-c18-c22-c24 oder c06-c18-c22-c24 / c43-c18-c21-c24. Die *Southern Blots* aus denen die korrekten *Contig*-Reihenfolgen c06-c18-c21-c24 und c43-c18-c22-c24 abzuleiten sind, sind in Abb. 3-26 gezeigt. Die Ergebnisse der Genomanalyse sowie die Sequenzen sind publiziert (Hinse *et al.* 2011) (GenBank Acc. No. FR824043, FR824044).

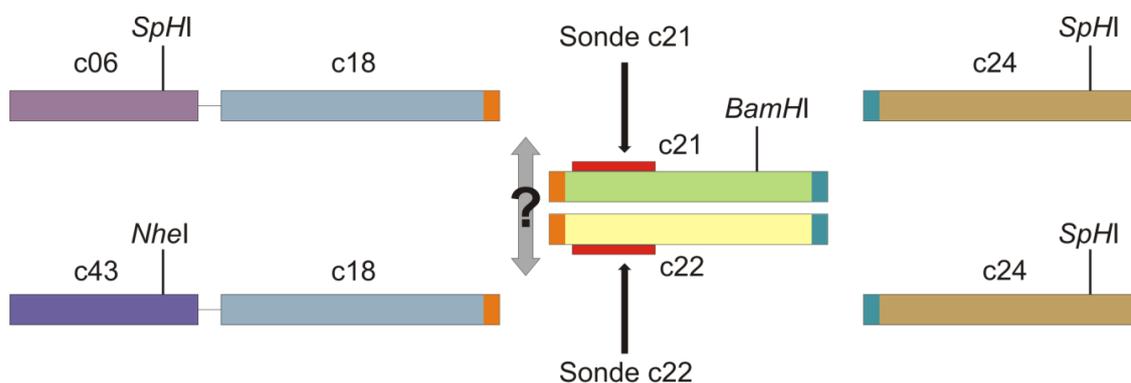


Abb. 3-24: Schematische Darstellung zweier Regionen und deren Contigs innerhalb des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BAA-2069 Genoms. Die gleichfarbigen endständigen Sequenzen symbolisieren homologe Sequenzbereiche. Unklar ist die Reihenfolge der Contig-Sequenzen.

Reihenfolge	Sonde c21		Sonde c22	
	c06-c18-c21	c43-c18-c21	c06-c18-c22	c43-c18-c22
<i>Bam</i> HI + <i>Sph</i> I	8, 9kb	>17kb	12, 3kb	>21kb
<i>Nhe</i> I + <i>Sph</i> I	12, 3kb	12, 3kb	12, 3kb	12, 3kb

Abb. 3-25: Darstellung der möglichen mittels Southern Blot Hybridisierung detektierbaren Bandengrößen und deren Aussage für die Genomkomposition.

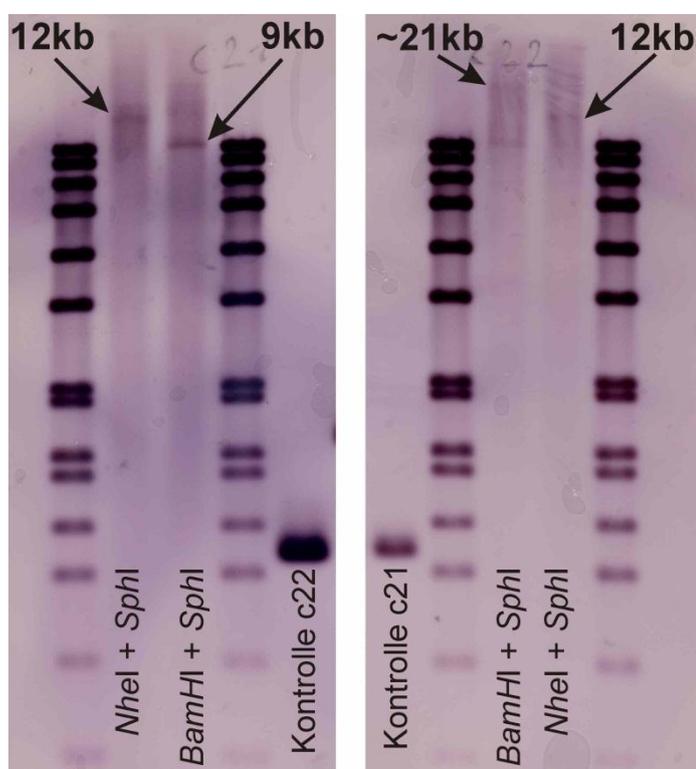


Abb. 3-26: Southern-Hybridisierung zur Aufklärung des Lückenschlusses. Die Gesamt-DNA von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und mit DIG-markierten Sonden spezifisch für Fragment c21 (links) bzw. c22 (rechts) hybridisiert. Marker: DIG DNA Molecular Weight MarkerVII, DIG-markiert (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

3.3.1 Allgemeine Genomeigenschaften

Im Rahmen der kompletten Sequenzierung des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes BAA-2069 wurde eine Größe des zirkulären DNA-Moleküls von 2.356.444 bp mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 37,65 % ermittelt. Weiterhin konnte auf Basis eines stark erhöhten Vorkommens bestimmter Sequenzbereiche erstmals das 20.765 bp große *multicopy*-Plasmid pSGG1 mit einem GC-Gehalt von 37,26 % beschrieben werden. Es wurden 2.309 *open reading frames* (ORFs) auf dem Chromosom und 21 ORFs auf dem Plasmid determiniert. Weiterhin wurden 80 für tRNAs und 21 für rRNAs kodierende Bereiche vorhergesagt. Abb. 3-27 zeigt eine zirkuläre Darstellung des Genoms.

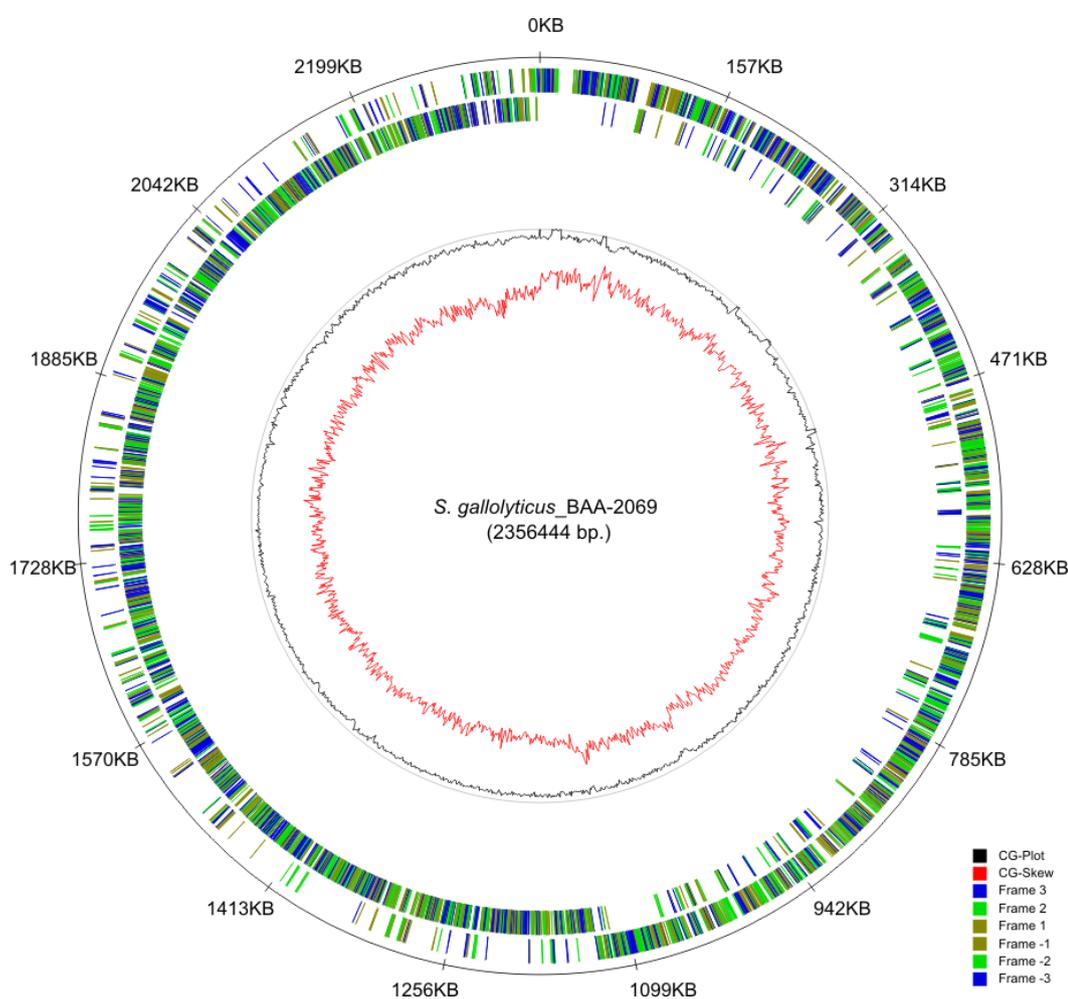


Abb. 3-27: Zirkulärer Genom-Plot von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069. Die rote Linie stellt den GC-Skew dar, die grüne Linie den GC-Gehalt des Bereichs. Alle ORFs sind als Balken im peripheren Randbereich auf dem jeweiligen Leseraster dargestellt.

Ein Vergleich des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BAA-2069 Genoms mit anderen, bereits sequenzierten Streptokokken-Genomen, zeigte ein 12 % größeres Genom im Vergleich zum Streptokokken-Durchschnitt (MW = 2,1 mbp, n = 15). Lediglich das Genom von *S. sanguinis* SK36 ist größer (2.388.435 bp). Der GC-Gehalt ist durchschnittlich 1,7 % niedriger und es

konnten 10 % mehr ORFs analysiert werden als im Durchschnitt verschiedener Streptokokken-Genome (MW = 2.107 ORFs). Zusammenfassend sind diese Ergebnisse in Abb. 3-28 dargestellt.

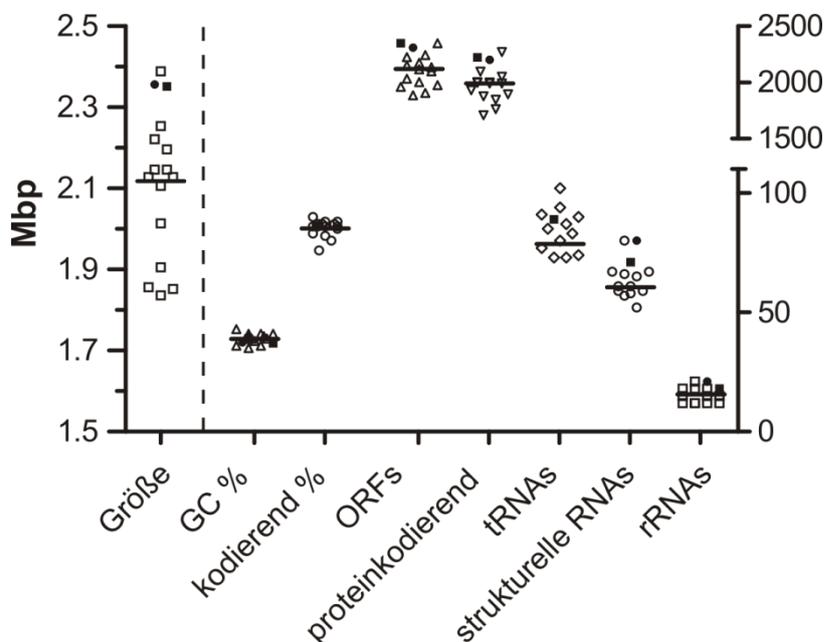


Abb. 3-28: Übersicht der Genomeigenschaften von Streptokokken. ● repräsentiert die Werte für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069. ■ repräsentiert die Werte für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN34. Andere Symbole stehen für die Stämme *S. agalactiae* A909, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS_124, *S. equi* subsp. *equi* 4047, *S. sanguinis* SK36, *S. suis* BM407, *S. uberis* 0140J, *S. pyogenes* MGAS9429, *S. pneumoniae* ATCC 700669, *S. mutans* NN2025, *S. mitis* B6, *S. thermophilus* LMD-9, *S. gordonii* str. *challis* substr. CH1, *S. oralis* ATCC 35037 und *S. salivarius* SK126.

3.3.2 Detektion und Analyse potentieller Virulenzgene

Im Zuge der Genomanalyse wurde speziell die Identifikation und Analyse potentieller Virulenzgene forciert. Insbesondere wurden zwei Gruppen von Genen betrachtet. Die als MSCRAMM-Unterguppe klassifizierten, für LPxTG-Proteine kodierenden Gene, welche eine funktionelle Rolle bei der Adhäsion von Bakterien an das Zielgewebe spielen können, sowie die MSCRAMMs, die die initiale Adhäsion an das Zielgewebe in allen Bakterien initiieren.

Im Genom von Stamm BAA-2069 konnte eine 34 kb große und bisher für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* einzigartige Region mit 35 ORFs identifiziert werden (SGGBAA2069_c20310-c20660). Dieser Bereich beinhaltet das putative *major cell surface protein* (*pac*), welches ein Hauptfaktor der Kolonisierung von *S. mutans* ist, sowie ein LPxTG-Motiv Gen mit unbekannter Funktion. Zudem wurde ein Gen

(SGGBAA2069_c20320) mit Ähnlichkeit zu dem Glukan-bindenden-Protein-C identifiziert. Nahezu identisch zu dieser Region ist eine 30 kb große Sektion (SGGBAA2069_c13640-c13980), welche die genannten Gene erneut kodiert.

Eine weitere 2,5 kb umfassende Region (SGGBAA2069_c22100 – c22120) beinhaltet eine Phagen-assoziierte Integrase und ein Gen mit Zellwandanker-Motiv. Es zeigt wenig Homologien mit bekannten Genen, jedoch ist bekannt, dass Zellwandanker-Proteine stets einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion an Wirtszellen haben. Weiterhin sind drei Gene (SGGBAA2069_c05730, c12530, c17410) mit Hämolysin A, Hämolysin III und einem undefinierten hämolysinähnlichen Protein assoziiert, auch wenn *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BAA-2069 auf Blutagar nicht-hämolytisch, bzw. nur schwach α -hämolytisch ist.

Innerhalb einer 13,5 kb Region sind 12 Gene lokalisiert, die für die Polysaccharid-Kapsel kodieren (*cpsA* – *cpsM* / SGGBAA2069_c09190 – c09300). Die Kapsel ist einer der wichtigsten bekannten Virulenzfaktoren und dient sowohl als Permeabilitätsbarriere als auch als Initiator der bakteriellen Adhäsion und Biofilmbildung (Abb. 3-29).

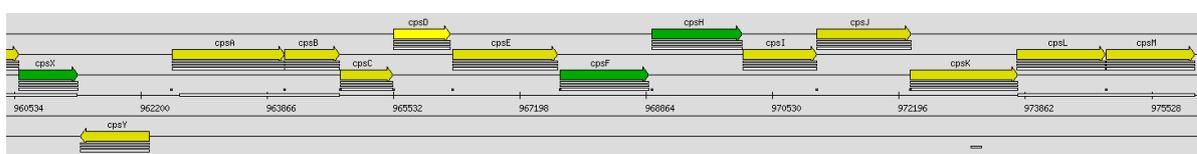


Abb. 3-29: Darstellung des cps-Operons *cpsX* – *cpsM* [c09170 - c09300] von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069. Die Gene *cpsX* und *cpsY* gelten als putative transkriptionale Regulatoren. (Ausschnitt aus GenDB-Software).

Eine Übersicht aller Gene mit LPxTG Motiv ist in Tabelle 3-8 dargestellt. Hervorzuheben ist das Vorkommen von vier für Kollagenadhäsine kodierende Gene, welche eine besondere Rolle bei der Pathogenität spielen.

Tabelle 3-8: Übersicht und Vergleich der in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 identifizierten Gene mit LPxTG Motiv. Prozentuale Angaben beziehen sich auf die Sequenzhomologie.

Gen-Nummer in Stamm BAA-2069	Gen-Nummer in Stamm UCN34 (Acc. No: FN597254.1)	Gen-Nummer in Stamm TX20005 (Acc. No: AEEM0000000.1)	Annotation
SGGBAA2069_c01280	Gallo_0112	<i>Sbs10</i>	(<i>fruA</i>) Fructan β -Fructosidase
SGGBAA2069_c05110	Gallo_0577	<i>Sbs16</i> (64%)	(<i>cna</i>) Kollagen-Adhäsine
SGGBAA2069_c07210	Gallo_0748	<i>Sbs6</i>	(<i>prtS</i>) Lactocepine
SGGBAA2069_c10430	Gallo_1058	<i>Sbs2</i>	(<i>spaP</i>) Glukan bindendes Protein C
SGGBAA2069_c13880	Gallo_1675 (88%)		unbekannte Funktion
SGGBAA2069_c13900			unbekannte Funktion
SGGBAA2069_c14850	Gallo_1462		(<i>pulA</i>) Pullulanase / Glycosidase

Gen-Nummer in Stamm BAA-2069	Gen-Nummer in Stamm UCN34 (Acc. No: FN597254.1)	Gen-Nummer in Stamm TX20005 (Acc. No: AEEM00000000.1)	Annotation
SGGBAA2069_c15950	Gallo_1569	<i>Sbs11</i> (66%)	(<i>fszB</i>) Fimbrien Untereinheit Type 2
SGGBAA2069_c15960	Gallo_1570	<i>Sbs12</i> (69%)	(<i>cna</i>) Kollagen-Adhäsion
SGGBAA2069_c16150	Gallo_1578		(<i>nanA</i>) Peptidoglycan-verknüpfendes Protein
SGGBAA2069_c16640	Gallo_1636	<i>Sbs1</i>	(<i>pmrB</i>) major facilitator superfamily permease
SGGBAA2069_c19780	Gallo_2018		(<i>blpT</i>) putativ immunmodifizierendes Protein
SGGBAA2069_c19910	Gallo_2032	<i>Sbs13</i>	(<i>cna</i>) Kollagen-Adhäsion
SGGBAA2069_c19970	Gallo_2039	<i>Sbs14</i>	große Pilus Untereinheit
SGGBAA2069_c19980	Gallo_2040	<i>Sbs15</i>	(<i>FNI</i>) Peptidoglycan-verknüpfendes Protein
SGGBAA2069_c20560	Gallo_1675 (84%)		(<i>pac</i>) Zelloberflächen-Adhäsion
SGGBAA2069_c20580			unbekannte Funktion
SGGBAA2069_c21750	Gallo_2178	<i>Sbs7</i>	Pilus Untereinheit
SGGBAA2069_c21760	Gallo_2179	<i>Acb</i>	(<i>cna</i>) Kollagen Adhäsion
SGGBAA2069_c22120			unbekannte Funktion
SGGBAA2069_c22310	Gallo_0272 (95%)		(<i>sspA</i>) putativer Agglutinin Rezeptor

3.3.3 Vergleichende Genomanalyse

Zum Zeitpunkt der Analyse des Genoms konnten die generierten Daten mit einer weiteren kompletten Genomsequenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (UCN34) (Rusniok *et al.* 2010), sowie einer unvollständigen und fragmentierten Sequenz (TX20005) (Sillanpää *et al.* 2009) verglichen werden. Eine zusätzliche Sequenz (ATCC 43143) wurde im Mai 2011 publiziert (Lin *et al.* 2011). Eine Übersicht der Sequenzeigenschaften aller Genome ist in Tabelle 3-9 gezeigt.

Tabelle 3-9: Übersicht der sequenzierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genome.

Genome Name	Genom-Status	Sequenzier-Zentrum	Datum der Veröffentlichung	NCBI Project Id	Genbank Accessions	Sequenz-Status
UCN34	komplett	Institut Pasteur	11.02.2010	34729	FN597254	komplett
TX20005	fragmentiert	Baylor College of Medicine	24.08.2010	30645	AEEM00000000	nicht assembliert
ATCC BAA-2069	komplett	Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen	02.03.2011	63179	FR824043, FR824044	komplett
ATCC 43143	komplett	National Yang-Ming University, Taiwan	28.05.2011	62517	AP012053	komplett

Genome Name	Chromosomen	Plasmide	Contigs	Sequenzen	Genomegröße in bp	CDS
UCN34	1	0	0	1	2.350.911	2.223
TX20005	0	0	6	6	2.246.969	2.218
ATCC BAA-2069	1	1	0	2	2.377.209	2.329
ATCC 43143	1	0	0	1	2.362.241	2.295

Im direkten Vergleich von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 zu UCN34 konnten 87 % des Genoms (2040 ORFs) als gemeinsam deklariert werden. Es sind größere Bereiche vorhanden, die individuell für den jeweiligen Stamm sind. So besitzen die Stämme BAA-2069 224 kb (9,5 %) und UCN34 199 kb (9 %) eigenständige Bereiche bezogen auf die gesamte Genomgröße. Dargestellt sind diese

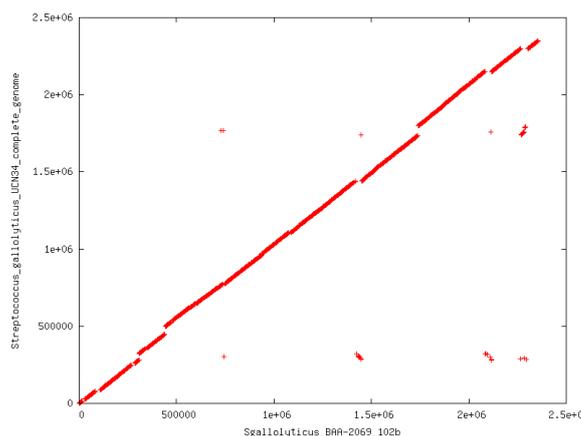


Abb. 3-30: Synteny Plot der Genome BAA-2069 und UCN 34.

Beziehungen in einem Plot in der Abb. 3-30. Die Abbildung zeigt, dass große Bereiche beider Genome hochkonserviert sind und eine Auftragung der Genome eine nahezu lineare Funktion darstellt. Wenige kleine Bereiche sind als Inseln außerhalb der Linie ersichtlich und sind daher als eigenständige genomische Inseln zu bezeichnen. Der Vergleich des Vorhandenseins oder Fehlens bestimmter ORFs lässt sich in einem Venn-Diagramm (Abb. 3-31) darstellen. Es ergeben sich 1973 gemeinsame ORFs und 131 (UCN34), 180 (ATCC 34143) sowie 212 (BAA-2069) spezifische ORFs für jeden Stamm.

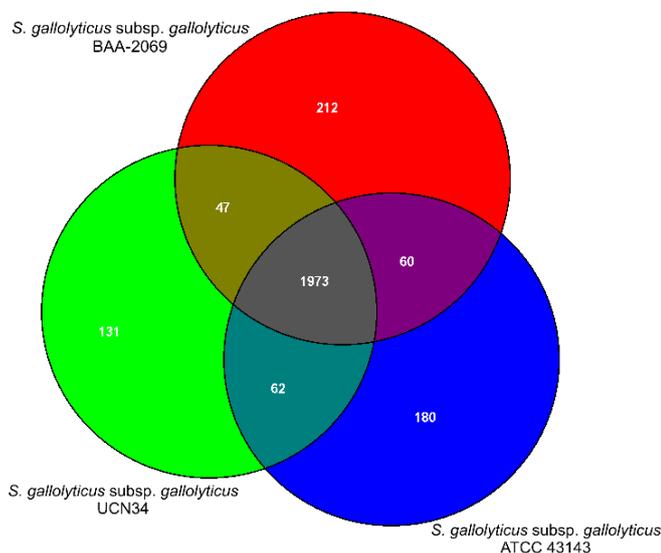


Abb. 3-31: Venn-Diagramm auf Basis identischer ORFs von verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen.

Eine erweiterte Form dieses Vergleichs, welche sich auf zusätzlich sequenzierte *Streptococcus*-Genome bezieht, ist in Abb. 3-32 gezeigt. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BAA-2069 teilt die meisten gemeinsamen ORFs mit *S. sanguinis* SK36 (935) und die wenigsten mit *S. uberis* 0140J (493). Aus dieser Analyse geht deutlich hervor, dass die

Diversität innerhalb der Streptokokken als mittelmäßig einzustufen ist und dass ein hoher Anteil spezifischer Gene für jede Spezies vorhanden ist.

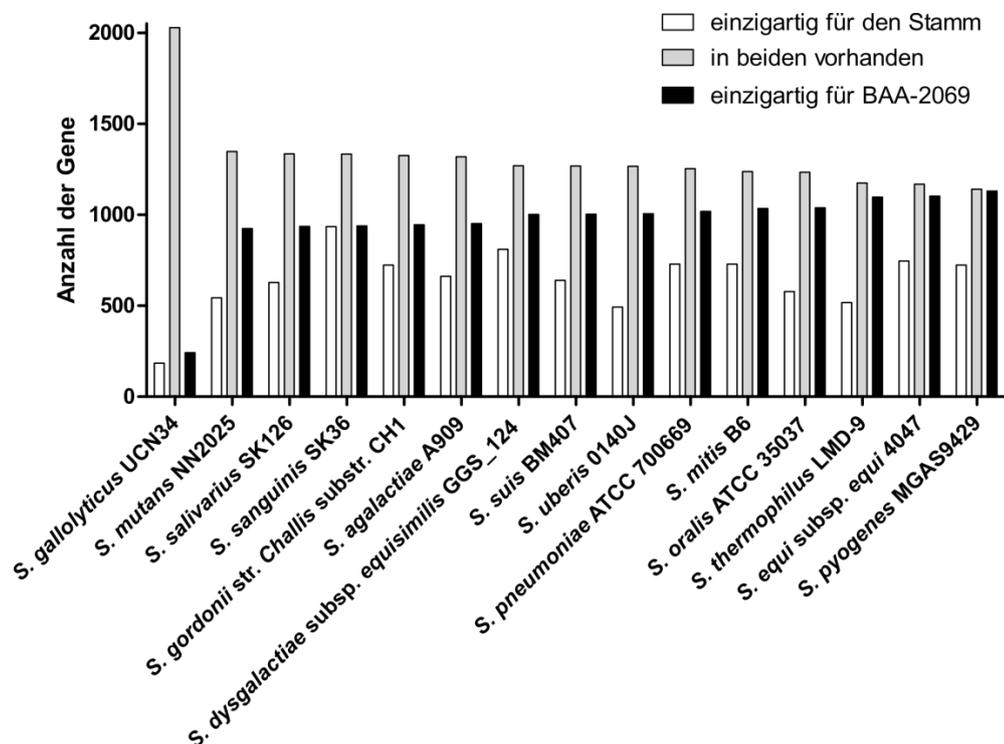


Abb. 3-32: Differenzierung der einzigartigen und gemeinsamen ORFs in verschiedenen Streptokokken bezogen auf Stamm BAA-2069. Rohdaten befinden sich im Anhang in Tabelle 9-3.

Eine weitere Analyse stellt die Zusammenhänge der Genomstruktur zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies her. In einer MAUVE-Abbildung werden *Alignments* von LCBs (*local collinear blocs*) dargestellt (Darling *et al.* 2004). Ein LCB ist definiert als ein kollineares, konsistentes Set von multiplen *maximal unique matches* (MUMs). Ein MUM ist dabei eine exakt übereinstimmende Subsequenz, die in allen beteiligten Chromosomen vorkommt und an beiden Seiten von nicht übereinstimmenden flankierenden Sequenzen begrenzt wird. Die Gewichtung, das heißt die Summe der Längen der eingeschlossenen multiplen-MUMs, eines LCBs dient als Grad für die Konfidenz der wahren Orthologie, statt einer zufälligen Übereinstimmung und wurde mit 355 definiert. Daher sind alle ORFs oder Sequenzen zwischen den LCBs und alle Regionen mit schwacher Ähnlichkeit (weiß dargestellt) als stammspezifische Regionen klassifiziert (Abb. 3-33). Zwischen den drei Genomen sind keine Inversionen oder Verschiebungen großer Regionen zu erkennen. Die zehn großen Bereiche sind als weitestgehend homogen zu betrachten und nur von kleinen stammspezifischen Regionen durchsetzt (weiße Bereiche). Bei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BAA-2069 und ATCC 43143 sind jeweils ein und bei UCN34 zwei

inhomogene Bereiche zu finden. Hierbei sind Verschiebungen über große Distanzen zu beobachten (in der Abbildung nach unten ragende Bereichen).



Abb. 3-33: Komplettes MAUVE-Genom Alignment von drei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen.

Weiterhin wurde eine taxonomische Analyse auf Basis des *Core*-Genoms durchgeführt (Abb. 3-34). Diese Analyseform ist die umfassendste Analyseform der taxonomischen Differenzierung, die zurzeit zur Verfügung steht. Der dargestellte phylogenetische Stammbaum zeigt eine hohe genomische Diversität zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und verwandten *Streptococcus*-Spezies.

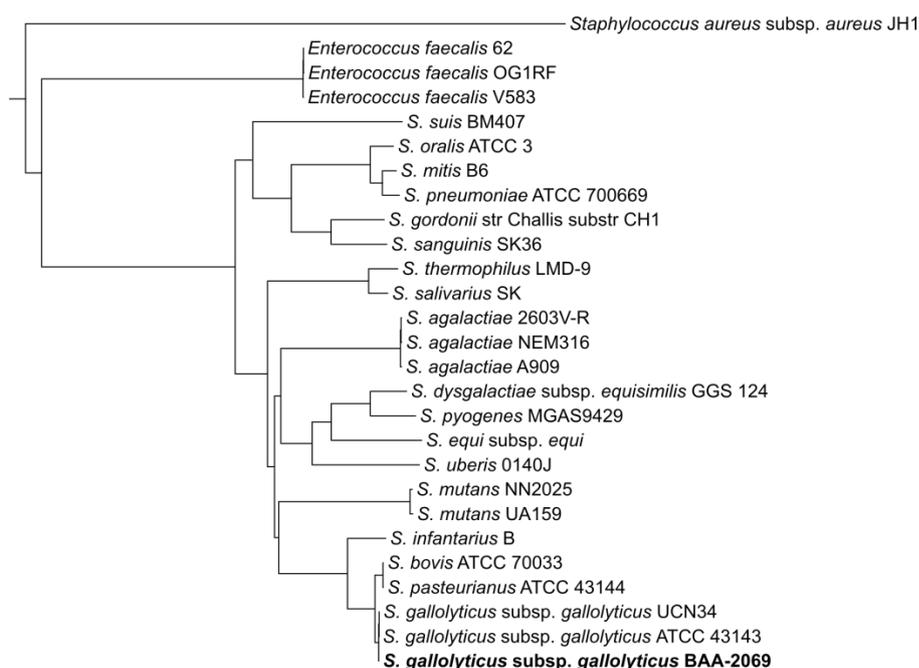


Abb. 3-34: Phylogenetischer Stammbaum von verschiedenen *Streptococcus*-Spezies. Die Analyse erfolgte auf Basis des *Core*-Genoms.

Es zeigt sich eine deutliche Diversität der *Enterococcus faecalis* Stämme zu den *Streptococcus* Stämmen. Der *Staphylococcus aureus* Stamm wurde zu Erstellung des Stammbaumes als weniger verwandte Spezies mitgeführt.

3.3.3.1 Direkter Vergleich von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genomen

Im direkten Vergleich zwischen den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen BAA-2069, UCN34 und TX20005 wurde, aufgrund der Vielzahl an Unterschieden, der Fokus auf wichtige Virulenzfaktoren gelegt.

In Stamm BAA-2069 wurden 21 Proteine mit C-terminalem LPxTG Motiv identifiziert. Zu allen in dem Stamm TX20005 („Sbs“-Gene) identifizierten Proteinen mit MSCRAMM Charakteristik konnten orthologe oder ähnliche Gene gefunden werden. Im Vergleich zu den Virulenzgenen in Stamm UCN34 („Gallo_“ Gene) zeigt sich, dass Stamm BAA-2069 drei stammspezifische MSCRAMM Gene trägt. Das Gen SGGBAA2069_c13880 und das paraloge Gen SGGBAA2069_c20560 haben nur eine schwache Ähnlichkeit zu Gallo_1675 und kodieren für einen putatives *major cell surface adhesin* (*pac*). Die paralogen Gene SGGBAA2069_c13900 und SGGBAA2069_c20580 besitzen ein Zellwandanker-Motiv, zeigen jedoch keine Ähnlichkeit zu in den Datenbanken hinterlegten funktionellen Genen. Außerdem ist das Gen SGGBAA2069_c22120 spezifisch für Stamm BAA-2069 und besitzt eine nicht näher definierte putative Funktion in der Virulenz.

Bei der Analyse potentieller protektiver Gene zeigt der Stamm BAA-2069 im Gegensatz zu Stamm UCN34 zwei zusätzliche Gene für Restriktionsenzyme. Das Typ III Restriktionsenzym *SthIR* (SGGBAA2069_c10290) ist auf einer 9,9 kb großen stammspezifischen Insel (SGGBAA2069_c10280 – c10350), zusammen mit der korrespondierenden Restriktions-Methylierungsuntereinheit und einem Integrase Gen, kodiert. Eine weitere Typ II Restriktionsendonuklease *Eco47II* und die modifizierende Methylase werden innerhalb einer spezifischen 9,7 kb großen Region kodiert.

Zu den wichtigen Faktoren die in Stamm UCN34, jedoch nicht in Stamm BAA-2069 vorkommen, zählt eine 46 kb große Phagen-assoziierte Region, die eine putative Zellwand-Hydrolase kodiert. Weiterhin beinhaltet Stamm UCN34 ein 46 kb großes CRISPR (*cluster regulatory interspaced short palindromic repeats*) Element (1.507.890 – 1.508.913 bp) mit 16 Wiederholungen einer 36 bp Konsensus-Sequenz. Eine in beiden Stämmen vorkommende CRISPR-Region ist weitestgehend konserviert (UCN34 1.515.490 – 1.516.317 bp;

BAA2069 1.517.213 – 1.518.237 bp). Eine zusätzliche für Stamm BAA-2069 spezifische CRISPR-Region ist zwischen 1.515.726 – 1.516.570 bp kodiert. Die korrespondierenden *cas*-Gene sind SGG BAA2069_c14660 und c14670 (*cas2*), c14670 (*cas1*), beziehungsweise Gallo_1437, Gallo_1444 (*cas2*) und Gallo_1438, Gallo_1439 (*cas1*) für UCN34. Alle identifizierten CRISPR-Daten beider Genome wurden im CRISPRs *web server* (<http://crispr.u-psud.fr>) hinterlegt.

Ebenfalls spezifisch für den Stamm UCN34 ist eine 27 kb große Transposon assoziierte Region, die das *tetL* und *tetM* Gen beinhaltet und damit für die Tetracyclin-Resistenz verantwortlich ist. Das Vorhandensein von *Tn916*-assoziierten Genen deutet auf eine Akquirierung durch horizontalen Gentransfer (HGT) hin. Des Weiteren beinhaltet eine 4,9 kb große, für BAA-2069 spezifische, Region (SGG BAA2069_c05330-c05370) Gene für ein Phosphotransferase-System (PTS) mit den Cellobiose-spezifischen Komponenten IIB und IIC.

3.3.4 Plasmid pSGG1

Erstmalig wurde in dieser Arbeit durch Sequenzanalysen ein 20.765 bp großes Plasmid (pSGG1) mit 21 ORFs in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nachgewiesen. Nur 14 Gene des Plasmides wurden bei Vergleichen mit Sequenzdatenbanken als bekannt identifiziert, die übrigen zeigen keine oder nur sehr schwache Homologien. Viele Bereiche weisen mosaikähnliche Homologien zu größtenteils im Verdauungstrakt vorkommenden Bakterien, wie Streptokokken oder Enterokokken oder deren assoziierten Plasmiden, auf (Abb. 3-35). Es konnten deutliche Homologien zu *S. bovis*, *S. ferrus*, *S. pyrogenes*, *S. thermophilus*, *S. infantarius*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Campylobacter jejunii*, *Bifidobacterium thermophilus* und *Clostridium cellulovorans* identifiziert werden. Des Weiteren wurden zwei IS1215 Elemente und eine putatives Resolvase-Gen detektiert. IS-Elemente ermöglichen insbesondere die Rekombination zwischen Plasmid-DNA und dem Chromosom. Das Relaxase Gen weist Homologien zum Plasmid pTet35 aus *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* 81-176 auf. Dies klassifiziert das konjugative Transfersystem als MOB_{P4} (ehemals MOB_V) (Garcillan-Barcia *et al.* 2009). Weiterhin konnte eine Mobilisierungsregion (SGG BAA2069_p00200), welche Homologien zu dem *mob*-Gen aus *Streptococcus ferrus* zeigt, detektiert werden. Auch dieses Gen ist ein Faktor für die Übertragbarkeit von Plasmiden und spielt, zusammen mit konjugativen Helfer-Plasmiden, eine Rolle im HGT. Das

Plasmid pSGG1 scheint jedoch nicht zu einem selbständigen konjugativen Transfer fähig zu sein, da es keine *tra*-Gene besitzt.

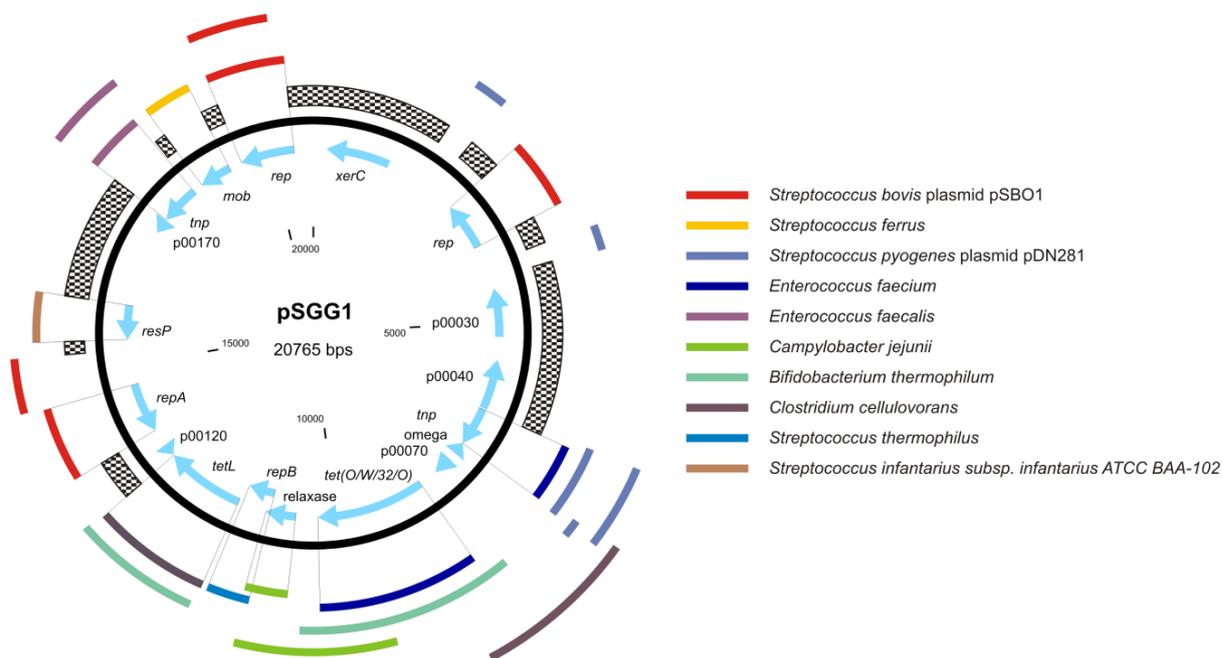


Abb. 3-35: Plasmid pSGG1 aus *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069. Durch farbliche Hervorhebung gekennzeichnet sind homologe Bereiche und deren Ursprung. Schwarz-Weiß schraffierte Bereiche zeigen keine Homologien zu bekannten Sequenzen.

Die Replikation des Plasmids pSGG1 wird von einem der vier identifizierten *rep*-Gene reguliert, wobei das Gen SGGBAA-2069_p00100 zu der *rep*₁ Superfamilie, und die Gene SGGBAA-2069_p00020, p00140, p00200 zu der *rep*₃ Superfamilie gehören. Weiterhin zeigt das *repA*-Element (p00140) eine 78%ige Ähnlichkeit zu dem Gen in Plasmid pSBO1 aus *S. bovis* (Nakamura *et al.* 2000). Eine definitive Aussage zur Funktionalität der Gene ist durch die durchgeführten *in silico* Analysen nicht möglich. Fünf ORFs wurden als proteinkodierend identifiziert, zeigten jedoch keine signifikante Homologie zu bekannten Sequenzen.

Weiterhin kodiert pSGG1 für das Tetracyclinresistenzgen *tetL* (SGGBAA2069_p00110), sowie das mosaikartige Tetracyclinresistenzgen *tet(O/W/32/O)*, welches häufig in gram-positiven Pathogenen vorkommt. Der für die Resistenz kodierende Bereich zeigt vielfältige Homologien zu verschiedenen Organismen, hauptsächlich zu gastrointestinal assoziierten Bakterien, jedoch gibt es keine vollständige Ähnlichkeit der gesamten Resistenz kodierenden Region (Abb. 3-36). Dies ist ein Anzeichen dafür, dass das Plasmid pSGG1 nicht durch HGT assembliert wurde.

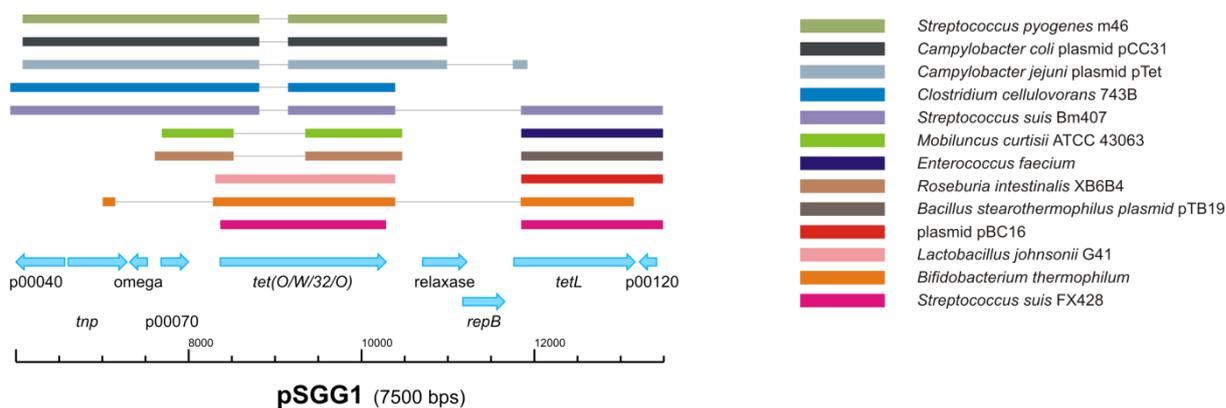


Abb. 3-36: Homologien des *tet*-Resistenz-tragenden Bereiches von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BAA-2069.

3.3.4.1 Verbreitung von pSGG1-homologen Plasmiden

Um die Verbreitung von pSGG1 innerhalb des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Kollektivs zu untersuchen, wurden 41 Stämme durch *Southern Blot* Hybridisierung mittels einer Digoxigenin markierten Sonde von pSGG1 getestet. In dem aus einer Blutkultur eines IE-Patienten stammenden Isolats 010672 konnte ein homologes Plasmid (pSGG2) identifiziert werden (Abb. 3-37).

Die darauf folgende Restriktionsfragmentanalyse von pSGG2 Plasmid-DNA ergab ein leicht verschiedenes Muster zu pSGG1, was auf leichte Sequenzvariationen hindeutet. Dies lässt sich besonders bei der Spaltung mit *NdeII* erkennen, bei der im Plasmid pSGG2 ein Fragment gänzlich fehlt (Abb. 3-38). In weiteren Experimenten wurde pSGG2 mittels *Primerwalking* sequenziert. Die Sequenzvariationen beschränkten sich auf nicht kodierende Regionen (Daten nicht gezeigt).

