

Aus dem Institut für Infektionsmedizin  
des Zentrums für Klinische Pathologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher

# **Etablierung eines GFP-basierten Reportergensystems in Staphylokokken**

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

vorgelegt von  
Gefion Franke  
aus Hamburg

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 13.06.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. I. Sobottka

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. F. Nolte

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Hauber

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Staphylokokken .....	7
1.2 Infektionen durch Staphylokokken.....	8
1.3 Biofilmbildung.....	10
1.4 Die <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung und ihre Rolle im Rahmen von Fremdkörper-assoziierten Infektionen.....	11
1.5 Die primäre Bindung von <i>S. epidermidis</i> .....	13
1.6 Faktoren der Akkumulation .....	14
1.7 Die Regulation der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> .....	16
1.8 Reportergene.....	17
1.9 Das Green Fluorescent Protein (GFP) .....	18
1.10 Voraussetzungen für diese Arbeit.....	21
1.11 Ziele der Arbeit.....	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien und Einwegartikel.....	23
2.1.2 Laborgeräte .....	23
2.1.3 Medien .....	24
2.1.4 Lösungen.....	27
2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide.....	30
2.1.6 Oligonukleotide und Sonden .....	31
2.1.7 Datenbanken und Programme.....	32
2.2 Methoden .....	33
2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden.....	33

---

2.2.1.1	Kultivierung von Bakterien .....	33
2.2.1.2	Resistenztestung.....	33
2.2.1.3	Biofilmtestung .....	34
2.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	34
2.2.2.1	Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	34
2.2.2.2	Plasmidpräparation .....	35
2.2.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
2.2.2.4	Restriktionsverdau .....	36
2.2.2.5	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	36
2.2.2.6	Ligation.....	36
2.2.2.7	Klonierung .....	37
2.2.2.8	Chemische Transformation.....	37
2.2.2.9	DNA-Sequenzierung.....	37
2.2.2.10	Transformation durch Elektroporation .....	38
2.2.2.11	Protoplastentransformation.....	39
2.2.2.12	Phagentransduktion (Mack <i>et al.</i> , 2001).....	40
2.2.2.13	Extraktion von Ribonukleinsäuren (RNA) aus <i>S. epidermidis</i> .....	41
2.2.2.14	Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA.....	42
2.2.2.15	Kapillärer Transfer von RNA auf Nitrozellulosemembranen (Northernblot).....	43
2.2.2.16	Transkriptionsanalyse durch <i>real time</i> PCR.....	44
2.2.3	Proteinchemische Methoden.....	45
2.2.3.1	Präparation von Proteinen aus <i>S. epidermidis</i> .....	45
2.2.3.2	Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976) .....	45
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen.....	45
2.2.3.4	Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF- und Nitrozellulose- membranen (Westernblot) .....	46

---

2.2.4	Messung der Fluoreszenz.....	48
2.2.4.1	Messung im Fluorometer .....	48
2.2.4.2	Bestimmung der Halbwertszeit.....	48
2.2.4.3	Bestimmung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität nach Xyloseinduktion.....	49
2.2.4.4	Fluoreszenzmikroskopie .....	49
2.2.4.5	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM).....	49
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensität von pASgfp <sub>icaA</sub> .....	51
3.2	Klonierung .....	52
3.3	Einfluss von pASgfp <sub>sarA</sub> , pASgfp <sub>GC</sub> , pASgfp <sub>sod</sub> und pASgfp <sub>hld</sub> auf den Biofilm- Phänotyp von <i>S. epidermidis</i> 1457 .....	54
3.4	Messung der Fluoreszenz.....	58
3.4.1	Quantitative Fluoreszenzanalyse .....	58
3.4.2	Qualitative Fluoreszenzanalyse .....	60
3.5	Transkriptions- und Translationsanalyse.....	63
3.5.1	Relative Transkriptionsanalyse von gfp <sub>mut3.1</sub> in <i>S. epidermidis</i> 1457 .....	63
3.5.2	Semiquantitative Translationsanalyse von GFP <sub>mut3.1</sub> .....	65
3.6	Charakterisierung von GFP <sub>mut3.1</sub> in Staphylokokken.....	66
3.6.1	Messung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität nach Xyloseinduktion.....	67
3.6.2	Messung der Halbwertszeit von GFP <sub>mut3.1</sub> in <i>S. epidermidis</i> 1457 und <i>S. aureus</i> RN4220.....	70
3.6.3	Untersuchung der Fluoreszenzintensität von GFP <sub>mut3.1</sub> innerhalb eines <i>S. epidermidis</i> Biofilms.....	74
4	Diskussion.....	76
4.1	Die Rolle der Shine-Dalgarno-Sequenz im Rahmen der Translationsinitiation von heterologen Genen in Staphylokokken .....	77
4.2	Charakterisierung des Reportergensystems bezogen auf die biologischen Eigenschaften des Wirtes.....	80