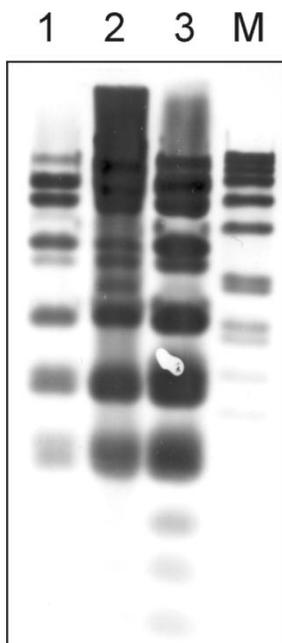


Abb. 3-37: *Southern blot* Analyse von *BamHI* gespaltener Gesamt-DNA aus zwei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen. Spur 1: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat 010672. Spur 2: *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 (Positivkontrolle). Spur 3: Plasmid-DNA von pSGG1. M: DIG DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-markiert (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

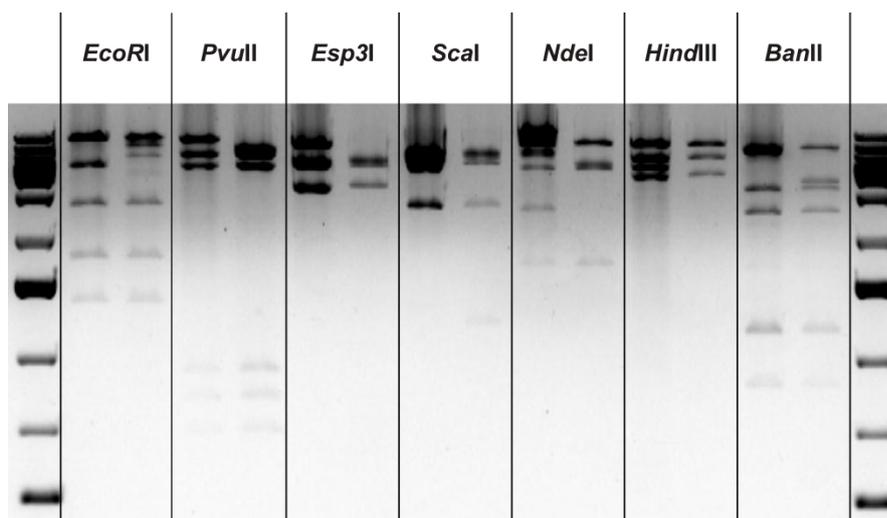


Abb. 3-38: Agarosegelelektrophorese der Restriktionsfragmentanalyse. Die Plasmid-DNA wurden mit den angegebenen Enzymen gespalten. Jeweils linke Spur: pSGG2, jeweils rechte Spur: pSGG1. Marker: *1 kb Ladder plus* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

3.3.4.2 Assoziation des Plasmidvorkommens mit der Suszeptibilität gegenüber Tetracyclin

Um zu überprüfen, ob das Vorkommen der *tet*-Resistenzgen-tragenden pSGG-Plasmide und das Auftreten einer Tetracyclin-Resistenz miteinander korrelieren, wurden 42 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate auf ihre Suszeptibilität gegenüber Tetracyclin getestet. Der epidemiologische *minimum inhibitory concentration* (MIC)-Grenzwert für den Wildtyp beträgt dabei ≤ 1 g/L Tetracyclin (<http://eucast.org>).

Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum bei 42 % der getesteten Stämme mit einer Tetracyclin-Konzentration von 0,5 - 1 mg/L gehemmt wurde. Bei zirka 95 % der Isolate wurde das Wachstum durch Konzentrationen größer 256 mg/L gehemmt. Ausschließlich Isolate, die Träger der pSGG-Plasmide und damit der *tet(O/W/32/O)* kodierten Resistenz sind (Isolat 010672 und BAA-2069), zeigten einen MIC-Wert von 512 mg/L (Abb. 3-39).

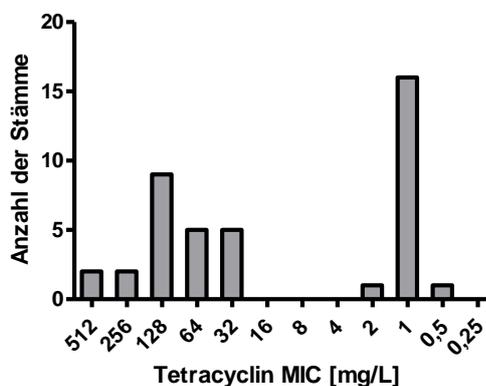


Abb. 3-39: Tetracyclin-Suszeptibilitäts Untersuchung von 42 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen.

3.4 Analyse der Verbreitung von Virulenz-assoziierten Genen mittels Microarray-Experimenten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte insbesondere die Verbreitung und das charakteristische Auftreten verschiedener potentiell Virulenz-assoziiierter Gene analysiert werden. Dazu wurde ein qualitativer Microarray (GalloChip) entwickelt und die An- oder Abwesenheit von 203 Genen (236 *Targets*) in dem *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammkollektiv überprüft.

3.4.1 Etablierung eines DNA-Microarrays

Basierend auf der in 3.3 dargestellten Genomanalyse, sowie zwei weiteren sequenzierten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genomen (UCN34, TX20005), wurden 203 Gene mit potentieller Virulenz- und Resistenz-Assoziation ausgewählt. Für jedes dieser Gene wurde mindestens eine Sonde zur Detektion und ein Primer zur Amplifikation konzipiert. Bei größeren Genen ab zirka 1.500 bp wurden zwei *Targets* pro Gen definiert. Die Sonden wurden mit einem Poly-A Schwanz synthetisiert und auf einem Epoxysilan beschichteten Objektträger (NEXTERION Slide E, Schott, Mainz, Deutschland) mittels eines Druckverfahrens (*Printing*) am Fraunhofer Institut in Stuttgart aufgebracht. Die *Targets* wurden in Gruppen zusammengefasst und in Triplikaten auf den Objektträger übertragen (*Spotting*). Jedes *Cluster-Layout* wurde vierfach auf einen Objektträger aufgebracht, um aus einer Vielzahl von Einzelwerten einen verlässlichen Durchschnittswert errechnen zu können. Die Lokalisierung der *Targets* ist über das gesamte Genom verteilt (Abb. 3-40).

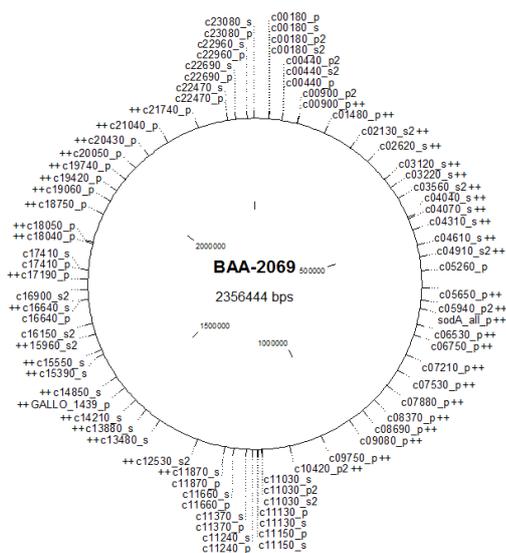
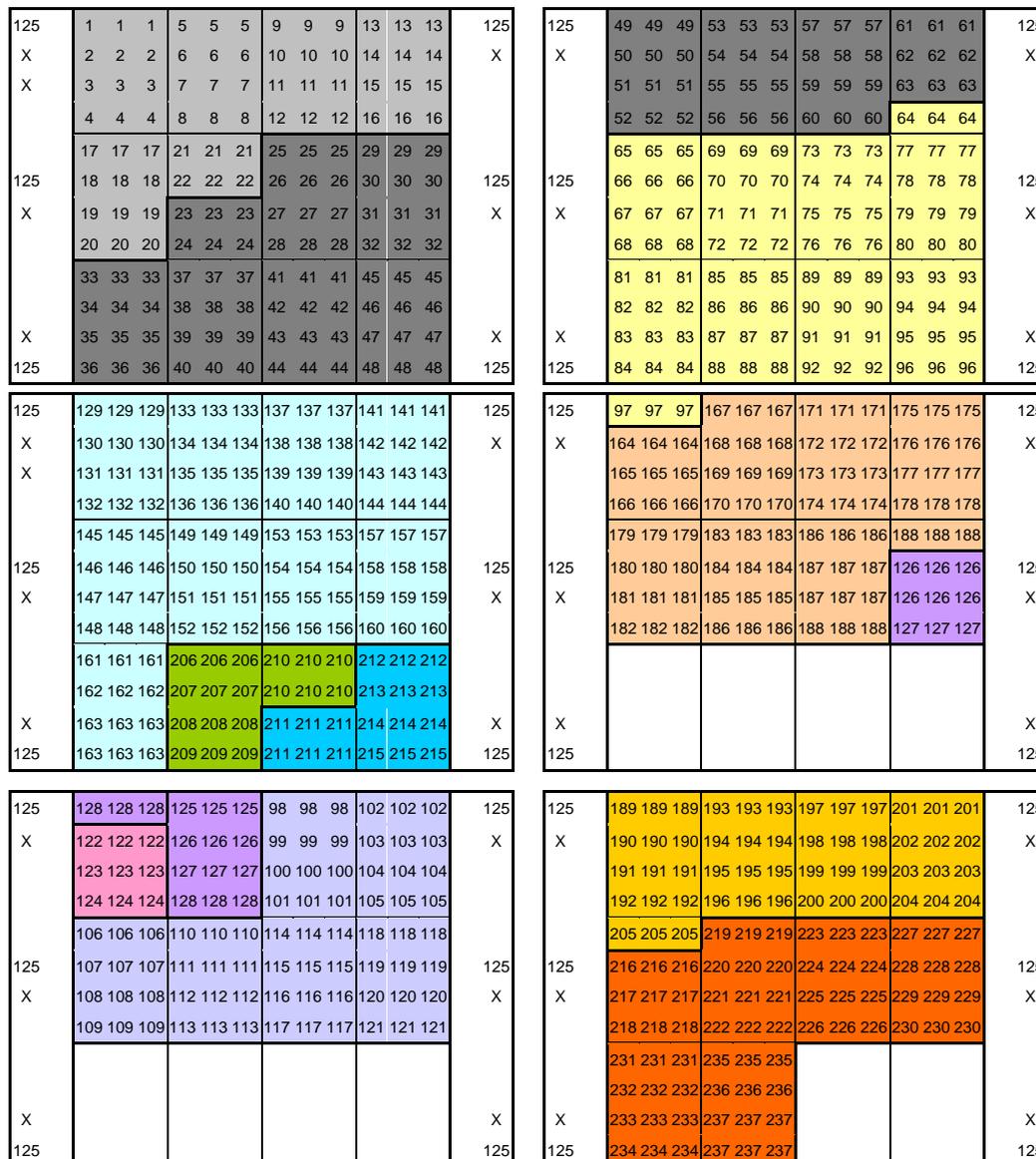


Abb. 3-40: Lokalisierung der im Microarray-Experiment verwendeten *Targets* auf dem *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BAA-2069 Genom.

Das zugrundeliegende Layout eines Clusters sowie die Unterteilung in Sondengruppen ist in Abb. 3-41 dargestellt.



- 1 - 22 = einzigartig in UCN34
- 23 - 63 = Resistenzgene
- 64 - 97 = LPxTG
- 98 - 121 = Proteine mit serinreichen Domänen
- 122 - 124 = einzigartig in TX20005
- 125 - 128 = Identifizierung
- 129 - 163 = Virulenz allgemein
- 164 - 188 = Glykosyltransferasen
- 189 - 205 = Kapselgene
- 206 - 210 = Sortasen
- 211 - 215 = Restriktionsenzyme
- 216 - 237 = sonstige

125 = Hybridisierungskontrolle
 X = Spotting-Kontrolle

Abb. 3-41: Positionierung der Sonden für den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Microarray „GalloChip“.

Alle in diesem Experiment verwendeten *Targets* und deren putative Funktionen sind im Anhang in Tabelle 9-4 dargestellt, die dazugehörigen Sonden und Primer sind in Tabelle 9-5 aufgelistet.

Der Ablauf eines Microarray-Experimentes wurde wie unter 5.6 beschrieben durchgeführt. Zusammengefasst erfolgte, unter Verwendung der hochkonzentrierten *Target*-DNA und der Primer, eine lineare PCR der *Target*-Regionen in sechs Multiplexansätzen. Dabei wurden in die Amplifikate biotinhaltige dUTPs inkorporiert. In einer auf den vorbehandelten Array geklebten Kammer erfolgte über Nacht die Hybridisierung mit den amplifizierten PCR-Produkten. Den anschließenden Waschschrritten folgte eine Inkubation mit einem Streptavidin-Cy3 Konjugat, welches eine starke Bindung mit den biotinylierten DNA-Amplifikaten eingeht. Nach dem Waschen der Microarrays, das der Entfernung des ungebundenen Farbstoffes dient, wurde der Chip in einem Chipreader mittels eines Lasers bei einer Extinktionswellenlänge von 552 nm angeregt und die Emissionswellenlänge bei 565 nm mit einer Auflösung von 5 µM gemessen (Abb. 3-42).

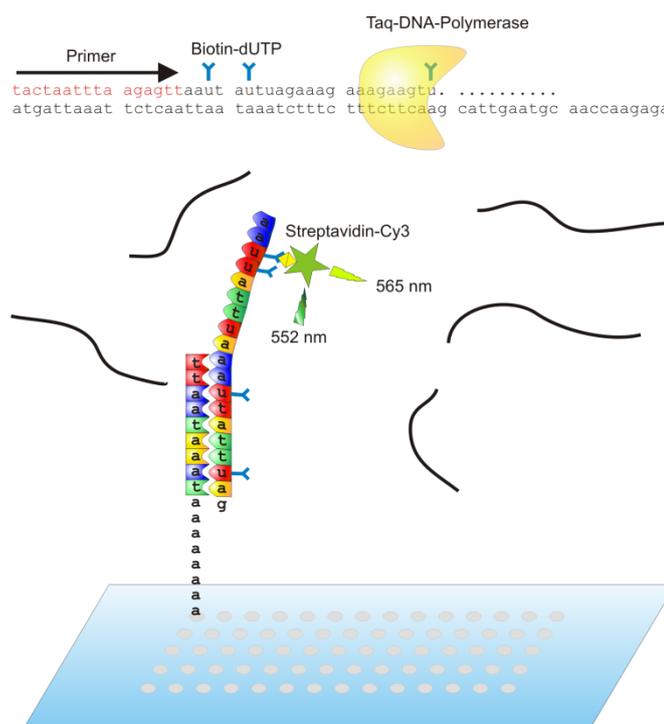


Abb. 3-42: Schematische Darstellung der linearen Amplifikation der *Target*-DNA (oben) und Hybridisierung an immobilisierte Sonden, sowie Detektion (unten).

Im Rahmen der experimentellen Vorarbeiten wurden die optimalen Konzentrationen von *Template*-DNA, Primer und DNA-Polymerase, sowie die Temperaturen der PCR-Reaktionen umfangreich evaluiert. Ein besonderer Fokus lag auf der Zusammensetzung der Primer-Pools der Multiplex-PCR. Es sollten möglichst wenige Pools genutzt werden und gleichzeitig

musste eine Interferenz der Primer untereinander ausgeschlossen werden. Dazu wurde zunächst *in silico* die Homologie der Primer untereinander berechnet. Die Primer mit gleichen Schmelztemperaturen und ohne Homologien zueinander wurden in gemeinsame Pools selektiert. Die auf diese Weise erstellten vorläufigen Pools wurden im Microarray-Experiment getestet und durch Modifikation der Zusammensetzung experimentell optimiert. Die verwendeten Kombinationen der Primerpools sind in Tabelle 3-10 dargestellt.

Tabelle 3-10: Tabellarische Auflistung der in den sechs Primerpools verwendeten Primer.

Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6
c00440_p	c00900_p	c02620_p	c00930_p	c03220_p	c00180_p
c01070_p	c00940_p	c05710_p	c01280_p2	c05940_p	c00940_p2
c01080_p	c01850_p	c08370_p	c04040_p	c08690_p	c01020_p
c01280_p	c06530_p	c08690_p2	c05730_p	c09070_p	c01020_p2
c01390_p	c06800_p	c10290_p2	c05790_p	c09210_p	c01060_p
c01480_p	c08170_p	c10910_p	c09080_p	c09220_p	c01170_p
c01810_p	c09240_p	c11240_p	c09180_p	c10320_p	c01330_p
c02100_p	c09260_p	c14160_p	c09250_p	c10930_p	c01480_p2
c02130_p	c09270_p	c15940_p	c13900_p	c11150_p	c01850_p2
c03120_p	c09280_p	c15950_p2	c14350_p	c13610_p	c02260_p
c03460_p	c09290_p	c16140_p2	c15950_p	c13700_p	c02280_p
c03560_p	c10290_p	c16150_p	c18050_p	c13750_p	c03530_p
c04040_p2	c10400_p2	c16150_p2	c19420_p	c13880_p2	c03550_p
c04070_p	c10420_p	c16640_p	c22170_p	c14170_p	c03560_p2
c04610_p	c10420_p2	c17190_p	c22310_p2	c14850_p2	c04150_p
c04910_p2	c10630_p	c17280_p	c22470_p	c15780_p	c04150_p2
c05070_p	c11030_p	c17280_p2	ermB_p	c15960_p	c04310_p
c05110_p	c11130_p	c17410_p	Gallo_0088_p	c15960_p2	c04910_p
c05650_p	c11370_p	c18750_p	Gallo_0917_p	c16140_p	c05110_p2
c05700_p	c11660_p	c19060_p	Gallo_1306_p	c16900_p	c05260_p
c06750_p	c11870_p	c19160_p	Gallo_1388_p	c19900_p	c05940_p2
c07530_p2	c11870_p2	c19300_p	Gallo_1389_p	c21150_p	c06860_p
c07880_p	c13480_p2	c19910_p	Gallo_1439_p	c21760_p	c07210_p
c07920_p	c13550_p	c19910_p2	Gallo_1649_p	Gallo_1940_p	c07210_p2
c08380_p	c13810_p	c19970_p	Gallo_1675_p	sodA_all_p	c07270_p
c08530_p	c13880_p	c19980_p	Gallo_1687_p		c07530_p
c09170_p	c14040_p	c19980_p2	Gallo_1851_p		c08170_p2
c09200_p	c14140_p	c20050_p	mefA_p		c08650_p
c09300_p	c14260_p2	c20320_p	mefE_p		c08850_p
c12530_p	c15550_p	c20320_p2	p00080_p		c09190_p
Gallo_0261_p	c15930_p	c20330_p	Sbs11_p		c09230_p
Gallo_0452_p	c21360_p	c20560_p	Sbs12_p		c09750_p
Gallo_1856_p	c22120_p	c20560_p2	Sbs16_p		c10380_p
	c22690_p	c20570_p	sodA_pasmac_p		c10400_p
	c22960_p	c20580_p2	vanA_p		c10430_p
	ermA_p	c21360_p2	vanB_p		c10440_p
	ermC_p	c21740_p	vanC1_p		c12250_p
	ermT_p	c21750_p2			c13800_p
	Gallo_1081_p				c14010_p
	Gallo_1420_p				c14210_p
	Gallo_1425_p				c14260_p
	Gallo_1439_p2				c14340_p
	Gallo_1445_p				c14850_p
	Gallo_1664_p				c15390_p
	Gallo_1715_p				c17310_p
	Gallo_1778_p				c18040_p
	p00110_p				c19740_p
					c19780_p
					c19830_p
					c21040_p
					c21280_p
					c22140_p
					c22310_p
					c23080_p
					p00200_p

3.4.2 Ergebnisse des Microarray-Screenings

Es wurden 64 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme mittels des GalloChip auf die An- oder Abwesenheit von 203 Genen getestet. Beispielhaft ist ein Scan des prozessierten und angeregten Microarrays von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm AC 6827 in Abb. 3-43 gezeigt (vergl. auch Abb. 3-41).

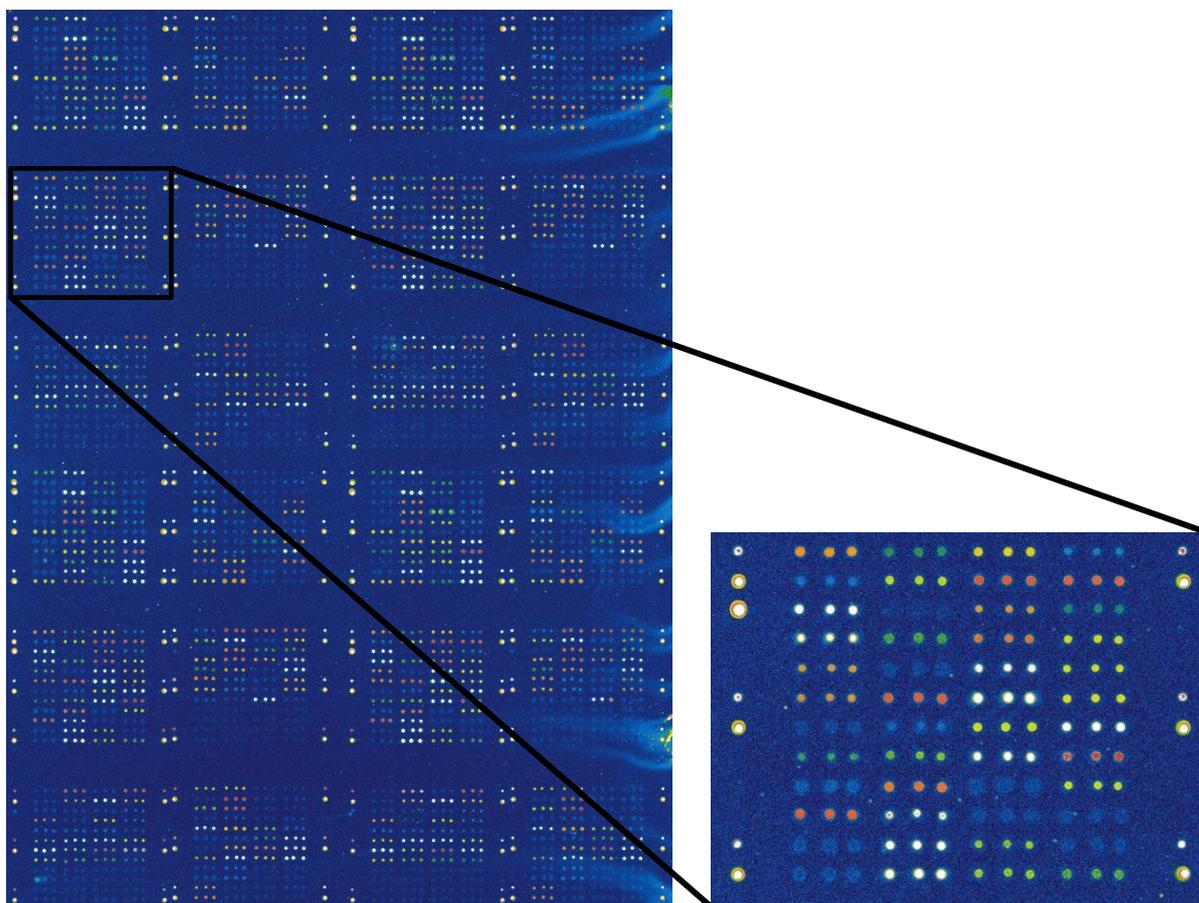


Abb. 3-43: Microarray des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes AC 6827. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Signalintensitäten wurde eine Falschfarbendarstellung verwendet. Die Signalintensität nimmt in folgender Reihenfolge ab: weiß, rot, orange, gelb, grün, blau.

Die Ergebnisse aller Microarray-Experimente sind zusammengefasst in Abb. 3-44 und Abb. 3-45 als Matrix dargestellt. Die Grafik verdeutlicht mittels einer Farblegende die Anwesenheit (grün), die Abwesenheit (schwarz) oder ein inkonsistentes (gelb) Ergebnis der Analyse. Als Positivkontrolle wurden *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 und Stamm UCN34 herangezogen. Es konnte ermittelt werden, dass die *Targets* p00200, c00180, c01810, c05260, c09280, c14010, c15550, c19780, sowie Gallo_0261, Gallo_1445, Gallo_1649 und Gallo_1664 nicht mit den Ergebnissen der Genomanalyse korrelieren, daher wurden sie für folgende Analysen ausgeschlossen. Der Überblick zeigt ein diverses Bild innerhalb des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Kollektives. Die getesteten Antibiotika-Resistenzen waren eher selten nachweisbar.

S. galloyticus subsp. *galloyticus* Stämme

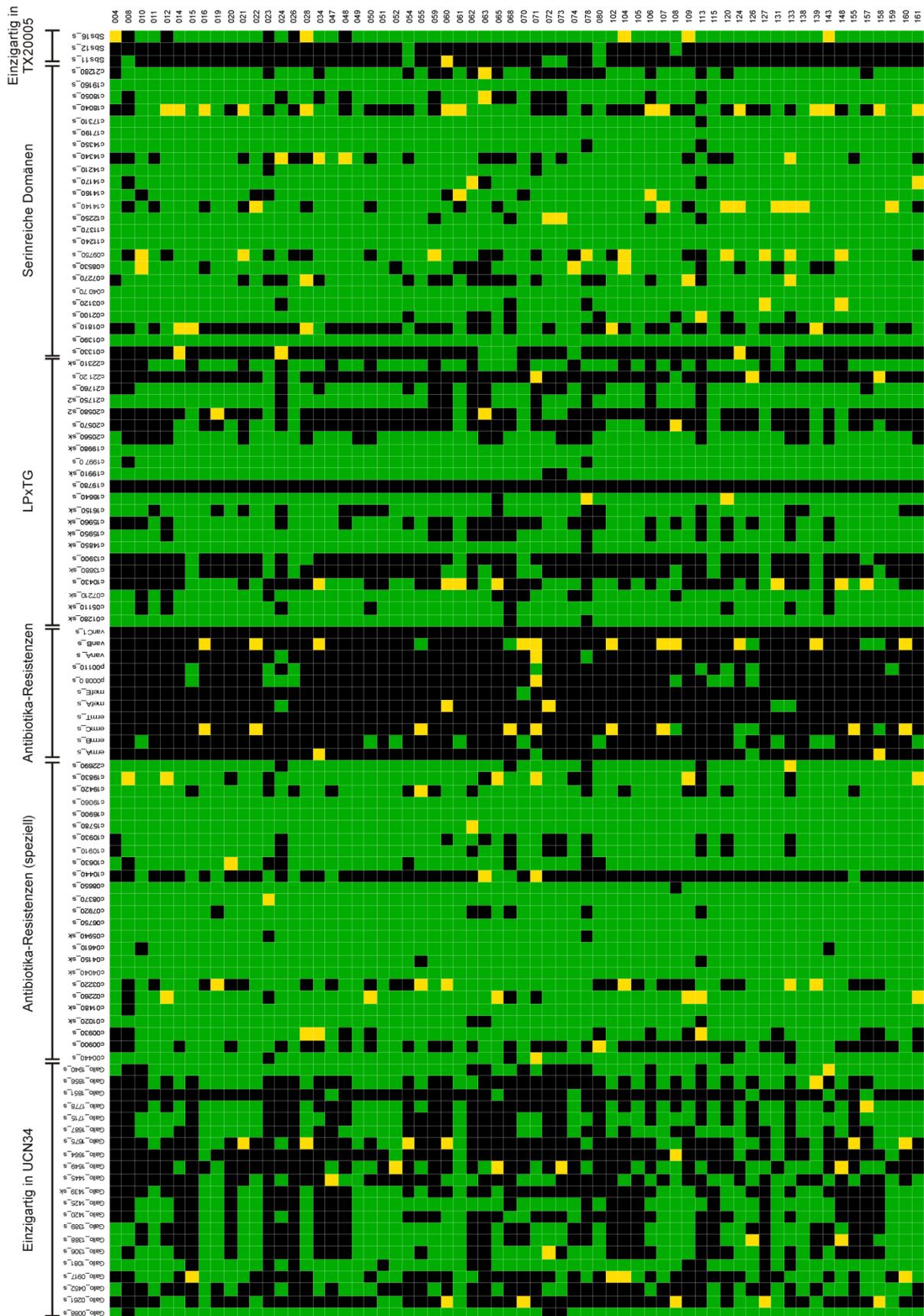


Abb. 3-44: Ergebnisse der Microarray-Experimente Teil I. Positiv nachgewiesene Gene sind grün dargestellt, nicht nachgewiesene Gene schwarz. Gelb definiert uneinheitliche Ergebnisse.

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* Stämme

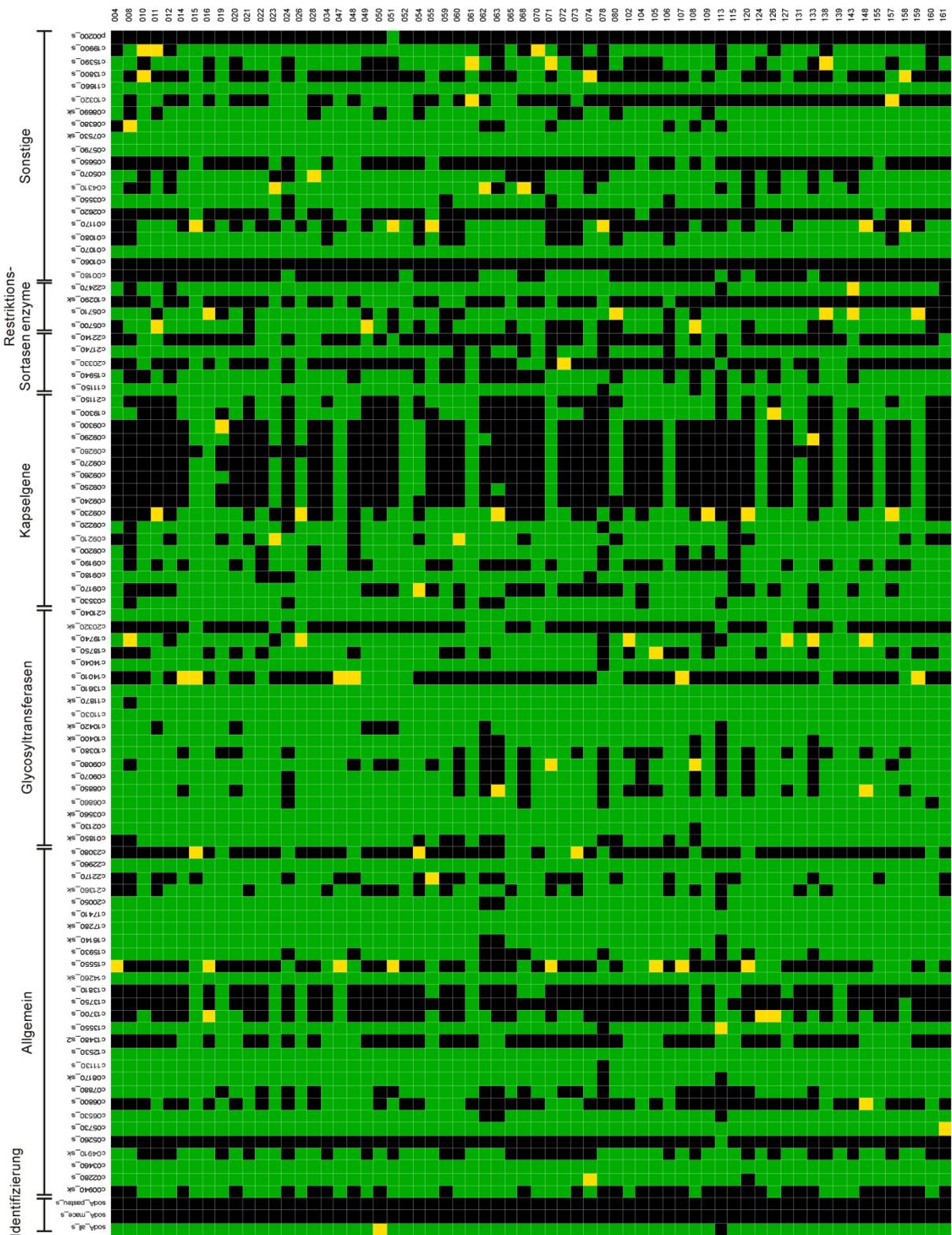


Abb. 3-45: Ergebnisse der Microarray-Experimente Teil II. Positiv nachgewiesene Gene sind grün dargestellt, nicht nachgewiesene Gene schwarz. Gelb definiert uneinheitliche Ergebnisse.

3.4.2.1 Phylogenetische Analyse der Microarray-Daten

Eine weitere Information, die sich aus den Microarray-Daten extrahieren lässt, ist die phylogenetische Verwandtschaft der getesteten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme.

Dazu wurden die Ergebnisse mit einem numerischen Wert gewichtet (1= negativ, 2= fraglich, 3= positiv) und anhand der Ähnlichkeit aller Werte eine phylogenetische Analyse mittels UPGMA Stammbaum durchgeführt sowie ein Dendrogramm berechnet (Abb. 3-46). Es zeigt sich eine deutliche Trennung der Stämme mit Differenzen bis zu 65 %, sowie eine deutliche Clusterbildung.

Es lassen sich sieben Cluster (I – VII) definieren. Cluster IV ist mit 14 Isolaten der Größte, Cluster VII mit fünf Stämmen der Kleinste. Auffällig ist, dass sich Cluster I deutlich von den übrigen abtrennt und dass in Cluster II größtenteils Tier- und Umweltisolate zu finden sind. Zwei der 64 Stämme (LMG 15053 und LMG 14878), beides Tierisolate, unterscheiden sich stark von den übrigen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen und gliedern sich nicht in die vorhandenen Cluster ein. Diese Abgliederung basiert nicht auf spezifischen Targets, sondern ist die Folge eines differenten Musters.

Ein Vergleich des berechneten Stammbaumes mit der MLST-Analyse zeigt eine sehr gute Korrelation zwischen den Methoden (Abb. 3-47). Allen mit der MLST-Analyse definierten Clustern, mit Ausnahme von Stamm HDZ 071, konnte eine entsprechende Gruppe innerhalb der phylogenetischen Microarray-Analyse zugewiesen werden.

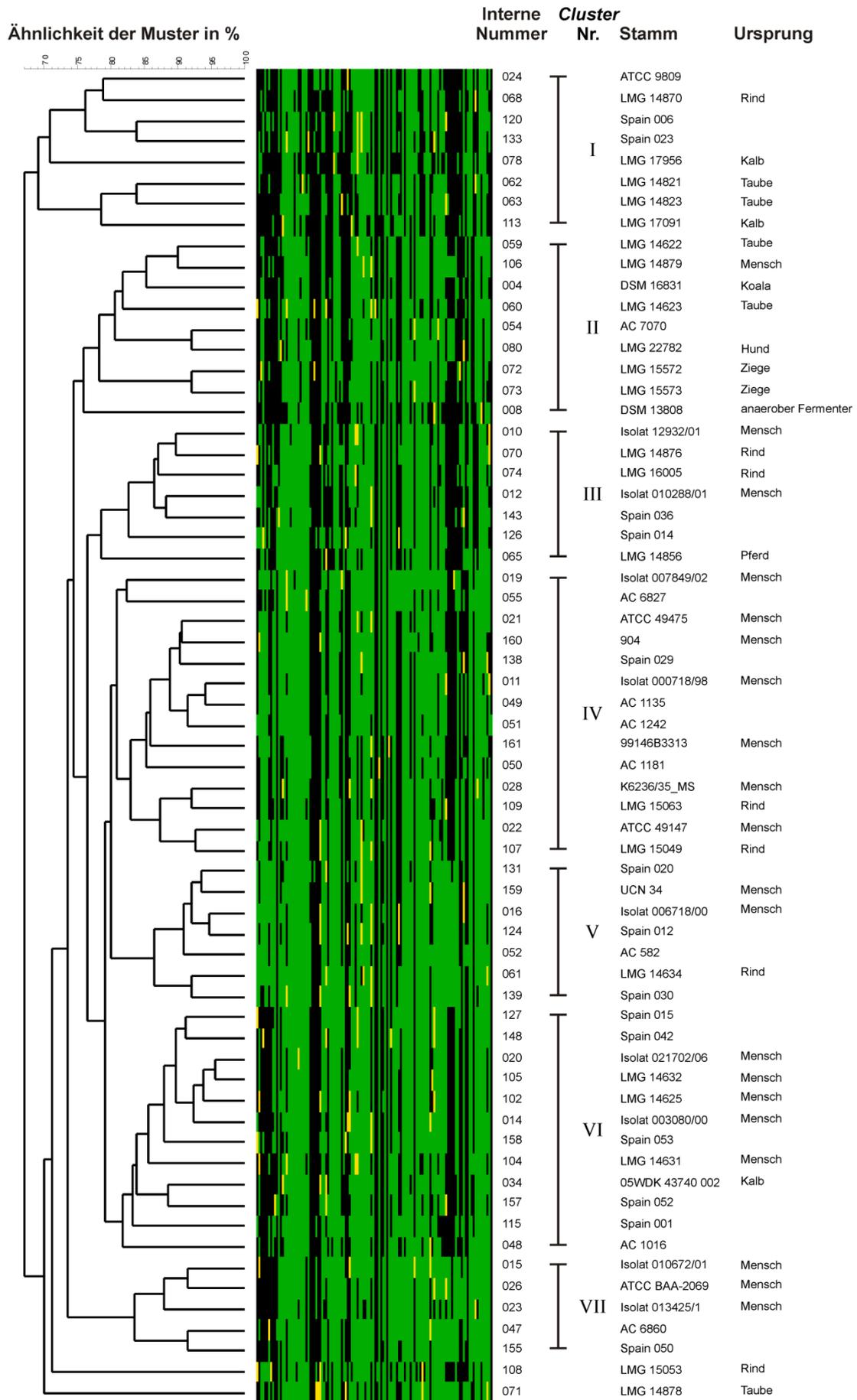


Abb. 3-46: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf den Ergebnissen der Microarray-Experimente.

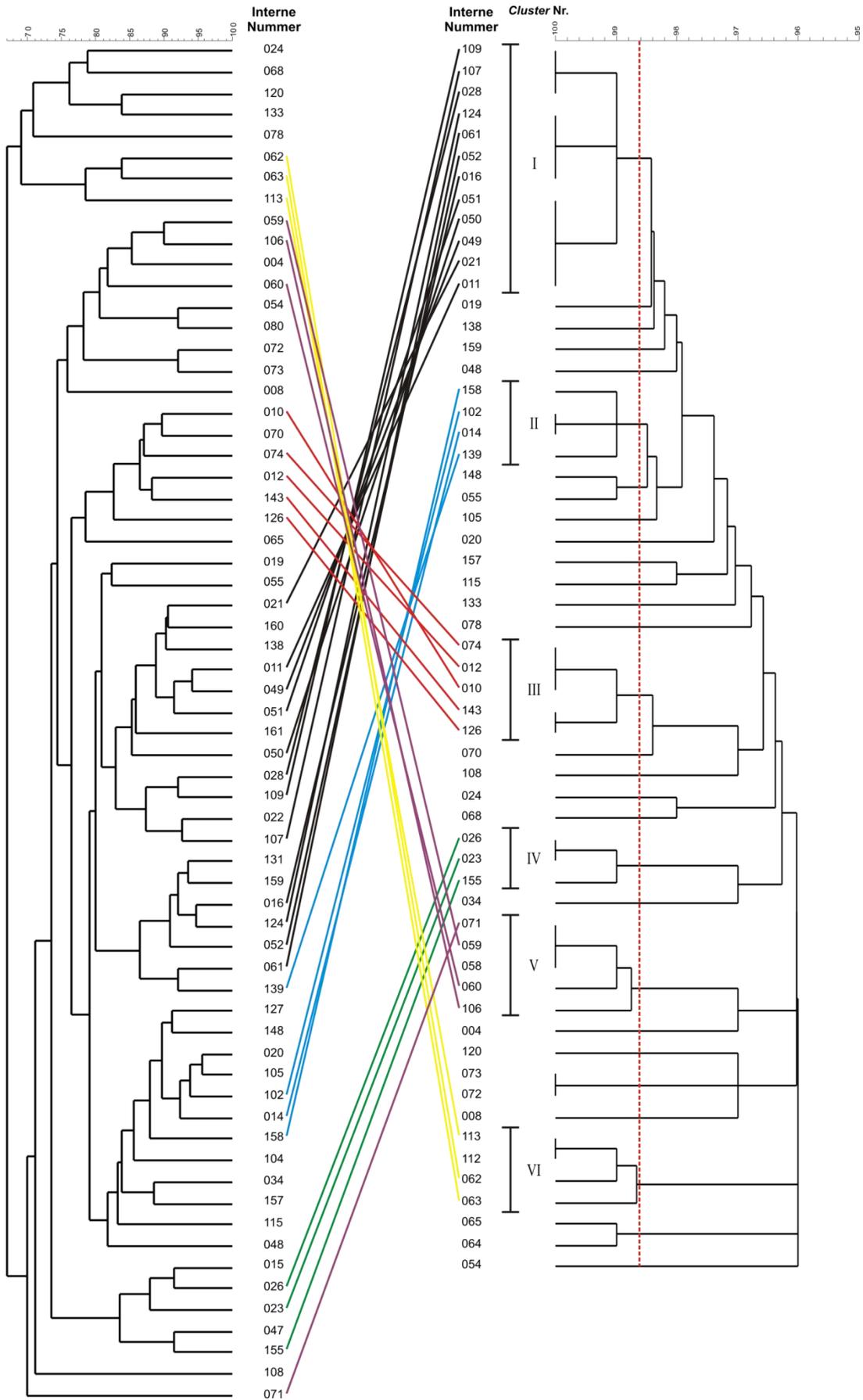


Abb. 3-47: Vergleich der phylogenetischen Analyse auf Basis der Microarray-Experimente (links) und der MLST-Experimente (rechts). Farbige Linien verbinden jeweils denselben Stamm miteinander.

3.4.2.2 Auswertung der Microarray-Daten auf Basis der Kollagenbindung

In aktuellen Publikationen wurde gezeigt, dass das Potential Biofilme an Kollagenoberflächen auszubilden bei *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im Gegensatz zu anderen grampositiven intestinalen Pathogenen höher ist. Daher wurde postuliert, dass die Kollagenbindung einen zentralen Faktor der Pathogenese darstellen könnte (Boleij *et al.* 2011).

Aus diesem Grund wurden die von Vollmer *et al.* durchgeführten und in Teilen publizierten Versuche zur Adhäsion verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme an Kollagen I, II und IV im Rahmen dieser Arbeit ergänzt (Vollmer *et al.* 2010). Im Folgenden sind in Abb. 3-48 die auf den Bakterientiter normierten Adhäsionen an Kollagene dargestellt. Es zeigt sich ein diverses Bild, bei dem besonders die Stämme DSM 16831, DSM 13808 und Isolat 12932 mit niedriger Adhäsion auffallen. Die Stämme AC 1181 und AC 1016 weisen eine besonders hohe Adhäsionsfähigkeit an alle Kollagentypen auf.

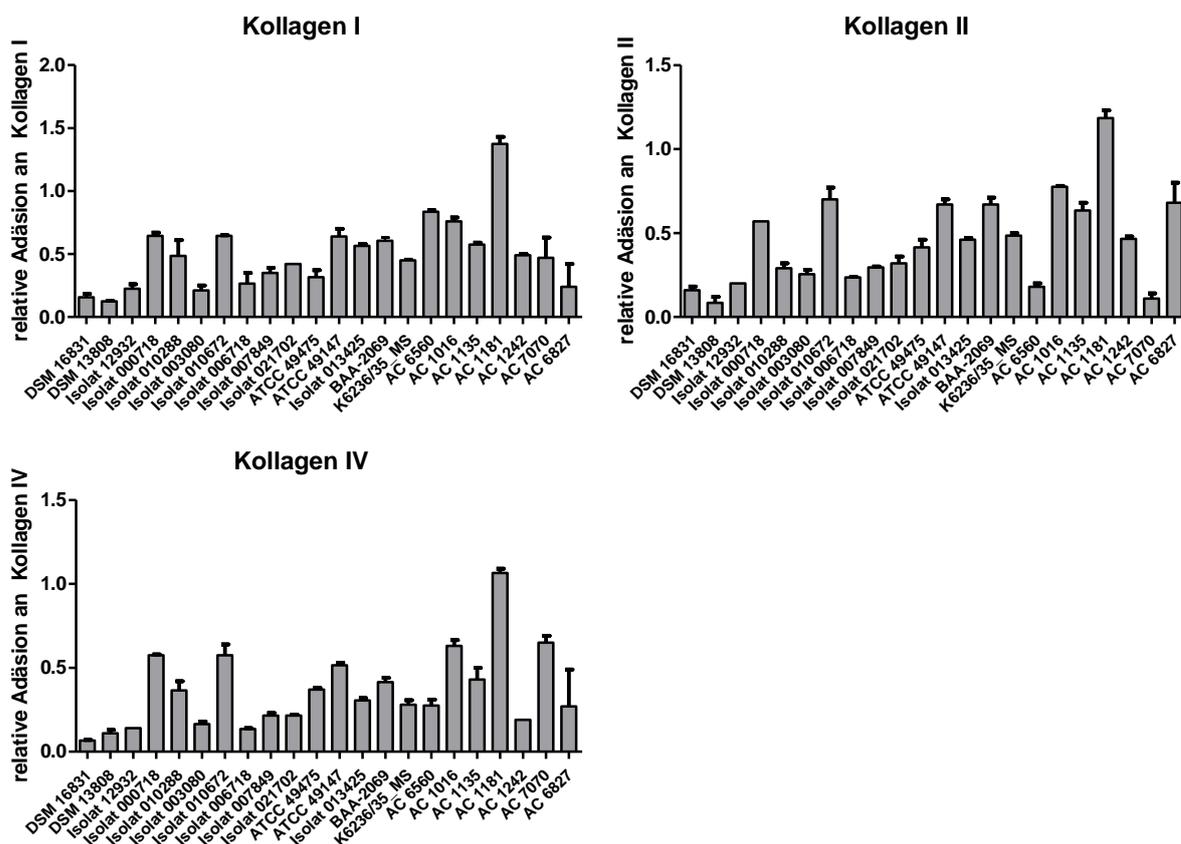


Abb. 3-48: Adhäsion verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme an Kollagen I, II und IV.