---

4.3	Evaluierung der Eigenschaften von GFP <sub>mut31</sub> in <i>S. epidermidis</i> .....	81
4.4	Verwendungsmöglichkeit und Limitierungen von pASgfp <sub>hd</sub> im Rahmen von Expressionsstudien in <i>S. epidermidis</i> .....	84
5	Zusammenfassung .....	86
6	Literaturverzeichnis .....	88

# Abkürzungsverzeichnis

A <sub>405</sub>	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 405 nm
BSA	Rinderserumalbumin (englisch: <i>bovine serum albumin</i> )
CFU	koloniebildende Einheiten (englisch: <i>colony forming units</i> )
CLSM	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (englisch: <i>confocal laserscanning microscopy</i> )
cm	Zentimeter
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxy-Nukleotidyl-Triphosphat
ELISA	englisch: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GFP	englisch: <i>green fluorescent protein</i>
<i>ica</i>	interzelluläre Adhäsion (englisch: <i>intercellular adhesion</i> )
IS256	Insertionselement 256
kV	Kilovolt
ln2	natürlicher Logarithmus von 2
M	Mol
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ms	Millisekunden
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Ω	Ohm
OD <sub>578</sub>	optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 578 nm

---

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i> )
PIA	interzelluläres Polysaccharid Adhäsion (englisch: <i>polysaccharide intercellular adhesin</i> )
RFU	relative Fluoreszenz-Einheiten (englisch: <i>relative fluorescence units</i> )
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i> )
Tn917	Transposon 917
TSB BBL	Trypton Soja Brühe (englisch: <i>trypticase soy broth</i> ) der Firma Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA
TSBØ	Trypton-Soja Brühe ohne Glucose
U	enzymatische Einheit (englisch: <i>unit</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: <i>rounds per minute</i> )
s	Sekunde
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	xfache Erdbeschleunigung

# 1 Einleitung

## 1.1 Staphylokokken

Staphylokokken gehören zusammen mit den Gattungen *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* zur Familie der *Micrococcaceae*. Im Vergleich zu den anderen Gattungen weisen sie einen sehr niedrigen GC-Gehalt der DNA von 30–39 Molprozent auf (Kloos, 1997; Wilkinson, 1997). Staphylokokken sind runde bis ovale grampositive Kokken von 0,5–1,5 µm Durchmesser, die sich bei der Betrachtung unter dem Lichtmikroskop in Haufen oder Trauben angeordnet darstellen. Staphylokokken sind unbeweglich und bilden Katalase. Sie können auf gewöhnlichen Nährmedien unter aeroben und anaeroben Bedingungen kultiviert werden. Derzeit lässt sich der Genus *Staphylococcus* durch biochemische, molekularbiologische und physiologische Untersuchungen in 39 Spezies einteilen, wovon eine Reihe in weitere Subspezies untergliedert werden kann, so dass zur Zeit 50 Taxa bekannt sind (Kloos *et al.*, 1997; Kloos *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998; Place *et al.*, 2003; Probst *et al.*, 1998; Spargser *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 1999; Trulzsch *et al.*, 2002; Vernozy-Rozand *et al.*, 2000). Der Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Plasmakoagulase erlaubt eine Einteilung in koagulase-positive und koagulase-negative Staphylokokken (Sperber und Tatini, 1975), wobei *Staphylococcus aureus* die einzige humanpathogene koagulase-positive Spezies ist, alle anderen sind koagulase-negativ (Kloos und Bannerman, 1994; Waldvogel, 2000).