Unter Verwendung dieser Resultate wurden zum Vergleich der Microarray-Daten die vier in der Genomanalyse identifizierten, für die Adhäsion an Kollagen verantwortlichen *Targets* herangezogen (c05110, c15960, c19910, c21760). Bei Betrachtung dieser vier *Targets* ergibt

sich ein dreigeteiltes Bild (Abb. 3-49). In zirka 50 % der Isolate sind alle dieser Gene vorhanden, in neun Stämmen fehlt jeweils ein Gen und in 20 Isolaten fehlen zwei Gene. Lediglich in Stamm ATCC 9809 sind drei Gene nicht nachweisbar. Dabei sind keine wirts- oder ursprungsspezifischen Besonderheiten zu beobachten.

Eine Korrelation der Microarray-Experimente zu diesen Daten ist in Abb. 3-49 und Abb. 3-50 dargestellt. Stämme mit herausstechenden Eigenschaften bezüglich ihres Adhäsionsvermögens an Kollagen sind in der Abbildung mit Pfeilen gekennzeichnet. Eine durchschnittliche Adhäsion an alle Kollagene ist als Raute (◆) dargestellt. In allen Isolaten die eine durchschnittliche Adhäsion an Kollagene zeigen, konnten alle vier *Targets* nachgewiesen werden. Tendenziell lässt sich erkennen, dass die Adhäsion eines Stammes an Kollagen generell erniedrigt ist, wenn sowohl Gen c15960, als auch ein weiteres *Target* nicht nachweisbar sind. Das alleinige Fehlen eines Genes scheint hingegen keine signifikante Änderung der Bindungsfähigkeit an Kollagen zu verursachen. Weiterhin zeigt sich, dass das *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolat 004 (DSM 16831), welches in bereits publizierten Experimenten als einziger Stamm *in vitro* keine Invasion an EA.hy926 Zellen zeigte, eine niedrige Adhäsion an Kollagen und ein Fehlen von zwei putativen Kollagen-Adhäsionsgenen aufweist.

Bei der Erweiterung der Analyse auf alle für ein LPxTG-Motiv kodierende *Targets*, ergibt sich ein ergänztes Bild (Abb. 3-50). Es zeigen sich 3 Hauptcluster (A - C) und innerhalb des A-Clusters zwei Subcluster (I + II). Alle Isolate, die eine durchschnittliche Bindung an Kollagen zeigten, sind in Cluster B und C zu finden, alle Cluster die eine sehr niedrige Affinität an alle drei Kollagene zeigten (DSM 13808, DSM 16831 und Isolat 12932) sind in Cluster A zu finden. Im Subcluster II sind ausschließlich niedrig kollagenaffine Stämme angesiedelt. Innerhalb dieser Auswertung finden sich auch die von Danne *et al.* identifizierten, für ein Pilus-Protein kodierenden, Gene c21750 und c21760 wieder (Danne *et al.* 2011). Es zeigt sich, dass, bis auf Stamm LMG 17956, alle Stämme bei denen diese *Targets* nicht nachweisbar sind in Cluster A II gruppiert sind. In zwei der drei Stämme (DSM 13808 und DSM 16831) mit deutlich erniedrigter Kollagenaffinität ist das *Target* c21760 nicht nachweisbar.

Auffällig ist das Isolat LMG 17956, bei dem nur vier von 21 für LPxTG-Motive kodierende Gene nachgewiesen werden konnten. Daten zu diesem Stamm bezüglich der Adhäsion und Invasion an Endothelzellen oder Kollagenbindungseigenschaften sind nicht vorhanden.

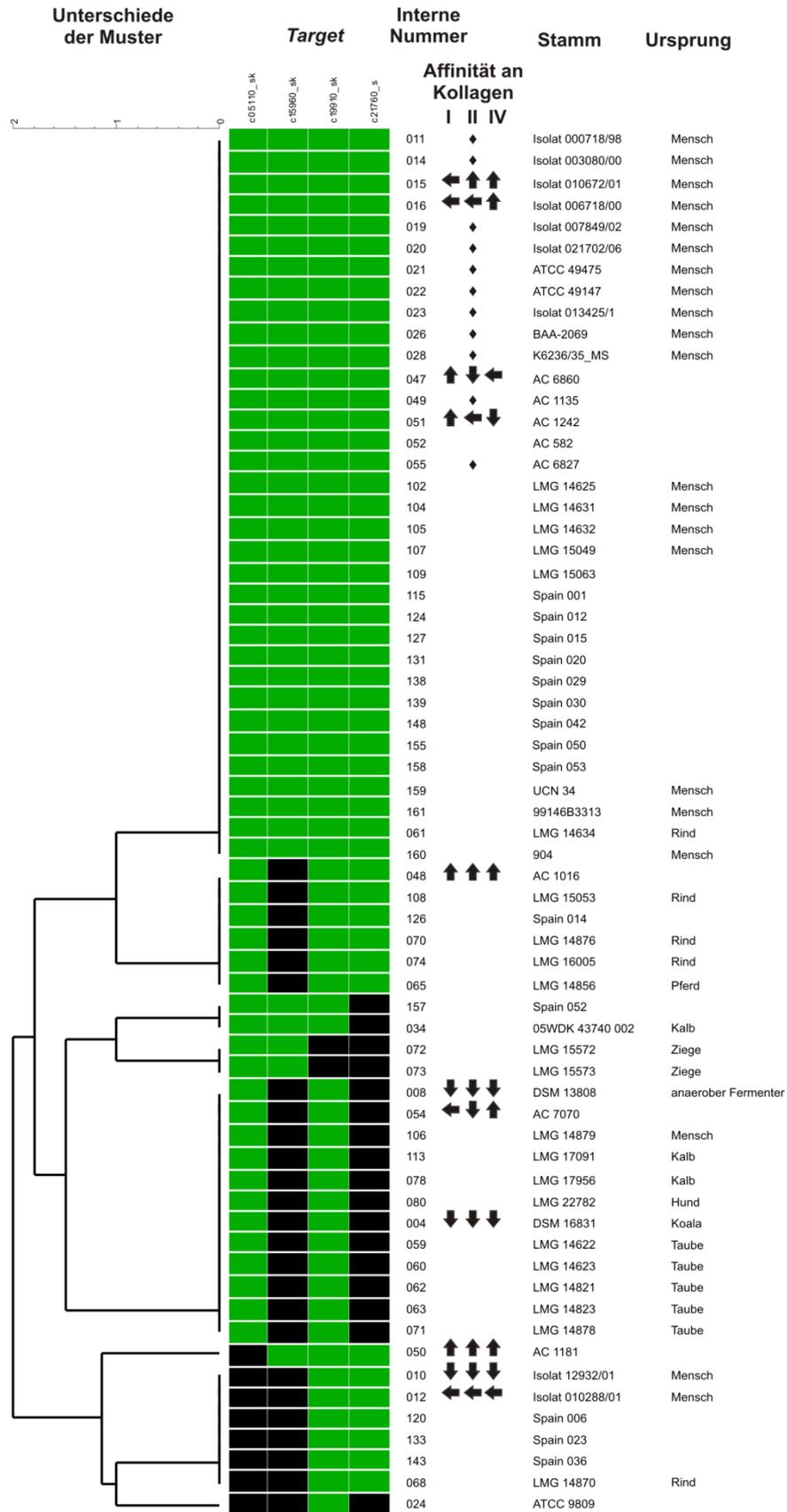


Abb. 3-49: Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der kollagenbindenden Targets der Microarray-Experimente. Betrachtet werden ausschließlich die für die Kollagenbindung verantwortlichen Gene. Pfeile zeigen die Bindungsfähigkeit der getesteten Stämme an Kollagen I, Kollagen II und Kollagen IV. ↑ = hohe Affinität ← = durchschnittliche Affinität ↓ = geringe Affinität. Eine Raute (◆) symbolisiert eine durchschnittliche Bindung an alle Kollagene.

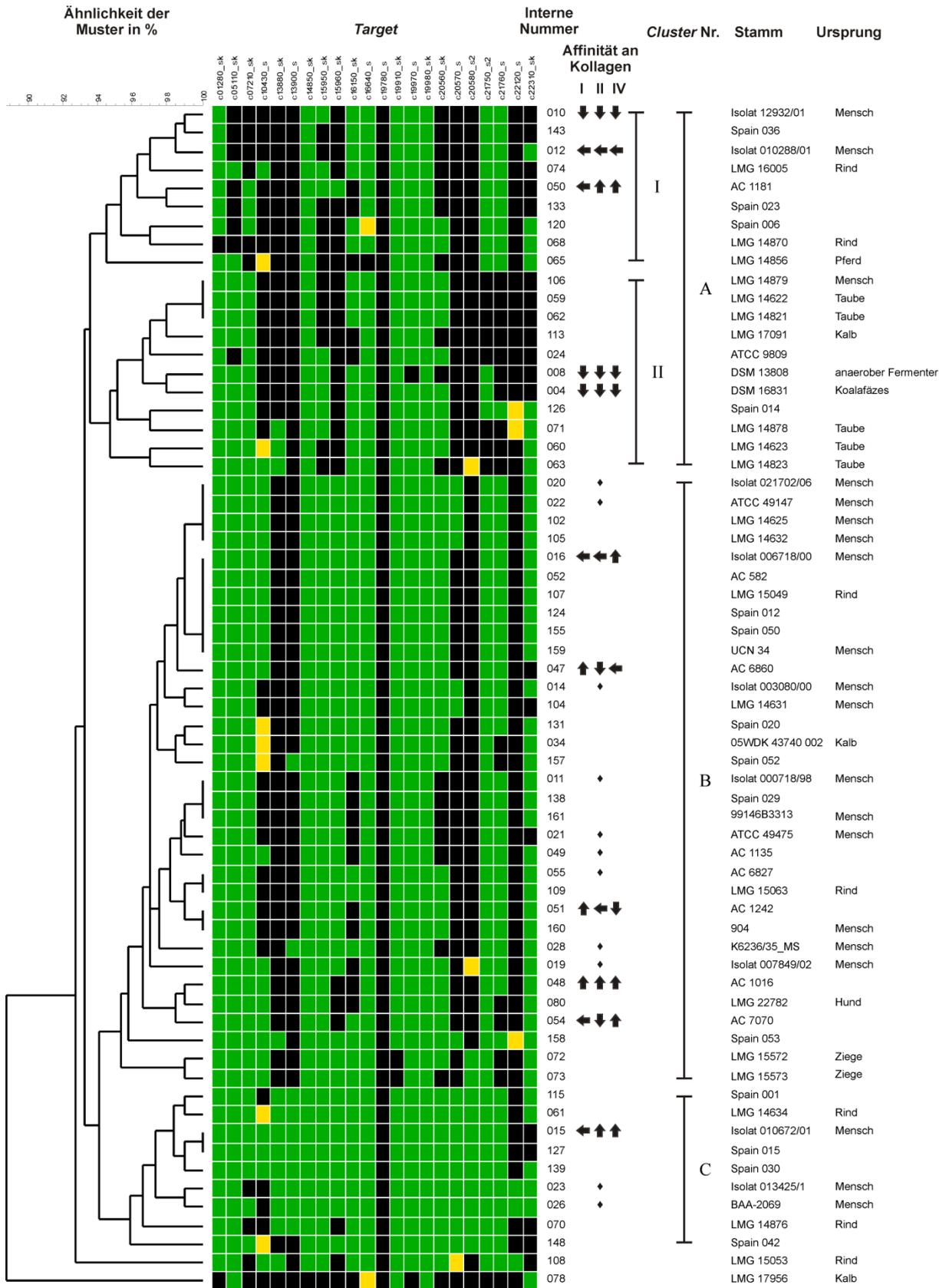


Abb. 3-50: Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der LPxTG Motiv Targets der Microarray-Experimente. Betrachtet werden ausschließlich die für die Kollagenbindung verantwortlichen Gene. Pfeile zeigen die Bindungsfähigkeit der getesteten Stämme an Kollagen I, Kollagen II und Kollagen IV. ↑ = hohe Affinität ↓ = durchschnittliche Affinität ♦ = geringe Affinität. Eine Raute (◆) symbolisiert eine durchschnittliche Bindung an alle Kollagene.

3.4.2.3 Analyse der Verteilung kapsulärer Gene

Die Polysaccharid-Kapsel ist einer der wichtigsten Faktoren in der bakteriellen Pathogenität. Dies konnte schon durch Versuche von Griffith 1928 nachgewiesen werden. Er beschrieb, dass die glatte Variante (S-Zellen) von *S. pneumoniae* bei Mäusen eine Lungenentzündung auslöst, die raue Variante (R-Form) jedoch nicht (Griffith 1928). Später wurde gezeigt, dass die glatte Variante keine Polysaccharid-Kapsel bildet und sich daher nicht vor dem Immunsystem schützen kann.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Analyse der Microarray-Ergebnisse ein Vergleich der Kapselgen-Komposition durchgeführt. Ein besonderer Fokus lag dabei auf dem *cps*-Operon, welches von c09170 bis c09300 [*cpsX* – *cpsM*] reicht (Abb. 3-29). Insgesamt wurden 17 Kapselgene für die Analyse herangezogen. Es zeigte sich ein diverses Bild, in dem bei neun Stämmen alle Kapsel-*Targets* nachweisbar waren. Bei den übrigen Stämmen konnten 1 bis 15 *Targets* nicht detektiert werden (Abb. 3-51).

Bei der Auswertung konnten keine geographischen oder wirtsspezifischen Besonderheiten festgestellt werden. In den zwei Stämmen LMG 16005 und Spain 001 waren beide putativ für die Transkriptionskontrolle verantwortlichen *Targets* nicht nachzuweisen. In 22 weiteren Stämmen war der *cpsX*-Nachweis negativ und in den Stämmen ATCC 49147, Isolat 013425 und ATCC 9809 konnte jeweils *cpsY* nicht detektiert werden.

Auffällig war, dass bei dem einzigen vorhandenen Umweltisolat 008 (DSM 13808), welches aus einer Käseproduktion stammt, sehr wenige *Targets* kapsulärer Gene nachweisbar waren.

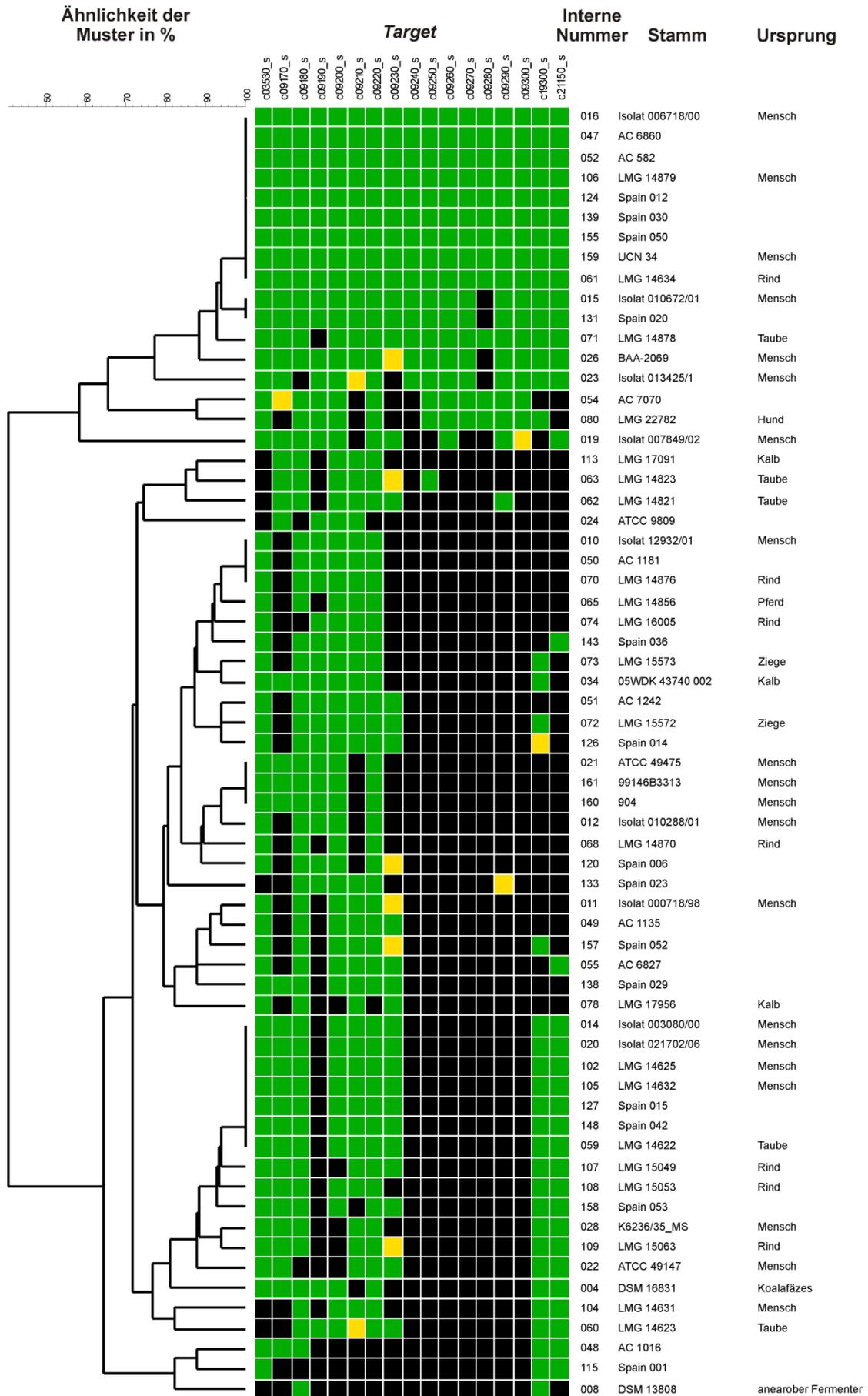


Abb. 3-51: Phylogenetischer Stammbaum auf Basis aller ausschließlich für Kapselgene kodierenden *Targets*.

3.4.2.4 Microarray-Analyse anhand bekannter phänotypischer Eigenschaften

In bereits publizierten Ergebnissen wurde am Herz- und Diabeteszentrum NRW in einem *in vitro* IE-Modellsystem eine Invasions- und Adhäsionsstudie mit der endothelialen Zelllinie EA.hy926 durchgeführt (Vollmer *et al.* 2010). Die angewandte Methode beruht auf der Infektion konfluenter Zellmonolayer mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Der Anteil der adhärenenten und invasiven Bakterien wurde mittels Titerbestimmung quantifiziert. Die endotheliale Zelllinie EA.hy926 zeigt im Gegensatz zu anderen Modellorganismen hoch differenzierte Eigenschaften, die charakteristisch für humanes, vaskuläres Endothelgewebe sind.

Es konnte gezeigt werden, dass der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm 004 (DSM 16831) als einziger Stamm aus 23 Isolaten kein Invasionspotential und ein vergleichsweise geringes Adhäsionspotential zeigt. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde eine Auswertung der Microarray-Experimente durchgeführt, die als Grundlage ausschließlich alle im Stamm 004 nicht nachweisbaren *Targets* beinhaltet. Alle positiv getesteten Gene wurden nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 3-52 dargestellt und auch phylogenetisch ausgewertet.

Ein zu Stamm DSM 16831 identisches Spektrum nachweisbarer Genen zeigte keines der getesteten Isolate, die höchste Homologie besitzt Stamm 008 (DSM 13808). Dieser zeigte ebenfalls eine verhältnismäßig geringe Adhäsion, jedoch eine hohe Invasion an EA.hy926 Zellen. Werden die ersten 18 Stämme als *Cluster* zusammengefasst, so fällt auf, dass 13 der 18 Stämme nachweisbar aus Tieren isoliert wurden, nur zwei Stämme dieses *Clusters* sind nachweislich humanen Ursprungs. Bei Betrachtung weiterer *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme, die eine geringe Invasion an EA.hy926 Zellen zeigten (AC 1181, AC 6827, Isolat 13425), erscheinen diese verteilt über das gesamte Dendrogramm und ohne aussagekräftige Gemeinsamkeiten. Auch weitere spezifische Gruppierungen sind nicht ersichtlich.

Das Isolat 071 (LMG 14878) trennt sich, wie auch in der Gesamtanalyse, phylogenetisch deutlich von den restlichen Stämmen ab. Dies kann nicht auf den Nachweis spezieller *Targets* zurückgeführt werden, sondern ist die Konsequenz aus einem ungewöhnlichen Nachweismuster aller *Targets*.

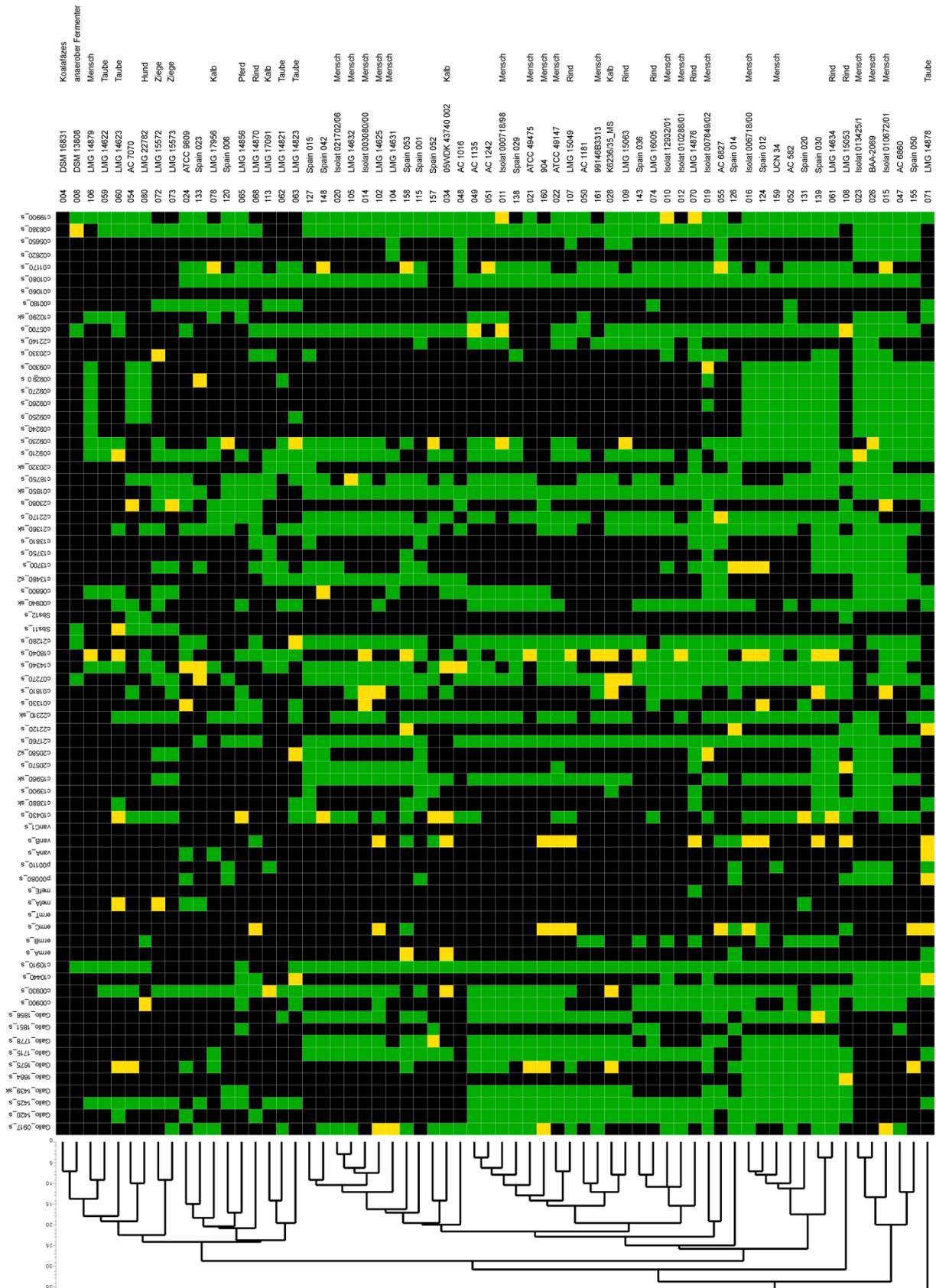


Abb. 3-52: Microarray sortiert nach in Stamm DSM 16831 nicht nachweisbaren *Targets*. Stamm DSM 16831 (004) wurde dabei als *Root*-Stamm an die oberste Position des Dendrogramms gesetzt.

3.4.3 Bestätigung der Microarray-Experimente durch konventionelle PCR

Ziel dieses Teilprojektes war es, die Ergebnisse der Microarray-Experimente zu überprüfen. Durch viele bekannte und unbekannt Faktoren, wie Qualität der *Template*-DNA, Affinität, Interferenz und optimale Schmelztemperatur der Primer oder Zusammensetzung der PCR-Ansätze, kann es zu einem falsch negativen oder falsch positiven Nachweis der *Targets* kommen.

Um zu überprüfen, ob die Daten der Microarray-Experimente valide sind, wurden für 22 *Targets* konventionelle PCR-Systeme etabliert und acht Stämme auf Nachweisbarkeit der Gene überprüft. Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 3-11 dargestellt. Es zeigte sich, dass zwischen den Microarray-Experimenten und den konventionellen PCRs acht inkonsistente Nachweise aufgetreten sind, dies entspricht bei 176 Tests 4,55 %. Vier dieser Inkonsistenzen gehen von dem *Target* c10430 aus. Bei Ausschluss dieses *Targets* aus der Microarray-Analyse läge die Fehlerrate bei 2,38 %.

Tabelle 3-11: Übersicht der mittels konventioneller PCR durchgeführten Kontroll-Experimente. Rote Rahmen zeigen im Vergleich zu den Microarray-Experimenten inkonsistente Ergebnisse.

		<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> Stämme							
Gen	Gen Nr.	010	011	012	015	016	026	048	049
<i>fruA</i>	c01280	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cna</i>	c05110	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>priS</i>	c07210	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>spaP</i>	c10430	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>dex</i>	c13880	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>hae</i>	c13900	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>pulA</i>	c14850	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>fszB</i>	c15950	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>cna</i>	c15960	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>nanA</i>	c16150	+	-	+	+	+	+	-	-
<i>pmrB</i>	c16640	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>blpT</i>	c19780	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cna</i>	c19910	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>trs</i>	c19970	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>FN1</i>	c19980	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>pac</i>	c20560	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>agr</i>	c20570	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>fhg</i>	c20580	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>fszB</i>	c21750	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cna</i>	c21760	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cbp</i>	c22120	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>sspA</i>	c22310	-	+	-	-	-	+	-	-

4 Diskussion

4.1 Identifikation und Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* gehört zu den Erregern der infektiösen Endokarditis (IE) und wird zudem mit dem Auftreten von Kolonkarzinomen assoziiert. Zahlreiche Studien haben den signifikanten Zusammenhang zwischen gastrointestinaler Besiedlung mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und einem erhöhten Kolonkarzinomrisiko bestätigt (McCoy *et al.* 1951; Leport *et al.* 1987; Zarkin *et al.* 1990). Bei nachweislicher Identifikation dieses Bakteriums als kausativer Erreger einer IE wird zu einer prophylaktischen Koloskopie geraten, um eventuell auftretende Neoplasien frühzeitig erkennen und behandeln zu können. Des Weiteren gewährleistet eine schnelle und sichere Identifikation des Keimes eine adäquate antibiotische Therapie und eine frühzeitige Erkennung von malignen Veränderungen.

Die aktuell in der Routinediagnostik verwendeten Methoden zur Typisierung von Reinkulturen ermöglichen jedoch lediglich eine Klassifizierung zwischen *S. bovis* Biotyp I und II und sind daher nicht für die Identifikation von *S. gallolyticus* und Subtypen ausgelegt.

In der 2011 von Boleij *et al.* publizierten ausführlichen Meta-Analyse zur klinischen Assoziation zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und kolorektalen Karzinomen (Boleij *et al.* 2011) wird der Schluss gezogen, dass Patienten mit *S. bovis* Biotyp I Infektionen (*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*) im Gegensatz zu *S. bovis* Biotyp II Infektionen ein stark erhöhtes Risiko besitzen kolorektale Karzinome auszubilden (Odds Ratio 7,26). Dabei zeigte sich, dass 25 – 80 % der Patienten mit einer *S. bovis* / *gallolyticus* Bakteriämie und 62 % der Patienten mit einer *S. bovis* / *S. gallolyticus* IE zugleich kolorektale Karzinome aufwiesen (Corredoira *et al.* 2008; Gupta *et al.* 2010). Boleij nahm dies zum Anlass, die in der Diagnose übliche Identifikation als *S. bovis* zu kritisieren. Sinnvoller bei Diagnose einer bakteriellen IE sei die Identifikation von Subspezies, um etwaige kanzerogene Veränderungen frühzeitig erkennen zu können.

Daher sollte im ersten Teil dieser Arbeit die Identifikation einer Reinkultur, wie sie aus Blutkulturen oder Exzisionen gewonnen wird, mittels der relativ jungen Methode der MALDI-TOF-MS Identifizierung etabliert und mit der molekulargenetischen Methode der *sodA* DNA-Sequenzierung verglichen werden. Zusätzlich sollten die erhobenen Daten zur Überprüfung der bestehenden taxonomischen Gegebenheiten dienen. Des Weiteren sollte eine

Methode zur schnellen und nichtinvasiven Detektion einer Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* entwickelt werden.

4.1.1 Molekulargenetische und MALDI-TOF-MS basierte Identifikation von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Die Identifikation von *S. gallolyticus* und dessen Subspezies ist für die Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung und Prävention von kolorektalen Tumoren essentiell (Romero *et al.* 2011). Eine Typisierung mittels molekulargenetischer Methoden ist durch die Sequenzierung verschiedener Gene möglich. Für die Identifikation von Bakterien hat sich im klinischen Alltag die Methode der 16S rDNA Sequenzanalyse etabliert. Diese Methode bietet ein extrem breites Spektrum detektierbarer Organismen. Zudem sind die zum Abgleich der Sequenzdaten existierenden Datenbanken sehr umfangreich. Im speziellen Fall des *S. bovis* / *equinus* Komplexes, zu dem auch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zählt, ist die Identifizierung von Subspezies mittels 16S rDNA-Sequenzierung jedoch unzuverlässig. In der Publikation von Beck *et al.* konnte gezeigt werden, dass lediglich vier divergente Nukleotide die Spezies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* voneinander trennen (Beck *et al.* 2008). Glazunova *et al.* zeigten, dass die durchschnittliche Divergenz zwischen *S. gallolyticus* Subspezies Nukleotidsequenzen 0,03 – 1,45 % beträgt und damit eine sichere Trennung nicht möglich ist (Glazunova *et al.* 2010). Die von Sasaki *et al.* entwickelte Methode der Gensequenzierung des für die manganabhängige Superoxiddismutase kodierenden Gens (*sodA*) hingegen erzielt eine deutlich höhere Auflösung innerhalb der Subspezies von 2,1 – 5,1 %. Damit ist die *sodA*-Typisierung ausreichend, um eine Diskriminierung auf Subspezies-Level zu ermöglichen (Sasaki *et al.* 2004; Glazunova *et al.* 2009). Auch wenn Glazunova nahelegt, dass die Sequenzierung des *recN* Gens die beste Methode zur Identifizierung innerhalb des gesamten Streptokokken-Komplexes sei, so ist dennoch die *sodA*-Sequenzierung die exakteste Methode zur Diskriminierung für den *S. bovis* / *equinus* Komplex (Glazunova *et al.* 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten, wie in Tabelle 3-1 gezeigt, 18 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme aus verschiedenen Stammsammlungen mittels *sodA* DNA-Sequenzierung und MALDI-TOF-MS Analytik als taxonomisch falsch hinterlegt, identifiziert werden. In vier Fällen fehlte in der angegebenen Bezeichnung lediglich die Subspezies, was nachfolgend durchgeführte Untersuchungen nicht beeinflusst. Die restlichen 14 Stämmen waren bislang taxonomisch falsch zugeordnet. Die Verwendung falsch hinterlegter Stämme

bringt insbesondere bei der Etablierung neuer Identifikations-, Nachweis- und Typisierungsmethoden negative Auswirkungen mit sich. Die Ursachen der falsch hinterlegten Identifizierungen sind zum einen in der sich ständig im Umbruch befindlichen taxonomischen Nomenklatur, sowie der Anwendung unzuverlässiger Typisierungsmethoden zu suchen. Zum anderen können etwaige Nachlässigkeiten der Einbringer, die den Stammsammlungen neue Materialien zur Verfügung stellen, nicht ausgeschlossen werden.

Die guten Diskriminierungsqualitäten der *sodA*-Sequenzierung innerhalb des *S. bovis* / *equinus* Komplexes konnten in dieser Arbeit bestätigt und ergänzt werden. So ist die Differenzierung zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus*, *S. equinus*, *S. bovis*, *S. lutetiensis* und *S. infantarius* subsp. *infantarius* als gut zu bezeichnen. Lediglich die Unterscheidung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* zu *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* ist mit einer Differenz von 0,02 genauso groß wie die Intraspeziesdifferenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Daher ist in diesem Fall eine sichere Diskriminierung nicht immer gewährleistet. Ein Grund dafür könnte die geringe Anzahl an zur Verfügung stehenden *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* Stämmen in dem verwendeten Kollektiv sein. Bei wiederholter Evaluation der Daten mit größerer Stichprobenanzahl könnte die Differenz der Subspezies zueinander steigen.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS Analytik stimmen weitestgehend mit denen der *sodA*-Sequenzierung überein. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die für die Identifikation des *S. bovis* / *S. equinus* essentiellen *Superspectra* für die *SARAMIS Software* erstellt und in die Datenbank für die Routine-Diagnostik eingepflegt. Damit konnte erfolgreich eine, der *sodA*-Sequenzierung gleichwertige, jedoch weit schnellere und kostengünstigere Methode zur Identifikation von Reinkulturen des *S. bovis* / *S. equinus* Komplexes verfügbar gemacht werden. Aus Gründen der Kostenersparnis und der guten bis sehr guten Spezifität der MALDI-TOF-MS Methodik wird postuliert, dass dieses Verfahren zukünftig eine Routinemethode der Mikrobiologie sein wird (Steensels *et al.* 2011).

Eine eindeutige Trennung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* mittels MALDI-TOF-MS ist als einzige Ausnahme nicht mit Sicherheit gegeben. Experimente von Schlegel *et al.* zeigten, dass bei DNA-DNA Hybridisierungs-Experimenten die Homologiewerte zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* größer 70 % sind (Schlegel *et al.* 2003). Dies bestätigt eine gemeinsame Spezies, jedoch unterschiedliche Subspezies, mit charakteristischen Genotypen. Auch Genomanalysen von Lin *et al.* bekräftigen diese These. Er konnte in einer komparativen

Genomanalyse zeigen, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* evolutionär besondere Anpassungen an das Rumen zeigt, *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* hingegen nicht (Lin *et al.* 2011). In diesem Zusammenhang könnte bei wiederholter Evaluation der MALDI-TOF-MS Daten, mit größerer Stichprobenanzahl, die Differenz der Subspezies zueinander steigen.

Daten anderer Studien zeigten zwischen *S. bovis* und *S. equinus* Isolaten eine 16S rDNA basierte Sequenzhomologie von 99,0 % und nur geringfügig unterschiedliche biochemische Eigenschaften. Daher wurde postuliert, dass beide Spezies taxonomisch zusammenzufassen sind (Poyart *et al.* 2002; Schlegel *et al.* 2003). Im Gegensatz hierzu konnte in dieser Arbeit sowohl mittels *sodA*-Sequenzierung als auch mittels MALDI-TOF-MS Analytik eine eindeutige Trennung zwischen allen *S. bovis* und *S. equinus* Isolaten erzielt werden. Folglich sind diese Spezies als taxonomisch klar getrennt einzuordnen.

Eine Differenzierung verschiedener Stämme innerhalb einer Spezies oder Subspezies mittels MALDI-TOF-MS war aufgrund der relativ hohen Intra-Variabilität nicht möglich. Diese Variabilität der Peakmuster kann auf einen Aminosäureaustausch innerhalb der detektierten Proteine hindeuten. Diese Modifikationen können Erklärungen für minimal verschobene und dennoch charakteristische Peakmuster in den Spezies / Subspezies sein. Dennoch sind extreme diverse Isolate innerhalb einer Spezies zu erkennen. Hervorzuheben ist hier der Stamm LMG 14870, der in der MALDI-TOF-MS Analyse das für die *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Gruppe untypischste Muster aufwies. Eine phänotypische Ausprägung dieser Divergenz konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dieses Beispiel zeigt, dass der Intraspezies-Vergleich zu *type strains* eine nicht zu vernachlässigende Quelle zur Erhöhung der Ungenauigkeit darstellen kann. *Type strains* sind nicht immer Stämme, die typisch für eine Spezies sind. Fast immer gibt es innerhalb von Spezies / Subspezies Gruppen mit verschiedenen charakteristischen Stämmen. Diese polymodale Diversität besteht aufgrund unterschiedlicher Quellen und evolutionären Divergenzen der Stämme. Gehört der hinterlegte *type strain* zu einer unterrepräsentierten oder seltenen Variante der Spezies / Subspezies, so kann ein direkter Vergleich zu diesem eine hohe Ungenauigkeit in der Identifikation verursachen.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit die bestehende Taxonomie des *S. bovis* / *S. equinus* Komplexes untermauert und die signifikante Trennung von *S. bovis* und *S. equinus sensu stricto* gezeigt werden. Es wurden 18 in Stammsammlungen falsch hinterlegte Stämme taxonomisch korrigiert. Aufbauend auf die korrekt hinterlegte Taxonomie wurden, auch für

den kommerziellen Einsatz, die Voraussetzungen geschaffen eine sichere Identifizierung des *S. bovis* / *S. equinus* Komplexes mittels MALDI-TOF-MS zu ermöglichen.

4.1.2 Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* im humanen Fäzes

Die Zusammenhänge zwischen einer von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* verursachten IE oder Bakteriämie und kolorektalen Karzinomen sind bereits beschrieben worden (Mc Coy *et al.* 1951; van't Wout *et al.* 2005; Sillanpää *et al.* 2008). Weit weniger erforscht ist der Zusammenhang einer Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes und malignen Veränderungen. Erste Untersuchungen wurden schon 1977 von Klein *et al.* durchgeführt, jedoch ist die Zahl der Publikationen die sich diesem Thema widmen sehr gering (Klein *et al.* 1977; Burns *et al.* 1985; Zarkin *et al.* 1990; Dubrow *et al.* 1991; Al-Jashamy *et al.* 2010). Zusammenfassend wird in allen Publikationen eine Kolonisierungsrate von 2,5 – 15 % in der Bevölkerung postuliert und eine starke Assoziation zwischen kolonisierten Patienten und dem Auftreten kolorektaler Karzinome beschrieben. Alle Studien haben gemeinsam, dass die Methodik auf einer Kulturtechnik oder einem Nachweis von im Blut zirkulierenden Antikörpern basiert. Dies führt bei beiden genannten Methoden zu einer komplizierten und aufwendigen Diagnostik und wurde von den Forschergruppen nur mit einem kleinen Probenkollektiv durchgeführt. Weiterhin ist die Gefahr einer falsch negativen Diagnostik aufgrund der hohen Durchmischung mit anderen Bakterien und der essentiellen Vitalität der nachzuweisenden Spezies im Probenmaterial sehr hoch und damit die Sensitivität sehr gering. Ein Vorteil der kulturbasierten Methode ist die hohe Spezifität, da eine isolierte Reinkultur zweifelsfrei identifiziert werden kann.

Ein Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, ein Kultur-unabhängiges System zum Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Fäzes zu etablieren. Angewendet werden könnte dieses auf einer nicht invasiven Methode basierende System, um potentiell interessante Kollektive humanen oder tierischen Ursprungs auf das Vorhandensein des Pathogens zu untersuchen und damit Hinweise auf Infektionsketten zu erlangen. Diese Informationen ließen wiederum Schlüsse auf epidemiologische Fragestellungen zu, etwa ob *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ein zoonotisches Potential besitzt.

Da Stuhl ein komplexes Medium und zugleich Habitat von verschiedensten Mikroorganismen ist, durfte dieses System nicht auf der Sequenzierung eines weit verbreiteten *Targets* wie der 16S rDNA oder *sodA* basieren. Eine Unterscheidung zwischen den Organismen wäre damit

nicht möglich. Auch ein wie in 3.1.2 beschriebener Nachweis mittels MALDI-TOF-MS ist bei diesem Probenmaterial, aufgrund der fehlenden Reinkultur, nicht möglich.

Durch die Fähigkeit Gallotannine (Tannin) zu Gallussäure umzusetzen, kann *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eindeutig von anderen Streptokokken abgegrenzt werden. Das dieser Eigenschaft zugrundeliegende Gen, das für das Enzym Tannase (*tanA*) kodiert, konnte durch Sequenzanalyse in dieser Arbeit als in seiner Basenabfolge einzigartig für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* identifiziert werden. Daher wurde ein auf *tanA* basierendes *real-time* PCR-System etabliert und getestet.

Die entwickelte *real-time* PCR beruht auf dem System der *TaqMan*-Sonden (auch Hydrolyse-Sonden genannt). Neben dem Vorteil einer hohen Sensitivität bietet das System auch Sicherheit vor Kreuzkontaminationen, da Amplifikation und Detektion in einem Reaktionsgefäß stattfinden. Ein Störfaktor in der molekulargenetischen Analyse von Stuhlproben ist die hohe Kontamination durch nicht bakterielle DNA sowie die, auch nach Reinigung der Nukleinsäuren, PCR-inhibitorische Eigenschaft von Fäzes (Zoetendal *et al.* 2001).

Eine immense Verbesserung der PCR-Sensitivität konnte erzielt werden, indem eine intensive mechanische Lyse durch eine speziell auf Fäzes abgestimmte Matrix und eine anschließende Abreicherung PCR-inhibierender Substanzen durch Aktivkohle durchgeführt wurde. Die mit diesen Optimierungen erreichte Sensitivität von 9 - 18 KbE pro Probe (150 mg Stuhl) ist subjektiv als sehr gut einzustufen. Um die angegebene Nachweisgrenze zu verifizieren bedarf es weiterer Studien unter Einbeziehung mehrfach hergestellter Inokulationsproben mit definierter Bakterienkonzentration.

Mit der etablierten Methode des *realtime*-PCR *tanA* Nachweises wurden 59 Stuhlproben, welche im Rahmen der Routinediagnostik pathogener Bakterien verwendet wurden, auf die An- oder Abwesenheit von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* getestet. Es konnten zwölf positive Nachweise geführt werden, was einer Kolonisierungsrate von 20,37 % entspricht.

Nobe *et al.* konnten bereits 1978 zeigen, dass 5 – 16 % der gesunden Normalbevölkerung Träger von *S. bovis* sind (Noble 1978). In neueren kulturbasierten Studien von Al-Jashamy *et al.* wurde eine Kolonisierungsrate von 7,29 % in einem gesunden Kollektiv gezeigt. Bei Patienten mit pathogenen Veränderungen im Gastrointestinaltrakt wies er eine Rate von 48,6 % nach (Al-Jashamy *et al.* 2010).

Der im Rahmen dieser Arbeit ermittelte vergleichsweise hohe Anteil von 20,37 % kann darauf zurückgeführt werden, dass die Wahrscheinlichkeit eines falsch negativen Ergebnisses bei kultur- oder antikörperbasierten Nachweisen relativ groß ist. Zum anderen ist das in den hier durchgeführten Arbeiten verwendete Patientenkollektiv nicht äquivalent zu einem Normalkollektiv. Patienten die im Herz- und Diabeteszentrum NRW behandelt werden sind im Durchschnitt signifikant älter als das Normalkollektiv und haben oftmals anamnestisch eine umfangreiche Krankengeschichte. Beide Faktoren könnten eine Kolonisierung mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* begünstigen. In einer weiterführenden Studie könnte *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* positiv getesteten Patienten eine Koloskopie angeraten werden. Die Ergebnisse könnten wertvolle Informationen hinsichtlich der Kolonisierungsrate in pathologischen- und Normalkollektiven liefern.

Zur Verifikation der hier aufgeführten Ergebnisse wurde in Kooperation mit dem Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie (ITTN) an der Tiermedizinischen Hochschule Hannover ein kulturbasiertes System entwickelt, welches auf Tanninsäure-resistente Bakterien selektiert. Erste Ergebnisse zeigen, dass aus mehreren mittels *real-time* PCR positiv getesteten Stuhlproben *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Reinkulturen isoliert werden konnten. Dies bestätigt, dass das in dieser Arbeit entwickelte System in der Lage ist, eine Kolonisierung durch *real-time* PCR-Nachweis zu detektieren.

Zusammenfassend wurde in diesem Teilprojekt erstmalig ein *real-time* PCR basierte Methode zum Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Stuhlproben etabliert und angewendet. Obwohl die Daten dieser Arbeit aufgrund des geringen Stichprobenumfangs und des speziellen Patientenkollektiv als nicht signifikant einzustufen sind, weist die Tendenz einer sehr hohen Kolonisierungsrate des humanen Gastrointestinaltraktes auf die immense Bedeutung einer umfassenden Studie zur Prävalenz von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* hin. Diese Studien sollten in nachfolgenden Arbeiten auf unterschiedliche Patientenkollektive erweitert werden. Interessante Kohorten wären dabei Patienten mit IE, Kolonkarzinomen und entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu einem Normalkollektiv. Darauf aufbauend ließe sich dieses System mit geringem Aufwand an verschiedene Probenmaterialien, wie zum Beispiel Tierkot, Gewebeproben oder Umweltproben (Boden, Stäube, Abwässer) anpassen um epidemiologisch relevante Kollektive mit molekulargenetischen Charakterisierungsmethoden zu typisieren und Infektionsketten zu erkennen.

4.2 Transmission von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Die humanen Infektionen mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nehmen zu, wobei die Transmissionsquellen bislang ungeklärt sind. Es wird postuliert, dass der Erreger über Schmierinfektionen von Mensch zu Mensch übertragen wird oder auch über die Nahrung, wie zum Beispiel Milch oder Käse, aufgenommen werden kann (Tsakalidou *et al.* 1998; Randazzo *et al.* 2006). Eine weitere Möglichkeit könnte der Kontakt mit kolonisierten oder infizierten Tieren sein, bzw. der Kontakt mit der Tierumgebung, wie Stäube, kontaminierte Böden oder Federn. *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde bei Nutztieren wie Rindern, Schafen, Hühnern, Gänsen und Schweinen sowie bei Haustieren wie Tauben, Hunden, Katzen und Pferden nachgewiesen (Devriese *et al.* 1998; Baele *et al.* 2001; Sasaki *et al.* 2004; Barnett *et al.* 2008; Sekizaki *et al.* 2008). Es ist jedoch noch nicht geklärt, inwieweit eine Gefahr durch die Übertragung des Erregers von Tier zu Mensch besteht und ob das Pathogen ein zoonotisches Potential besitzt (Hogg *et al.* 2009). Die Sequenzierung und Genomanalyse eines humanpathologischen Stammes ergab, dass in diesem Stamm Gene vorhanden sind, die charakteristisch für die Adaption im Rinderpannen sind (Rusniok *et al.* 2010). Diese Daten werden durch die Funde der für Cellobiose-spezifischen Komponenten IIB und IIC kodierenden Gene in dem in dieser Arbeit sequenzierten Stamm BAA-2069 bestätigt. Zudem können tierische und menschliche Isolate gleiche Krankheitsbilder wie Sepsis und Endokarditis bei ihren Wirten verursachen (Sekizaki *et al.* 2008). Es ist daher nicht auszuschließen, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* auch als Zoonoseerreger fungieren könnte. Bislang wurden diesbezüglich jedoch erst wenige Publikationen veröffentlicht. Tsakalidou und Vaughan konnten bereits zeigen, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in Milch und Milchprodukten zu finden ist (Tsakalidou *et al.* 1998; Randazzo *et al.* 2006). Ein eindeutiger Beweis für das zoonotische Potential von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde bisher jedoch nicht erbracht (Hogg *et al.* 2009). Besonders im Hinblick auf den stark steigenden Einsatz von Antibiotika in Tiermast und Tierhaltung und der daraus resultierenden Gefahr von multiresistenten Keimen für den Menschen, sollte dieser These jedoch weiter nachgegangen werden.

4.2.1 Molekulardiagnostische Charakterisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

Eine Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, eine Einordnung verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate aufgrund epidemiologischer Charakteristika im Hinblick auf den

geographischen und wirtsspezifischen Ursprung zu analysieren und weiter eine Methode zur Identifikation von Infektionsketten zu etablieren.

Es wurden zwei PCR-basierte Methoden, die rep- und RAPD-PCR angewandt. Beide Analysen beruhen darauf, dass anhand der Größe und Konzentration von methodisch spezifischen PCR-Amplifikaten, charakteristische Bandenmuster, sogenannte „genetische Fingerabdrücke“, zur Differenzierung herangezogen werden. Die dritte angewandte Methode ist das MLST (*multi locus sequence typing*). Hierbei werden definierte Fragmente von bis zu sieben Haushaltsgenen sequenziert und jeder Sequenzvariation eine Allelnummer zugeordnet. Die Komposition aller Allelnummern eines Stammes ergibt den *sequence type* (ST).

Historisch haftet der rep-, RAPD- und ERIC-PCR ein Problem bei der Interpretation der Bandenmuster an, da bis vor wenigen Jahren eine herkömmliche Agarosegelelektrophorese angewandt wurde. Erst mit der Einführung der automatisierten Chip- oder Kapillargelelektrophorese ist eine Standardisierung dieser Analysen möglich. Für die rep-PCR wurde in dieser Arbeit das kommerziell erhältliche *DiversiLab* System (BioMérieux, Nürtingen, Deutschland) verwendet und die dort angewandte Chipgelelektrophorese auf die *in house* RAPD- und ERIC-PCR übertragen. Neben der elektrophoretischen Produktauftrennung ist die Konzentration und Reinheit der *Template*-DNA eine wichtige Variable dieser Analysen, da diese die PCR-Effizienz und damit das Amplifikatmuster beeinflussen. Die MLST-Typisierung hingegen hat wenige störende Variablen, ist jedoch aufwendig, da viele nicht automatisierbare Schritte durchgeführt werden müssen und da die Etablierung eines MLST-Schemas erfolgen muss.

Eine Übersicht über die Charakteristik der verwendeten Methoden und weiterer Vergleichsmethoden ist in Tabelle 4-1 dargestellt. Die Reproduzierbarkeit von sequenzbasierten Methoden ist den auf einer Amplifikatmuster-Detektion beruhenden Analysen deutlich überlegen. Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)-Analytik wird nach wie vor als „Gold-Standard“ bezeichnet und besitzt eines der höchsten Diskriminierungspotentiale. Das Diskriminierungspotential der MLST-Methodik ist jedoch bei Auswahl geeigneter Haushaltsgene gleichwertig und bietet den Vorteil der einfachen Interpretation und guten Portierbarkeit der Ergebnisse (Nemoy *et al.* 2005). Ohne Zweifel ist die Sequenzierung ganzer Genome die beste Methode zur Diskriminierung von diversen Stämmen. Aus Kostengründen ist sie zurzeit jedoch noch nicht für die Charakterisierung großer Kollektive einsetzbar.

Tabelle 4-1: Eigenschaften genotypischer Verfahren (erweitert und modifiziert nach (Wichelhaus *et al.* 2000)).

Methoden	Reproduzierbarkeit	Diskriminierungspotential	Vorteile	Nachteile
rep-PCR	gut	gut	- schnell	- kostenintensive kommerzielle Lösung
RAPD-PCR	mäßig bis gut	gut bis exzellent	- schnell - preiswert	- viele Variablen beeinflussen die Reproduzierbarkeit
MLST	sehr gut	exzellent	- einfache Interpretation - vorhandene Datenbanken	- aufwendige Etablierung - kostenintensive Apparatur
PFGE	gut	exzellent	- einfache Interpretation	- aufwendige Durchführung - kostenintensive Apparatur
Genomsequenzierung	sehr gut	exzellent	- einfache Interpretation	- aufwendige Durchführung - sehr kostenintensiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 69 verschiedene *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate mittels rep-PCR und 65 Stämme mit RAPD- und ERIC-PCR charakterisiert. Es konnte mit beiden Methoden gezeigt werden, dass die Diversität innerhalb des getesteten *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Kollektivs sehr hoch ist und sich spezifische *Cluster* detektieren lassen. Es gibt keine eindeutigen Gruppen von humanen oder tierischen Isolaten, lediglich Häufungen von Stämmen eines Ursprungs in bestimmten Gruppen. Auch eine Korrelation der Stämme bezüglich ihrer geographischen Herkunft konnten nicht ermittelt werden.

Dies untermauert die Ergebnisse von Sasaki *et al.*, die in einer RAPD- und ARDRA- (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) Analyse keine speziesspezifischen DNA-Profile nachweisen konnten (Sasaki *et al.* 2004). Devriese *et al.* hingegen zeigten, dass Stämme von humanen Isolaten und Tauben mit Sepsis mittels SDS-Gelelektrophorese deutlich von Isolaten aus dem Rumen von Wiederkäuern abtrennbar sind (Devriese *et al.* 1998). Zwar konnte im Rahmen dieser Arbeit mittels ERIC-PCR ein *Cluster* identifiziert werden in dem gehäuft Taubenisolate vorkommen (siehe Abb. 3-16), jedoch sind in diesem auch Isolate aus Rindern und eines Menschen vorzufinden. Baele *et al.* zeigten, dass die durch die SDS-Gelelektrophorese als virulent und avirulent determinierten Stämme auch mittels

RAPD-Analytik in hoch-, mittel- und wenigvirulente Isolate zu unterteilen sind (Baele *et al.* 2000). Aufbauend auf den Ergebnissen von Baele *et al.* konnten Kimpe *et al.* im Tierversuch diese Klassifizierungen nicht widerspiegeln. Er testete die morphologische Veränderung der Mucosa von infizierten und euthanasierten Tauben und quantifizierte auch die Kolonisation. Es zeigte sich keinerlei Korrelation von Virulenztyp und Kolonisierung oder Adhärenz an Gewebe (Kimpe *et al.* 2003). Diese Publikationen zeigen, dass mit den zur Verfügung stehenden Mitteln höchstwahrscheinlich keine Klassifizierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten hinsichtlich ihrer Pathogenität oder ihrer wirtsspezifischen Herkunft auszumachen ist. So ist anzunehmen, dass eine horizontale Übertragung zwischen verschiedenen Spezies, inklusive des Menschen, möglich ist und damit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ein zoonotisches Potential besitzen könnte.

Die nachfolgend aufgeführte Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten molekulargenetischen Charakterisierung von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bekräftigt diese Theorie. Bei der rep-PCR mit dem *DiversiLab Streptococcus-Kit* zeigten 37 % der Stämme eine Übereinstimmung von mehr als 97 % und wären daher als klonal identisch einzustufen. Dies wird auch durch den hohen Mittelwert von 77 ± 15 % in den Klassen der Übereinstimmung bestätigt. Im Rahmen einer Genotypisierung stellt dies kein zufriedenstellendes Ergebnis dar und zeigt, dass das Diskriminierungspotential dieser Methode nicht hoch genug ist. Bei Verwendung des rep-PCR *DiversiLab Enterococcus-Kits* ist ein ähnlich schlechtes Ergebnis festzustellen. Weiterhin konnte bei Wiederholung der Analytik mit demselben Stamm lediglich eine minimale Ähnlichkeit von 81,3 % festgestellt werden. Demnach würde jeder durchgeführte Vergleich mit mehr als 81,3 % Ähnlichkeit ein potentiell gleiches Isolat darstellen. Der Mittelwert der Abweichung beziffert sich auf 3,3 %. Andere Publikationen beschreiben lediglich einen Standardfehler von 2,3 % (Healy *et al.* 2005). Eine Rückfrage bei dem Hersteller BioMérieux bestätigt die Annahme einer unzureichenden Diskriminierung, jedoch ist dieser Sachverhalt nicht abschließend zu erklären. Möglicherweise lag ein zu hoher Hintergrund durch Unterschiede in der Gel-Präparation oder der Versuchsdurchführung vor. Weiterhin trägt die relativ geringe Anzahl der detektierten PCR-Produkte zu einer schlechteren Diskriminierung bei.

Um ein höheres Diskriminierungspotential zu erreichen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine RAPD- und ERIC-Analytik mittels Chipgelelektrophorese durchgeführt. Zunächst musste eine Optimierung im Hinblick auf die DNA-Qualität und -Menge durchgeführt werden, um eine optimale Detektion mittels Chipgelelektrophorese zu erreichen. Es wurden 65

S. gallolyticus subsp. *gallolyticus* Isolate mit dem ERIC2-Primer und 45 Stämme mit dem OPM6-Primer analysiert. Der Mittelwert der Klassen der Übereinstimmung, welcher als Diskriminierungsparameter zu werten ist, betrug bei dem ERIC2-System 46 ± 33 % und bei der OPM6-Analytik 51 ± 32 %. Diese Werte sind im Vergleich zu der rep-PCR Analytik geringer, und daher ist diese Methode als überlegen einzustufen. Interessant ist das Ergebnis der Clusterbildung mittels des ERIC2-Primers. So wurde gezeigt, dass der 13 Stämme umfassende Cluster VIII, bis auf einen unbekanntem Stamm, ausschließlich Stämme tierischer Herkunft enthält. Analog zu den Publikationen von Sasaki *et al.* und Baele *et al.* kann dies als ein Hinweis auf die Möglichkeit einer genotypisierbaren phänotypischen Stammeigenschaft gesehen werden (Baele *et al.* 2000; Sasaki *et al.* 2004). Dazu im Widerspruch stehen andere Publikationen, die keinerlei Eigenschaften korrelieren konnten (Devriese *et al.* 1998). Die Beobachtungen müssen in nachfolgenden Arbeiten durch eine Studie mit umfangreicheren Kontrollen und einer Vielzahl an Stämmen unterschiedlicher Wirts- und Isolationsherkunft verifiziert werden.

Die Arbeiten zur Etablierung eines MLST-Schemas sind aufwendig und kostenintensiv, die Diskriminierungsqualität der Methode ist jedoch als sehr hoch einzustufen. Daher sollte diese Methode in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie am Hospital Ramon y Cajal, Madrid, entwickelt werden. Die Aufgabenteilung beinhaltet die MLST-Etablierung von vier Haushaltsgenen am Herz- und Diabeteszentrum NRW und drei durch die spanische Arbeitsgruppe. In dieser Arbeit erfolgte die Etablierung und Analyse der Gene *glgB*, *nifS*, *p20* und *uvrA*. Schon die Anwendung einer MLST-Analytik mit vier Haushaltsgenen demonstriert die gute Diskriminierungsfähigkeit dieser Methode. Der entscheidende Vorteil der MLST-Analytik besteht darin, dass zum einen das etablierte Schema speziell auf die Spezies *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* angepasst ist und die gewonnenen Daten nicht subjektiv interpretiert werden müssen, sondern direkt ausgewertet werden können. Zum anderen ermöglicht diese Methode den Ergebnisexport in Form von Sequenzdaten, so dass diese auch von anderen Forschungseinrichtungen leicht ausgewertet werden können. Die in Abb. 3-22 zusammengefassten Daten der MLST-Analyse zeigen eine deutlich geringere Clusterbildung als die rep-PCR Analysen. Es ist zu erwarten, dass die Einflechtung dreier weiterer Gene in die Analyse, ein noch höheres diskriminatorisches Potential ergibt. Die Ergebnisse zeigen, dass den (*sequence types*) STs 2, 6 und 12 jeweils drei Isolate, dem ST 7 vier und dem ST 3 fünf Isolate zugewiesen werden konnten. Obwohl in der Darstellung des *Minimum-Spanning Trees* (Abb. 4-1) eine Häufung von Isolaten tierischen Ursprungs beobachtet werden kann, zeigen einige STs ein gemischtes Vorkommen von Tier- und Humanisolaten. Erst mit einer

höheren Anzahl getesteter Isolate wird sich eine Tendenz zu bestimmten STs oder ST-Gruppen herausstellen und eventuell ein wirtsspezifischer oder geografischer Bezug zeigen lassen. Dies konnte zum Beispiel bereits für Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Isolate (MRSA) durch die Entwicklung umfangreicher epidemiologischer Datenbanken realisiert werden (Deresinski 2005).

Bei Vergleich von *Cluster*zuordnungen der durch die verschiedenen Methoden erstellten Stammbäume miteinander und Definition der MLST-Analytik als zuverlässigste Analysemethode, zeigt sich die beste Korrelation mit den ERIC-PCR und rep-PCR Daten. Dieser grobe Vergleich berücksichtigt jedoch nicht die Stammdiversitäten untereinander und schließt auch nicht die nicht in *Cluster* einzuordnenden Stämme ein. Jedoch lässt sich der Schluss ziehen, dass die Differenzierung der Stämme durch verschiedene Methoden ein ähnliches Bild zeigt.

Für phylogenetische Analysen lassen sich auch Daten aus Genomsequenzierungen nutzen. Im Vergleich zu Standard-Techniken der Phylogenieanalyse, wie Sequenzierungsmethoden (16S rDNA, *sodA*), PFGE, MLST oder MALDI-TOF-MS ist die Genomsequenzierung zusammen mit der DNA-DNA Hybridisierung als die genaueste Technik einzuordnen (Glazunova *et al.* 2009; Glazunova *et al.* 2010; Hinse *et al.* 2011). Die eingesetzte Berechnung basiert weder auf einzelnen DNA-Abschnitten, noch auf Muster-Analysen, sie inkludiert alle kodierenden Sequenzen die in allen Spezies gemeinsam sind und berechnet deren Unterschiede. Die Methode ist grob vergleichbar mit einer MLST-Analyse, die alle gemeinsamen Gene betrachtet (Blom *et al.* 2009). Der in Abb. 3-34 gezeigte phylogenetische Stammbaum zeigt dabei eine klare Abgrenzung zwischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* und nah verwandten, sequenzierten Spezies. Eine genauere Betrachtung der Divergenzen innerhalb der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme wurde aufgrund der geringen Stammzahl nicht durchgeführt. Bei weiter exponentiell sinkenden Kosten für NGS-Methoden könnte die Genomsequenzierung bald ein wichtiger Bestandteil von phylogenetischen und epidemiologischen Untersuchungen sein, wie es populäre Fälle von schwerwiegenden Epidemien, wie der enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)-Ausbruch in Deutschland im Jahr 2011, bereits heute zeigen (Mellmann *et al.* 2011).

Zusammenfassend konnte durch die Etablierung einer bioinformatisch gut auswertbaren RAPD-PCR und durch die Entwicklung eines neuen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* spezifischen MLST-Schemas die Grundlage geschaffen werden, um epidemiologische Zusammenhänge zu analysieren und Infektionsketten zu erkennen. Es konnte gezeigt werden,

dass es keinen wirtsspezifischen oder geografisch geprägten „genomischen Fingerabdruck“ gibt. Vielmehr wird die These, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Infektionen eine bakterielle Zoonose darstellen, gestützt. Würden überwiegend tierische oder humane *Cluster* erkennbar sein, so wäre eine horizontale Übertragung zwischen verschiedenen Spezies unwahrscheinlich. Bei systematischer Testung und Typisierung von regionalen Stammkollektiven oder *Screening* von Herden und deren humanen Kontaktpersonen, könnten spezifische *Cluster* mit den in dieser Arbeit vorgestellten Methoden identifiziert werden, die auf ein zoonotisches Potential hindeuten würden.

4.3 Genomsequenzierung und Analyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus*

In Rahmen dieser Arbeit sollte erstmalig die komplette Genomsequenz eines *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes sequenziert und analysiert werden, um weitere Einblicke in die Pathomechanismen der Spezies zu erlangen. Zudem sollten die Daten als Grundlage für weitere Arbeiten genutzt werden.

Dazu wurde in Kooperation mit dem CeBiTec Bielefeld das Isolat 013366 mit der 454 *GLX Titanium* Technik sequenziert, sämtliche Lücken mittels PCR und *Southern Blot*-Hybridisierung geschlossen und das Isolat als Referenzstamm BAA-2069 in der *American Type Culture Collection* hinterlegt. Während der experimentellen Arbeiten wurde von Sillanpää *et al.* eine unvollständige und von Rusniok *et al.* eine vollständige Genomsequenz publiziert (Sillanpää *et al.* 2009; Rusniok *et al.* 2010). Nach Publikation der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente (Hinse *et al.* 2011) folgte durch Lin *et al.* die Veröffentlichung einer weiteren *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genomsequenz (Lin *et al.* 2011). Dies unterstreicht eindrucksvoll, dass die Forschung an *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eine immer größere Bedeutung einnimmt, zeigt aber auch dass Genomsequenzierung durch immer kostengünstigere Verfahren eine leichter zugängliche Informationsquelle darstellt.

Aus diesem Grund fokussierte sich die Auswertung der hier erstellten Arbeit auf die komparative Analyse. Die Heterogenität verschiedener Genome der gleichen Spezies birgt viele Informationen über spezifische Anpassung an den Wirt, antibiotische Resistenzen und variable genetische Elemente, wie Plasmide oder IS-Elemente. Daher sind komparative Analysen essentiell für das Verstehen pathogener Prozesse. Studien dieser Art können

Informationen über potentiell gemeinsame oder exklusive Virulenzfaktoren generieren und damit grundlegende Pathomechanismen aufdecken. Auch Angriffsbereiche für potentielle medikamentöse Behandlungen oder Impfungen können aufgezeigt werden. Weiterhin können neue Zielbereiche für die Diagnostik des Pathogens, wie auch in dieser Arbeit unter 3.1.3 durchgeführt, Derivate einer komparativen Genomanalytik sein (Raskin *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2006).

Die Genomanalyse definiert das „Pan-Genom“ als das Kern-Genom, welches alle Stämme der Spezies tragen, komplementiert durch ein individualisiertes Set an Genen, welches einzigartig oder nur in einer Gruppe von Genomen vorkommt. Mit steigender Zahl an sequenzierten Stämmen steigt auch die Größe des „Pan-Genoms“, die Steigerung ist dabei ein Maß der Diversität innerhalb einer Spezies. Tettelin *et al.* zeigten, dass das Kern-Genom im Fall von *Streptococcus agalactiae* etwa 80 % aller Gene eines jeden Genoms beinhaltet. Datenanalysen lassen vermuten, dass das Reservoir an Genen aller Genome explorativ immens sein muss (Tettelin *et al.* 2005). Dagegen konnte im Fall von *Bacillus anthracis* gezeigt werden, dass die Anzahl der stammspezifischen Gene nach der vierten Genomsequenz nicht mehr anstieg (Keim *et al.* 2000). Der Analyse für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nach ist die durchschnittliche Anzahl stammspezifischer Gene mit 10,7 % pro Genom 3,5 % höher als bei *S. agalactiae*. Dies könnte ein Hinweis auf ein extrem großes *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* „Pan-Genom“ sein und sollte mit steigender Anzahl sequenzierter Stämme weiter analysiert werden.

Im direkten Vergleich zu *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm UCN34 und TX20005 konnten zahlreiche putativ virulenzassoziierte, stammspezifische Gene ermittelt werden. Dazu zählen unter anderem drei für LPxTG-Motive kodierende Gene im Stamm BAA-2069. Dies könnte ein Indiz auf eine sehr heterogene Pathogenität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* sein. Dabei liegt der Großteil der stammspezifischen Information (53 %) von UCN34 auf drei großen genomischen Inseln, bei Stamm BAA-2069 befinden sich nur 39 % der spezifischen Gene auf den drei größten Inseln. Es ist bekannt, dass virulenzassoziierte Informationen tendenziell häufiger auf genomischen Inseln lokalisiert sind, da dies zu einer höheren genetischen Austauschbarkeit beiträgt (Ho Sui *et al.* 2009).

Ein Beispiel für eine putative Virulenzinsel in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm BAA-2069 ist die Region (SGGBAA2069_c20310-c20660), sowie die nahezu identische 30 kb große Sektion (SGGBAA2069_c13640-c13980), welche die genannten Gene erneut kodiert (Vergl. 3.3.2). Dieser Bereich enthält 34 Gene und ist höchstwahrscheinlich durch

Genduplikation entstanden und wurde im Laufe der Evolution nur geringgradig modifiziert. Beide Bereiche kodieren ebenfalls für Mobilisierungsgene (*mob*, SGGBAA2069_c20390 / c13710) sowie zwei replikationsassoziierte Proteine (*repA* SGGBAA2069_c20650 / c13970). Dies deutet darauf hin, dass diese Bereiche sehr wahrscheinlich über HGT akquiriert wurden.

Die im *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* UCN34 wie auch BAA-2069 Genom identifizierten CRISPR Regionen werden auch als mutmaßliches bakterielles Immunsystems bezeichnet (Barrangou *et al.* 2007; Brouns *et al.* 2008). CRISPRs sind mobile genetische Elemente, die als Verteidigung gegen virale oder andere Nukleinsäure-basierte Angriffe dienen. Die vererbaren CRISPR-Elemente unterstützen insbesondere die Abwehr gegen Phagen und können durch Transformationsereignisse zwischen verschiedenen Organismen ausgetauscht werden (Horvath *et al.* 2010). Diese Regionen sind extrem variabel und oftmals selbst bei nah verwandten Stämmen sehr divers. Unter dem Aspekt des Habitats von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* mit einer Vielzahl an umgebenen Spezies und extrachromosomalen genetischen Elementen kann es ein putativer Vorteil sein, sich mit Hilfe dieses Systems selektiv vor Rekombination zu schützen. Erste Forschungen diese Eigenschaft sinnvoll zu nutzen, zielen auf künstlich generierte Immunität in industriell wichtigen Bakterien (Sorek *et al.* 2008), aber auch die Eindämmung der Verbreitung von Resistenzplasmiden ab, z. B. in *Staphylococcus aureus* (Marraffini *et al.* 2008).

Dass der Stamm *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BAA-2069 Träger eines Plamides ist wurde zunächst nur auf Grund von *in silico* Analysen vermutet, konnte jedoch durch Aufreinigung bestätigt werden. Das Plasmid pSGG1 ist das erste in *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* beschriebene Plasmid und Träger einer durch das Gen *tet(O/W/32/O)* vermittelten Tetracyclin-Resistenz. Bei dem ebenfalls Tetracyclin-resistenten Stamm UCN34 basiert die Resistenz hingegen auf dem chromosomal kodierten *Tetracycline Efflux* Protein *tetL* Gen, welches häufig auf Plasmiden kodiert ist (Speer *et al.* 1992). Nakamura *et al.* bewiesen, dass das Mosaik-Resistenzgen *tet(O/W)* und seine Derivate ein höheres Level der Resistenz bedingen, als die originalen Gene. Dies konnte in dieser Arbeit durch Suszeptibilitätsuntersuchungen bestätigt werden. In der Publikation von Beck *et al.* konnte gezeigt werden, dass 69 % der getesteten Isolate Tetracyclin-resistent sind (Beck *et al.* 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Anteil von 42 % resistenter Stämme ermittelt werden. Eine Resistenzgenkomposition wie sie im Plasmid pSGG1 kodiert ist, konnte bislang in keinem Organismus nachgewiesen werden. Dies unterstützt die These, dass die Variabilität des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Pan-Genoms sehr hoch ist und dass sich zahlreiche

„Fitness-beeinflussende-Faktoren“ durch Rekombination, auch innerhalb oder zwischen Plasmiden und dem Chromosom, austauschen und akkumulieren können.

Ein *Southern Blot* Screening von 41 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten, unter Verwendung einer Digoxigenin-markierten Probe von pSGG1, zeigte ein homologes Plasmid in einem weiteren *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stamm. Dieser wurde aus einer Blutkultur eines Patienten mit IE isoliert (Isolat 010672). Die Sequenzanalyse des zweiten Plasmides (pSGG2) zeigte nur marginale Veränderungen der Sequenz ohne Auswirkungen auf kodierende Gene. Die Verbreitung in zwei von 41 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen deutet entweder auf ein erhöhtes Vorkommen dieses Plasmides innerhalb dieser Spezies oder auf einen epidemiologischen Zusammenhang der zugrundeliegenden Infektionen hin.

Eine von Danne *et al.* veröffentlichte Publikation zeigte, dass das, auch in BAA-2069 (c21740-c21760) für einen Pilus kodierende Operon, einen signifikanten Einfluss auf die Kollagenbindung, die Biofilmbildung und die Virulenz im experimentellen Endokarditis-Modell besitzt (Danne *et al.* 2011), (vergl. auch Tabelle 3-8). In einer weiteren Veröffentlichung publizierten Boleij *et al.*, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* einen geringen Grad der Internalisierung von Epithelzellen zeigt, jedoch eine hohe Bindungsaffinität zu Kollagen besitzt. Adhäsionsgene an Kollagen könnten daher eine zentrale Rolle in der Pathobiochemie der Infektion mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* einnehmen. Die in dieser Arbeit identifizierten putativ für die Adhäsion an Kollagen verantwortlichen Gene sollten daher weiter analysiert und mit *knock-out* und Komplementierungsexperimenten auf ihre Relevanz untersucht werden.

Zudem spricht Boleij *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* eine hohe Fähigkeit zu, dem angeborenen Immunsystem auszuweichen (Boleij *et al.* 2011). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-8 und IL-1 β in epithelialen Caco-2 Zellen nach bakterieller Infektion durch *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* nicht signifikant ansteigt. Dies konnte auch durch Arbeiten an endothelialen Zellen am Herz- und Diabeteszentrum bestätigt werden (Weinstock 2010). Weiterhin konnte Boleij zeigen, dass *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ein hohes Potential aufweist in Kokultur mit Makrophagen zu überleben, ohne diese zu zerstören. Zusammenfassend hat *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ein hohes Potential sich durch bisher unbekannte Faktoren vor der Immunantwort des Wirts zu schützen. Faktoren die für diesen Sachverhalt verantwortlich sein könnten wären Bestandteile der Polysaccharid-Kapsel oder spezielle immunmodulierende Gene. Beide konnten im Rahmen dieser Arbeit in divergenten

Mustern für verschiedene *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme identifiziert werden. Eine Charakterisierung des vorhandenen Kollektivs durch Makrophagen-Kokultivierung und weitere Interleukin-Expressionsstudien in definierten Infektionszuständen könnte interessante Korrelationen aufdecken. Später könnte in weiteren Arbeiten das für das putativ immunmodulierende Protein kodierende Gen *blpT* oder das für Kapselproteine kodierende Operon (*cpsA – cpsM* / c09190 – c09300) disbezüglich eingehender untersucht werden.

Unklar, aber höchst interessant bleibt die Rolle der für Hämolysine kodierenden Gene (c05730, c12530, c17410). Diese könnten in der fortschreitenden Pathogenese der IE eine entscheidende Rolle spielen.

In den *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Genomen konnten Genen identifiziert werden, die einen adaptiven Vorteil im Rumen von Wiederkäuern bieten (Rusniok *et al.* 2010). Da diese Stämme humanen Ursprungs sind, ist dies ein indirekter Beleg für eine horizontale Infektion von einem Tier auf den Menschen. Tiere und auch Milchprodukte könnten daher ein Reservoir und potentieller Infektionsherd für *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Infektionen sein.

Die exponentiell sinkenden Kosten für eine Genomsequenzierung auf Basis des NGS (*next generation sequencing*) werden in Zukunft die Sequenzierung eines Humangenoms für 1.000 \$ erlauben, die Kosten für bakterielle Genome dürfte deutlich darunter liegen (Mardis 2006). Daher werden in den nächsten Jahren eine große Zahl neuer Genome, aber auch bioinformatische Hilfsmittel, die Forschung bereichern und auch das Verständnis der Pathogenität von Bakterien erweitern (Deresinski 2005). Ein wichtiges Ziel ist es jedoch die sequenzierten Isolate auch phänotypisch gut zu charakterisieren, um eine aussagekräftige Datenlage zur Interpretation der Sequenzen zu schaffen.

4.4 Analyse der Verbreitung von Virulenz-assoziierten Genen mittels Microarray-Experimenten

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, unter Verwendung der in 3.3 ermittelten kompletten Genomsequenz und weiterer Sequenzen, ein qualitativer Virulenz- und Resistenzgenmicroarray (GalloChip) etabliert und zur Charakterisierung des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Kollektivs eingesetzt werden. Andere Studien konnten bereits darstellen, dass Virulenzgenprofile mit Infektionen assoziiert sind. So konnte Silva *et al.* durch

Typisierung verschiedener Virulenzgenmuster in *S. suis* zeigen, dass ein Großteil der virulenten Isolate zwei spezifischen Genprofilen zuzuordnen ist (Silva *et al.* 2006). Weiterhin entwickelten Weile *et al.* einen Microarray zur Genotypisierung von Resistenzgenen, der innerhalb von 5 h Rückschlüsse auf das Resistenzgenprofil von *Pseudomonas aeruginosa* zulässt (Weile *et al.* 2007). Cassone *et al.* postulieren, dass die Microarray-Analytik auch für die klinische Bakteriologie im Hinblick auf die Resistenztestung, die bakterielle Pathogenität und epidemiologische Fragestellungen ein hohes Potential besitzt. Er prognostiziert zukünftig eine kosteneffiziente, routinemäßige Anwendung in der klinischen Diagnostik oder in Form eines *Bedside-Testes* (Cassone *et al.* 2007).

Daher sollte das vorhandene und phänotypisch gut charakterisierte *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Kollektiv einen Aufschluss geben, welche Gene für die Pathogenität verantwortlich sein könnten. Das gehäufte Vorkommen bestimmter Virulenzgene in wirtsspezifischen Isolaten könnte Aufschluss über spezielle tierische oder humane Pathogenitätsfaktoren liefern. Ähnliche Methoden wurden bereits erfolgreich durch Zou *et al.* für *Salmonella* entwickelt (Zou *et al.* 2011). Er konnte in 27 Stämmen diverse Profile für 69 *Salmonella*-spezifische Virulenzgene nachweisen und sie mit dem Virulenzmaß assoziieren. Microarray-basierte Profile für den Nachweis differenter *Enterococcus* Spezies und deren Typisierung im Hinblick auf 18 Virulenzfaktoren und 174 Resistenzgene konnten zeigen, dass die Methodik ebenso robust ist wie konventionelle PCR-basierte Methoden (Champagne *et al.* 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein Festphasen-Microarray zum Nachweis von 203 Genen entwickelt, der auf der Biotin-Inkorporation mittels linearer PCR-Amplifikation beruht und einen Biotin-Streptavidin-Cy3 Nachweis zur Detektion nutzt. Bisherige Entwicklungen von Microarray-Systemen fokussierten sich auf die lineare PCR, oder auf eine Biotin-Inkorporation während der Amplifikation und einen anschließenden Nachweis mittels Streptavidin-Cy3 Konjugat. Die lineare PCR birgt den Vorteil eine hohe Anzahl an Primern in einem Multiplex-Ansatz zu verwenden. Der Vorteil der Biotin-Inkorporation liegt, im Gegensatz zum direkten Cy3-Einbau, in einer starken Kostensenkung, da Cy3-gekoppelte dNTPs vergleichsweise teuer sind. Nach Stand der Recherche wurden in dieser Arbeit erstmals eine lineare PCR und der Biotin-Streptavidin-Cy3 Nachweis in einem qualitativen Festphasen-Virulenzgen-Microarray kombiniert.

Es konnten von 64 *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen Virulenz- und Resistenzprofile erstellt und diese umfangreich ausgewertet werden. In der phylogenetischen Analyse

der erhaltenen Daten zeigte sich eine sehr gute Korrelation zu den mittels MLST-Analytik gewonnenen Daten (Abb. 3-47). Da die MLST-Methodik als zuverlässig und genau einzustufen ist, sind die mittels „GalloChip“ evaluierten Ergebnisse in ihrer Gesamtheit als valide einzuordnen. Daher ist eine Anwendung des etablierten Systems zur epidemiologischen Fragestellung gleich in zweierlei Hinsicht sinnvoll. Zum einen können Verwandtschaftsverhältnisse und Infektionsketten dargestellt werden, zum anderen besteht die Möglichkeit die gesammelten Daten für eine Typisierung der Virulenz zu nutzen. Garaizar postuliert in seinem Übersichtsartikel, dass bei einer weiteren Steigerung der Effizienz und Zuverlässigkeit dieser Methode eine breite Anwendung in der epidemiologischen Routinetestung vorstellbar sei (Garaizar *et al.* 2006).

Eine stichprobenartige Kontrolle der Ergebnisse, mittels eigens dafür evaluierten konventionellen Primersystemen, zeigte eine Inkonsistenz der Ergebnisse in acht von 176 Fällen (4,55 %). Wird in dieser Analyse ein besonders häufig inkonsistentes *Target* ausgeschlossen, so bleiben vier von 168 in der konventionellen PCR negativen Nachweise (2,38 %) bestehen. Diese dem ersten Anschein nach hohen Werte entsprechen jedoch keiner endgültigen Wertung der Qualität des Arrays. So greifen die konventionelle PCR, sowie die Microarray-Analytik auf verschiedene Primer-(Sonden)-Bindungssequenzen zu und Sequenzvariationen in diesen Bereichen könnten zu inkonsistenten Ergebnissen führen. Auch bleiben nach der Elimination des häufig inkonsistenten *Targets* nur putativ falsch positive Nachweise in der „GalloChip“-Diagnostik. Dies könnte dafür sprechen, dass das Primersystem in der konventionellen PCR nicht ausreichend getestet wurde, zumal in diesem Fall nicht quantifizierte DNA eingesetzt wurde. Auch ein falsch positiver Nachweis in den „GalloChip“-Experimenten durch falsch bindende homologe Amplifikate ist nicht auszuschließen. Daher ist auch kein Vergleich dieser Werte mit anderen etablierten Assays möglich. Für eine möglichst exakte Evaluation der „GalloChip“-Experimente könnten weitere konventionelle PCR-Systeme mit quantifizierter *Template*-DNA etabliert werden oder synthetische Genkonstrukte hergestellt und in entsprechenden Kombinationen getestet werden.

Ein wichtiges Ergebnis ist die Korrelation der Microarray-Analytik mit der phänotypischen Kollagenbindung verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme. Danne *et al.* konnten zeigen, dass die erhöhte Fähigkeit zur Bindung an Kollagene zugleich ein Indikator für die Virulenz im experimentellen Endokarditismodell ist (Danne *et al.* 2011). Weiterhin präsentiert er Daten, die nahelegen, dass ein Pilus-Operon die Kollagenbindung beeinflusst. In

der Vergangenheit wurden am Herz- und Diabeteszentrum NRW bereits Studien zur Kollagenbindung einiger Stämme durchgeführt (Vollmer *et al.* 2010), die in dieser Arbeit ergänzt und mit den „GalloChip“ Daten korreliert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Betrachtung der putativ für kollagenbindende Gene kodierenden *Targets*, sowie bei Betrachtung aller LPxTG Motiv *Targets*, spezifische SubCluster eine niedrigere Affinität zu Kollagen besitzen (Abb. 3-49 und Abb. 3-50). Auch das Fehlen eines der von Danne *et al.* charakterisierten Pilusproteine (c21760) in zwei von drei sehr schwach kollagenadhäsiven Stämmen unterstützt Dannes Ergebnisse. Aufbauend auf diesen vielversprechenden Daten sollten in weiteren Arbeiten umfangreiche Kollagenbindungsstudien mit allen zur Verfügung stehenden Stämmen durchgeführt werden. Aufschluss über die Funktionalität der getesteten Gene könnten in Zukunft auch *knockout*- und Komplementationstudien geben.

Eine weitere Auswertung bezog sich auf in der Vergangenheit gewonnenen Daten bezüglich der Adhäsion und Invasion verschiedener *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme an die Endothelzelllinie EA.hy926. Hier konnten Vollmer, Hinse *et al.* zeigen, dass insbesondere der Stamm DSM 16831 keine Invasion an diese Zelllinie zeigt. Wird davon ausgegangen, dass das Fehlen eines oder mehrerer Virulenzgene für diese Eigenschaft verantwortlich ist, so müsste eine phylogenetische Analyse mit Basis aller negativ (oder inkonsistent) getesteten *Targets* des Stammes DSM 16831 einen Hinweis auf weitere wenig virulente Stämme geben. Das in Abb. 3-52 dargestellte Dendrogramm zeigt, dass sich um den betreffenden Stamm ein kleines SubCluster und ein größeres HauptCluster bildet. Interessant ist, dass der als phylogenetisch am nächsten definierte Stamm DSM 13808 zwar eine geringe Adhäsion, jedoch eine hohe Invasion an EA.hy926 Zellen zeigt. Dennoch zeigen die Daten, dass dieser Stamm zusammen mit DSM 16831 die niedrigste Affinität zu Kollagenen besitzt. Auch der phylogenetisch nah verwandte Stamm AC 7070 weist eine niedrige Affinität zu Kollagen II, jedoch eine leicht erhöhte Affinität zu Kollagen IV auf. Boleij *et al.* wiesen nach, dass insbesondere die Invasion von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* an die Epithelzelllinien Caco-2 und HT-29 im Vergleich zu anderen pathogenen Bakterien als sehr gering einzustufen ist (Boleij *et al.* 2011). In nachfolgenden Arbeiten könnte demnach eine Methode entwickelt werden, die eine klare Diskriminierung zwischen virulenten und avirulenten Isolaten ermöglicht. Optimal wäre die Verwendung eines Tiermodells für eine infektiöse Endokarditis oder eine 3D-basierte Zellkulturmethode, die einen *in vivo* Zustand realistischer nachstellen kann als Monolayer-basierte Modelle. Im Rahmen der Sequenzierung weiterer *S. gallolyticus*

subsp. *gallolyticus* Isolate könnten zusätzliche Virulenzgene identifiziert werden, die zu einer Erweiterung des Microarray-Spektrums führen könnten.

Eine wirtsspezifische oder geografische Korrelation der *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämme mit den GalloChip-Daten konnte nicht gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnten Rato *et al.* in einer Microarray-Analyse von *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* Stämmen einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem Nachweis bestimmter Virulenzgene und deren Wirten aufzeigen. Er konnte beweisen, dass die für Streptokinase, Laminin-bindendes Protein und der C5a Peptidase Vorstufe kodierenden Gene ausschließlich in humanen Isolaten nachweisbar waren (Rato *et al.* 2011). Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist, dass die beiden potentiell als niedrig virulent einzustufenden Stämme DSM 16831 (aus Koalafäzes) und DSM 13808 (aus einem Sheanussbutter Fermenter), die ein sehr ähnliches Virulenzgenmuster zeigen, beide aus Stammsammlungen stammen und als Umweltisolate ohne infektiösen Hintergrund einzustufen sind. Es ist in Betracht zu ziehen, ob eine lange Lagerung und häufige Subkultivierung der Isolate hier eine natürliche Selektion zu einem nichtvirulenten Stamm begünstigen könnte, oder ob Umweltisolate durch evolutionäre Anpassung generell keine Träger von entscheidenden Virulenzgenen sind.