14 der bekannten koagulase-negativen Staphylokokkenspezies kommen beim Menschen regelmäßig als Besiedlungsflora der Haut vor (Kloos, 1997; Kloos und Bannerman, 1994). Die höchste Populationsdichte mit  $10^3$ – $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup> findet sich an den Ausführungsgängen von Talg- und Schweißdrüsen sowie auf den Schleimhäuten von natürlichen Körperöffnungen (Kloos und Bannerman, 1994; Noble, 1997). Nicht alle Staphylokokkenarten kommen gleichmäßig an allen Stellen des Körpers vor. Einige sind äußerst spezialisiert, so besiedelt zum Beispiel *Staphylococcus auricularis* lediglich den äußeren Gehörgang. *Staphylococcus epidermidis* kommt hingegen auf der gesamten Körperoberfläche vor und ist die am häufigsten von der Haut des Menschen

isolierte Staphylokokkenspezies (Kloos, 1997; Kloos und Bannerman, 1994; Noble, 1997).

## 1.2 Infektionen durch Staphylokokken

*Staphylococcus aureus* besitzt ein großes pathogenes Potential, und ist in der Lage, beim Menschen zum Teil lebensbedrohliche, eitrige Infektionen der Haut, der Weichteile und der Knochen hervorzurufen. Die Bildung von Toxinen führt zu spezifischen Krankheitsbildern wie dem Toxischen Schocksyndrom, dem *staphylococcal scaled skin syndrome* oder zu Lebensmittelintoxikationen (Peters und Pulverer, 2001; Waldvogel, 2000).

Im Gegensatz dazu galten koagulase-negative Staphylokokken lange Zeit im Wesentlichen als apathogene, kommensale Bakterien. Lediglich *Staphylococcus saprophyticus* war als Harnwegsinfektionserreger bei jungen Frauen bekannt (Marrie *et al.*, 1982; Wallmark *et al.*, 1978). In den letzten 25 Jahren wurde allerdings zunehmend deutlich, dass koagulase-negative Staphylokokken bei nosokomialen Infektionen als fakultativ pathogene Erreger eine große Rolle spielen. Der am häufigsten isolierte Erreger ist dabei mit bis zu 94 % *S. epidermidis*, seltener kommen auch andere Staphylokokkenarten wie *S. lugdonensis*, *S. warneri* oder *S. haemolyticus* vor (Kloos und Bannerman, 1994; Peters und Pulverer, 2001).

Charakteristischerweise werden koagulase-negative Staphylokokken im Rahmen einer spezifischen oder unspezifischen Immunsuppression als nosokomiale Sepsiserreger gefunden; eine Konstellation, wie sie vor allem bei Frühgeburtlichkeit, schweren Verbrennungen, Traumata oder Tumorleiden auftritt (Archer, 2000; Wisplinghoff *et al.*, 2003). Zugrunde liegt hierbei die teils transiente Suppression der Opsonierungs- und Phagozytoseaktivität der zellulären Abwehr dieser Patienten (Peters und Pulverer, 2001).

Die Mehrzahl der *S. epidermidis* Infektionen wird jedoch typischerweise im Zusammenhang mit implantierten Polymermaterialien beobachtet (Fidalgo *et al.*, 1990). Ihr breiter Einsatz in der modernen Medizin bedingt einen dramatischen Anstieg der Inzidenz von nosokomialer Sepsis und Fremdkörper-assoziierten *S. epidermidis* Infektionen. Typische klinische Konstellationen stellen implantierte zentralvenöse oder Peritonealdialysekatheter, Liquorshunts, künstliche Herzklappen, Brustprothesen aus

Silikon, Herzschrittmacher, Intraokularlinsen sowie Gelenk- und Gefäßprothesen dar (Archer, 2000; Boyce, 1997; Emori und Gaynes, 1993; Kloos, 1997; Kloos und Bannerman, 1994; Rupp und Archer, 1994). Vor allem bei infizierten Endoprothesen unterscheidet man zwischen zwei Verlaufsformen der Fremdkörper-assoziierten Infektion, der *early onset* Infektion, die Tage bis wenige Wochen nach Einbringen des Fremdmaterials beginnt, und der *late onset* Infektion, bei der Krankheitssymptome erst im Verlauf von Monaten auftreten (Kloos und Bannerman, 1994).

Trotz der bei Fremdkörperimplantationen regelhaft durchgeführten peri- und postoperativen Wundinfektionsprophylaxe stieg von 1980 bis 1989 die Zahl der durch koagulase-negative Staphylokokken induzierten, nosokomialen Bakteriämien um das 1,5–8,5fache (Baddour *et al.*, 1990; Banerjee *et al.*, 1991; Fidalgo *et al.*, 1990; Rupp und Archer, 1994; Schaberg *et al.*, 1991). Daten des Centers for Disease Control (CDC) belegen, dass koagulase-negative Staphylokokken in den Jahren 1990 bis 1999 mit 37,3 % die häufigste Ursache für nosokomiale Bakteriämien waren (National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, 1999). Insgesamt gehören sie heutzutage zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen (Karlowsky *et al.*, 2004; National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, 1996).

Die Diagnose von Infektionen durch koagulase-negative Staphylokokken stellt den behandelnden Arzt und den klinischen Mikrobiologen gleichermaßen vor große Probleme. Bei der Isolierung dieser Keime aus einem Untersuchungsmaterial gilt es zwischen Infektionserreger und einfacher Kontaminante zu unterscheiden. Dies kann angesichts der Gefahr, die Probe bei der Materialgewinnung mit menschlicher Hautflora zu kontaminieren, im Einzelfall schwierig sein. Man kann davon ausgehen, dass 75–90 % der aus Patientenmaterial isolierten koagulase-negativen Staphylokokken als Kontamination zu betrachten sind (Fidalgo *et al.*, 1990; Herwaldt *et al.*, 1996; Kirchoff und Sheagren, 1985; Kleeman *et al.*, 1993; Ringberg *et al.*, 1991; Weinstein *et al.*, 1983). Durch Gewinnung mehrerer Materialien aus einem Untersuchungsgebiet lässt sich die Aussagekraft eines Keimnachweises erhöhen (Burkhardt und Schaal, 1992).

Fremdkörper-assoziierte Infektionen präsentieren sich klinisch häufig als schwer therapierbare, chronische Infektionen, bei denen in der Mehrzahl der Fälle eine endgültige Sanierung des Infektionsherdes nur durch die Entfernung des entsprechenden Fremdmaterials gelingt (Götz und Peters, 2000; Younger *et al.*, 1987). Die

Möglichkeiten der antibiotischen Therapie sind aufgrund von Resistenz gegen multiple Antibiotika oftmals eingeschränkt. Zum Beispiel findet sich in bis zu 80 % der Isolate eine Methicillinresistenz, eine  $\beta$ -Lactamase liegt in mehr als 50 % der Fälle vor (Archer und Climo, 1994; Archer, 2000). Zudem wachsen die Bakterien auf der Oberfläche des Fremdmaterials als Biofilm. Diese spezielle Organisationsform ist direkt für die eingeschränkte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika verantwortlich (Knobloch *et al.*, 2002).