Ein weiterer, sich aus den Microarray-Daten ergebender Aspekt betrifft das Isolat 071 (LMG 14878), welches sich phylogenetisch in seinem Nachweismuster deutlich von den restlichen Stämmen abtrennt (Abb. 3-47). Dies ist jedoch nicht auf spezielle Eigenschaften oder Gruppen von *Targets* zurückzuführen, sondern beruht auf einem untypischen Muster an Nachweisen. Interessant wäre es, diese Isolate mit weiteren phänotypischen Charakterisierungsmethoden zu klassifizieren um eine Korrelation der genetischen Sonderstellung mit anderen Eigenschaften zu überprüfen. Durch die polymodale Divergenz einer Stammsammlung sind Isolate die eine Sonderstellung einnehmen nicht ungewöhnlich, könnten jedoch auf eine andere bisher noch nicht bekannte Subspezies hindeuten.

In nachfolgenden Arbeiten ist die Untersuchung einer erweiterten, gut charakterisierten Stammsammlung mit epidemiologisch relevanter Beprobungen bestimmter Kollektive geplant, um weiteren Aufschluss über mögliche Infektionsketten und die Verteilung von Virulenzgenen zu erhalten. Durch Typisierung der Isolate ließen sich so auch Rückschlüsse auf das zoonotische Potential von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* ziehen. Auch eine Erweiterung der Microarray-Methodik im Hinblick auf eine Transkriptom-Analyse, unter Einbeziehung verschiedener Infektionszustände an eukaryotischen Zellen, würde das Verständnis der Pathogenität von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* erhöhen.

4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführte Genomsequenzierung und Analyse des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes ATCC BAA-2069 zeigte eine Vielzahl unterschiedlicher potentieller Virulenzfaktoren auf. In zukünftigen Arbeiten sollten die bedeutendsten dieser Gene mittels *knock-out*-Experimenten und Komplementationsstudien in einem *in vitro* Modell auf ihren Einfluss hinsichtlich der Pathogenese untersucht werden. Dabei könnten zellkulturbasierte Methoden durch eukaryotische und prokaryotische Expressionsstudien ergänzt werden, um ein möglichst vielschichtige Darstellung einer Infektion zu ermöglichen. Auch die Sequenzierung eines weiteren *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes mit signifikanten Unterschieden in phänotypischen Charakteristika würde durch komparative Analysen Rückschlüsse auf Schlüsselfaktoren in der Pathogenese zulassen. Zu diesem Zweck wurde bereits die Sequenzierung des Isolats DSM 16831, welches in vorangegangenen *in vitro* Studien keine Invasion an Endothelzellen zeigte, in Auftrag gegeben. Weiterhin könnte die Etablierung eines Zellkulturmodells zur Darstellung inflammatorischer Parameter in verschiedenen Infektionsstadien einen Aufschluss darüber geben, inwieweit es, genotypisch verschiedenen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stämmen, möglich ist dem Immunsystem auszuweichen und welche Faktoren dies beeinflussen.

Basierend auf dem in dieser Arbeit entwickelten Virulenzgenmicroarray („GalloChip“), können bei in Zukunft akquirierte Isolate sowohl die putative Virulenz prädiziert, als auch eine phylogenetische Einordnung vorgenommen werden. Eine Weiterentwicklung des GalloChips im Hinblick auf den Nachweis weiterer Virulenzgene als auch die Etablierung einer Transkriptionsanalyse von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in verschiedenen Infektionszuständen wäre wünschenswert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine *real-time* PCR basierte Methode zum Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in humanem Fäzes entwickelt werden. Erste Untersuchungen einer humanen Kohorte deuten auf eine hohe Kolonisierungsrate im menschlichen Gastrointestinaltrakt hin. In weiteren Studien könnten spezifische Kollektive mit relevanten Vorerkrankungen, wie kolorektalen Karzinomen, entzündlichen Darmerkrankungen oder infektiöser Endokarditis, auf eine signifikante Erhöhung der Prävalenz untersucht und mit einem Normalkollektiv verglichen werden. Weiterhin könnte die bestehende Methode auf unterschiedliche Probenmaterialien wie Tierkot, Bodenproben, Stäube und Gewebe angepasst und entsprechende Extraktionsmethoden etabliert werden. Darauf aufbauend könnten durch Beprobungen definierter Kollektive, wie Tierherden, deren

Umwelt und deren Kontaktpersonen weitere *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolate detektiert werden. Eine Methode zum kulturellen Nachweis und zur Isolation der Reinkultur aus positiv getestetem Material wird bereits zusammen mit dem Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie (ITTN) an der Tiermedizinischen Hochschule Hannover entwickelt.

Die derart akquirierten Isolate könnten durch die in dieser Arbeit etablierten, molekulargenetischen Charakterisierungsmethoden im Hinblick auf spezifische Subpopulationen oder Isolate einer Infektionskette analysiert werden. Dadurch ließen sich Rückschlüsse ziehen, inwieweit eine Transmission von Tier auf Mensch und *vice versa* möglich ist, um das bisher unbekannte zoonotische Potential von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* abzuwiegen.

Mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen konnte die Grundlage für eine umfangreiche molekulare Charakterisierung und Virulenzeinschätzung entwickelt werden. In Zukunft können diese Erkenntnisse genutzt werden, um *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Infektion besser zu verstehen und um die Identifizierung potentieller Infektionsquellen zu ermöglichen.

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

5.1.1 Anzucht und Kultivierung von Bakterien

Mit Hilfe einer Impföse wurde entweder eine Kolonie von einer BHI-Stammplatte oder eine Impferle aus einer Kryokultur (bei -80 °C gelagert), je nach Anwendung, in 5 – 250 mL Medium in ein Zentrifugenröhrchen oder einen Schüttelkolben überführt. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm im Inkubator (Inkubator Unimax 1000 mit Schüttler Unimax 1010) ü. N. inkubiert. Alternativ wurde die Anzucht auf TS-Agarplatten (BioMérieux, Nürtingen) oder BHI-Agarplatten durchgeführt, dabei wurde entweder eine Kolonie von einer Stammplatte oder eine Impferle aus einer Kryokultur (bei -80 °C gelagert) in einem Dreiösenausstrich mit einer Impföse ausgestrichen.

5.1.2 Herstellen einer Kryokultur

Die *Cryobank* Röhrchen (Mast Diagnostica, Reinfeld) wurden mit einer frischen ü. N. Kultur des zu archivierenden Bakteriums inokuliert und gut suspendiert. Die Bakteriendichte sollte ungefähr 3-4 McFarland-Einheiten entsprechen. Anschließend wurde mit einer sterilen Pipette so viel Kryomedium wie möglich abgenommen und das Röhrchen fest verschlossen. Das beimpfte Kryoröhrchen wurde bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

5.1.3 Bindung an Kollagenoberflächen

Es wurden 96-Kavitäten Platten, welche mit Kollagen I, II und IV vorbeschichtet waren (Millipore, Schwalbach), mit 100 µL einer ü. N. in BHI stationär gewachsenen Bakterienkultur inokuliert. Die Platten wurden 2 h bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur vorsichtig abgesaugt und jede Kavität zweifach mit PBS gewaschen. Die Platte wurde 20 min bei 60 °C getrocknet. An die Kollagenoberfläche gebundene Bakterien wurden mit 100 µL 0,4 % Kristallviolett-Lösung bei RT für 45 min angefärbt. Die Kavitäten wurden anschließend fünfmal mit PBS gewaschen und trocken gelassen. Das Kristallviolett wurde in Ethanol (99%) gelöst und die Absorption bei 550 nm bestimmt. Alle Werte wurden in Doppelbestimmung ermittelt. Die erhaltenen Werte wurden auf den Inokulationstiter normiert.

5.1.4 Analyse der Tetracyclin Suszeptibilität

Für jeden Stamm wurden in einer 96-Kavitäten Platte 200 µL BHI-Medium (Oxoid, Cambridge, UK) mit der angegebenen Konzentration Tetracyclin versetzt und mit 1 µL einer frischen *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BHI-Medium ü. N. Kultur (37 °C, 200 rpm) angeimpft. Die Kulturen wurden 16 h bei 37 °C ohne schütteln inkubiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ gemessen, wobei Wachstum als ein Wert > 0,2 definiert wurde. Es wurden alle Werte in Dreifachbestimmung ermittelt.

5.2 Molekulargenetische Methoden

5.2.1 Nukleinsäureextraktion aus Reinkulturen

Die Nukleinsäureextraktion der Gesamt-DNA von Bakterien wurde mit dem *QIAamp Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Die Methode beruht auf einer Permeabilisierung der Zellwand durch Lysozym, Lyse der Bakterien durch Detergenzien und chaotrope Salze sowie einer anschließenden Fällung durch Ethanol. Die DNA wird daraufhin an eine Silikasäule gebunden, mit zwei Puffern gewaschen und eluiert. Die gereinigten Nukleinsäuren wurden bei -20 °C gelagert.

Die DNA-Isolierung erfolgte übereinstimmend nach Anweisung des Herstellers. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei RT durchgeführt.

Es wurden 1,5 mL einer ü. N. Bakterienkultur oder von einer Agarplatte steril geerntete Einzelkolonien abzentrifugiert (2 min, 12.000 × g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 180 µL Lysis-Lösung (inkl. 20 mg/mL Lysozym) resuspendiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 20 µL Proteinase K und 200 µL AL-Puffer zugegeben und 30 min bei 56 °C, sowie anschließend 15 min bei 95 °C inkubiert. Dann wurden 200 µL Ethanol (99 %) zugegeben und gevortext, erneut zentrifugiert (1 min, 12.000 × g) und die Probe auf die Säule gegeben. Anschließend wurde zentrifugiert (1 min, 4.000 × g) und der Durchfluss verworfen. Es wurden 500 µL AW1 (Waschpuffer 1) zugeben, zentrifugiert (1 min, 4.000 × g) und der Durchfluss verworfen. Dann wurden 500 µL AW2 (Waschpuffer 2) zugegeben, zentrifugiert (1 min, 12.000 × g) und erneut der Durchfluss verworfen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1 min, 12.000 × g) um Waschpufferreste zu entfernen. Zur Elution wurden 50 µL AE-Puffer (auf 55 °C vortemperiert) oder *Aqua bidest.* direkt auf die Silikasäule gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend

wurde zentrifugiert (1 min, $4.000 \times g$) und die Säule verworfen. Die Gesamt-DNA wurde mittels NanoDrop (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) quantifiziert (5.2.6) und bei -20 °C gelagert. Gegebenenfalls wurde das Eluat in der Vakuumzentrifuge bei 50 °C für 60 min, 1000 rpm, aufkonzentriert.

5.2.2 Nukleinsäureextraktion mit dem *UltraClean Microbial DNA Isolation Kit*

Für die DNA-Extraktion mit dem *UltraClean Microbial DNA Isolation Kit* (Mo Bio, Hamburg) wurden je 2 mL einer Bakterien-Flüssigkultur pelletiert (60 s, $10.000 \times g$), alle Zentrifugationsschritte wurden bei RT durchgeführt. Die weitere Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Zellpellet wurde in 300 μL *MicroBead Solution* durch Vortexen resuspendiert und anschließend in ein *MicroBead* Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 50 μL Lösung MD1 hinzugefügt und die Probe 15 min bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. Der Ansatz wurde pelletiert (30 s, $10.000 \times g$) und der Überstand in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Im nächsten Schritt wurden 100 μL MD2 Lösung hinzugefügt und der Ansatz kurz gevortext, dann bei -20 °C für 5 min inkubiert. Die Probe wurde pelletiert (60 s, $10.000 \times g$) und der Überstand in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 900 μL gut gemischte MD3 Lösung gegeben und gevortext. Im nächsten Schritt wurde der Säulenfilter mit je 700 μL Probenvolumen durch Zentrifugation (30 s, $10.000 \times g$) beladen. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt wurde mit dem restlichen Probenvolumen wiederholt. Der Säulenfilter wurde mit 300 μL MD4 Lösung gewaschen. Es wurde zentrifugiert (30 s, $10.000 \times g$) und der Durchfluss verworfen. Nachfolgend wurde erneut zentrifugiert (60 s, $10.000 \times g$) und der Säulenfilter wurde in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. 30 μL MD5 Lösung wurden auf den Filter gegeben und für 3 min inkubiert. Abschließend erfolgte die Elution der DNA durch Zentrifugation (30 s, $10.000 \times g$). Die Reinheit und Ausbeute an DNA wurde mittels NanoDrop (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) quantifiziert (5.2.6). Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.3 DNA-Extraktion aus humanem Fäzes

Für die DNA-Extraktion mit dem *Spin Stool DNA Kit* (Invitex, Berlin) wurden 150 mg (bei flüssigen Stühlen 200 μL) Stuhlprobe verwendet. Die Extraktion erfolgte, mit geringen Modifikationen, nach den Angaben des Herstellers.

Zu einem *Precellys Glas/Keramik-Kit SK38* Reaktionsgefäß wurden 1,2 mL Lysepuffer P hinzugefügt und die Probe darin gelöst. Die Probe wurde auf dem Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) bei 900 rpm und 95 °C homogenisiert. Anschließend wurde die Probe 3 min auf Eis gekühlt. Das Reaktionsgefäß wurde für 1 min im MagNA Lyzer Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim) bei 7000 Einheiten homogenisiert. Im nächsten Schritt wurde die Probe für 3 min bei 95 °C und 900 rpm im Thermomixer inkubiert. Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei RT durchgeführt. Die Probe wurde pelletiert (60 s, 13.400 × g), Der Überstand wurde in das *InviAdsorb*-Reaktionsgefäß transferiert. Es wurde für 15 s gevortext und anschließend für 1 min inkubiert. Die Probe wurde erneut pelletiert (180 s, 13.400 × g) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde erneut pelletiert (13.400 × g, 180 s). Von dem Überstand wurden 400 µL in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, in welches 25 µL Proteinase K vorgelegt wurden. Es wurde gevortext und bei 70 °C im Thermomixer bei 900 rpm für 10 min inkubiert. Dann wurden 200 µL Binde-Puffer P hinzugefügt. Der durchmischte Ansatz wurde in den *RTA* Säulenfilter überführt und für 1 min inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (180 s, 9.300 × g) und der Durchfluss verworfen. Der *RTA* Säulenfilter wurde darauf folgend mit 500 µL Wasch-Puffer sowie mit 700 µL Wasch-Puffer II durch Zentrifugation gewaschen (60 s, 9.300 × g). Der Durchfluss wurde bei beiden Schritten verworfen. Abschließend wurde erneut zentrifugiert (180 s, 13.400 × g) und der *RTA* Säulenfilter in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. 100 µL des auf 70 °C vorgewärmten Elutions-Puffers D wurden auf den Filter gegeben und für 3 min inkubiert. Zuletzt wurde die DNA durch Zentrifugation (60 s, 9.300 × g) eluiert. Die Reinheit und Ausbeute der DNA wurde mittels NanoDrop (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) quantifiziert (5.2.6). Die eluierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.2.4 Isolierung von Gesamt-DNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-DNA erfolgte nach dem Prinzip der Phenol-Chloroform Extraktion. Diese Methode ist besonders schonend, so dass im Gegensatz zu Methoden die Affinitätssäulen benutzen, die DNA nicht durch Scherkräfte fragmentiert wird. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei RT durchgeführt.

Es wurden 30 mL ü. N. Kultur abzentrifugiert (10 min, 4000 × g) und das Pellet in 500 µL AK I-Puffer (inkl. Lysozym) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C. Dann wurden 250 µL 2%ige SDS-Lösung zugegeben und für 1 min gevortext. Anschließend

wurden 250 μ L Lösungsmittel (Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol = 25 : 24 : 1) zugeben und für 2 min gevortext. Es folgte eine Zentrifugation (30 min, $10.000 \times g$). Die Oberphase wurde überführt und 250 μ L Lösungsmittel (Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol = 25 : 24 : 1) zugegeben und für 2 min gevortext. Der Zentrifugation (20 min, $10.000 \times g$) folgte eine Überführung der Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß. Zum Fällen der DNA wurden 0,1 Vol. 3 M Natrium-Acetat (pH 5,0) und 1 Vol. eiskaltes Isopropanol ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) zugegeben und invertiert. Mit einer Pasteurpipette wurde die gefällte DNA aufgewickelt und in 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde an der Luft getrocknet bis der Alkohol komplett verdampft war und dann in 1x TE-Puffer oder 10 mM Tris-HCl pH 5,2 gelöst. Die Gesamt-DNA wurde photometrisch am NanoDrop (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) quantifiziert (5.2.6) und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

5.2.5 Plasmid-DNA Extraktion mit dem *NucleoBond PC Kit*

Zur Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde das *Nucleo Bond PC-100 Kit* (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Extraktion erfolgte durch silikabasierte Anionen-Austauschersäulen und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt.

Es wurden 100 mL LB-Medium mit einer Kolonie von einer frischen BHI-Stammpolte angeimpft und ü. N. bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 200 rpm inkubiert. Die Kultur wurde pelletiert (15 min, $6.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 4 mL S1 Puffer (inkl. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A) resuspendiert und 4 mL S2 Puffer hinzugegeben. Der Mix wurde 8 x invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Es wurden 4 mL auf $4 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühlter S3 Puffer zugegeben und 8 x invertiert. Die Durchflusssäule AX 100 wurde mit 2,5 mL N2 Puffer äquilibriert und das Lysat durch einen mit N2 Puffer befeuchteten Filter durch einen Trichter in die Durchflusssäule geklärt. Die Säule wurde anschließend mit 10 mL N3 Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 mL N5 Puffer eluiert. Zur Präzipitation der Plasmid-DNA wurde das Eluat mit 3,5 mL Isopropanol (99 %) gemischt und zentrifugiert (30 min, $15.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Der Überstand wurde vorsichtig verworfen. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol durch Zentrifugation (10 min, $15.000 \times g$) gewaschen, der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 200 μ L 10 mM Tris-HCl Puffer aufgenommen, mittels NanoDrop (PeqLab Biotechnologie, Erlangen) quantifiziert (5.2.6) und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

5.2.6 Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Quantifizierung von DNA wurde die Nukleinsäurebestimmung mittels Absorptionsmessung durchgeführt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz können Nukleinsäuremengen sowie Proteinmengen spektrophotometrisch bestimmt werden. Dazu muss die Extinktion der Probe bei 260 und 280 nm gemessen werden, da Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum von 280 nm aufweisen. Über den Quotienten der Absorption bei 260 / 280 nm ist der Verunreinigungsgrad der DNA bestimmbar.

Die Durchführung ist mit modernen Geräten (NanoDrop2000, PeqLab Biotechnologie, Erlangen) nahezu automatisiert. Es wurde 1 µL der zu analysierenden Probe auf den Probenarm aufgetragen und der Arm geschlossen. Die Messung und Analyse erfolgte *Software*-gesteuert.

5.2.7 PCR im Block-Thermocycler

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine einfache Methode um DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. In einer ersten Denaturierungsphase wird die doppelsträngige *Template*-DNA durch Hitzedenaturierung getrennt, so dass in der *Annealing*phase die Primer an die DNA binden können. Durch Erhöhung der Temperatur auf 72 °C in der Elongationsphase wird das Temperaturoptimum der Polymerase erreicht, welche die Primersequenzen unter Vorlage der *Template*-DNA verlängert. Nach der Elongation beginnt der nächste Zyklus mit erneuter Denaturierung. Für PCRs wurde, je nach Anwendung, der Personal Cycler (Eppendorf, Hamburg) oder der Gradient Cycler (Biometra GmbH, Göttingen) verwendet. Im Anschluss einer PCR wurde meist eine Kontrolle der Amplifikation mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das verwendete Protokoll einer PCR ist nachfolgend in Tabelle 5-1 dargestellt.

Tabelle 5-1: Protokoll eines Standard PCR-Ansatzes.

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1x Vol.
H ₂ O <i>bide</i> st.			35,75 µL
HotMaster <i>Taq</i> -Puffer (inkl. 25 mM MgCl ₂)	10x	1x	5,00 µL
<i>Forward</i> Primer	20 µM	100 nM	1,00 µL
<i>Reverse</i> Primer	20 µM	100 nM	1,00 µL
dNTPs	Je 5 mM	200 µM	2,00 µL
HotMaster <i>Taq</i> Polymerase	5 U/µL		0,25 µL
DNA- <i>Template</i>			5,00 µL
Summe			50,00 µL

Das Temperaturprofil einer Block-Thermocycler PCR ist in

Tabelle 5-2 dargestellt, wobei die primerspezifischen *Annealing*temperaturen in Tabelle 6-3 aufgeführt sind.

Tabelle 5-2: Standardtemperaturprofil einer PCR.

1x	30x			1x
Denaturierung	Denaturierung	<i>Annealing</i>	Elongation	Terminale Elongation
95 °C	95 °C	siehe Tabelle 6-3	72 °C	72 °C
180 s	30 s	60 s	60 s	300 s

5.2.8 *Real-time* PCR Analyse

Die *real-time* PCR (Echtzeit-PCR) ist ein PCR-Verfahren, das den Prozess der Amplifikation mit der Echtzeit-Detektion des entstehenden PCR-Produktes durch fluoreszenzmarkierte Sonden oder DNA-bindende Farbstoffe verbindet. Diese Methode ermöglicht unter definierten Bedingungen einen sehr sensitiven Nachweis von Nukleinsäuren in Proben und schützt durch die Kombination aus Amplifikation und Detektion in einem Reaktionsgefäß vor der Gefahr der Kreuzkontamination.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *TaqMan* Sonden-basierte *real-time* PCR verwendet. *TaqMan* Sonden besitzen am 5'-Ende ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende einen Quencher. Bei ungebundenen und ungespaltenen Sonden findet ein FRET-Effekt (*fluorescence resonance energy transfer*) statt, der zum Löschen der Emission des Fluorochroms führt. Während der Amplifikation des Zielbereiches wandert die Polymerase den DNA-Strang entlang und spaltet bei der Amplifikation des Sonden-Zielbereichs die Sonde. Fluoreszenzfarbstoff und Quencher befinden sich nun nicht mehr in räumlicher Nähe und die Emission ist messbar. Dazu wurden der Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Für den *real-time* PCR Nachweis von *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* wurde ausschließlich die in 5.2.3 dargestellte Methode zur DNA-Extraktion verwendet. Der verwendete Reaktionsansatz ist in Tabelle 5-3 dargestellt.

Tabelle 5-3: In der *real-time* PCR verwendeter Reaktionsansatz.

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1x Vol.
H ₂ O	0		15,65 µL
PCR-Puffer (- MgCl ₂)	10x	1x	5,00 µL
MgCl ₂	25 mM	5 mM	12,00 µL
tanA-F	20 µM	200 nM	0,50 µL
tanA-R	20 µM	200 nM	0,50 µL
tanA-S	20 µM	100 nM	0,25 µL
Lambda-R	20 µM	300 nM	0,60 µL
Lambda-TM-F	20 µM	300 nM	0,60 µL
Lambda-S	20 µM	100 nM	0,25 µL
Lambda DNA	8,34E+8 geq/ml	91700 geq/ml	2,00 µL
dNTPs	je 2,5 mM	120 µM	2,40 µL
Platinum <i>Taq</i> Polymerase	5 U/µl		0,25 µL
<i>Template</i> -DNA			10,00 µL
Summe			50,00 µL

Das verwendete Temperaturprofil ist in Tabelle 5-4 dargestellt. Am Ende jedes *Annealing*-Schrittes wurden die Fluoreszenzen der Kanäle FAM und JOE gemessen.

Tabelle 5-4: Temperaturprofil einer *real-time* PCR.

1x	50x		
Aktivierung	Denaturierung	<i>Annealing</i>	Elongation
95 °C	94 °C	55 °C	72 °C
90 s	18 s	25 s	30 s

5.2.9 Aufreinigung von DNA mit dem *QIAquick PCR Purification Kit*

Unter chaotropen Bedingungen binden die PCR-Amplifikate durch Wasserstoffbrücken und Kationen-Brücken an einer Silikamatrix und werden nach Waschvorgängen mit Wasser oder Tris-Puffer eluiert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellervorgaben und ist im Folgenden dargestellt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei RT durchgeführt.

Es wurden pro Volumen PCR-Produkt 5 Volumen PB-Puffer zugeben und gut gemischt. Die QIAquick-Säule wurde in ein 2 mL Auffanggefäß gesetzt und das Gemisch auf die Säule pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation (1 min, 2.200 × g), der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden 750 µL PE-Puffer zugegeben und nach Zentrifugation (1 min, 14.000 rpm, EZ) der Durchfluss verworfen. Zum Entfernen von Pufferresten wurde zentrifugiert (2 min, 12.000 × g). Die Säule wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und 35 µL EB-Puffer zugegeben, anschließend wurde 5 min bei RT inkubiert. Zur Elution wurde zentrifugiert

(1 min, 6.000 rpm, EZ), abschließend die Säule verworfen und das gereinigte PCR Produkt bei 4 °C gelagert.

5.2.10 Genomisches Fingerprinting (RAPD-PCR / ERIC-PCR)

Die RAPD- und ERIC-PCR-Analyse basiert auf der Amplifikation von DNA durch Primer, die bei sehr niedriger *Annealing*temperatur an Sequenzabschnitte in der genomischen DNA binden. Dabei entsteht nach elektrophoretischer Auftrennung der entstandenen PCR-Amplifikate ein charakteristisches Bandenmuster, das ein Anhaltspunkt für taxonomische Verwandtschaft und genomische Charakteristik ist.

Das Verfahren entspricht einer PCR-Reaktion, allerdings wird nur ein Oligonukleotid als Primer in der PCR verwendet. Das Protokoll ist in Tabelle 5-5 dargestellt.

Tabelle 5-5: Protokoll für eine RAPD- und ERIC-PCR.

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1x Vol.
H ₂ O			32,00 µL
Ampli <i>Taq</i> -Puffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	10x	1x	5,00 µL
ERIC2- oder OPM6-Primer	20 µM	100 nM	5,00 µL
dNTPs	Je 5 mM	200 µM	2,00 µL
Ampli <i>Taq</i> DNA-Polymerase	5 U/µL		1,00 µL
<i>Template</i> -DNA			5,00 µL
Summe			50,00 µL

Das verwendete Temperaturprofil ist in Tabelle 5-6 dargestellt.

Tabelle 5-6: Temperaturprofil einer RAPD-PCR.

1x	35x			1x
Denaturierung	Denaturierung	<i>Annealing</i>	Elongation	Terminale Elongation
94 °C	95 °C	35 °C	60 °C	72 °C
300 s	30 s	60 s	60 s	300 s

Die PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel 0,8 h bei 100 V aufgetrennt und unter UV-Licht detektiert.

5.2.11 Genomisches Fingerprinting rep-PCR Analyse

Die rep-PCR Analyse erfolgt im Grundsatz wie die RAPD- oder ERIC-PCR Analyse, mit dem Unterschied, dass es sich um das kommerzielles *DiversiLab Kit* (BioMérieux, Nürtingen) handelt. Daher sind keine Informationen über die Primerkomposition bekannt. Die Methode basiert auf einer Amplifikation von DNA-Fragmenten und deren Analyse mittels der in 5.2.12 dargestellten Kapillargelelektrophorese, in der sich ein charakteristisches Bandenmuster zeigt. Für die rep-PCR mit dem *DiversiLab Enterococcus- oder Streptococcus-Kit* wurde als Thermocycler der Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) verwendet.

Es wurde ausschließlich die DNA verwendet, die mittels des *UltraClean Microbial DNA Isolation Kit* extrahiert wurde (siehe 5.2.2). Die DNA wurde auf eine Konzentration von 35 ng/μL verdünnt und in folgendem Reaktionsmix verwendet.

Tabelle 5-7: Protokoll für eine rep-PCR.

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1x Vol.
rep-PCR MM1			18,00 μL
Ampli <i>Taq</i> -Puffer (inkl. 15 mM MgSO ₄)	10x	1x	2,50 μL
Primer Mix			2,00 μL
Ampli <i>Taq</i> DNA-Polymerase	5 U/μL		0,50 μL
Template-DNA	35 ng/μL	2,8 ng/μL	2,00 μL
Summe			25,00μL

Tabelle 5-8: Temperaturprofil einer rep-PCR.

1x	34x			1x
Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Terminale Elongation
94 °C	94 °C	50 °C	70 °C	70 °C
120 s	30 s	30 s	90 s	180 s

5.2.12 Analyse von PCR–Amplifikaten mittels Kapillargelelektrophorese

Die Analyse der ERIC-, RAPD- und rep-PCR Produkte erfolgte durch eine Elektrophorese. Es wurde ein Mikrofluidtechnik-Chip (Agilent Technologies, Böblingen) verwendet. Der Mikrofluidtechnik-Chip verfügt über 16 Kavitäten, die über feine Kapillaren miteinander verbunden sind. Durch Anlegen einer Spannung zwischen zwei mit einer Gelmatrix, sowie der DNA beladenen Kavitäten kann eine elektrophoretische Trennung erfolgen. Die PCR-Produkte wurden mit einem Farbstoffmix fluoreszenzmarkiert.

Die Vorbereitung des Chips erfolgte nach Angaben des Herstellers. Um Luftblasen zu vermeiden wurde revers pipettiert. In die Kavitäten G wurden 9 μL Farbstoffmix pipettiert. Dann wurde der Mikrofluidtechnik-Chip in der Spritzenstation mit 10 mL Volumen für 30 s unter Druck gesetzt. Der Spritzenkolben sollte von alleine wieder ein Volumen von 7 - 9 mL erreichen. In die beiden G- Kavitäten wurden je 9 μL Farbstoffmix pipettiert, in die Kavitäten eins bis zwölf sowie in die Längenmarker-Kavität wurden je 5 μL DNA-Matrix pipettiert. Diese enthält die beiden Größenmarker, welche für die Normalisierung der Elektropherogramme mit der *DiversiLab-Software* benötigt werden. Dann wurden die Kavitäten eins bis zwölf und die Längenmarker-Kavität mit je 1 μL PCR-Amplifikat beladen. Abschließend wurde der Mikrofluidtechnik-Chip eine Minute gevortext (2000 rpm). Für die Elektrophorese und die Detektion der Amplifikate wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen) benutzt. Die generierten Daten werden automatisch an die *Online-Analysesoftware* übertragen und können von dort heruntergeladen, um mit der *BioNumerics Software* (AppliedMath, Sint-Martens-Latem, Belgien) analysiert zu werden.

5.2.13 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Für das Spalten von Gesamt-DNA, PCR-Produkten und Plasmid-DNA wurden in dieser Arbeit Restriktions-Endonukleasen des Typs II verwendet. Für alle verwendeten Enzyme wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer und Inkubationstemperaturen verwendet.

Es wurde jeweils folgender Restriktionsansatz eingesetzt.

Tabelle 5-9: Reaktionsansatz einer Restriktionsspaltung.

Reagenz	1x Vol.
H ₂ O <i>bidest.</i>	12,00 μL
Restriktionsenzym (10U/ μL)	1,00 μL
Restriktionspuffer	2,00 μL
DNA (100 ng/ μL)	5,00 μL
Summe	20,00 μL

Die Restriktionsansätze wurden mindestens 1 h und maximal über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert und die Reaktion dann durch eine Inkubation von 20 min bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur gestoppt.

Zur Überprüfung der Fragmentgrößen wurden 5 μL der gespaltenen DNA mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

5.2.14 Agarosegelelektrophorese

In einer Gelmatrix (Agarose) lassen sich negativ geladene DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe auftrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe und Ladung des Moleküls ab. Je größer ein DNA-Molekül ist, umso stärker wird es durch die Agarosematrix zurückgehalten. Die Mobilität der zu untersuchenden Fragmente verhält sich umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Mittels Ethidiumbromid-(EtBr)-Färbung erfolgt die Detektion der DNA. Der Farbstoff interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren und erzeugt auf einem UV-Transilluminator eine sichtbare Fluoreszenz (Absorption 320 nm, Emission 590 nm). Für die Auftrennung von PCR-Fragmenten wird eine Agarosekonzentration von 2 %, bei der Auftrennung von Restriktionsfragmenten von Gesamt-DNA sowie für die weitere Verwendung für *Southern-Blots* wird eine Konzentration von 0,7 % verwendet.

Als Gelmatrix wurden 3 g Agarose (2%iges Agarosegel) in 150 mL 0,5x TBE-Puffer unter Zugabe von 15 µL Ethidiumbromid (1,0 % in wässriger Lösung) bis zur vollständigen Lösung der Agarose in der Mikrowelle gekocht. Das Gel wurde in eine Gelform gegossen und ein Kamm mit 20 vorgeformten Taschen eingesetzt. Nach Polymerisation wurde das Gel in die mit 0,5x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (BioRad, München) gelegt. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei 100 V, 60 mA für 0,7 h.

5.2.15 Transfer von DNA-Fragmenten mittels Vakuum (*Southern Blot*)

Die Methode der *Southern*-Hybridisierung dient als eine Methode des Transfers, der Fixierung und Detektion von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen.

Zur Durchführung eines *Southern Blots* wurde chromosomale DNA zuerst durch Restriktionsendonukleasen gespalten (siehe 5.2.13) und in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 5.2.14). Um eine optimale Auftrennung zu erreichen, erfolgte die Elektrophorese in einem Agarosegel über 3 h. Als DNA-Größenstandard wurden 2 µL des *DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled* (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Das Vacu-Blot-System (Biometra, Göttingen) wurde den Herstellerangaben gemäß aufgebaut und die Nylonmembran auf die Apparatur gelegt.

Das Agarosegel wurde zweimal für je 20 min in 30 mL Depurinierungslösung inkubiert. Das Gel wurde anschließend für 20 min mit 30 mL Denaturierungslösung überschichtet, die Flüssigkeit wurde während der Inkubationszeit einmal gewechselt. Im Folgenden wurden

30 mL Neutralisierungslösung hinzugegeben und 20 min inkubiert. Das Gel wurde luftblasenfrei auf eine positiv geladene Nylonmembran gelegt und ein Unterdruck von 50 mbar an die Apparatur angelegt. Während des Transfers musste das Gel komplett mit Transferlösung (20x SSC) bedeckt sein. Der Transfer erfolgt über einen Zeitraum von 1 h, anschließend wurde die Nylonmembran kurz in dest. Wasser gewaschen. Die Membran wurde dann 1 h bei 80 °C auf Whatman-Papier getrocknet.

5.2.16 Southern-Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde zuerst eine spezifische DNA-Sonde hergestellt, die mittels *Nick Translation* mit Digoxigenin-dUTP markiert wurde. Dabei wird der Reparaturmechanismus der DNA-Polymerase genutzt, um die zuvor zufällig durch eine DNase generierte Einzelstrangbrüche mit DIG-markierten Nukleotiden zu füllen.

Zunächst wurde folgender Reaktionsmix hergestellt.

Tabelle 5-10: Reaktionsmix einer Nick-Translation Markierung.

Reagenz	1x Vol.
5x Puffer	10,00 µL
0,1 M DTT	5,00 µL
dNTP-Mix [0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,1 mM dTTP]	4,00 µL
1 mM DIG-11-dUTP	2,00 µL
DNA Polymerase I	2,00 µL (10 U)
DNase (1:100 in <i>aqua dest.</i>)	5,00 µL (5 ng)
Template-DNA	1 – 5 µg
H₂O bidest.	add. 50 µL

Der Reaktionsansatz wurden kurz gemischt und abzentrifugiert, dann 2 h bei 15 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 µL 0,5 M EDTA hinzugegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Sonde wurde bei -20 °C gelagert.

Zur Hybridisierung wurde die Nylonmembran für 1 h in 25 mL Hybridisierungspuffer im Hybridisierungs-ofen bei 42 °C inkubiert. Die Sonde wurde 5 min bei 95 °C denaturiert und sofort zum Hybridisierungspuffer hinzugegeben. Dann wurde die Membran luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt. Der Blot wurde ü. N. bei 42 °C im Hybridisierungs-ofen bei ständiger Rotation inkubiert.

5.2.17 Detektion des kolorimetrischen Nachweises

Das verwendete Detektionsprinzip beruht auf der Bindung eines modifizierten Antikörpers an die DIG-Markierung der DNA-Sonde. An den Antikörper ist das Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt. Durch die von der alkalischen Phosphatase katalysierte Umsetzung wird 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) kann das farbige Produkt nachgewiesen werden. Hierbei wird BCIP durch die enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe in das entsprechende Indoxyl überführt, das zu einem Keton tautomerisiert. Unter den Detektionsbedingungen dimerisiert das Keton zu blauem Indigo, wobei H^+ freigesetzt wird. Dieses reduziert schließlich das zur Farbverstärkung eingesetzte NBT zum purpurnen Diformazan. Beide Farbstoffe fallen dabei in unmittelbarer Nähe der AP-Moleküle aus und färben die Umgebung der markierten DNA-Sonde dunkelviolett an.

Dazu wurde die Membran zweimal für 5 min bei RT mit DIG Wasch-Puffer I gewaschen und zweimal für 15 min mit DIG Wasch-Puffer II bei 65 °C unter Schütteln gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Membran wurde kurz in 30 mL Waschpuffer gelegt und 30 min in 30 mL Blockierungslösung (Roche, Mannheim) inkubiert. Das Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat (Roche, Mannheim) wurde 1:5.000 in 20 mL Detektions-Puffer (Roche, Mannheim) verdünnt und 30 min auf der Membran inkubiert, dann zweimal für 15 min in Waschpuffer (Roche) gewaschen und für 5 min in 20 mL Detektions-Puffer (Roche, Mannheim) inkubiert. 200 µl der NBT/BCIP Stammlösung wurden frisch in 10 mL des Detektions-Puffers verdünnt. Die Membran wurde komplett mit 10 mL der Färbelösung bedeckt. Wenn die gewünschte Bandenintensität erreicht wurde, wurde die Reaktion mit 50 mL TE Puffer gestoppt.

5.3 DNA-Sequenzierung (*Cycle Sequencing*)

Die DNA-Sequenzierung basiert auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger *et al.* 1977). Bei der Methode des *Cycle Sequencing* wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) mit Hilfe einer *Taq*-DNA-Polymerase und vier Didesoxynukleotid-Derivaten (ddNTP) verlängert. An diese sind für die jeweilige Base spezifische Fluoreszenzmarker gekoppelt. Der Einbau der ddNTPs bewirkt einen Kettenabbruch aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am dritten C-Atom des Zuckers.

5.3.1 Aufreinigung der PCR-Amplifikate für die Sequenzierung

Zunächst wurden die Amplifikate welche zur Sequenzierung eingesetzt werden sollten, mittels eines enzymatischen Verdau von Primer gereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Exo-SAP (ExonukleaseI, *Shrimp Alkaline Phosphatase*). Für einen Ansatz wurden 10 µL Amplifikat mit je 2 µL ExoI und SAP versetzt und bei 37 °C für 30 min im Thermocycler inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzyme erfolgt eine Inkubation für 15 min bei 80 °C. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt.

5.3.2 Sequenzierung mit dem *BigDye Terminator Kit*

Entsprechend Tabelle 5-11 wurde für jede Probe ein Sequenzieransatz hergestellt und die PCR mit dem Temperaturprofil (Tabelle 5-12) im Block-Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 5-11: Reaktionsansatz einer Sequenzierreaktion.

Reagenz	1x Vol.
BigDye v1.1 Prämix	4,00 µL
BigDye Sequenzierpuffer	2,00 µL
Primer (2 µM)	1,50 µL
H ₂ O <i>bidest.</i>	7,50 µL
aufgereinigtes PCR Produkt	5,00 µL
Summe	20,00 µL

Tabelle 5-12: Temperaturprofil einer Sequenzierreaktion.

1x	30x		
Denaturierung 95 °C 120 s	Denaturierung 95 °C 10 s	<i>Annealing</i> 55 °C 5 s	Elongation 60 °C 240 s

5.3.3 Reinigung von Sequenzieransätzen mittels Sephadex G50 Gelfiltration

In einer Sephadexmatrix können nach dem Prinzip der Gelfiltration Salze, einzelne Nukleotide und Farbstoffe zurückgehalten werden. Die stationäre Phase besteht aus einer porösen dreidimensionalen Gelmatrix, in welche je nach Porenstruktur verschieden große Moleküle eindringen und verweilen können. Größere Moleküle, welche die

Sephadexkügelchen umgehen, werden schneller eluiert. Zu Aufreinigung von vielen Proben standen 96- Kavitäten-Säulenplatten zur Verfügung, die analog prozessiert wurden.

Die Säule wurde in einem 2 mL Auffanggefäß platziert und 800 mL Sephadex G50-Suspension (in TE-Puffer) zugeben. Nach der Zentrifugation (3 min, $550 \times g$) wurde der Durchfluss verworfen und die Säule in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt. Der Sequenzieransatz (20 μL) wurde mittig auf die gepackte Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (4 min, $550 \times g$) wurde die Säule verworfen. Der Sequenzieransatz wurde 1:1 mit dest. Wasser verdünnt und in ein 500 μL Reaktionsgefäß überführt. Die Sequenzierprodukte wurden vor der Sequenzierung 2 min bei 95°C denaturiert.

5.3.4 Analyse der DNA-Sequenzierungsprodukte mittels Kapillarelektrophorese

Die Sequenzierprodukte wurden am Kapillarsequenzier ABI-Prism 310 (Applied Biosystems, Darmstadt) oder 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgetrennt und fluorometrisch detektiert. Die Methode basiert auf der elektrophoretischen Wanderung von fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten in einer dünnen, mit einer Gelmatrix gefüllten, Kapillare. Dabei wandern kleine Fragmente schneller als größere. Alle jeweils mit einer fluoreszenzmarkierter Endbase markierten Fragmente mit Größen von 1 Base bis ca. 900 Basen trennen sich in Richtung des Detektors auf. Die vier verschiedenen Fluoreszenzen können dann durch Lichtanregung und Messung am Detektor innerhalb der DNA-Sequenz zugeordnet werden.

Die Injektionsdauer und -spannung wurde am ABI-Prism 310 entsprechend der Ausbeute der Amplifizierungsreaktion eingestellt. In Tabelle 5-13 sind die Einstellungen für den Kapillarsequenzier ABI-Prism 310 aufgelistet.

Tabelle 5-13: Standardeinstellungen des Kapillarsequenzers ABI Prism 310.

Modul	Matrix	Injektion		Elektrophorese		
		Zeit	Spannung	Zeit	Spannung	Temperatur
Seq POP6 Rapid	E	30 s	6 kV	42 min	15 kV	50°C

Die Analyse am 3500 Genetic Analyzer erfolgte mittels des Standard Programmes „Std_Seq_Assay-POP7“ und bedurfte keiner weiteren Einstellungen.

Die durch die *ABI Prism 310 Collection Software* (Applied Biosystems, Darmstadt) oder *Sequencing Analysis Software* (Applied Biosystems, Darmstadt) ermittelte DNA-Sequenz wurde in einem Fluoreszenzkurvendiagramm dargestellt und automatisch in eine Basenabfolge übersetzt.

5.4 MALDI-TOF-MS Analyse

Mittels der MALDI-TOF-MS Analyse (*matrix assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry*) ist es möglich anhand von spezifischen Massenspektren aus bakteriellen Reinkulturen oder Pilzen durch WCMS-Analyse (*whole cell mass spectrometry*) Spezies zu identifizieren und zu diskriminieren. Die erstellten Massenspektren-Muster basieren dabei größtenteils auf den quantitativ häufig vorkommenden ribosomalen Proteinen und werden durch Abgleich mit Referenz-Datenbanken zugeordnet.

5.4.1 Probenvorbereitung

Die Bakterienkulturen für die MALDI-TOF-MS Analyse wurden ü. N. bei 37 °C auf CBS-Agarplatten (BioMérieux, Nürtingen) kultiviert. Einzelkolonien (ca. 0,1 mm³) von frischen Platten wurden mit einer Pipettenspitze oder einem Zahnstocher in Doppelbestimmung auf den Metallträger aufgetragen. Zu jeder Probenposition wurde 1 µL α -Cyano-4-Hydroxymizsäure (in Wasser:Acetonitril:Ethanol [1:1:1] gelöst und mit Trifluoressigsäure angesäuert), zugegeben und suspendiert. Die Probe wurde bei Raumtemperatur etwa 2 min getrocknet bis eine Kristallisation sichtbar war.

5.4.2 Aufnahme der Spektren

Die Analysen wurden mit dem *AXIMA Confidence Instrument* (Shimadzu, Kyoto, Japan) durchgeführt. Es wurden 500 Laserpulse ($\lambda=337$ nm) abgegeben, dabei wurden pro Probe 100 Profile mit je 5 Pulsen akkumuliert. Bei der Analyse wurde der lineare, positive Ionen Modus mit einem Massenbereich von 2–20 kDa verwendet. Das untere Massenfenster wurde auf 1.500 Da gesetzt. Die Spektren wurden mit einer automatischen Qualitätskontrolle, die eine

minimale Intensität des höchsten Peaks von 10 mV fordert, aufgenommen. Jeder Stamm wurde in Doppelbestimmung analysiert.

5.4.3 Analyse und Interpretation der Spektren

Alle Roh-Spektren wurden mit der *Biotech Lunchpad Software* (Shimadzu, Kyoto, Japan) prozessiert und zu der *SARAMIS Software* (AnagnosTec, Potsdam) exportiert. Alle Peakmuster wurden mit einer Toleranz von 0,08 % ausgerichtet. Die daraus resultierende Matrix aus an- und abwesenden Peaks jedes Massesignals wurde, durch einzeln verbundene agglomerierende *Cluster* Algorithmen, in eine Ähnlichkeits-Matrix umgerechnet. Diese wurden verwendet um das dargestellte Dendrogramm zu berechnen.

In dem Dendrogramm wurden die Massenmuster anhand ihrer relativen Ähnlichkeit als ein Prozentsatz der gleichen Massensignale gruppiert. Die prozentuale Gleichheit wurde, basierend auf den Spektren mit wenigen Peaks, normiert. Um Subspezies spezifische Massenspektren zu detektieren, wurden zuerst die Konsensusspektren für die jeweilige Subspezies überlagert. Dazu wurden alle Signale, die in weniger als 80 % der Spektren vorkommen, entfernt. Darauf folgend wurde innerhalb der Konsensusspektren die Verteilung der individuellen Massensignale durch die Überlagerung aller Spektren zueinander evaluiert.

5.5 Genomsequenzierung

5.5.1 Genom-Sequenzierung und Lückenschluss

Die Sequenzierung des *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Stammes ATCC BAA-2069 wurde vom CeBiTec Bielefeld mittels der *454 Life Science pyrosequencing technology* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die *reads* wurden mittels der *Software Newbler V2.3* (Roche Diagnostics, Mannheim) assembliert und es konnten 38 *Contigs*, von denen 31 *Contigs* größer als 500 bp waren, erstellt werden. Die großen *Contigs* zeigten eine 64,9x Überlagerung und dienten als Basis für den Lückenschluss. Der Lückenschluss wurde mit konventioneller PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung erreicht. Lange redundante Sequenzbereiche wurden durch den Einbau von *fake reads* gelöst.

5.5.2 Annotation des Genom

Die Verwaltung und Annotation des Genoms wurde mit der *Software GenDB 2.4* (Meyer *et al.* 2003) durchgeführt. Dabei wurden die Vorhersagen der kodierenden Sequenzen (CDS) mittels der Programme *Critica* (Badger *et al.* 1999), *Glimmer* (Delcher *et al.* 1999) und *Reganor* (Linke *et al.* 2006) durchgeführt. Alle vorhergesagten ORFs wurden automatisch mit den Datenbanken *nr*, *Swissprot*, *KEGG*, *InterPro*, *Pfam* und *TIGRfam* abgeglichen. Putative Signalpeptide, Transmembran-Helices und Nukleinsäure-Bindedomänen wurden durch die *Software SignalP* (Bendtsen *et al.* 2004), *TMHMM* (Krogh *et al.* 2001) und *Helix-Turn-Helix* (Dodd *et al.* 1987) ermittelt.

Die automatische Annotation jeder CDS wurde manuell überprüft und bei Bedarf nach dem wahrscheinlichsten Ergebnis korrigiert. Die Detektion der für LPxTG-kodierende Gene wurde mittels der Suche nach dem [LYF]P[TSA][GANS] Motiv und der Nutzung eines LPxTG *Hidden Markov Model* für Sortase Substrate analog zu (Boekhorst *et al.* 2005) durchgeführt.

5.5.3 Berechnung des phylogenetischen Stammbaums

Für die Kalkulation des phylogenetischen Stammbaums wurde die *Software EDGAR* (Blom *et al.* 2009) genutzt. Es wurden aus 25 Genomen 300 *core* Gene (Orthologie-*cutoff* 35 % *Score Ratio Value*) errechnet. Im nächsten Schritt wurden Vergleiche der *core* Gene mittels *MUSCLE* (Edgar 2004) generiert und die nicht übereinstimmende Bereiche der Vergleiche durch *GBLOCKS* (Castresana 2000) maskiert und entfernt. Die verbleibenden Bereiche wurden in einem großen *Alignment* zusammengefasst und darauf basierend eine Distanz-Matrix mittels des Kimura Algorithmus generiert. Dieser wurde als Basis für die *neighbor joining method* verwendet und ein Stammbaum im *newick* Format erstellt.

5.5.4 GC skew Analyse

Die *GC skew* misst den Überschuss von G-Nukleotiden durch Berechnung der Differenz zwischen der Anzahl von G-Nukleotiden und C-Nukleotiden in einem Fenster von 1.000 Nukleotiden. Die *skews* werden kumuliert um den kumulativen *GC skew*, welcher die Summe der *GC skews* vom ersten bis zum i_{en} Fenster enthält, zu errechnen.

5.6 Microarray

5.6.1 Lineare Multiplex-PCR

Im Grundsatz ist die Funktionsweise der linearen Multiplex-PCR identisch zu der in 5.2.7 dargestellten Standard-PCR. Abweichend wird statt eines Primerpaares nur ein Primer pro *Target* eingesetzt. Dies hat zur Folge, dass Amplifikate mit einer nicht definierten Länge gebildet werden. Die Polymerase arbeitet so lange wie der Elongationszyklus dauert oder bis sie sich auf Grund von Sequenzgegebenheiten von dem DNA-*Template*-Strang ablöst. Der Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung von Interaktionen der Amplikons, daher kann eine hohe Anzahl Primer in einer PCR-Reaktion verwendet werden. Voraussetzung für diese Reaktion ist die Verwendung hochkonzentrierter *Template*-DNA.

Es wurden für jeden Array sechs Reaktionen mit den sechs verwendeten Primerpools durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist Tabelle 5-14 dargestellt.

Tabelle 5-14: Reaktionsansatz einer linearen Multiplex PCR.

Reagenz	Konzentration	Endkonzentration	1x Vol.
H ₂ O <i>bide</i> st.			18,00 µL
HotMaster <i>Taq</i> -Puffer (inkl. 25 mM MgCl ₂)	10x	2,5 mM MgCl ₂	3,00 µL
Primerpool	je 135 nM	je 13,5 nM	3,00 µL
dNTP-Biotin <i>Stock Solution</i>			3,00 µL
HotMaster <i>Taq</i> Polymerase	5 U/µL	0,25 U/µL	1,50 µL
DNA- <i>Template</i>	400 ng/µL	20 ng/µL	1,50 µL
Summe			30,00 µL

Für die Ansätze mit Primerpool 1, 2, 3, 4 und 6 (siehe 3.4.1) wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

Tabelle 5-15: Temperaturprofil der linearen PCR für Primerpool 1-4, 6.

1x	45x			1x
Denaturierung	Denaturierung	<i>Annealing</i>	Elongation	Terminale Elongation
94 °C	95 °C	53 °C	72 °C	72 °C
60 s	40 s	40 s	60 s	120 s

Für den Primerpool 5 wurde aufgrund differenter Schmelztemperaturen folgendes Profil verwendet.

Tabelle 5-16: Temperaturprofil der linearen PCR für Primerpool 5.

1x	45x				1x
Denaturierung	Denaturierung	<i>Annealing</i>	<i>Annealing</i>	Elongation	Terminale Elongation
94 °C	95 °C	54 °C	45 °C $\Delta=0,3\text{ °C/s}$	72 °C	72 °C
60 s	30 s	5 s	20 s	45 s	120 s

5.6.2 Prozessieren des Microarrays

Die bedruckten Bereiche der Microarrays wurden randständig markiert um später eine genaue Positionierung der Hybridisierungskammer zu gewährleisten. Alle Waschschrte wurden bei 200 rpm in Färbetrogen mit einer Objekttragerhalterung durchgeföhrt.

Zunächst wurden folgende Waschschrte bei den angegebenen Temperaturen durchgeföhrt.

- MA-Wasch I 5 min bei 22 °C
- MA-Wasch II 4 min bei 22 °C
- MA-Wasch III 10 min bei 22 °C
- H₂O *bidest.* 1 min bei 22 °C
- *Blocking Solution* 60 min bei 50 °C
- H₂O *bidest.* 1 min bei 22 °C

Der Microarray wurde anschließend durch Zentrifugation bei 200 × g für 2 min getrocknet.

5.6.3 Hybridisierung des Microarrays

Es wurde eine *Secure-Seal* Hybridisierungskammer auf den zuvor markierten Bereich aufgeklebt und der folgende Hybridisierungsmix (Tabelle 5-17) luftblasenfrei in die Kammer einpipettiert.

Tabelle 5-17: Ansatz für einen Reaktionsmix für die Microarray Hybridisierung.

Reagenz	1x Vol.
gelabelte DNA (6*30 µL)	180,00 µL
SSC-Puffer (20x)	140,00 µL
SDS-Lösung (1%)	70,00 µL
Hybridisierungskontrolle (100 µM)	0,2 µL
H ₂ O <i>bidest.</i>	320,00 µL
Summe	710,2 µL

Die Kammer wurde mit Klebepunkten verschlossen und 8 h bei 51 °C, sowie 8 h bei 48 °C bei 200 rpm im Thermomixer comfort inkubiert. Anschließend wurde der Array mit 0,75x TNT-Puffer 10 min bei RT gewaschen und anschließend 60 min in 0,75x TNT-Puffer bei 46 °C inkubiert. Im direkten Anschluss wurde der Array nur durch schräges Halten von Pufferresten befreit und ein *Lifterslip* aufgelegt. Der Microarray sollte bei diesem Schritt nicht trocknen.

5.6.4 Detektion mittels Streptavidin-Cy3

Das Streptavidin-Cy3 Konjugat wurde 1:100 in 1xTNT-Puffer verdünnt und an den Rand des *Lifterslips* pipettiert. Durch Kapillarkräfte wurde die Lösung gleichmäßig unter den *Lifterslip* gezogen. Es wurde 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde der *Lifterslip* vorsichtig mit einem Skalpell angehoben und entfernt, der Array wurde sofort in 1xTNT-Puffer überführt und viermal für 5 min gewaschen. Abschließend wurde der Array 5 min bei RT in 0,05 % Tween 20 gewaschen und durch Zentrifugation (2 min, 200 × g) getrocknet.

5.6.5 Messung im Microarrayscanner und Analyse der Daten

Die prozessierten Microarrays sind bis zu 2 h signalstabil, sollten jedoch zeitnah gescannt werden. Dazu wurden sie in dem Microarray Scanner *GenePix 4300A* unter Verwendung der *GenePix Pro 7.2 Software* mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt und mit dem Filter 532R (Cy3) in einer Auflösung von 5 nm gescannt. Die interne Verstärkung des Signals (PMT) wurde auf 700 eingestellt und nur bei stark über- oder unterbelichteten Microarrays angepasst. Die Spots wurden mit dem unteren Grenzwert von 40 µM und einem oberen Grenzwert von 400 µM Durchmesser detektiert. Der Hintergrund wurde aus dem Mittelwert der fünffachen Spotgröße abzüglich der 8 Pixel der direkten Spotumgebung berechnet. Bei jedem Array wurden manuell Verunreinigungen, Artefakte oder fehlende Spots aus der Analyse ausgeschlossen. Aus zwölf Werten für jedes *Target* wurde der Mittelwert der Mediane abzüglich des Hintergrundes berechnet. Alle *Targets* über einer Intensität von 300 wurden positiv gewertet, alle *Targets* unter 100 Intensität wurden als negativ deklariert. Die Ergebnisse aller *Targets* die im Grenzbereich zwischen 100 und 300 liegen wurden manuell überprüft und als positiv, negativ oder inkonsistent gewertet.

6 Material und Geräte

6.1 Bakterienstämme

Tabelle 6-1: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Interne Nummer	Spezies	Stamm	Isolations-Quelle	Isolations-Ort
001	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	DSM 20065	Sauerbrei	
002	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	DSM 15351	Mensch	
003	<i>S. suis</i>	DSM 9682	Schwein	
004	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	DSM 16831	Koalafäzes	
005	<i>S. equinus</i>	DSM 20558		
006	<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	Isolat 007270/99	Mensch	HDZ-NRW
007	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	Isolat 014080/98	Mensch	HDZ-NRW
008	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	DSM 13808	anaerober Fermenter	
009	<i>S. suis</i>	EDCC 5220		
010	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 12932/01	Mensch	HDZ-NRW
011	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 000718/98	Mensch	HDZ-NRW
012	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 010288/01	Mensch	HDZ-NRW
013	<i>S. pasteurii</i>	Isolat 003259/00	Mensch	HDZ-NRW
014	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 003080/00	Mensch	HDZ-NRW
015	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 010672/01	Mensch	HDZ-NRW
016	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 006718/00	Mensch	HDZ-NRW
017	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	Isolat 001081/02	Mensch	HDZ-NRW
018	<i>S. bovis</i>	DSM 20480	Kuhdung	
019	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 007849/02	Mensch	HDZ-NRW
020	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 021702/06	Mensch	HDZ-NRW
021	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATCC 49475	Mensch	
022	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATCC 49147	Mensch	
023	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 0134257/1	Mensch	HDZ-NRW
024	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATCC 9809		
025	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Isolat 005950/03	Mensch	HDZ-NRW
026	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATTC BAA-2069	Mensch	
027	<i>S. lutetiensis</i>	K1407_MS	Mensch	
028	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	K6236/35_MS	Mensch	
029	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	26020_MS	Mensch	
030	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	26029_MS	Mensch	
031	<i>S. lutetiensis</i>	K1697/1/07		
032	<i>S. equinus</i>	05PA 06776 001	Mensch	
034	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	05WDK 43740 002		
035	<i>S. equinus</i>	05WDK 43161		
036	<i>S. lutetiensis</i>	07SCH 04660	Mensch	
037	<i>S. equinus</i>	07WDK 06692		
038	<i>S. alactolyticus</i>	05SCH 17930 001	Mensch	
039	<i>S. parasanguis</i>	06E 21494 015		
045	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	Isolat 002866/07	Mensch	HDZ-NRW
046	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	Isolat 002376/07	Mensch	HDZ-NRW
047	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC 6860		
048	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC 1016		
049	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC 1135		
050	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC 1181		
051	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC 1242		

Interne Nummer	Spezies	Stamm	Isolations-Quelle	Isolations-Ort
052	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC 582		
053	<i>S. pasteurii</i>	AC 589		
054	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC 7070		
055	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	AC 6827		
056	<i>S. agalactiae</i>	M-009790		
057	<i>S. agalactiae</i>	Isolat 008410/02	Mensch	HDZ-NRW
058	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14621	Taube	Belgien
059	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14622	Taube	Belgien
060	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14623	Taube	Belgien
061	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14634	Rind	Belgien
062	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14821	Taube	Belgien
063	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14823	Taube	Belgien
064	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14855	Pferd	Belgien
065	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14856	Pferd	Belgien
066	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 14862	Schwein	Belgien
067	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 14865	Katze	Belgien
068	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14870	Rind	Belgien
070	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14876	Rind	Belgien
071	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14878	Taube	Belgien
072	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15572	Ziege	
073	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15573	Ziege	
074	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 16005	Rind	Belgien
075	<i>S. equinus</i>	LMG 16293	Pferd	Belgien
076	<i>S. equinus</i>	LMG 16294	Pferd	Belgien
077	<i>S. equinus</i>	LMG 16295	Pferd	Belgien
078	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 17956	Kalb	Niederlande
079	<i>S. equinus</i> / <i>bovis</i>	LMG 22781	Hund	Flandern, Belgien
080	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 22782	Hund	Flandern, Belgien
082	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 22784		Flandern, Belgien
083	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	Isolat 007071/09	Mensch	HDZ-NRW
084	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	LMG 18487	Käse	Griechenland
085	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	LMG 18488	Käse	Griechenland
086	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	LMG 18489	Käse	Griechenland
087	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	LMG 18490	Käse	Griechenland
088	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	LMG 21596	Hund	
102	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14625	Mensch	Belgien
103	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 14626	Mensch	Belgien
104	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14631	Mensch	Belgien
105	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14632	Mensch	Belgien
106	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14879	Taube	Belgien
107	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15049	Rind	England
108	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15053	Rind	England
109	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15063	Rind	England
110	<i>S. pasteurianus</i>	LMG 15456	Mensch	Göteborg, Schweden
111	<i>S. pasteurianus</i>	LMG 16880	Mensch	Boras, Schweden
112	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 17082	Rind	Belgien
113	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 17091	Kalb	Belgien
114	<i>S. lutetiensis</i>	LMG 18173	Kalb	Niederlande
115	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 001		
116	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 002		
117	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 003		
118	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 004		
119	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 005		

Interne Nummer	Spezies	Stamm	Isolations-Quelle	Isolations-Ort
120	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 006		
121	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 007		
122	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 008		
123	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	Spain 009		
124	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 012		
125	<i>S. lutetiensis</i>	Spain 013		
126	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 014		
127	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 015		
128	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 016		
129	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 017		
130	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 018		
131	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 020		
132	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 021		
133	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 023		
134	<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	Spain 024		
135	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 025		
136	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 026		
137	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 028		
138	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 029		
139	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 030		
140	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 031		
141	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 032		
142	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 034		
143	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 036		
144	<i>S. lutetiensis</i>	Spain 037		
145	<i>S. lutetiensis</i>	Spain 038		
146	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 040		
147	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 041		
148	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 042		
149	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 043		
150	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 044		
151	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 045		
154	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 049		
155	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 050		
156	<i>S. pasteurianus</i>	Spain 051		
157	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 052		
158	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	Spain 053		
159	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	UCN34	Mensch	
160	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	904	Mensch	Korea
161	<i>S. gallolyticus</i>	99146B3313	Mensch	Geesthacht

6.2 Enzyme

Ampli <i>Taq</i> DNA Polymerase	Applied Biosystems, Darmstadt
DNase	Fermentas, Leon-Rot
Exonuklease (ExoI)	USB, Cleveland, USA
Hot Master <i>Taq</i> DNA Polymerase	5Prime, Hamburg
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen, San Diego, USA
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (SAP)	USB, Cleveland, USA

Tabelle 6-2: In diese Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen.

Enzym	Puffer	Erkennungssequenz	Bezugsquelle
<i>Bam</i> HI	NEBuffer 3	5'...G [^] GATCC...3'	New England, Frankfurt am Main
<i>Ban</i> II	NEBuffer 4	5'...GRG [^] CY [^] C...3'	New England, Frankfurt am Main
<i>Eco</i> RI	EcoRI	5'...G [^] AATTC...3'	Fermentas, Leon-Rot
<i>Esp</i> 3I	Buffer Tango	5'...CGTCTC(N) ¹ [^] ... ³	Fermentas, Leon-Rot
<i>Hind</i> III	Buffer R	5'...A [^] AGCTT...3'	Fermentas, Leon-Rot
<i>Nde</i> I	Buffer O	5'...CA [^] TATG...3'	Fermentas, Leon-Rot
<i>Nhe</i> I	Buffer Tango	5'...G [^] CTAGC...3'	Fermentas, Leon-Rot
<i>Pvu</i> II	Buffer G	5'...CAG [^] CTG...3'	Fermentas, Leon-Rot
<i>Sca</i> I	ScaI	5'...AGT [^] ACT...3'	Fermentas, Leon-Rot
<i>Sp</i> HI	NEBuffer 2	5'...GCATG [^] C...3'	New England, Frankfurt am Main

6.3 Reagenzien

Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Hohenbrunn
Biotin-16-5-aminoallyl-dUTP	Jena Bioscience, Jena
CDP-Star	Roche Diagnostics, Mannheim
DIG-11-dUTP	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>DNA Molecular Weight Marker VII</i> (DIG-labeled)	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs	Fermentas, Leon-Rot
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen
Ethanol 99 %	Merck, Hohenbrunn
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Lysozym	Fluka, Neu-Ulm
Natriumchlorid	Merck, Hohenbrunn
NBT / BCIP Stammlösung	Roche Diagnostics, Mannheim
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	Invitrogen, San Diego, USA
Pepton aus Fleisch	Merck, Hohenbrunn
Rinderserumalbumin (BSA)	Fermentas, Leon-Rot
Saccharose	Sigma, Taufkirchen
Sephadex G50	Amersham, Braunschweig
Streptavidin-Cy3-Konjugat	Sigma, Taufkirchen
TBE-Puffer	Invitrogen, San Diego, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

6.4 Puffer und Lösungen

AK I	6,7 % 50 mM 1 mM	Saccharose Tris-HCl EDTA, pH 8,0
Depurinierungslösung	0,25 N	HCl
Denaturierungslösung	1,5 M 0,5 M	NaCl NaOH
Neutralisierungslösung (pH 7,0)	1 M 2 M	Tris-HCl NaCl
DIG Wasch-Puffer I	2x 0,1 %	SSC SDS
DIG Wasch-Puffer II	0,5x 0,1 %	SSC SDS
dNTP-Biotin <i>Stock Solution</i>	1 mM 1 mM 1 mM 0,5 mM 0,5 mM	dATP dCTP dGTP dUTP Biotin-16-dUTP
Hybridisierungspuffer	50 % 5x 2 % 0,1 % 0,02 %	Formamid (w/v) SSC Blockierungslösung (w/v) N-Lauroylsarkosin (w/v) SDS (w/v)
SSC Puffer (20x)	3 M 0,3 M	NaCl Na-Citrat, pH 7,0
TE Puffer	10 mM 1 mM 70 mM 10 mM	Tris-HCl (pH 7,5) EDTA MgCl ₂ Dithiothreitol (DTT)
MA-Wasch I	0.1 % (v/v)	Triton X100
MA-Wasch II	1 mM	HCl
MA-Wasch III	100 mM	KCl

<i>Blocking-Solution</i>	1-fach 2 mM	Nexterion Block E HCl
5x NT Puffer (pH 7.8)	250 mM 25 mM 0,5 mg/mL	Tris-HCl MgCl ₂ BSA
20x SSPE-Puffer (pH 7,4)	3 M 200 mM 20 mM	NaCl NaH ₂ PO ₄ EDTA
1x TNT Buffer (pH 7,5)	0,15 M 100 mM 0,05 %	NaCl Tris-HCl Tween 20

6.5 Nährmedien

<i>Brain Heart Infusion Broth</i> (Oxoid)	37 g H ₂ O bidest. add. 1000 mL	Medium	autoklavieren und bei 4 °C lagern
<i>Brain Heart Infusion Agar</i> (Oxoid)	47 g H ₂ O bidest. add. 1000 mL	Medium	Autoklavieren, in Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern
LB Agar	1000 mL 20 g	LB Broth Agar	autoklavieren, in Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern
LB Medium	10 g 10 g 5 g H ₂ O <i>bidest.</i> add. 1000 mL	NaCl Trypton Hefeextrakt	autoklavieren und bei 4 °C lagern
<i>Tryptone Soya Broth</i> (Oxoid)	30 g H ₂ O <i>bidest.</i> add. 1000 mL	Medium	autoklavieren und bei 4 °C lagern

6.5.1 Medienzusätze

Tetracyclin-Stammlösung	10 mg / mL in 70 % EtOH gelöst, sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C
-------------------------	-------------------------------------------------------------------------

6.6 Testkits

<i>Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>DIG Wash and Block Buffer Set</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>DiversiLab Streptococcus-Kit</i>	BioMérieux, Nürtingen
<i>DiversiLab Enterococcus-Kit</i>	BioMérieux, Nürtingen
<i>DiversiLab LabChip Kit</i>	BioMérieux, Nürtingen
<i>MSB Spin PCRapace Kit</i>	Invitek GmbH, Berlin
<i>NucleoBond PC 100 Plasmid Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Spin Stool DNA Kit</i>	Invitek, Birkenfeld
<i>UltraClean Microbial DNA Isolation Kit</i>	Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA
<i>QIAamp DNA Blood Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAEX II Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>DiversiLab LabChip Kit</i>	BioMérieux, Nürtingen
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden

6.7 Oligonukleotide

Tabelle 6-3: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Bezogen von Biomers, Ulm.

Name	Sequenz 5' - 3'	Quelle/Annealingtemperatur
Primer für <i>sodA</i>-PCR / Sequenzierung (3.1.1)		
sodA d1	CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC	(Poyart <i>et al.</i> 1995) / 56 °C
sodA d2	ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC	(Poyart <i>et al.</i> 1995) / 56 °C
Primer RAPD / ERIC-PCR (3.2.2)		
OPM6	CTGGGCAACT	(Williams <i>et al.</i> 1990) / 35 °C
Eric2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	(Endtz <i>et al.</i> 1993) / 35 °C
Primer für die <i>real-time</i> PCR (3.1.3)		
Lambda_TM_F	GCAGGTCGAAAAATGGGTGGA	(Tomaso <i>et al.</i> 2004) / 55 °C
Lambda_TM_R	GCATAAACGAAGCAGTCGAGT	(Tomaso <i>et al.</i> 2004) / 55 °C
Lambda_S	JOE-TCATTGCGTCGCTTTTTGCTGTCC-BHQ2	(Tomaso <i>et al.</i> 2004) / 55 °C
tanA_F	GGTGACGGTAACAGCGTTCA	diese Arbeit / 55 °C
tanA_R	AAGGCTTCTTCGTAATCTGTTCCCT	diese Arbeit / 55 °C
tanA_S	FAM-TGGGACTCAACCTTGGGAGATTTGKTC-BHQ1	diese Arbeit / 55 °C
Primer für die Etablierung des MLST-Schemas (3.2.3)		
fmt_F	ATGGACGCTGGTGATATG	diese Arbeit / 57 °C
fmt_R	CACCTACTTCGAGCTTAC	diese Arbeit / 57 °C
trpD_F	CGACGCCATGTGTAATTG	diese Arbeit / 57 °C
trpD_R	AAGGTAAGGGCTAGGTTC	diese Arbeit / 57 °C
pyrD_F	CCACGGAAATCTTCAAGG	diese Arbeit / 57 °C
pyrD_R	GAACCACGTTATGCAGAC	diese Arbeit / 57 °C
ribD_F	GGCAGACCTATAACCAATC	diese Arbeit / 57 °C
ribD_R	GTTCAACCTGACGAGAAC	diese Arbeit / 57 °C
glgB_F	CAGCAGCAGTTCTTACAG	diese Arbeit / 57 °C
glgB_R	ACCGTGAACCACTTCATC	diese Arbeit / 57 °C
rmlB_F	GTGACCGTGTTGAATTGG	diese Arbeit / 57 °C
rmlB_R	CTGCACCGATAAAGGTAAG	diese Arbeit / 57 °C
gabD_F	CTAAAGGCGAAGTGGAAC	diese Arbeit / 57 °C
gabD_R	GTACCACCAAGACCATAG	diese Arbeit / 57 °C
parE_F	AAGTTGAAGTCGCTCTCC	diese Arbeit / 57 °C
parE_R	GGAAGGGCAATATAGACG	diese Arbeit / 57 °C
bglA1_F	GAATATGCGCGTGTCTTG	diese Arbeit / 57 °C
bglA1_R	CGACCATGGATTGTAACC	diese Arbeit / 57 °C
gor_F	GTTCTTCGCCAAACTCTG	diese Arbeit / 57 °C
gor_R	CCTACGCTAGTGAATACG	diese Arbeit / 57 °C
folE_F	CCACGCATTGTCATACAC	diese Arbeit / 57 °C
folE_R	CTCGAAGCAGCAGTTTAC	diese Arbeit / 57 °C
natC_F	GACCGAACTTCAAGTGAG	diese Arbeit / 57 °C
natC_R	GCTTTGGCTAGTGATG	diese Arbeit / 57 °C
uvrA_F	CTCGCAAGGTACGTAAAC	diese Arbeit / 57 °C
uvrA_R	GGCAACACCTTGATTGTC	diese Arbeit / 57 °C
p20_F	TATTTACGCCACGTCTG	diese Arbeit / 57 °C
p20_R	CATAGCGCAATAGGTCAC	diese Arbeit / 57 °C
nifS_F	GATTCGGACAGCTGATTG	diese Arbeit / 57 °C
nifS_R	GTCTGGTGGTACAGAAAG	diese Arbeit / 57 °C
malM_F	GACCTGGTTCCCAACTAC	diese Arbeit / 57 °C

Name	Sequenz 5' - 3'	Quelle/Annealingtemperatur
mamM_R	GATACTAGCTGGCTCCAAG	diese Arbeit / 57 °C
hisD_F	CATGACGCACCTCAATAG	diese Arbeit / 57 °C
hisD_R	GTGGAACCTGCTTATC	diese Arbeit / 57 °C
NAD_F	TTGTAGCCGTCATGTCC	diese Arbeit / 57 °C
NAD_R	CATGACGCACCTCAATAG	diese Arbeit / 57 °C
NPH_F	GACCAAACCCAGGAAG	diese Arbeit / 57 °C
NPH_R	GCCATTTGAGGACTTGG	diese Arbeit / 57 °C
glcK_F	CACTTGAGGGGAGAAGTG	diese Arbeit / 57 °C
glcK_R	CTGTTGCTGAAGCAACTG	diese Arbeit / 57 °C
aroE_F	CCTACGCTTGTAGCATTG	diese Arbeit / 57 °C
aroE_R	CTTAGCTGCGTTGTTG	diese Arbeit / 57 °C
tkf_F	GTCAAACGGTGGATACTC	diese Arbeit / 57 °C
tkf_R	CCGAATACGGTCATACTG	diese Arbeit / 57 °C
Primer für Bestätigung der Microarray-Experimente (3.4.3)		
fruA_01280_F	GTGGTGAAGCGTATGTCTC	diese Arbeit / 48 °C
fruA_01280_R	CGCGACCGTATTTGATATCC	diese Arbeit / 48 °C
cna_05110_F	CTTCGTCGACTTCAGTAAC	diese Arbeit / 49 °C
cna_05110_R	CCGTCTACAGATGACGTATAGC	diese Arbeit / 49 °C
prtS_07210_F	AGAGCGGCTATAAAGGAC	diese Arbeit / 47 °C
prtS_07210_R	CAGAGCCTGTTGACTTC	diese Arbeit / 47 °C
spaP_10430_F	ACCATTGGCGTGGTTTCAGTAG	diese Arbeit / 53 °C
spaP_10430_R	TCCTGCCGCTTCGCTTAAATAG	diese Arbeit / 53 °C
dex_13880_F	CACTGGTGAAGTTGGTAAGG	diese Arbeit / 49 °C
dex_13880_R	GGGATTGCGGTTGACTATTG	diese Arbeit / 49 °C
hae_13900_F	GTGCTTTCACCTGTTGAG	diese Arbeit / 49 °C
hae_13900_R	CAATCAGGAACCGTTGAG	diese Arbeit / 49 °C
pulA_14850_F	GCCCAGTAACCATGATAAGC	diese Arbeit / 48 °C
pulA_14850_R	CCTGGAGACTATGACTTACC	diese Arbeit / 48 °C
fszB_15950_F	GTACCGACAACGTAGAGAAG	diese Arbeit / 47 °C
fszB_15950_R	CCAGACGATACTGGTGAAAC	diese Arbeit / 47 °C
cna_15960_F	CAGATTCTTCGGCTACAGAG	diese Arbeit / 48 °C
cna_15960_R	ACTGGCAAATGGTGTAGAGG	diese Arbeit / 48 °C
nanA_16150_F	ACCAGCTAGGTAGAGATCAG	diese Arbeit / 48 °C
nanA_16150_R	TGCACTTGGGCAACAATACG	diese Arbeit / 48 °C
pmrB_16640_F	CCCGTTAACCCAATAAGAG	diese Arbeit / 49 °C
pmrB_16640_R	TGATTCTGGCACAAGCACTG	diese Arbeit / 49 °C
blpT_19780_F	CCACGCACTCACAATTTGAC	diese Arbeit / 50 °C
blpT_19780_R	TCAACCGAAGCAACGGAAAC	diese Arbeit / 50 °C
cna_19910_F	TCCTAGACCGCTGCTATTTCC	diese Arbeit / 51 °C
cna_19910_R	ACGCATGTGCCAGTAATTCC	diese Arbeit / 51 °C
trs_19970_F	GCAGCTTTAGCTTCTGTTCC	diese Arbeit / 49 °C
trs_19970_R	CCAACCTTGCCTATGGTTAC	diese Arbeit / 49 °C
FN1_19980_F	CTTGCCTGTCGTGTTCAAAG	diese Arbeit / 50 °C
FN1_19980_R	ACAAGTGGTTAGCGAGAGTG	diese Arbeit / 50 °C
pac_20560_F	CCTGAACCGTCTGGATTAAC	diese Arbeit / 50 °C
pac_20560_R	TGTGACACTTGACCCGAATG	diese Arbeit / 50 °C
agr_20570_F	GGGCTTGATTATCAGCTGTG	diese Arbeit / 51 °C
agr_20570_R	TTGTGGTATTGCCCTAGGAG	diese Arbeit / 51 °C
fhg_20580_F	TTAGTGTCTCCGTCATTGG	diese Arbeit / 52 °C
fhg_20580_R	CCTGGTGATACGGAAGAAAC	diese Arbeit / 52 °C
fszB_21750_F	TACCGGTGTAGTTAGGGTTG	diese Arbeit / 48 °C
fszB_21750_R	CCGGTGAAACTACTGATTGG	diese Arbeit / 48 °C
cna_21760_F	TGACCTCAGGGATATGTG	diese Arbeit / 44 °C
cna_21760_R	TGGTGGTGTAGATGGTAG	diese Arbeit / 44 °C

Name	Sequenz 5' - 3'	Quelle/Annealingtemperatur
cbp_22120_F	CCAGTTTCAGGAAGCGTTAC	diese Arbeit / 50 °C
cbp_22120_R	AGATAATGGTGCAGGAGAGG	diese Arbeit / 50 °C
sspA_22310_F	CTTGAGCCGCATTAGGATCG	diese Arbeit / 51 °C
sspA_22310_R	TAGTAGGGCGCGGATACTTC	diese Arbeit / 51 °C
Primer für pSGG2 Sequenzierung (3.3.4.1)		
pSGG Seq 1_F	ATGCCACTTGCGGATTAGCC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 1_R	AGCGATATTCAGCGTGAGGAC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 2_F	CTTCTCTAGCGACCTTTG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 2_R	ACAGGTGAGTGGGAAGAC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 3_F	ACACCTGCCACTTGTTAC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 3_R	CCTTGTCTTGCTACCGATTC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 3a_F	CGTTAAAGGGTCCGTATC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 3a_R	GGAAC TAAGTGGCTTTGC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 3b_F	CTGCTACTTTGGTTGCGACACT	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 3b_R	GCAGGTTTTCAACCGACACCTT	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 4_F	CGCGTTTGTCTGCTAATCGG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 4_R	AACGGAGAGCGGATGGTTAC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 5_F	TTACCGCTGTAACCATCCG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 5_R	ACTGGACGATGGTCTTGTTG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 6_F	GAACCGAAGGTTGTAGTC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 6_R	TTAGCGGAGATCACCAAG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 7_F	ATCCAGACAGCAGTGACATC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 7_R	ACCAATAGCTGGCTGGTATC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 8_F	GACGAGGTCATTCTGAAAGG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 8_R	TTCCACGCCATACTTAC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 9_F	GCGTCAAATTGGGTTTGG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 9_R	CCTGCTGTTTCAAGCTAC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 10_F	GGCTACATTGGTGGGATACTTG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 10_R	ACGTTGGGAAGAGGTTATCG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 11_F	TGCGACACCATCGATAACC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 11_R	AAGCTATCAGCGCGTAAG	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 12_F	TGTTGTTCCGTCCTAGTC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 12_R	TACTCCGCCAATCATTC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 13_F	GGGGCTGTAGCAAATGTT	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 13_R	TAGGCTAGAGAGCCAAGT	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 14_F	ATACTGAGCAGGCGACTA	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 14_R	GAGCCCCAACAGATTACA	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 15_F	CTTCAGCTGTCCATTTCC	diese Arbeit / 52 °C
pSGG Seq 15_R	ATAGCCTGCGACAGCACGAATC	diese Arbeit / 52 °C
Primer für DIG-markierte Sonden (3.3.1)		
c21_F	CCAACATTGACGCTGACAAG	diese Arbeit / 53 °C
c21_R	TTGACCGTTGAGGCGTATAG	diese Arbeit / 53 °C
c22_F	CGATGATAGCGGCAATGCAA	diese Arbeit / 55 °C
c22_R	CAGCCAATCGCCGTTACAAG	diese Arbeit / 55 °C

Die für das Microarray-Experiment verwendeten Primer und Sonden sind im Anhang unter Tabelle 9-5 aufgeführt.

6.8 DNA-Größenmarker

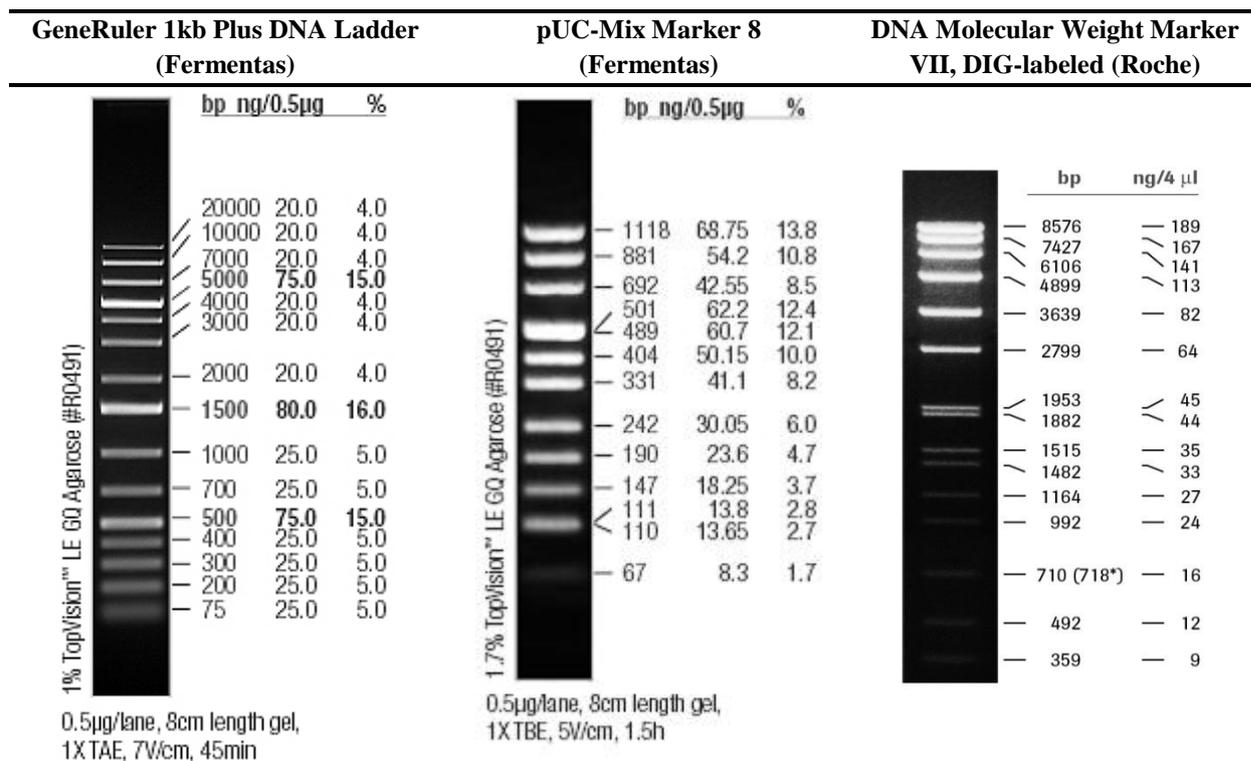


Abb. 6-1: In dieser Arbeit verwendete DNA-Größenmarker.

6.9 Software

Tabelle 6-4: Übersicht der verwendeten Softwareprogramme.