### 1.3 Biofilmbildung

Biofilmbildung ist ein in der Natur weit verbreitetes Phänomen. Biofilme sind definiert als Gemeinschaft von Mikroorganismen, die an eine Oberfläche gebunden und von einer selbst synthetisierten polymeren Matrix umgeben sind (Costerton *et al.*, 1999; O'Toole *et al.*, 2000). In der Umwelt sind vielfach unterschiedliche Spezies gemeinsam in einem Biofilm organisiert, es gibt aber auch Monospezies-Biofilme. Diese stehen im medizinischen Bereich als Ursache klinisch relevanter Biofilm-assoziiierter Infektionen im Vordergrund (Costerton *et al.*, 1999). Ein Biofilm ist ein komplexes Gebilde, das den Bakterien günstige Lebensbedingungen und Schutz vor Umwelteinflüssen bietet (Costerton *et al.*, 2003). Nach Anheftung der Bakterien an eine Oberfläche bilden sich Mikrokolonien, die in der Folge durch Zellaggregation und Einbettung in eine Exopolysaccharid-Matrix zum eigentlichen Biofilm akkumulieren (Stoodley *et al.*, 2002). Bei der Betrachtung von *Pseudomonas aeruginosa* Biofilmen unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop erkennt man, dass diese von Kanälen durchzogen sind, die alle Bereiche des Biofilms über Konvektionsströme mit Nährstoffen versorgen (Costerton *et al.*, 2003; Stoodley *et al.*, 2002). In *Pseudomonas aeruginosa* und *E. coli* durchgeführte Expressionsstudien zeigen, dass Genregulationsvorgänge den Übergang von einer planktonischen in eine sessile Lebensform kontrollieren (Prigent-Combaret *et al.*, 1999; Stoodley *et al.*, 2002). In *Pseudomonas aeruginosa* sind vor allem Gene betroffen, die am Stoffwechsel, Membranaufbau, Transport und der Regulation von Genexpression beteiligt sind (Whiteley *et al.*, 2001). Auch innerhalb eines Biofilms und während seiner Entwicklung durchlaufen die Bakterien verschiedene Expressionsmuster, die es der funktionell heterogenen Gemeinschaft ermöglichen, sich an wechselnde physiologische Gegebenheiten anzupassen (Sauer *et al.*, 2002; Stoodley *et*

*al.*, 2002). Die differentielle Genexpression innerhalb eines *Pseudomonas* Biofilms unterliegt einerseits der Kontrolle durch *quorum sensing*, also der Steuerung der Zelldichte über frei diffusible Signalstoffe (Davies *et al.*, 1998; Whiteley *et al.*, 1999; Whiteley *et al.*, 2000), andererseits stellen Flüssigkeitsverteilung und Nährstoffangebot wichtige äußere Determinanten dar, die Einfluss auf die Biofilmarchitektur nehmen (Kjelleberg und Molin, 2002).

Medizinische Relevanz erlangen Biofilme im Rahmen von chronisch-persistierenden Infektionen. Bekannte Beispiele hierfür sind Biofilme auf Zähnen bestehend aus Streptokokken und anaeroben gramnegativen Bakterien, die durch Säurebildung zu Karies und Parodontose führen. *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* persistieren in der Lunge von Patienten mit zystischer Fibrose und können dort therapieresistente Pneumonien hervorrufen (Costerton *et al.*, 1999).

Durch die Organisation in einem Biofilm können sich die Bakterien der Immunabwehr des Menschen entziehen, denn die wirtseigene Abwehr ist nicht in der Lage, die Zellen innerhalb des Biofilms wirksam zu bekämpfen (Cochrane *et al.*, 1988; Costerton *et al.*, 2003; Heinzelmann *et al.*, 1997; Knobloch *et al.*, 2002). Auch gegen Antibiotika stellt der Biofilm eine Barriere dar. Zum einen können manche Wirkstoffe schlecht hindurch diffundieren, zum anderen wachsen die Bakterien innerhalb des Biofilms vielfach äußerst langsam, was die Unempfindlichkeit gegen bestimmte Antibiotikaklassen erklärt (Costerton *et al.*, 1999; Knobloch *et al.*, 2002).

#### **1.4 Die *S. epidermidis* Biofilmbildung und ihre Rolle im Rahmen von Fremdkörper-assoziierten Infektionen**

Die Aufklärung der Pathogenese Implantat-assoziiierter Infektionen und der überragenden Bedeutung koagulase-negativer Staphylokokken bei diesem Krankheitsbild begann mit Berichten verschiedener Autoren von einer speziellen Organisationsform des Erregers auf der Oberfläche des zu besiedelnden Fremdkörpers, bei der die Bakterien, eingeschlossen in eine komplexe Matrix, festhaftend organisiert waren (Christensen *et al.*, 1982; Peters *et al.*, 1982). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von infizierten Kathetern dokumentieren eine vielschichtige Lagerung von *S. epidermidis* Zellen, die in eine amorphe Grundsubstanz eingebettet sind, wobei die

Mehrzahl der Bakterien keinen direkten Kontakt zur Polymeroberfläche hat (Marrie und Costerton, 1984; Peters *et al.*, 1981).