Programm	Hersteller	Verwendungszweck
<i>ABI Prism 310 Collection</i>	Applied Biosystems, Darmstadt	Sequenzierung
<i>BioNumerics</i>	AppliedMath, Sint-Martens-Latem, Belgien	Phylogenetische Analysen, MLST-Auswertung
<i>Biotech Lunchpad Software</i>	Shimadzu, Kyoto, Japan	MLST-Analyse
<i>Clone Manager 4.01</i>	Scientific & Educational Software, Cary, U.S.A.	Sequenzanalyse, -vergleich, Primer- und Sondendesign
<i>ClustalX 2</i>	Referenz: (Thompson 1997)	Sequenzvergleich
<i>EDGAR 1.2</i>	https://edgar.cebitec.uni-bielefeld.de/	Genom Analyse / Vergleich
<i>Fusion 15.18</i>	Vilber, Eberhardzell	Gel-Dokumentation
<i>Diana v1.6</i>	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt	Gel-Dokumentation
<i>DiversiLab-Software 3.4</i> (https://iltmhdz.diversilab.com/)	BioMérieux, Nürtingen	rep-PCR Analyse
<i>DNASIS Max 2.0.6</i>	Hitachi Software	Sequenzanalysen
<i>GenDB 2.2</i>	https://gendb.cebitec.uni-bielefeld.de/	Genom Annotation

Programm	Hersteller	Verwendungszweck
<i>GenePix Pro 7.2</i>	Molecular Devices, Sunnyvale, USA	MicroArray Analyse
<i>GraphPad Prism 4.0</i>	GraphPad Software Inc., U.S.A.	Statistikanalyse und Darstellung
<i>Nanodrop 2000/2000c Version 1.4.1</i>	PeqLab Biotechnologie, Erlangen	DNA-Quantifizierung
<i>Oligo Primer Analysis 5.0</i>	National Bioscience, Plymouth, USA	Primeranalyse
<i>Primer-Express 2.0</i>	Applied Biosystems, Darmstadt	<i>real-time</i> Primerdesign
<i>Rotor-Gene Analysis Ver. 6.0 und 6.1</i>	Corbett Research, Sydney, Australien	Analyse der DNA-Quantifizierung
<i>SARAMIS Software</i>	AnagnosTec, Potsdam	MALDI-TOF-MS Analyse
<i>Sequencing Analysis Software v.5.1</i>	Applied Biosystems, Darmstadt	Sequenzanalysen

6.10 Geräte

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI 3500 Genetic Analysis	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysewaage BP 160 P	Sartorius, Göttingen
AXIMA Confidence Instrument	Shimadzu, Kyoto, Japan
Brutschrank	Memmert, Schwabach
CB 210 CO ₂ -Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Diana II Digital Image Analyzer mit Dunkelkammer	Raytest, Straubenhardt
Feinwaage XP105 DR/M	Metler Toledo GmbH, Greifensee
Fusion-SL 3500 Bio-Imaging System	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
GENios Plattenleser	Tecan, Crailsheim
GenePix 4300A	Molecular Dev., Sunnyvale, USA
Gradient Cycler TGradient 96	Biometra, Göttingen
Incubator Unimax 1000 mit Schüttler 1010	Heidolph, Schwabach
Kolbenhubpipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Laborschüttler Environmental Shaker ES-20	Dewert, Bünde
MagNA Lyser	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
Nanodrop 2000 Spektralphotometer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen

pH-Meter 766	Knick, Berlin
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham, Braunschweig
Personal Cyclor	Eppendorf, Hamburg
Rotor-Gene 3000	Corbett Res., Sydney, Australien
Rotor-Gene Q	Qiagen, Hilden
S-Concentrator BA-VC-300H	Saur Laborbedarf, Reutlingen
Sicherheitswerkbank	Wesco, Wettingen Schweiz
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vacu-Blot System	Whatmann, Biometra, Göttingen
Vacuubrand CVC 3000	Saur Laborbedarf, Reutlingen
Vortex Genie 2	Scientific Ind., New York USA
Zentrifuge G-10, Rotor 11160	Sigma-Aldrich Chemie, München
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifugen 5417C, 5417 und 5417R	Eppendorf, Hamburg

6.11 Sonstige Materialien

Eppendorf Reaktionsgefäße 0,5 /1,5 / 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Glasgeräte	Schott, Mainz
Klebefolie für 96er PCR-Platten	Eppendorf, Hamburg
<i>Lifterlips</i> (22x40 mm)	Thermo Scientific, Bonn
Millex-GV4 Sterilfilter	Millipore, Schwalbach/Ts.
Positiv geladene Nylonmembranen	Roche Diagnostics, Mannheim
Parafilm	Fleischhacker, Meckenheim
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 mL	Corbett Res., Sydney, Australien
Pipettenspitzen (Rnase frei/ mit Filter)	RatioLab, Dreieich
<i>Receiver Columns</i> , 20 µm	Machery und Nagel, Dühren
<i>Receiver Plates</i>	Machery und Nagel, Dühren
<i>Secure-Seal hybridization chambers</i> (22x40 mm)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg
96-er PCR-Platten	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

7 Abkürzungen

ABC	ATP-bindende Kasette
ATP	Adenosintriphosphat
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHQ	BlackHole Dark Quencher
Bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CDS	<i>coding Sequence</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CT	<i>cycle threshold</i>
Da	Dalton
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DIG	Digoxigenin
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Enzyme Commission</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZ	Eppendorf Zentrifuge
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
g	Erdbeschleunigung
HGT	horizontaler Gentransfer
IL	Interleukin
JOE	Dichlorofluoresceinderivat
LCB	<i>local collinear bloc</i>
LMG	Laboratorium voor Microbiologie
NGT	<i>next generation sequencing</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)
ST	<i>sequence type</i>
tet	Tetracyclin
TNF- α	Tumornekrosefaktor
ü. N.	über Nacht
UPGMA	<i>unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
UV	Ultraviolett
vol	Volumen
WCMS	<i>whole cell mass spectrometry</i>
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

8 Literatur

- Abdulmir, A. S., R. R. Hafidh und F. Abu Bakar (2011). The association of *Streptococcus bovis/galloyticus* with colorectal tumors: the nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *J Exp Clin Cancer Res* 30: 11.
- Al-Jashamy, K., A. Murad, M. Zeehaida, M. Rohaini und J. Hasnan (2010). Prevalence of colorectal cancer associated with *Streptococcus bovis* among inflammatory bowel and chronic gastrointestinal tract disease patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 11(6): 1765-1768.
- Alazmi, W., M. Bustamante, C. O'Loughlin, J. Gonzalez und J. B. Raskin (2006). The association of *Streptococcus bovis* bacteremia and gastrointestinal diseases: a retrospective analysis. *Dig Dis Sci* 51(4): 732-736.
- Allen, B. L., B. Katz und M. Hook (2002). *Streptococcus anginosus* adheres to vascular endothelium basement membrane and purified extracellular matrix proteins. *Microbial Pathogenesis* 32(4): 191-204.
- Badger, J. H. und G. J. Olsen (1999). CRITICA: coding region identification tool invoking comparative analysis. *Mol Biol Evol* 16(4): 512-524.
- Baele, M., K. Chiers, L. A. Devriese, H. E. Smith, H. J. Wisselink, M. Vaneechoutte und F. Haesebrouck (2001). The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *Journal of Applied Microbiology* 91(6): 997-1003.
- Baele, M., M. Vanrobaeys, M. Vaneechoutte, P. De Herdt, L. A. Devriese und F. Haesebrouck (2000). Genomic fingerprinting of pigeon *Streptococcus galloyticus* strains of different virulence by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet Microbiol* 71(1-2): 103-111.
- Barnett, J., H. Ainsworth, J. D. Boon und D. F. Twomey (2008). *Streptococcus galloyticus* subsp. *pasteurianus* septicaemia in goslings. *Veterinary Journal* 176(2): 251-253.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero und P. Horvath (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315(5819): 1709-1712.
- Beachey, E. H. und I. Ofek (1976). Epithelial cell binding of group A streptococci by lipoteichoic acid on fimbriae denuded of M protein. *Journal of Experimental Medicine* 143(4): 759-771.
- Beck, M., R. Frodl und G. Funke (2008). Comprehensive study of strains previously designated *Streptococcus bovis* consecutively isolated from human blood cultures and emended description of *Streptococcus galloyticus* and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 46(9): 2966-2972.
- Beckmann, G. und A. Ruffer (2000). *Mikroökologie des Darmes. Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, Schlütersche Verlag.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne und S. Brunak (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340(4): 783-795.
- Billroth, T. (1874). *Untersuchungen über die Vegetationsformen von Coccobacteria Septica*. Berlin.
- Blom, J., S. P. Albaum, D. Doppmeier, A. Puhler, F. J. Vorholter, M. Zakrzewski und A. Goesmann (2009). EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics* 10: 154.
- Boekhorst, J., M. W. de Been, M. Kleerebezem und R. J. Siezen (2005). Genome-wide detection and analysis of cell wall-bound proteins with LPxTG-like sorting motifs. *J Bacteriol* 187(14): 4928-4934.
- Boleij, A., C. M. Muijtens, S. I. Bukhari, N. Cayet, P. Glaser, P. W. Hermans, D. W. Swinkels, A. Bolhuis und H. Tjalsma (2011). Novel clues on the specific association

- of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with colorectal cancer. *Journal of Infectious Diseases* 203(8): 1101-1109.
- Boleij, A., R. M. Schaeps, S. de Kleijn, P. W. Hermans, P. Glaser, V. Pancholi, D. W. Swinkels und H. Tjalsma (2009). Surface-exposed histone-like protein a modulates adherence of *Streptococcus gallolyticus* to colon adenocarcinoma cells. *Infect Immun* 77(12): 5519-5527.
- Boleij, A., M. M. van Gelder, D. W. Swinkels und H. Tjalsma (2011). Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 53(9): 870-878.
- Bridge, P. D. und P. H. Sneath (1983). Numerical taxonomy of *Streptococcus*. *Journal of General Microbiology* 129(3): 565-597.
- Brooker, J. D. und J. M. McCarthy (1997). Gene knockout of the intracellular amylase gene by homologous recombination in *Streptococcus bovis*. *Curr Microbiol* 35(3): 133-138.
- Brouns, S. J., M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. Slijkhuis, A. P. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin und J. van der Oost (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321(5891): 960-964.
- Brown, J. H. (1919). The use of blood agar for the study of streptococci. NY Monograph No. 9. The Rockefeller Institute for Medical Research.
- Burns, C. A., R. McCaughey und C. B. Lauter (1985). The association of *Streptococcus bovis* fecal carriage and colon neoplasia: possible relationship with polyps and their premalignant potential. *Am J Gastroenterol* 80(1): 42-46.
- Cassone, M., A. Giordano und G. Pozzi (2007). Bacterial DNA microarrays for clinical microbiology: the early logarithmic phase. *Frontiers in Bioscience* 12: 2658-2669.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17(4): 540-552.
- Champagne, J., M. S. Diarra, H. Rempel, E. Topp, C. W. Greer, J. Harel und L. Masson (2011). Development of a DNA microarray for enterococcal species, virulence, and antibiotic resistance gene determinations among isolates from poultry. *Applied and Environmental Microbiology* 77(8): 2625-2633.
- Corredoira, J., M. P. Alonso, A. Coira, E. Casariego, C. Arias, D. Alonso, J. Pita, A. Rodriguez, M. J. Lopez und J. Varela (2008). Characteristics of *Streptococcus bovis* endocarditis and its differences with *Streptococcus viridans* endocarditis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 27(4): 285-291.
- Courtney, H. S., C. von Hunolstein, J. B. Dale, M. S. Bronze, E. H. Beachey und D. L. Hasty (1992). Lipoteichoic acid and M protein: dual adhesins of group A streptococci. *Microbial Pathogenesis* 12(3): 199-208.
- Crowe, S. E. (2005). Helicobacter infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. *Curr Opin Gastroenterol* 21(1): 32-38.
- Danne, C., J. M. Entenza, A. Mallet, R. Briandet, M. Debarbouille, F. Nato, P. Glaser, G. Jouvion, P. Moreillon, P. Trieu-Cuot und S. Dramsi (2011). Molecular characterization of a *Streptococcus gallolyticus* genomic island encoding a pilus involved in endocarditis. *Journal of Infectious Diseases* 204(12): 1960-1970.
- Darling, A. C., B. Mau, F. R. Blattner und N. T. Perna (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14(7): 1394-1403.
- Dederer, H. (2009). Charakterisierung von *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Isolaten und Etablierung eines Vektor- und Transformationssystems Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Del Vecchio, V. G., J. M. Petroziello, M. J. Gress, F. K. McCleskey, G. P. Melcher, H. K. Crouch und J. R. Lupski (1995). Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33(8): 2141-2144.

- Delcher, A. L., D. Harmon, S. Kasif, O. White und S. L. Salzberg (1999). Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res* 27(23): 4636-4641.
- Deresinski, S. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolutionary, epidemiologic, and therapeutic odyssey. *Clinical Infectious Diseases* 40(4): 562-573.
- Devriese, L. A., P. Vandamme, B. Pot, M. Vanrobaeys, K. Kersters und F. Haesebrouck (1998). Differentiation between *Streptococcus gallolyticus* strains of human clinical and veterinary origins and *Streptococcus bovis* strains from the intestinal tracts of ruminants. *J Clin Microbiol* 36(12): 3520-3523.
- Dieckmann, R., R. Helmuth, M. Erhard und B. Malorny (2008). Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74(24): 7767-7778.
- Dodd, I. B. und J. B. Egan (1987). Systematic method for the detection of potential lambda Cro-like DNA-binding regions in proteins. *J Mol Biol* 194(3): 557-564.
- Dubrow, R., S. Edberg, E. Wikfors, D. Callan, F. Troncale, R. Vender, M. Brand und R. Yapp (1991). Fecal carriage of *Streptococcus bovis* and colorectal adenomas. *Gastroenterology* 101(3): 721-725.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5): 1792-1797.
- Elahi, E. und M. Ronaghi (2004). Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis. *Methods in Molecular Biology* 255: 211-219.
- Ellen, R. P. und R. J. Gibbons (1972). M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infection and Immunity* 5(5): 826-830.
- Ellmerich, S., M. Scholler, B. Duranton, F. Gosse, M. Galluser, J. P. Klein und F. Raul (2000). Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*. *Carcinogenesis* 21(4): 753-756.
- Endtz, H. P., B. A. Giesendorf, A. van Belkum, S. J. Lauwers, W. H. Jansen und W. G. Quint (1993). PCR-mediated DNA typing of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with recurrent infections. *Research in Microbiology* 144(9): 703-708.
- Facklam, R. R. (1972). Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Applied Microbiology* 23(6): 1131-1139.
- Farrow, J. A., D. Jones, B. A. Phillips und M. D. Collins (1983). Taxonomic studies on some group D streptococci. *Journal of General Microbiology* 129(5): 1423-1432.
- Fischetti, V. A. (1989). Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clinical Microbiology Reviews* 2(3): 285-314.
- Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick und *et al.* (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269(5223): 496-512.
- Fodor, S. P., R. P. Rava, X. C. Huang, A. C. Pease, C. P. Holmes und C. L. Adams (1993). Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364(6437): 555-556.
- Garaizar, J., A. Rementeria und S. Porwollik (2006). DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 47(2): 178-189.
- Garcillan-Barcia, M. P., M. V. Francia und F. de la Cruz (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* 33(3): 657-687.
- Glazunova, O. O., D. Raoult und V. Roux (2009). Partial sequence comparison of the *rpoB*, *sodA*, *groEL* and *gyrB* genes within the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59(Pt 9): 2317-2322.

- Glazunova, O. O., D. Raoult und V. Roux (2010). Partial *recN* gene sequencing: a new tool for identification and phylogeny within the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60(Pt 9): 2140-2148.
- Gold, J. S., S. Bayar und R. R. Salem (2004). Association of *Streptococcus bovis* bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy. *Arch Surg* 139(7): 760-765.
- Gould, K., C. H. Ramirez-Ronda, R. K. Holmes und J. P. Sanford (1975). Adherence of bacteria to heart valves in vitro. *J Clin Invest* 56(6): 1364-1370.
- Grant, R. J., T. R. Whitehead und J. E. Orr (2000). *Streptococcus bovis* meningitis in an infant. *Journal of Clinical Microbiology* 38(1): 462-463.
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Journal of Hygiene* 27(2): 113-159.
- Gupta, A., R. Madani und H. Mukhtar (2010). *Streptococcus bovis* endocarditis, a silent sign for colonic tumour. *Colorectal Dis* 12(3): 164-171.
- Hardie, J. M. und R. A. Whiley (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* 26: 1S-11S.
- Headings, D. L., A. Herrera, E. Mazzi und M. A. Bergman (1978). Fulminant neonatal septicemia caused by *Streptococcus bovis*. *Journal of Pediatrics* 92(2): 282-283.
- Healy, M., J. Huong, T. Bittner, M. Lising, S. Frye, S. Raza, R. Schrock, J. Manry, A. Renwick, R. Nieto, C. Woods, J. Versalovic und J. R. Lupski (2005). Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 43(1): 199-207.
- Herzberg, M. C., M. W. Meyer, A. Kilic und L. Tao (1997). Host-pathogen interactions in bacterial endocarditis: streptococcal virulence in the host. *Adv Dent Res* 11(1): 69-74.
- Hinse, D. (2008). Charakterisierung von Virulenzfaktoren bei *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- Hinse, D., T. Vollmer, M. Erhard, M. Welker, E. R. Moore, K. Kleesiek und J. Dreier (2011). Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equinus*-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses. *Systematic and Applied Microbiology* 34(1): 52-57.
- Hinse, D., T. Vollmer, C. Ruckert, J. Blom, J. Kalinowski, C. Knabbe und J. Dreier (2011). Complete genome and comparative analysis of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, an emerging pathogen of infective endocarditis. *BMC Genomics* 12: 400.
- Ho Sui, S. J., A. Fedynak, W. W. Hsiao, M. G. Langille und F. S. Brinkman (2009). The association of virulence factors with genomic islands. *PLoS One* 4(12): e8094.
- Hoen, B., C. Chirouze, C. H. Cabell, C. Selton-Suty, F. Duchene, L. Olaison, J. M. Miro, G. Habib, E. Abrutyn, S. Eykyn, Y. Bernard, F. Marco und G. R. Corey (2005). Emergence of endocarditis due to group D streptococci: findings derived from the merged database of the International Collaboration on Endocarditis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24(1): 12-16.
- Hogg, R. und A. Pearson (2009). *Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus* infection in ducklings. *Veterinary Record* 165(10): 297-298.
- Horvath, P. und R. Barrangou (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327(5962): 167-170.
- Hulton, C. S., C. F. Higgins und P. M. Sharp (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* 5(4): 825-834.
- Hyams, C., E. Camberlein, J. M. Cohen, K. Bax und J. S. Brown (2010). The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and Immunity* 78(2): 704-715.

- Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura und T. Ezaki (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(2): 406-408.
- Kayser, F. H., K. A. Bienz, J. Eckert und R. M. Zinkernagel (1998). *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme Verlag.
- Keim, P., L. B. Price, A. M. Klevytska, K. L. Smith, J. M. Schupp, R. Okinaka, P. J. Jackson und M. E. Hugh-Jones (2000). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 182(10): 2928-2936.
- Kimpe, A., A. Decostere, K. Hermans, J. Mast und E. Haesebrouck (2003). Association of *Streptococcus gallolyticus* strains of high and low virulence with the intestinal tract of pigeons. *Avian Dis* 47(3): 559-565.
- Klein, R. S., R. A. Recco, M. T. Catalano, S. C. Edberg, J. I. Casey und N. H. Steigbigel (1977). Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N Engl J Med* 297(15): 800-802.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne und E. L. Sonnhammer (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305(3): 567-580.
- Lancefield, R. C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci. *Journal of Experimental Medicine* 57: 571-595.
- Leask, R. L., N. Jain und J. Butany (2003). Endothelium and valvular diseases of the heart. *Microscopy Research and Technique* 60(2): 129-137.
- Leport, C., A. Bure, J. Leport und J. L. Vilde (1987). Incidence of colonic lesions in *Streptococcus bovis* and enterococcal endocarditis. *Lancet* 1(8535): 748.
- Lin, I. H., T. T. Liu, Y. T. Teng, H. L. Wu, Y. M. Liu, K. M. Wu, C. H. Chang und M. T. Hsu (2011). Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. *PLoS One* 6(5): e20519.
- Linke, B., A. C. McHardy, H. Neuweger, L. Krause und F. Meyer (2006). REGANOR: a gene prediction server for prokaryotic genomes and a database of high quality gene predictions for prokaryotes. *Appl Bioinformatics* 5(3): 193-198.
- Littman, A. J., E. White, L. A. Jackson, M. D. Thornquist, C. A. Gaydos, G. E. Goodman und T. L. Vaughan (2004). *Chlamydia pneumoniae* infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 13(10): 1624-1630.
- Ludwig, W., E. Seewaldt, R. Kilpper-Balz, K. H. Schleifer, L. Magrum, C. R. Woese, G. E. Fox und E. Stackebrandt (1985). The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of General Microbiology* 131(3): 543-551.
- Mager, D. L. (2006). Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *J Transl Med* 4: 14.
- Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman und B. G. Spratt (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6): 3140-3145.
- Maisey, H. C., M. Hensler, V. Nizet und K. S. Doran (2007). Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J Bacteriol* 189(4): 1464-1467.
- Maisey, H. C., D. Quach, M. E. Hensler, G. Y. Liu, R. L. Gallo, V. Nizet und K. S. Doran (2008). A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *Faseb J* 22(6): 1715-1724.

- Mardis, E. R. (2006). Anticipating the 1,000 dollar genome. *Genome Biol* 7(7): 112.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9: 387-402.
- Marques, M. B., D. L. Kasper, M. K. Pangburn und M. R. Wessels (1992). Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infection and Immunity* 60(10): 3986-3993.
- Marraffini, L. A. und E. J. Sontheimer (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322(5909): 1843-1845.
- Mc Coy, W. C. und J. M. Mason (1951). Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *Journal of the Medical Association of the State of Alabama* 21(6): 162-166.
- Mellmann, A., D. Harmsen, C. A. Cummings, E. B. Zentz, S. R. Leopold, A. Rico, K. Prior, R. Szczepanowski, Y. Ji, W. Zhang, S. F. McLaughlin, J. K. Henkhaus, B. Leopold, M. Bielaszewska, R. Prager, P. M. Brzoska, R. L. Moore, S. Guenther, J. M. Rothberg und H. Karch (2011). Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 6(7): e22751.
- Meyer, F., A. Goesmann, A. C. McHardy, D. Bartels, T. Bekel, J. Clausen, J. Kalinowski, B. Linke, O. Rupp, R. Giegerich und A. Puhler (2003). GenDB--an open source genome annotation system for prokaryote genomes. *Nucleic Acids Res* 31(8): 2187-2195.
- Monecke, S. und R. Ehricht (2005). Rapid genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates using miniaturised oligonucleotide arrays. *Clin Microbiol Infect* 11(10): 825-833.
- Moreillon, P., Y. A. Que und A. S. Bayer (2002). Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 16(2): 297-318.
- Morozova, O. und M. A. Marra (2008). Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 92(5): 255-264.
- Naber, C. K., A. Bauhofer, M. Block, M. Buerke, R. Erbel, W. Graninger, M. Herrmann, D. Horstkotte, P. Kern, H. Lode, U. Mehlhorn, J. Meyer, A. Mügge, J. Niebel, G. Peters, P. M. Saha und K. Werdan (2004). S2 Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der infektiösen Endokarditis. *Z Kardiol* 93: 1005-1021.
- Nagy, E., T. Maier, E. Urban, G. Terhes und M. Kostrzewa (2009). Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 15(8): 796-802.
- Nakamura, M., K. Ogata, T. Nagamine, K. Tajima, H. Matsui und Y. Benno (2000). Characterization of the cryptic plasmid pSBO2 isolated from *Streptococcus bovis* JB1 and construction of a new shuttle vector. *Curr Microbiol* 41(1): 27-32.
- Nemoy, L. L., M. Kotetishvili, J. Tigno, A. Keefer-Norris, A. D. Harris, E. N. Perencevich, J. A. Johnson, D. Torpey, A. Sulakvelidze, J. G. Morris, Jr. und O. C. Stine (2005). Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 43(4): 1776-1781.
- Noble, C. J. (1978). Carriage of group D streptococci in the human bowel. *Journal of Clinical Pathology* 31(12): 1182-1186.
- O'Donovan, L. und J. D. Brooker (2001). Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology* 147(Pt 4): 1025-1033.
- Olive, D. M. und P. Bean (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37(6): 1661-1669.

- Osawa, R., T. Fujisawa und L. I. Sly (1995). *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. Systematic and Applied Microbiology 18: 74-78.
- Pareek, C. S., R. Smoczynski und A. Tretyn (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. J Appl Genet 52(4): 413-435.
- Parker, M. T. und L. C. Ball (1976). Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. Journal of Medical Microbiology 9(3): 275-302.
- Patti, J. M. und M. Hook (1994). Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. Curr Opin Cell Biol 6(5): 752-758.
- Pisani, P., D. M. Parkin, N. Munoz und J. Ferlay (1997). Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 6(6): 387-400.
- Poyart, C., P. Berche und P. Trieu-Cuot (1995). Characterization of superoxide dismutase genes from gram-positive bacteria by polymerase chain reaction using degenerate primers. FEMS Microbiol Lett 131(1): 41-45.
- Poyart, C., G. Quesne und P. Trieu-Cuot (2002). Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of '*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*' as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov. and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 52(Pt 4): 1247-1255.
- Ramirez-Ronda, C. H. (1978). Adherence of glucan-positive and glucan-negative streptococcal strains to normal and damaged heart valves. J Clin Invest 62(4): 805-814.
- Randazzo, C. L., E. E. Vaughan und C. Caggia (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. International Journal of Food Microbiology 109(1-2): 1-8.
- Raskin, D. M., R. Seshadri, S. U. Pukatzki und J. J. Mekalanos (2006). Bacterial genomics and pathogen evolution. Cell 124(4): 703-714.
- Rato, M. G., A. Nerlich, R. Bergmann, R. Bexiga, S. F. Nunes, C. L. Vilela, I. Santos-Sanches und G. S. Chhatwal (2011). Virulence gene pool detected in bovine group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* isolates by use of a group A *S. pyogenes* virulence microarray. Journal of Clinical Microbiology 49(7): 2470-2479.
- Romero, B., M. I. Morosini, E. Loza, M. Rodriguez-Banos, E. Navas, R. Canton und R. D. Campo (2011). Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: still an issue? Journal of Clinical Microbiology 49(9): 3228-3233.
- Rothberg, J. M., W. Hinz, T. M. Rearick, J. Schultz, W. Mileski, M. Davey, J. H. Leamon, K. Johnson, M. J. Milgrew, M. Edwards, J. Hoon, J. F. Simons, D. Marran, J. W. Myers, J. F. Davidson, A. Branting, J. R. Nobile, B. P. Puc, D. Light, T. A. Clark, M. Huber, J. T. Branciforte, I. B. Stoner, S. E. Cawley, M. Lyons, Y. Fu, N. Homer, M. Sedova, X. Miao, B. Reed, J. Sabina, E. Feierstein, M. Schorn, M. Alanjary, E. Dimalanta, D. Dressman, R. Kasinskas, T. Sokolsky, J. A. Fidanza, E. Namsaraev, K. J. McKernan, A. Williams, G. T. Roth und J. Bustillo (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 475(7356): 348-352.
- Ruiz-Garbajosa, P., M. J. Bonten, D. A. Robinson, J. Top, S. R. Nallapareddy, C. Torres, T. M. Coque, R. Canton, F. Baquero, B. E. Murray, R. del Campo und R. J. Willems (2006). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. Journal of Clinical Microbiology 44(6): 2220-2228.
- Rusniok, C., E. Couve, V. Da Cunha, R. El Gana, N. Zidane, C. Bouchier, C. Poyart, R. Leclercq, P. Trieu-Cuot und P. Glaser (2010). Genome sequence of *Streptococcus*

- gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. J Bacteriol 192(8): 2266-2276.
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-5467.
- Sasaki, E., R. Osawa, Y. Nishitani und R. A. Whiley (2004). ARDRA and RAPD analyses of human and animal isolates of *Streptococcus gallolyticus*. J Vet Med Sci 66(11): 1467-1470.
- Sasaki, E., R. Osawa, Y. Nishitani und R. A. Whiley (2004). Development of a diagnostic PCR assay targeting the Mn-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) for identification of *Streptococcus gallolyticus*. Journal of Clinical Microbiology 42(3): 1360-1362.
- Scheld, W. M., J. A. Valone und M. A. Sande (1978). Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin. J Clin Invest 61(5): 1394-1404.
- Schena, M., R. A. Heller, T. P. Theriault, K. Konrad, E. Lachenmeier und R. W. Davis (1998). Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. Trends in Biotechnology 16(7): 301-306.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis und P. O. Brown (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 270(5235): 467-470.
- Schlegel, L., F. Grimont, E. Ageron, P. A. Grimont und A. Bouvet (2003). Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53(Pt 3): 631-645.
- Schleifer, K. H., R. Kilpper-Balz, J. Kraus und F. Gehring (1984). Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and "mutans-like" streptococci. Journal of Dental Research 63(8): 1047-1050.
- Sekizaki, T., H. Nishiya, S. Nakajima, M. Nishizono, M. Kawano, M. Okura, D. Takamatsu, H. Nishino, T. Ishiji und R. Osawa (2008). Endocarditis in chickens caused by subclinical infection of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. Avian Diseases 52(1): 183-186.
- Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P. E. Fournier, J. M. Rolain und D. Raoult (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis 49(4): 543-551.
- Sillanpää, J., S. R. Nallapareddy, X. Qin, K. V. Singh, D. M. Muzny, C. L. Kovar, L. V. Nazareth, R. A. Gibbs, M. J. Ferraro, J. M. Steckelberg, G. M. Weinstock und B. E. Murray (2009). A collagen-binding adhesin, Acb, and ten other putative MSCRAMM and pilus family proteins of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* Group, biotype I). J Bacteriol 191(21): 6643-6653.
- Sillanpää, J., S. R. Nallapareddy, K. V. Singh, M. J. Ferraro und B. E. Murray (2008). Adherence characteristics of endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* ssp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* biotype I) isolates to host extracellular matrix proteins. FEMS Microbiol Lett 289(1): 104-109.
- Silva, L. M., C. G. Baums, T. Rehm, H. J. Wisselink, R. Goethe und P. Valentin-Weigand (2006). Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. Vet Microbiol 115(1-3): 117-127.
- Sly, L. I., M. M. Cahill, R. Osawa und T. Fujisawa (1997). The tannin-degrading species *Streptococcus gallolyticus* and *Streptococcus caprinus* are subjective synonyms. Int J Syst Bacteriol 47(3): 893-894.

- Sorek, R., V. Kunin und P. Hugenholtz (2008). CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* 6(3): 181-186.
- Speer, B. S., N. B. Shoemaker und A. A. Salyers (1992). Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* 5(4): 387-399.
- Staali, L., M. Morgelin, L. Bjorck und H. Tapper (2003). *Streptococcus pyogenes* expressing M and M-like surface proteins are phagocytosed but survive inside human neutrophils. *Cell Microbiol* 5(4): 253-265.
- Steensels, D., J. Verhaegen und K. Lagrou (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Acta Clinica Belgica* 66(4): 267-273.
- Tettelin, H., V. Massignani, M. J. Cieslewicz, C. Donati, D. Medini, N. L. Ward, S. V. Angiuoli, J. Crabtree, A. L. Jones, A. S. Durkin, R. T. Deboy, T. M. Davidsen, M. Mora, M. Scarselli, I. Margarit y Ros, J. D. Peterson, C. R. Hauser, J. P. Sundaram, W. C. Nelson, R. Madupu, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, S. A. Sullivan, S. C. Daugherty, D. H. Haft, J. Selengut, M. L. Gwinn, L. Zhou, N. Zafar, H. Khouri, D. Radune, G. Dimitrov, K. Watkins, K. J. O'Connor, S. Smith, T. R. Utterback, O. White, C. E. Rubens, G. Grandi, L. C. Madoff, D. L. Kasper, J. L. Telford, M. R. Wessels, R. Rappuoli und C. M. Fraser (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39): 13950-13955.
- Thompson, J. D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Tomaso, H., H. C. Scholz, S. Al Dahouk, T. L. Pitt, T. M. Treu und H. Neubauer (2004). Development of 5' nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the *burkholderia mallei*//*burkholderia pseudomallei* complex. *Diagnostic Molecular Pathology* 13(4): 247-253.
- Tripodi, M. F., R. Fortunato, R. Utili, M. Triassi und R. Zarrilli (2005). Molecular epidemiology of *Streptococcus bovis* causing endocarditis and bacteraemia in Italian patients. *Clin Microbiol Infect* 11(10): 814-819.
- Tsakalidou, E., E. Zoidou, B. Pot, L. Wassill, W. Ludwig, L. A. Devriese, G. Kalantzopoulos, K. H. Schleifer und K. Kersters (1998). Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 Pt 2: 519-527.
- Urwin, R. und M. C. Maiden (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* 11(10): 479-487.
- Vacca-Smith, A. M., C. A. Jones, M. J. Levine und M. W. Stinson (1994). Glucosyltransferase mediates adhesion of *Streptococcus gordonii* to human endothelial cells in vitro. *Infect Immun* 62(6): 2187-2194.
- van't Wout, J. W. und H. A. Bijlmer (2005). Bacteremia due to *Streptococcus gallolyticus*, or the perils of revised nomenclature in bacteriology. *Clinical Infectious Diseases* 40(7): 1070-1071.
- Vollmer, T., D. Hinse, K. Kleesiek und J. Dreier (2010). Interactions between endocarditis-derived *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* isolates and human endothelial cells. *BMC Microbiol* 10: 78.
- Weile, J. und C. Knabbe (2009). Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem* 394(3): 731-742.

- Weile, J., R. D. Schmid, T. T. Bachmann, M. Susa und C. Knabbe (2007). DNA microarray for genotyping multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 59(3): 325-338.
- Weinstock, M. (2010). *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* vermittelte Zytokinexpression in Modellsystemen für die infektiöse Endokarditis Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- White, B. A., S. A. Labhsetwar und A. N. Mian (2002). *Streptococcus bovis* bacteremia and fetal death. *Obstetrics and Gynecology* 100(5 Pt 2): 1126-1129.
- Wichelhaus, T. A., V. Schäfer und V. Brade (2000). Typisierungsverfahren in der Infektionsepidemiologie. *Chemotherapie Journal* 9(2): 93-98.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski und S. V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22): 6531-6535.
- Zarkin, B. A., K. D. Lillemoe, J. L. Cameron, P. N. Effron, T. H. Magnuson und H. A. Pitt (1990). The triad of *Streptococcus bovis* bacteremia, colonic pathology, and liver disease. *Ann Surg* 211(6): 786-791; discussion 791-782.
- Zhang, R. und C. T. Zhang (2006). The impact of comparative genomics on infectious disease research. *Microbes Infect* 8(6): 1613-1622.
- Zoetendal, E. G., K. Ben-Amor, A. D. Akkermans, T. Abee und W. M. de Vos (2001). DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology* 24(3): 405-410.
- Zou, W., S. F. Al-Khaldi, W. S. Branham, T. Han, J. C. Fuscoe, J. Han, S. L. Foley, J. Xu, H. Fang, C. E. Cerniglia und R. Nayak (2011). Microarray analysis of virulence gene profiles in *Salmonella* serovars from food/food animal environment. *J Infect Dev Ctries* 5(2): 94-105.

9 Anhang

Tabelle 9-1: Liste der in der molekularen Identifizierung verwendeten Stämmen. *Type strains* sind unterstrichen.

Spezies / Subspezies	Isolat	sodA GenBank Accession Nr.	Taxonomische Bezeichnung in Stammsammlung	Referenz der <i>sodA</i> Sequenz
<i>S. alactolyticus</i>	CCUG 44480	GU991785	<i>S. lutetiensis</i>	diese Arbeit
<i>S. alactolyticus</i>	HDZ 038	GU991741		diese Arbeit
<u><i>S. bovis</i></u>	<u>CCUG 34832 T</u>	<u>Z95896</u>		Poyart <i>et al.</i> 1995
<i>S. bovis</i>	DSM 20480	GU991732		diese Arbeit
<i>S. bovis</i>	LMG 22781	GU991768	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	diese Arbeit
<i>S. bovis</i>	HDZ 035	GU991738		diese Arbeit
<i>S. bovis</i>	HDZ 037	GU991740		diese Arbeit
<u><i>S. equinus</i></u>	<u>DSM 20558 T</u>	<u>GU991726</u>		diese Arbeit
<i>S. equinus</i>	HDZ 032	GU991737		diese Arbeit
<i>S. equinus</i>	LMG 16293	GU991764	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	diese Arbeit
<i>S. equinus</i>	LMG 16294	GU991765	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	diese Arbeit
<i>S. equinus</i>	LMG 16295	GU991766	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATCC 49147	FJ617230	<i>S. gallolyticus</i>	Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATCC 49475	FJ617229		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	ATCC 9809	GU991733	<i>S. gallolyticus</i>	diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	DSM 13808	FJ617227	<i>S. gallolyticus</i>	Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	DSM 16831	FJ617226		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 010	GU991729		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 011	FJ042703		Hinse 2008
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 012	FJ151353		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 014	FJ151354		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 015	FJ151355		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 016	FJ151356		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 019	FJ151357		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 020	FJ151358		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 023	FJ151359		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 025	FJ151360		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 026	FJ151361		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 028	FJ151362		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 034	FJ151363		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 047	GU991744		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 048	GU991745		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 049	GU991746		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 050	FJ151364		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 051	FJ151365		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 052	FJ151366		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 054	GU991748		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	HDZ 055	FJ151367		Vollmer, Hinse <i>et al.</i> 2010
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14621	GU991749		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14622	GU991750		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14623	GU991751		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14634	GU991752		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	CCUG 44395	GU991781		diese Arbeit
<u><i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i></u>	<u>CCUG 35224 T</u>	<u>AJ297183</u>		Poyart <i>et al.</i>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14823	GU991753		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14855	GU991754		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14856	GU991755		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14870	GU991758		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14876	GU991759		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 14878	GU991760		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15572	GU991761		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 15573	GU991762		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 16005	GU991763		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 17956	GU991767		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	LMG 22782	GU991769		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	DSM 20065	GU991723	<i>S. bovis</i>	diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	<u>LMG 18487</u>	GU991771		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	<u>HDZ 085</u>	GU991772		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	<u>LMG 18489</u>	GU991773		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	<u>LMG 18490</u>	GU991774		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	<u>LMG 21596</u>	GU991776		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	CCUG 39970 T	GU991782	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HDZ 083	HQ426964		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	DSM 15351	GU991724		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HDZ 045	GU991742		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HDZ 046	GU991743		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 14862	GU991756	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 14865	GU991757	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	diese Arbeit

Spezies / Subspezies	Isolat	sodA GenBank Accession Nr.	Taxonomische Bezeichnung in Stammsammlung	Referenz der sodA Sequenz
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	LMG 22784	GU991770	<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HDZ 013	GU991730		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	HDZ 053	GU991747		diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	CCUG 42618	GU991778	<i>S. bovis</i>	diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	CCUG 46074	GU991780	<i>S. gallolyticus</i>	diese Arbeit
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	CCUG 46150 T	GU991783		diese Arbeit
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	HDZ 017	GU991731		diese Arbeit
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	CCUG 47736	GU991779	<i>S. equinus</i>	diese Arbeit
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	HDZ 007	GU991727		diese Arbeit
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	HDZ 029	GU991735		diese Arbeit
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	HDZ 030	GU991736		diese Arbeit
<i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	CCUG 43820 T	AJ297184		Poyart <i>et al.</i> 1995
<i>S. lutetiensis</i>	CCUG 41793	GU991777	<i>S. bovis</i>	diese Arbeit
<i>S. lutetiensis</i>	HDZ 027	GU991734		diese Arbeit
<i>S. lutetiensis</i>	HDZ 036	GU991739		diese Arbeit
<i>S. lutetiensis</i>	CCUG 46149 T	AJ297189		Poyart <i>et al.</i> 1995
<i>S. peroris</i>	CCUG 36756	GU991784	<i>S. infantis</i>	diese Arbeit
<i>S. peroris</i>	CCUG 39814 T	DQ232541		Glazunova <i>et al.</i> 2005
<i>S. suis</i>	DSM 9682 T	GU991725		diese Arbeit
<i>S. suis</i>	HDZ 009	GU991728		diese Arbeit

Tabelle 9-2: Vergleich der Consensus-Spektren der individuellen Subspezies des *S. bovis* / *equinus* Komplex. Subspeziespezifische Signale sind *kursiv* und Signale die in allen Subspezies vorkommen **fett** gekennzeichnet.

<i>m/z</i>		<i>Streptococcus</i>				
Von	bis	<i>gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	<i>gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	<i>gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	<i>infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	<i>equinus</i> / <i>bovis</i>
3023	3026					3025
3034	3036	3035				
3040	3042			3041		
3055	3058				3057	
3111	3113	3112				
3123	3125					3124
3191	3193					3192
3244	3247	3246		3245	3246	3246
3375	3378	3376	3377			3376
3420	3422	3421		3421	3422	3421
3495	3498	<u>3497</u>	<u>3496</u>	<u>3496</u>	<u>3497</u>	<u>3497</u>
3651	3654			3653		
3663	3666					3664
3671	3674		3672			
3761	3764		3762			3763
3772	3775		3772	3776	3774	3773
3826	3830					3828
3944	3947			3946		
3972	3975	3973	3973		3974	3973
4060	4063					4062
4175	4178	4177		4176	4177	4176
4298	4302					4300
4404	4408	4405			4405	4404
4437	4440	4438	4438		4439	4438
4519	4523		4521	4521		
4536	4539	<u>4538</u>	<u>4538</u>	<u>4537</u>	<u>4538</u>	<u>4537</u>
4556	4560				4558	
4608	4611	4610	4610			
4796	4800			4797		
4803	4807	4803	4803		4805	4804

<i>m/z</i>		<i>Streptococcus</i>				
Von	bis	<i>gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	<i>gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	<i>gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	<i>infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	<i>equinus</i> <i>/bovis</i>
4816	4820		4818			
5097	5101				5099	
5140	5144	5142	5142			
5153	5157			5154		5157
5179	5183	5181	5180	5181	5181	
5245	5249	5248	5247	5246		5247
5386	5390			5386	5390	
5413	5418	5415	5416		5416	5416
5447	5451				5449	5448
5461	5465	5464	5463	5462		
5496	5501					5499
5536	5540		5538			
5591	5596					5594
5739	5744	5744			5739	5744
5924	5929				5927	5926
5966	5971	<u>5969</u>	<u>5969</u>	<u>5968</u>	<u>5969</u>	<u>5969</u>
6069	6074	6073	6071			
6087	6092	6092	6088			6092
6094	6099	6094			6096	6094
6109	6113			6109	6113	6113
6133	6137				6137	6137
6208	6213		6210			
6221	6226	6224		6222		
6247	6252					6249
6448	6453	<u>6451</u>	<u>6450</u>	<u>6450</u>	<u>6452</u>	<u>6451</u>
6490	6495	<u>6493</u>	<u>6493</u>	<u>6492</u>	<u>6493</u>	<u>6493</u>
6630	6636			6633	6633	6633
6648	6654				6651	
6654	6660					6657
6752	6758	6754	6756			6754
6770	6776				6773	
6828	6834			6831		
6840	6846	6843	6843		6843	6843
6991	6996	6993	6993		6994	6993
7210	7216		7216		7211	7210
7304	7309			7307		
7344	7349		7347			
7478	7484					7481
7728	7734				7733	7728
7889	7895			7892		
7944	7950	7947	7947		7947	7947
8003	8009	8007				8006
8122	8129				8126	8125
8350	8357	8356		8352	8353	8353
8485	8492	8492				8485
8495	8501	8495			8498	
8806	8813	8809	8810			8809
8831	8838			8835		
9072	9079				9075	9075
9586	9593			9593		
10355	10363				10359	
12182	12192					12187

Tabelle 9-3: Vergleich von vollständig sequenzierten Streptokokkus Genomen mit *S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* BAA-2069

<u>Strain</u>	<u>GenBank Acc No:</u>	<u>GC %</u>	<u>kodierend %</u>	<u>Größe bp</u>	<u>ORFs</u>	<u>tRNA s</u>	<u>rRNA s</u>
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> BAA-2069	FR824043	38	87	2,356,444	2,309	80	21
<i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> UCN34	FN597254	37	86	2,350,911	2,349	71	18
<i>S. agalactiae</i> A909	CP000114	35	86	2,127,839	2,136	80	21
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> GGS_124	AP010935	39	86	2,106,340	2,174	57	15
<i>S. equi</i> subsp. <i>equi</i> 4047	FM204883	41	80	2,253,793	2,243	66	18
<i>S. sanguinis</i> SK36	CP000387	43	88	2,388,435	2,348	61	12
<i>S. suis</i> BM407	FM252032	41	83	2,146,229	2,118	52	12
<i>S. uberis</i> 0140J	AM946015	36	87	1,852,352	1,908	59	15
<i>S. pyogenes</i> MGAS9429	CP000259	38	87	1,836,467	1,962	67	18
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 700669	FM211187	39	82	2,221,315	2,224	58	12
<i>S. mutans</i> NN2025	AP010655	36	85	2,013,587	1,976	65	15
<i>S. mitis</i> B6	FN568063	39	86	2,146,611	2,098	61	12
<i>S. thermophilus</i> LMD-9	CP000419	39	76	1,856,368	2,002	67	18
<i>S. gordonii</i> str. <i>challis</i> substr. CH1	CP000725	40	87	2,196,662	2,150	59	12
<i>S. oralis</i> ATCC 35037	AEDW0000 000	41	90	1,905,531	1,886	n.d.	n.d.
<i>S. salivarius</i> SK126	ACLO00000 000	40	88	2,128,332	2,034	n.d.	n.d.

Tabelle 9-4: Liste aller im Microarray-Experiment verwendeten *Targets* und deren Beschreibung, sowie deren erweiterte Beschreibung / putative Funktion.

Nr.	Name	Cluster	Gen	Beschreibung	erweiterte Beschreibung / Anmerkung
1	Gallo_0088_s	1	<i>ComGB</i>	putative competence protein	
2	Gallo_0261_s	1	<i>Rep</i>	putative replication initiation protein	
3	Gallo_0452_s	1		putative conserved phage protein	
4	Gallo_0917_s	1		putative phospho-beta-glucosidase	
5	Gallo_1081_s	1		putative ABC transporter, ATP-binding/permease protein	
6	Gallo_1306_s	1		predicted membrane protein	
7	Gallo_1388_s	1		putative alpha/beta hydrolase	
8	Gallo_1389_s	1		FMN-binding protein	
9	Gallo_1420_s	1		putative MATE family multidrug efflux pumps	
10	Gallo_1425_s	1		putative permease	
11 + 12	Gallo_1439_s	1	<i>cas5</i>	CRISPR-associated protein, CsnI family	
13	Gallo_1445_s	1		CRISPR-associated protein CasI-like	
14	Gallo_1649_s	1		putative peptidoglycan linked serine rich protein (LPXTG motif)	
15	Gallo_1664_s	1		hypothetical protein	
16	Gallo_1675_s	1		putative peptidoglycan linked protein (LPXTG motif)	
17	Gallo_1687_s	1	<i>tetM</i>	tetracycline resistance protein	
18	Gallo_1715_s	1		putative permeases of the major facilitator superfamily	
19	Gallo_1778_s	1		conserved domain protein	
20	Gallo_1851_s	1		putative Glycoside hydrolase	
21	Gallo_1856_s	1		putative helicase	
22	Gallo_1940_s	1		putative ABC transporter	
23	c00440_s	2	<i>norN</i>	Multidrug resistance protein mdtK	
24	c00900_s	2		Lactacin 48 I/lactococcin biosynthesis protein lcnDR2	
25	c00930_s	2		Lactacin 48 I/lactococcin biosynthesis protein lcnDR2	
26 + 27	c01020_s	2	<i>pbp</i>	multimodular transpeptidase-transglycosylase PBP 1B Penicillin-binding protein 1A;	
28 + 29	c01480_s	2	<i>pbp2</i>	penicillin-binding protein 2A	
30	c02260_s	2		multiple antibiotic resistance protein marR	
31	c03220_s	2		Multiple antibiotic resistance protein marR	
32 + 33	c04040_s	2	<i>pbpX</i>	penicillin-binding protein 2X	
34 + 35	c04150_s	2		penicillin-binding protein 1A	
36	c04610_s	2		macrolide-efflux protein	
37 + 38	c05940_s	2	<i>penA</i>	penicillin-binding protein 2B	
39	c06750_s	2	<i>yxcB</i>	TetR family transcriptional regulator	
40	c07920_s	2	<i>bsh</i>	chologycine hydrolase resistenz gegen Gallensäure	

Nr.	Name	Cluster	Gen	Beschreibung	erweiterte Beschreibung / Anmerkung
41	c08370_s	2		Metallo-beta-lactamase superfamily protein	Predicted hydrolase of the metallo-beta-lactamase superfamily
42	c08650_s	2	<i>norM</i>	multidrug resistance protein Na ⁺ -driven multidrug efflux pump	
43	c10440_s	2	<i>matE</i>	multidrug resistance protein mdtK	
44	c10630_s	2	<i>prevent</i>	prevent-host-death family antitoxin	
45	c10910_s	2	<i>nisG</i>	antibiotic transport system permease protein	
46	c10930_s	2	<i>nisF</i>	lanthibiotic ABC transporter, ATP-binding protein	COG: ABC-type sugar transport systems, ATPase components
47	c15780_s	2	<i>vicX</i>	Metallo-beta-lactamase superfamily	COG: Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily I
48	c16900_s	2	<i>norNI</i>	MATE efflux family protein	
49	c19060_s	2		putative beta-lactamase	COG: Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins
50	c19420_s	2		metallo-beta-lactamase superfamily protein	COG: Predicted hydrolase of the metallo-beta-lactamase superfamily
51	c19830_s	2	<i>comA</i>	ATP-binding cassette, subfamily C, bacterial, competence factor transporting protein	COG: ABC-type bacteriocin/lantibiotic exporters, contain an N-terminal double-glycine peptidase domain
52	c22690_s	2		Antibiotic biosynthesis monooxygenase	
53	<i>ermA_s</i>	2	<i>ermA</i>	Genes for enzymes causing macrolide	D86934 Rapid genotyping of MRSA using miniaturised oligonucleotide arrays
54	<i>ermB_s</i>	2	<i>ermB</i>	erythromycin resistance methylase	FJ667784 EF422365.1 EF426854
55	<i>ermC_s</i>	2	<i>ermC</i>	erythromycin resistance	M17990.1
56	<i>ermT_s</i>	2	<i>ermT</i>	<i>erm(T)</i> -containing 4,107-bp nucleotide sequence from <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	AY894138.1
57	<i>mefA_s</i>	2	<i>mefA</i>	macrolide-efflux protein	FJ667795
58	<i>mefE_s</i>	2	<i>mefE</i>	macrolide-efflux protein	FJ667794
59	p00080_s	2	<i>tet(O/W/32/O)</i>	putative tetracycline resistance protein	
60	p00110_s	2	<i>tetL</i>	Tetracycline resistance protein	
61	<i>vanA_s</i>	2	<i>vanA</i>	Vancomycin resistance protein A	HM565172
62	<i>vanB_s</i>	2	<i>vanB</i>	Vancomycin resistance protein B	AY665551
63	<i>vanC1_s</i>	2	<i>vanC1</i>	Vancomycin resistance protein C	AY033764
64 + 65	c01280_s	3	<i>fruA</i>	LPxTG fructan beta-fructosidase	
66 + 67	c05110_s	3	<i>cna</i>	LPxTG Collagen adhesin	
68 + 69	c07210_s	3	<i>prtS</i>	LPxTG lactocepin	C5a peptidase
70	c10430_s	3	<i>spaP</i>	LPxTG Agglutinin receptor	Glucan-binding protein C/Surface antigen I/II, V-region
71 + 72	c13880_s	3	<i>dex</i>	LPxTG Dextranase	Alpha-1,6-glucan-6-glucanohydrolase
73	c13900_s	3	<i>hae</i>	LPxTG Filamentous hemagglutinin	
74 + 75	c14850_s	3	<i>pulA</i>	LPxTG pullulanase	type II secretory pathway, pullulanase PulA and related glycosidases
76 + 77	c15950_s	3	<i>fszB</i>	LPxTG Fimbrial subunit type 2	
78 + 79	c15960_s	3	<i>cnaI</i>	LPxTG Collagen adhesin	

Nr.	Name	Cluster	Gen	Beschreibung	erweiterte Beschreibung / Anmerkung
80 + 81	c16150_s	3	<i>nanaA</i>	LPxTG peptidoglycan linked protein	putative beta-lactamase hepE
82	c16640_s	3	<i>pmrB</i>	LPxTG major facilitator superfamily permease	
83	c19780_s	3	<i>blpT</i>	LPxTG putative immunity/modification protein	
84 + 85	c19910_s	3	<i>cna2</i>	LPxTG Collagen adhesin precursor	
86	c19970_s	3	<i>trs</i>	LPxTG putative major pilus subunit	Collagen-binding surface protein Cna-like, B region
87 + 88	c19980_s	3	<i>FN1</i>	LPxTG Fibronectin	Protein of unknown function DUF1085
89 + 90	c20560_s	3	<i>pac</i>	LPxTG putative major cell-surface adhesin	
91	c20570_s	3	<i>agr</i>	LPxTG putative agglutinin receptor	
92	c20580_s2	3	<i>fhg</i>	LPxTG Filamentous hemagglutinin	
93	c21750_s2	3	<i>fszB</i>	LPxTG backbone pilus subunit	
94	c21760_s	3	<i>cna3</i>	LPxTG Collagen adhesin	Collagen-binding surface protein Cna-like, B region
95	c22120_s	3	<i>cbp</i>	LPxTG Cortactin-binding protein	
96 + 97	c22310_s	3	<i>sypA</i>	LPxTG putative agglutinin receptor	Glucan-binding protein C Glucan-binding protein C/Surface antigen I/II, V-region
98	c01330_s	4		sugar-binding periplasmic protein	Proteins with serine rich domains
99	c01390_s	4		ABC superfamily ATP binding cassette transporter substrate binding/membrane-spanning protein	Proteins with serine rich domains
100	c01810_s	4		Multiple sugar-binding protein	Proteins with serine rich domains
101	c02100_s	4	<i>msmE</i>	Uncharacterized ABC transporter extracellular-binding protein yurO	Proteins with serine rich domains
102	c03120_s	4	<i>oppA</i>	Periplasmic oligopeptide-binding protein	Proteins with serine rich domains
103	c04070_s	4		polar amino acid ABC uptake transporter substrate binding protein	Proteins with serine rich domains
104	c07270_s	4		Maltose-binding periplasmic proteins/domains	Proteins with serine rich domains
105	c08530_s	4	<i>fatB</i>	ferrichrome ABC transporter, substrate-binding protein	Proteins with serine rich domains
106	c09750_s	4		amino acid ABC transporter, extracellular amino acid-binding protein	Proteins with serine rich domains
107	c11240_s	4		Basic membrane protein A	Proteins with serine rich domains
108	c11370_s	4	<i>pstS</i>	Phosphate-binding protein pstS	Proteins with serine rich domains
109	c12250_s	4		amino acid ABC transporter, substrate binding protein	Proteins with serine rich domains
110	c14140_s	4		amino acid ABC transporter, amino acid-binding protein	Proteins with serine rich domains
111	c14160_s	4		polar amino acid transport system substrate-binding protein	Proteins with serine rich domains
112	c14170_s	4		putative amino acid transporter, amino acid-binding protein	Proteins with serine rich domains
113	c14210_s	4	<i>malE</i>	maltose/maltodextrin transport system substrate-binding protein	Proteins with serine rich domains

Nr.	Name	Cluster	Gen	Beschreibung	erweiterte Beschreibung / Anmerkung
114	c14340_s	4	<i>oppA1</i>	peptide/nickel transport system substrate-binding protein	Proteins with serine rich domains
115	c14350_s	4	<i>oppA2</i>	peptide/nickel transport system substrate-binding protein	Proteins with serine rich domains
116	c17190_s	4	<i>livK</i>	branched-chain amino acid transport system substrate-binding protein	Proteins with serine rich domains
117	c17310_s	4	<i>ftuD</i>	iron (Fe+3) ABC superfamily ATP binding cassette transporter, binding protein	Proteins with serine rich domains
118	c18040_s	4	<i>ambB</i>	ABC superfamily ATP binding cassette transporter, binding protein	Proteins with serine rich domains
119	c18050_s	4	<i>hipO1</i>	polar amino acid transport system substrate-binding protein	Proteins with serine rich domains
120	c19160_s	4		Phosphate-binding protein pstS	Proteins with serine rich domains
121	c21280_s	4		Probable D-methionine-binding lipoprotein metQ	Proteins with serine rich domains
122	Sbs11_s	5	<i>FimI</i>	pilus subunit protein (46 %)	Homologie zu SGGBAA2069_c21750
123	Sbs12_s	5	<i>Cna</i>	B repeats of <i>S. aureus</i> Cna (61 %)	Homologie zu SGGBAA2069_c15960
124	Sbs16_s	5		B repeats of <i>S. aureus</i> Cna B (62 %)	Homologie zu SGGBAA2069_c05110
125	hybcontrol_s	6		Hybridisierungskontrolle	
126	sodA_all_s	6	<i>sodA</i>	Variante für alle <i>S. gallolyticus</i>	
127	sodA_mace_s	6	<i>sodA</i>	Variante für <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>macedonicus</i>	
128	sodA_pasteu_s	6	<i>sodA</i>	Variante für <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>pasteurianus</i>	
129+130	c00940_s	7	<i>bhtT</i>	Toxin RTX-1	
131	c02280_s	7	<i>def</i>	Peptide deformylase;	COG: Hemolysins and related proteins containing CBS domains
132	c03460_s	7	<i>lytR</i>	LytR family transcriptional regulator	involved in biofilm formation, cell division, autolysis and the regulation of acid and oxidative stress tolerance. May be associated with systemic virulence in blood.
133+134	c04910_s	7	<i>yuk</i>	FtsK/SpoIIIE family protein / diarrheal toxin	
135	c05260_s	7		Peptidase A24A, prepilin type IV	type IV pili
136	c05730_s	7		putative hemolysin A	
137	c06530_s	7		putative serine rich lipoprotein	COG: Large exoproteins involved in heme utilization or adhesion
138	c06800_s	7		hypothetical protein Hemolysins and related proteins containing CBS domains	
139	c07880_s	7		putative lipoprotein	COG: Autotransporter adhesin
140+141	c08170_s	7		fibronectin-binding protein	Serologically defined colon cancer antigen 1 homolog
142	c11130_s	7		conserved hypothetical protein	COG: putative Zn-dependent protease, contains TPR repeats
143	c12530_s	7	<i>hlyIII</i>	hemolysin III	

Nr.	Name	Cluster	Gen	Beschreibung	erweiterte Beschreibung / Anmerkung
144	c13480_s2	7	<i>GBSII</i>	Gag-Pol polyprotein	Matrix protein p17 has two main functions: in infected cell, it targets Gag and Gag-pol polyproteins to the plasma membrane via a multiparite membrane-binding signal, that includes its myristoinegration complex
145	c13550_s	7	<i>ebaA</i>	Pore-forming protein ebsA	
146	c13700_s	7		Group II intron-interrupted relaxase ltrB	COG: Type IV secretory pathway, VirD2 components (relaxase)
147	c13750_s	7	<i>traD</i>	Type IV secretion system-coupling protein virD4	COG: Type IV secretory pathway, VirD4 components
148	c13810_s	7		hypothetical protein	COG: Type IV secretory pathway, VirB4 components
149+150	c14260_s	7	<i>ghnH</i>	Virulence sensor protein bvgS ; amino acid-binding/permease protein	
151	c15550_s	7		K08303 putative protease	Peptidase collagenase
152	c15930_s	7		myosin-crossreactive antigen	
153+154	c16140_s	7	<i>espP</i>	Serine protease	Extracellular serine protease plasmid-encoded
155+156	c17280_s	7	<i>mviN</i>	Virulence factor mviN; Polysaccharide biosynthesis protein	
157	c17410_s	7	<i>hlyX</i>	putative hemolysin	
158	c20050_s	7	<i>scbA</i>	putative manganese ABC transporter, substrate-binding liprotein and adhesin	Proteins with serine rich domains
159+160	c21360_s	7		virulence-associated protein E	
161	c22170_s	7		conjugative transposon protein	COG: Type IV secretory pathway, VirB4 components
162	c22960_s	7		protease	COG: predicted Zn-dependent peptidases
163	c23080_s	7	<i>htrA</i>	endopeptidase DegP	COG: Trypsin-like serine proteases, typically periplasmic, contain C-terminal PDZ domain
164+165	c01850_s	8	<i>rafA</i>	alpha-galactosidase	
166	c02130_s	8	<i>gffA</i>	Sucrose glucosyltransferase	
167+168	c03560_s	8		cellulose synthase (UDP-forming) putative glycosyltransferases	
169	c06860_s	8		glycosyltransferase I	
170	c08850_s	8	<i>pcaC</i>	carboxymuconolactone decarboxylase gallat decarboxylase?	
171	c09070_s	8	<i>tanA</i>	tannase	
172	c09080_s	8	<i>tanAI</i>	tannase	
173	c10380_s	8		putative glycosyltransferase	
174+175	c10400_s	8	<i>gffB</i>	dextranucrase	
176+177	c10420_s	8	<i>gffBI</i>	glucosyltransferase-I	
178	c11030_s	8	<i>Alg5</i>	Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	
179+180	c11870_s	8		Glucosyltransferase-I	
181	c13610_s	8		glucosyltransferase	

Nr.	Name	Cluster	Gen	Beschreibung	erweiterte Beschreibung / Anmerkung
182	c14010_s	8	<i>rgpE</i>	putative glycosyltransferase	
183	c14040_s	8		rhamnosyltransferase	
184	c18750_s	8		acyltransferase	
185	c19740_s	8		Glycosyl transferase family 2	
186+187	c20320_s	8	<i>gbpC</i>	putative glucan-binding protein C	
188	c21040_s	8	<i>pdc</i>	Phenolic acid decarboxylase gallat decarboxylase?	
189	c03530_s	9		Probable diguanylate cyclase yeaP	
190	c09170_s	9	<i>epsX</i>	Probable Transcription regulator	
191	c09180_s	9	<i>epsY</i>	putative transcriptional regulator	
192	c09190_s	9	<i>epsA</i>	capsular polysaccharide biosynthesis protein CpsA	putative biofilm involvement
193	c09200_s	9	<i>epsB</i>	capsular polysaccharide biosynthesis protein CpsB	
194	c09210_s	9	<i>epsC</i>	capsular polysaccharide biosynthesis protein cpsC	
195	c09220_s	9	<i>epsD</i>	tyrosine-protein kinase CpsD	
196	c09230_s	9	<i>epsE</i>	exopolysaccharide glycosylphosphotransferase	biosynthesis polyprenyl
197	c09240_s	9	<i>epsF</i>	rhamnosyl transferase	
198	c09250_s	9	<i>epsH</i>	oligosaccharide repeat unit polymerase	
199	c09260_s	9	<i>epsI</i>	utative glycosyltransferase	
200	c09270_s	9	<i>epsJ</i>	capsular polysaccharide biosynthesis protein-like protein	
201	c09280_s	9	<i>epsK</i>	Polysaccharide biosynthesis protein Polysaccharide biosynthesis protein	
202	c09290_s	9	<i>epsL</i>	CDP-glycerol:poly(glycerophosphate) glycerophosphotransferase	
203	c09300_s	9	<i>epsM</i>	glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase	
204	c19300_s	9	<i>hxtB</i>	6-phospho-3-hexuloisomerase (capsule?)	
205	c21150_s	9	<i>kpsF</i>	arabinose-5-phosphate isomerase (involved in capsule formation)	
206	c11150_s	10	<i>srtA</i>	Sortase family Peptidase C60, sortase A/B	
207	c15940_s	10	<i>srtC</i>	sortase family protein Peptidase	
208	c20330_s	10	<i>srtA1</i>	Sortase family Peptidase C60, sortase A/B	
209	c21740_s	10	<i>srtC1</i>	sortase SrtC2	
210	c22140_s	10	<i>srtA2</i>	Sortase family sortase_fam: sortase family protein Peptidase C60, sortase A/B	
211	c05700_s	11	<i>xseA</i>	exodeoxyribonuclease VII large subunit	

Nr.	Name	Cluster	Gen	Beschreibung	erweiterte Beschreibung / Anmerkung
212	c05710_s	11	<i>xxeB</i>	exodeoxyribonuclease VII small subunit	
213+214	c10290_s	11	<i>sthIR</i>	DNA endonuclease, type III restriction and modification system	
215	c22470_s	11	<i>Eco47II</i>	type II restriction enzyme (Eco47II, Sau96I)	
216	c00180_s	12	<i>pcsB</i>	peptidoglycan hydrolase / glucan binding protein	
217	c01060_s	12	<i>cglA</i>	General secretion pathway protein E	
218	c01070_s	12		putative competence protein ComGC	
219	c01080_s	12		competence protein ComGD	
220	c01170_s	12	<i>CAAX</i>	CAAX amino protease-like	
221	c02620_s	12		hypothetical protein predicted by Glimmer/Critica	
222	c03550_s	12	<i>dpm</i>	dolichyl-phosphate mannosase synthase	
223	c04310_s	12	<i>YvqF</i>	transporter YvqF	
224	c05070_s	12	<i>CAAX</i>	CAAX amino terminal protease family protein	
225	c05650_s	12	<i>comD</i>	two-component system, sensor histidine kinase	
226	c05790_s	12	<i>hup</i>	DNA-binding protein HU	
227 + 228	c07530_s	12	<i>pulA</i>	pullulanase	
229	c08380_s	12		Zn-dependent protease	COG: predicted Zn-dependent protease
230 + 231	c08690_s	12		conserved hypothetical protein Large exoprotein	
232	c10320_s	12		FtsK/SpoIIIE family protein	COG: DNA segregation ATPase FtsK/SpoIIIE and related proteins
233	c11660_s	12		putative cyclase family protein	COG: Predicted metal-dependent hydrolase
234	c13800_s	12		putative CHAP domain protein	COG: Surface antigen
235	c15390_s	12	<i>pepF</i>	oligoendopeptidase F	COG: Oligoendopeptidase F

Tabelle 9-5: Liste aller im Microarray-Experiment verwendeten Sonden- und Primer-Sequenzen, sowie die zugehörigen Nummern und Cluster.

Nr.	Name	Cluster	Sonde 5' - 3'	Primer 5' - 3'
1	Gallo_0088_s	1	TGGAATCCGGCTTATTCG	GGCGTTTATCGCAGATTG
2	Gallo_0261_s	1	CAATGGGCTGTACAATC	AGCTGAGGGCTATGTTAC
3	Gallo_0452_s	1	CTCACCAGCCATACTACG	TAGCCAGGGATTGAGAG
4	Gallo_0917_s	1	TTAGAGCCAGCTGTCAAG	CTGCCAGTCAGTTGAAG
5	Gallo_1081_s	1	TCATGAGACCCTCCATTC	GCTGGTCGATACAAACAC
6	Gallo_1306_s	1	CCTATGAGTTGGCTATGC	CCGACGTTTAAGCCAATC
7	Gallo_1388_s	1	GTCTATGGGCGGGTATATC	ACGGTGATGAGTCAATGG
8	Gallo_1389_s	1	CGGATACTCTTGCCAGTAG	GCCGTTAAATCCCTCTAC
9	Gallo_1420_s	1	TCCCTTAACGACGATCTG	CAGATTAAACCCGGAAGC
10	Gallo_1425_s	1	TTGTCCCTATCGGCATTG	GATTGCCTTTAAGCCAAA
11	Gallo_1439_s	1	GGTATCGAAGACGCTATC	CGGAGATTTGTCCCTCAG
12	Gallo_1439_s2	1	CCATGCCGAATGTCAAAC	TTCTCCCAAAGCCTCAAC
13	Gallo_1445_s	1	TGACGCCTTACTATGGAC	GGGCAATAATCGTTGTCC
14	Gallo_1649_s	1	TCCGTGATGTAACGACTG	CCCGCTTGAATATCTGTG
15	Gallo_1664_s	1	GGAACGTGAGCTTAAAGG	CCCTCAACCAGCAATTC
16	Gallo_1675_s	1	AGATGAGGCTGTTGTACC	CTTGCTGGCTCAACAATC
17	Gallo_1687_s	1	ACAGTGGAGCGATTACAG	AGCGTATTATCCGTCCTC
18	Gallo_1715_s	1	ATACCCAGCACCTAATCC	CTGCTCTATCTAGGGTATGG
19	Gallo_1778_s	1	ACGAAATGGACAGGATG	TTGTTCCCGTAGAATCCC
20	Gallo_1851_s	1	GAGTTAGAGCCGAATGAG	TTGGCTGGATACCGTAAG
21	Gallo_1856_s	1	CTGCACCAACAAGTACAG	TAAAGCCCTGGAAGGAAC
22	Gallo_1940_s	1	CAAGAGCAAGAGCATAACC	CCATTACATGGCTGGAAG
23	c00440_s	2	TAGGCTAACTCCCAACAC	GCAAGGTTTGGGCAATG
24	c00900_s	2	AACCTCTGCGTATACTGC	GAGCTCTGTCATAGTG
25	c00930_s	2	TGACTACCCCTCTAGTCA	AGAGGTGCATAGAGAAGC
26	c01020_s	2	CATTGCCGTTCTTCTTC	GTCAATCATGCACGGTAG
27	c01020_s2	2	ATCCTCCTCGTCTTTCAG	CCACAAAGTCCGATTGTC
28	c01480_s	2	TTACCTGCCATCGTGTAG	GATGCTCGGAACATTCTC
29	c01480_s2	2	AGCTTCATCAGCCTCTTC	GACAAATCGCCGCAATAC
30	c02260_s	2	CCGTCATATTGCCAGAAG	GACACCGACTCAATTTGG
31	c03220_s	2	TAAGTGAACAACACGGCG	CGCTCGGAACAATAACC
32	c04040_s	2	CTTCTGATGTCGCTACAC	GGTGGTGTTCATGCTAGAG
33	c04040_s2	2	TATCTCCTGGGCTTTCAC	GACTAGTACAGCGGTAAC
34	c04150_s	2	TTCCTCAAGCTCCTAGTC	GGTATCACGACGACTTTG
35	c04150_s2	2	GGGACCGTCAATACTATG	CTGGGCAATGGATAAGTC
36	c04610_s	2	TAGTCTGGGCGCAATATG	GCTCTTTATGCCTCTTGG
37	c05940_s	2	CTAGAGACATGCCTGAGTAG	CGGCTCAACAAACATCAC
38	c05940_s2	2	CAAGGGCATCAAGAGTAG	TTAGCAATGGCTGGACTC
39	c06750_s	2	TAATAACGCCCATGACGG	CTTGGTCTAACCCTCATC
40	c07920_s	2	TGGCGATACAGGATAGTC	CTTGTCGAGTGTGAAAG
41	c08370_s	2	ACCTGCTGAATACGAACC	TATCGCAGATGCTGAAGG
42	c08650_s	2	GCTGCGCCACAATTATAC	CAATTACGCCAGCAGTTC
43	c10440_s	2	CGTCGTCCGATAAGGATAC	CATTTACGGGCATATGGG
44	c10630_s	2	TGCTCGAGGTAGATGATG	AAGGAGTGGCGTCAATC
45	c10910_s	2	GAAATAGCCGAGCAACAC	ACGACAATCCACCCTATC
46	c10930_s	2	GCTGATACAGGACGAAAG	GCCATTCCAATCCCTAAG
47	c15780_s	2	ACGTTTCAGGCTCTTATCC	CAGCACCATCTTCGTTTG
48	c16900_s	2	CGCCAGCCATAATATTGC	CCCTTTGCCATACCAATC
49	c19060_s	2	TGGTGCGGTATTATCCTG	AGCCCACTACTATGTGTC
50	c19420_s	2	TAGCATCACGGAGAAGTC	CTGGACCATTAGCTCTTG
51	c19830_s	2	TAGCCACCAAGGGTAATC	ATCAGCGGTTCTGGTAAG
52	c22690_s	2	GTTGTCCCAACGTGAAAC	ACGAGGTCTGGATTCAAG

Nr.	Name	Cluster	Sonde 5' - 3'	Primer 5' - 3'
53	ermA_s	2	GATTGGTTCAGGAAAGG	TATTTCAATGGCGTTAC
54	ermB_s	2	AGAGCAACCCTAGTGTTT	GCGTCTGACATCTATCTG
55	ermC_s	2	GTGGAATACGGGTTTGC	GCCAATGAGCGTTTTG
56	ermT_s	2	CCTTTCCCTGAACCAATC	TTTATTACTTCAAAGCATCAT
57	mefA_s	2	CACAGCACCCAATACATC	GCAGCACTCTTATACTCC
58	mefE_s	2	GACAGGTAGCTCCATACAG	GTGCAGTGCTTGCTATTG
59	p00080_s	2	TAGGGAGCGTAGATGAAG	ACTGCTGTCTGGATAGTG
60	p00110_s	2	CAGGGTTTGTCTCTATGG	CTTCCGATTTTCGGCAGTA
61	vanA_s	2	CTTTGCATGGCAAGTCAG	AGGGATACCGGACAATTC
62	vanB_s	2	GATGGATGCGGAAGATAC	GGATCAAATCCGGTTGAG
63	vanC1_s	2	CAACGCAGGTGACTTTAG	TAATGAAGCGGGTTCCTC
64	c01280_s	3	GTAGAAGCGGAACAAACG	CTTCAGGCAATCCAGATG
65	c01280_s2	3	GTGCTGTCACCAACATTC	CATTGTCCCTGCTTCTG
66	c05110_s	3	ATTACTGTTCGGCTGTCAC	CGTCCAGATTCGATTACC
67	c05110_s2	3	TCAATCCCAAGCCACTAC	AGCTCTTCTCCCATCAAC
68	c07210_s	3	CTAGTCCGACCTTGACTTC	TGACGAGCCGTCAATATG
69	c07210_s2	3	GCATTCCGGTGTGAGATAG	GGCGTCTTTGAAGATAGC
70	c10430_s	3	GCCGCTTCGCTTAAATAG	AGTAGCCGATTACGAAGC
71	c13880_s	3	GACTCCTGAGACACCTATC	GCTGGTGTTCCTACTAGTC
72	c13880_s2	3	GCTCATTGACCGATCAAG	ATAGTCAACCGCAATCCC
73	c13900_s	3	CAGTGATGGGACTATCTC	GTGCTTTCACCTGTTGAG
74	c14850_s	3	CGAGCATTGGGTAACAC	ATCACTTGCCAGTAACC
75	c14850_s2	3	AGCAAGCAGGAGTAGAAG	TGGCTCGATGGTTAATCC
76	c15950_s	3	CTGGTGAACTCCAGAAG	GTAATCCAGCACCTACC
77	c15950_s2	3	CAGATGCAGCTACAATCG	ATCTGAAGCTCCGTC AAG
78	c15960_s	3	GGAAGGTCGAGA ACTCTAC	TCCCATTGATGCCACTAC
79	c15960_s2	3	CACGGCAGAAGATGATTG	GCCAGTCACTTCTTCTTC
80	c16150_s	3	AGGCGGCACTATCTAATG	GCAGCTACCGTAGTTCTC
81	c16150_s2	3	ATACGAAACGGGTGATGG	CCAAGCCTGTTCTTCTG
82	c16640_s	3	GCTTCTGGCTTCTCTTTC	AGGCACTTCAGACAAGAG
83	c19780_s	3	GAAAGCCCACAAGCTTTC	GGGCGTTGCTGTTATTAG
84	c19910_s	3	ACTTAGCGTGGACTTCAG	GTGTAGGTACCCTTTGAC
85	c19910_s2	3	TGGGCTTCGCTCTAATTC	TATCCGCTGCTGTTAAGG
86	c19970_s	3	GGCGGTGGTAAACATATC	CCAACTTTGGCAGTTGTG
87	c19980_s	3	AAGTGGTTAGCGAGAGTG	GGCGGTAACCCGTAATAG
88	c19980_s2	3	CCGATGGCTATGTTATCC	TCTCTGCTTGGCTTCTG
89	c20560_s	3	GATGAAGAGGGCAATGTG	CTGGTGGTTCTACCGTATG
90	c20560_s2	3	TGACACTTGACCCGAATG	CCGTATCGTGACTAGTAACC
91	c20570_s	3	CCGATTATGCCTCAC AAG	GACAGCTGCCAAACTTTC
92	c20580_s2	3	ACCCAGGTACAAGTGAAG	GTGTCTCAGGGTCACTTG
93	c21750_s2	3	CTTGCTGCTGGTATCTTG	ACAACAGTCTGCCTAGTG
94	c21760_s	3	ATCGGGCAGGAAAGATAC	GACCAGGTGACCTCAATAG
95	c22120_s	3	GCAATGGTAGCTGTTACG	CTGCTCCTGCTAATACTG
96	c22310_s	3	CCTACAGCACCTGACTATC	CGACTTCATGCACATCTG
97	c22310_s2	3	TGCTGGAAGTGGTTATGG	CACTAGAACCAGCAATCG
98	c01330_s	4	GCTTGCTGCCAAGTATAG	ATACAGATGGCGATGGAG
99	c01390_s	4	GAGCGAGATAGCACTAAC	TGATGAGCCAGACAGAAG
100	c01810_s	4	ATCGCTATCACTGCTTCC	TAGCAGCCGTGACATTAG
101	c02100_s	4	CATGAACCACCTGGTAAC	TGGGAAGGTGCTTCTTAC
102	c03120_s	4	GTGATGGGCTAGACAATG	CTAGGCGTTAAAGCTGAC
103	c04070_s	4	GGTGCTGTATCTGAGTCTG	CTGTTGACGCTAGTTCTG
104	c07270_s	4	GTAGAGCATAGGCGTTTG	CAGCATGGAAAGCCTTTG
105	c08530_s	4	TCACTTCAGAGGCGTTAC	ACCGCAATGATGGTACTC
106	c09750_s	4	GCCACCAGAAACAATGTC	GTCAGGGTCATCTGGTTAC

Nr.	Name	Cluster	Sonde 5' - 3'	Primer 5' - 3'
107	c11240_s	4	TCTGGTACAGGTGTCTTC	GACACCGATTACCCAAAC
108	c11370_s	4	TGAGTCAGCCGTACAAAG	CACCTGGAGTCTGTGATAC
109	c12250_s	4	CTAGCCGTGTAGAATACCTG	CACGTTTCATCGGTAAC TG
110	c14140_s	4	GTGATGCCAAAGCAGTAG	TACCAATTCGCCGCTATC
111	c14160_s	4	GACAGGTGTCAGTCAATC	CGGTGCAAATTCTGACTC
112	c14170_s	4	CGGTCTATCAGTTGGTACTC	GAGGCAACTGTTTCTTGG
113	c14210_s	4	AGACATCGCTGAGAAGAG	GCGTCATCATCTGACTAC
114	c14340_s	4	CGCGATGACCTAAATGG	CCAGCTGTACACAAAGTC
115	c14350_s	4	GCTCTACCAGGATTGAAG	TGACACAAGAGCGACTTC
116	c17190_s	4	GTGTTCCGTTGTTGACTC	AACGCCATCACTATCCAC
117	c17310_s	4	CTGCCGCTTCTTTAGTG	TCGGAGACTACGTTGTTT
118	c18040_s	4	CCCAATTCGTCTCTTCTC	GGCACGGCTTTCATTTG
119	c18050_s	4	ACCCAGAAGTGTCTGAAC	GACAATGCGAATCCCAAG
120	c19160_s	4	TTGTTGGAGTGGGAGTTG	ACCTTCCTCAGGAAAAC
121	c21280_s	4	TTCCAGACGGTGCTTTAG	CTCTTGTGCAAGCAAGAG
122	Sbs11_s	5	CTTGGCAATGTAGCAGTC	CGACACA ACTGGTGA AAC
123	Sbs12_s	5	TCACAGGCTCAGATGATG	GCGAAGGCTGAAACTTAC
124	Sbs16_s	5	GCCATCAGCATCGTATTG	ACAGTAACAGCGGATGAC
125	hybcontrol_s	6	CTAGGGCAGTTGTAGTAGAG	CTCTACTACA ACTGCCCTAG
126	sodA_all_s	6	TTGGTGCTTTTCCTTGTG	CTTGGCTTGTGGTGAATG
127	sodA_mace_s	6	GCAGCTTGC GTGAAAGA	
128	sodA_pasteu_s	6	TTGCAGCCAACACTTGTGT	GGGCATTTGAATCACACC
129	c00940_s	7	GATCGGCTTCAATTCGAG	GGGGCAAGTATAAAGG
130	c00940_s2	7	CCCCGAGAAGAACATAGA	GTTGCGATTGTAGGTGAG
131	c02280_s	7	CGAAGGCTATGTGGTTC	GTGGTTCGATTTCGTGTTG
132	c03460_s	7	CGTCCATAGTCACCTTCTG	GAACCTGGTACTCACAAG
133	c04910_s	7	CGTCATTCCAGCAGTAAG	CGTAATCCGTGGATGATG
134	c04910_s2	7	GCTGCACCATCTAAGTTG	GTGGTGGAAATGGCTAATC
135	c05260_s	7	TCAGCTCTGCCATTATCC	GTCACGCCGATTAATGC
136	c05730_s	7	GACATCAACCGCATAGAC	GACGGTCAAACGACAATC
137	c06530_s	7	AAGCGTTCCGTCTGATAG	GACAGGTGGAGGATTTG
138	c06800_s	7	CGCCATTGTCAAGGATAG	GTGATAGAGAGCGATGAG
139	c07880_s	7	CTGCATCACTGCTTCATC	TGGTTGACGGTTACCTTG
140	c08170_s	7	GGTAGCCACGTTCTTATC	CTAATTCAGCAGCGTCAG
141	c08170_s2	7	AGCTACCGCACTATCTTG	TGGCGGTGCAAGATAAG
142	c11130_s	7	TGCAGCTGTTACACTAGG	CGATTGGTGAAGCTACTG
143	c12530_s	7	GACAGCTGCTTCTATACC	TGTCCTGCTTCTATCAC
144	c13480_s2	7	CTAGGTGGTTAGCCGATAAG	CTAACAGGCTACCAGTTG
145	c13550_s	7	TTGGCAGTTCATCTGAC	CCCAACAAAGGCTCTTAC
146	c13700_s	7	GGAGAAGTGCTGATTACC	GTTACGCCATGTTCTACC
147	c13750_s	7	CTGTGCTACCCATCTCTTC	CGGGTTCGAGTAATACTCC
148	c13810_s	7	CACTGACACCTTCTTAG	GTATCTCCAGCCACAATC
149	c14260_s	7	CCAGTGATAGACTCGAGAAG	GTAGCCGCCTTATCTTC
150	c14260_s2	7	GGATAGCGTAGAGGAGAAC	GACGAAGCCTCAACAATG
151	c15550_s	7	CCACGAAGGAAACGAAAC	AAGTTCACGGAACCACTC
152	c15930_s	7	GCGGTCAGTATAAAGTGC	CTAGTCGTTTGGCTCTAC
153	c16140_s	7	GTTGACGGCACTATTGAG	CCGTCAACTGTGAATTGG
154	c16140_s2	7	CTATGGCTTAGACGGGTTAG	CGTGTTCACCGTCTATC
155	c17280_s	7	GCAGCGATTCAACTCTTC	GTCGTATGCGACGTA AAC
156	c17280_s2	7	CTATCTTGGGCACTCTTG	AAGCCACGTAGA AACTC
157	c17410_s	7	GCAGGTAGCGTTATTTC	CAGGGGCAGAAATGACA
158	c20050_s	7	AACACCTGAGCAGACTAC	CATTGGACGGTCATCAAC
159	c21360_s	7	GAGCTGGTGTAAGGACTATC	GCATAGTCTGGTGTATCC
160	c21360_s2	7	CCGCCTACAATCCTTATG	GCCAATCTGTC ACTTTC

Nr.	Name	Cluster	Sonde 5' - 3'	Primer 5' - 3'
161	c22170_s	7	GCGGTTCAAGGTTCTAAG	GACGGTTCGCATTAAGAG
162	c22960_s	7	GGTGTATGAGCAGGTAGTG	CTGTGCTCCTCTATAACC
163	c23080_s	7	ACGGCTAAGACTTGAGAC	GTCGGTGAAACTGCTATC
164	c01850_s	8	CGCAACTTGGTGATTAGG	CATGAGTGCCCATGTTTC
165	c01850_s2	8	TACGATAGCCCACATAGC	TATCCGACGGGAGATTTG
166	c02130_s	8	TGCTCAACCGAACCATC	GTCCGACACAAGTTGATG
167	c03560_s	8	ACACCTAGCTCGAAATCC	CCGACAGATACCATTACG
168	c03560_s2	8	TTCCAGCAACCTGAACC	GTCCTGTTTCAGCCTATG
169	c06860_s	8	CAGTAACCCCTGCATAACC	CCAAGATATGCCGAAAGC
170	c08850_s	8	CCTTGGCAACCTAGTAAC	GCGACATTGGATGACAAG
171	c09070_s	8	CAAGCAGGTTCTACTAC	TGAGCTGGCATCATATGG
172	c09080_s	8	GACAGCGACTGATAATGG	TAGGAGCCGTTTCAGAAG
173	c10380_s	8	GAAGCTCTCAGCATAAGG	TGGTGCAGAGTGATAACG
174	c10400_s	8	GACCAGCATAACGGTTAC	GGTATGCGTGACATTGAC
175	c10400_s2	8	GACGGAATGACTCTTCTG	GGTATCGTCCGACTAAAG
176	c10420_s	8	AGCCACCGTTGAAGTATC	ATTCAGGAGCGGATACAG
177	c10420_s2	8	CGGTCATCAAAGGCATAG	CTGATGACGGTACATTCC
178	c11030_s	8	CCGATTAGTGACAGGAGTAG	CACGTAAGCCAGTTTGAG
179	c11870_s	8	GTGGAACGGTGAAATACG	ATGTCGTAGCGTCATACC
180	c11870_s2	8	TACACCGCAGACAGTAAC	TCAGCCCAGTCATCTTTC
181	c13610_s	8	GGGCTATGATGTTGTTGG	CGCACCATCTACCATTTC
182	c14010_s	8	TAGGGAATCGAGTCAG	TTGATTCAAGAAGTAGCC
183	c14040_s	8	GGATACGCTGAGACAGTG	CGCGTTTTCTGCTAGAC
184	c18750_s	8	ACCGCTTGCTAAGTCTG	GGCTGATGAACCAAATGC
185	c19740_s	8	GCGACTGGATTGTTTCTC	CGTTATCACCTCGAATTA
186	c20320_s	8	GGACGCTTTATTCATC	CTAACGTCGCTGTAGTTG
187	c20320_s2	8	GCAGACGAGTTGATGAAG	CTACTCAATGGCTGACTG
188	c21040_s	8	CCATACCGCCATGAATAC	GGTTGGGAATACGAATGG
189	c03530_s	9	TGCTGTGACACCCATATC	CAAGGTTAGGTGGAGATG
190	c09170_s	9	TGACACCTGCATAGGTAG	TCTCATCCCAAGCCTTTC
191	c09180_s	9	GAAACAGGGAGCATGAAC	GAAAGGCTTGGTTGAGTG
192	c09190_s	9	CACCACAACACTCATCTC	GTTGTGACGGTTCTCTTG
193	c09200_s	9	CAGCAGCTTCTTTGACTC	CATCGTCGCAAAGGAATG
194	c09210_s	9	GCACCTAAAGCAGCATTG	CGCTAGCAAACCATCATC
195	c09220_s	9	CGTAAAGTCCACGAACAG	CCCACCAAATCCAACATC
196	c09230_s	9	GTCGGTAATGTCACTACG	GCTTGTGGCAAGTTAGTG
197	c09240_s	9	ATGGTCCTATGCGACAAG	GACATCGCTGCTCTAAAC
198	c09250_s	9	GTGTAACGGGATGGAATG	CGGCATTTCAACTGTCC
199	c09260_s	9	CATGTGCTGCTTCAATCC	ATGGTGGCCTTTCAGAC
200	c09270_s	9	TACCCTTTGTCGCATACC	TTCCGCTACATGGAAAGG
201	c09280_s	9	GCCAGATATTGCCATCTC	ACGGGGTGTATATATGGG
202	c09290_s	9	CCTTCAGAGCTGTCTGATAG	ATGGTAAGGGCTATGGAG
203	c09300_s	9	TCCGATACCGTTACTACC	AGCGAGCGAAAGAGTTAG
204	c19300_s	9	TTAGCAGGTATGGGAAGG	CTCCAACAACGTTACTG
205	c21150_s	9	GATGCTACGGAATCTGTC	CGCTGTAACTCCAATGTC
206	c11150_s	10	CCTGGACAATCTCAAGTG	TTGGTCCATGCAGGTAAC
207	c15940_s	10	ATGTCTGCTGTGGCTATC	GTAAGGCGTACAAGTCAC
208	c20330_s	10	GAGAGTGTGCTCCTAGTC	CCGTACACGTGACTAGAG
209	c21740_s	10	GTCGAGTGCTGAGACTAAG	GGTAAATCGGCAAAGTCC
210	c22140_s	10	GCAGAAGCCACTTATGAC	CAATGCCACCAACAACCTG
211	c05700_s	11	CCCAGAGATCCTCAATCG	ATGAGCGAGATGACCTTG
212	c05710_s	11	GGCATCCATTTCGGTTTC	AAGTGATGCAGGCTGAC
213	c10290_s	11	CCTGATGGTCGGTCATATAG	GCGGATAGATTTCGTAAGC
214	c10290_s2	11	TTCAACGGATAGCGGTAG	CATGCCCGTGATGATAAG

Nr.	Name	Cluster	Sonde 5' - 3'	Primer 5' - 3'
215	c22470_s	11	AAGGTGGTTGGGATGTC	CACGACTAACTCGAGAAC
216	c00180_s	12	CTGCTGCAGTATCTGTAG	CTGCATCTGTAGCACAAAG
217	c01060_s	12	CCTACTGGTCCCGAAAA	ACCAGTAGGGAGTGGAAA
218	c01070_s	12	TCTCCCGTTTTCACTTCG	GCTGCTGTTGTGAAAGTG
219	c01080_s	12	GAATTGCCCTCCTGCTTTG	CTCCGTCCGGTCAAAGTAG
220	c01170_s	12	GGTACGCCCTAAGATAAGTC	CTGCACCGATTGTAGAAG
221	c02620_s	12	TGAGGCCACCACTAATAC	GAAACCTTGAGCGTGTG
222	c03550_s	12	CATCGTCAAGGCATTTCC	ACAGATTGCCCTGTCAAG
223	c04310_s	12	TCCAGCAAGCGTACTAAC	CATAGTGAGGACGAAGAG
224	c05070_s	12	GAAGACGCTCCTGTTAAG	GTATTATTGCCGCTGGAG
225	c05650_s	12	CTTCGCCAGCAATTAGAG	CTGTTACGCCGGATTCTA
226	c05790_s	12	CACCAGTTTGTGGGTTAC	AGCAGCAGCTGTAGATG
227	c07530_s	12	CCGTGCGTATTATAGAGG	GAACGCGGTGACATTATC
228	c07530_s2	12	GTGCGTTTCTTGCTATC	GACCTGATGTGGGAATTG
229	c08380_s	12	CCGTAGTAAGACCCTGAAG	GAATTGGGACACGCTATC
230	c08690_s	12	GAAGAAACGACCTCTGAC	CAGAATCCGTTTCGICTG
231	c08690_s2	12	CGTGCTGTCCAATAGTAG	AGACGGTCAAAGTGCTAC
232	c10320_s	12	CGGGTCGATGATTACAAG	GGCAATTCAGGGAACTC
233	c11660_s	12	GCCTTTCGTAGTGATTGG	GTCAAGGCTTCTTGAGAC
234	c13800_s	12	GACGGATACTTCAGATGG	GTCGCATATTGACGAAGG
235	c15390_s	12	ATACGACCAGTCCAATC	CTACGCTACTGACCCTTAC
236	c19900_s	12	GGATGGAAGACCCAAAGG	GCCTGCTTCTTTGATGAC
237	p00200_s	12	TAGGCTAGAGAGCCAAGT	TGAGCAGGCGACTATTTTC

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §8, Absatz (2) der Promotionsordnung der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe und dass diese Dissertation weder in dieser noch in einer anderen Form einer anderen Fakultät oder Hochschule vorgelegen hat.

Löhne, den 28. Februar 2012

Dennis Hinse