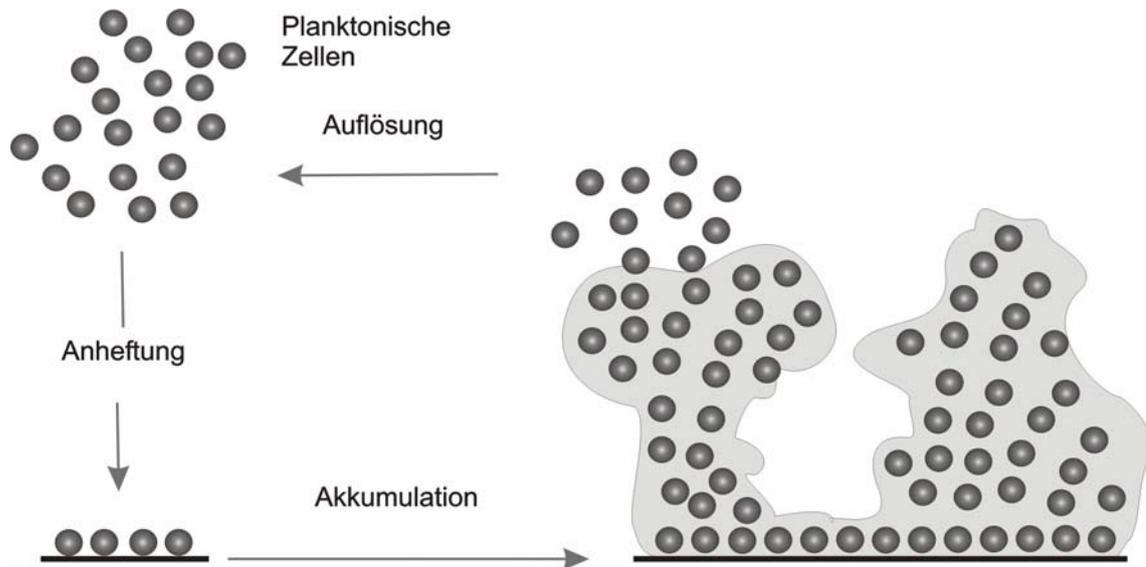
Dieses Phänomen wurde zunächst als Schleimbildung bezeichnet, heute ist allgemein der Begriff Biofilmbildung üblich (Götz *et al.*, 2000; Mack, 1999).

Durch einen von Christensen und Mitarbeiter etablierten *In-vitro*-Test ist es möglich, Biofilmbildung semiquantitativ zu untersuchen (Christensen *et al.*, 1982). Dieser sogenannte Biofilm-Assay hat entscheidend zum Verständnis der Entstehung von *S. epidermidis* Biofilmen beigetragen.

Verschiedene epidemiologische Studien belegen eine enge Assoziation zwischen der klinischen Relevanz eines *S. epidermidis* Isolates und dessen Fähigkeit zur Biofilmbildung. Biofilm-bildende Stämme finden sich signifikant häufiger bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen als biofilm-negative (Christensen *et al.*, 1983; Davenport *et al.*, 1986; Deighton und Balkau, 1990; Dunne *et al.*, 1987; Ishak *et al.*, 1985; Ziebuhr *et al.*, 1997). Zudem weisen tierexperimentelle Daten auf einen Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Biofilmbildung und der Virulenz des Erregers hin (Rupp *et al.*, 1999a; Rupp *et al.*, 1999b; Rupp *et al.*, 2001). Das Versagen einer alleinigen antibiotischen Therapie solcher Infektionen korreliert ebenfalls mit dem Vorhandensein eines biofilm-positiven Phänotyps bei den isolierten Infektionsstämmen (Davenport *et al.*, 1986; Diaz-Mitoma *et al.*, 1987; Younger *et al.*, 1987). Die Fähigkeit zur Biofilmbildung kann daher als der entscheidende Pathogenitätsfaktor von *S. epidermidis* im Rahmen von Fremdkörper-assoziierten Infektionen gelten.

Der genomweite Vergleich des Genexpressionsmusters planktonischer und biofilmständiger Bakterien in *S. epidermidis* zeigen globale Veränderungen beim Übergang in einen Biofilm-Phänotyp, die mit einem verminderten Stoffwechsel einhergehen (Yao *et al.*, 2005). *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien in *S. epidermidis* Infektionsmodellen verdeutlichen, dass im Verlauf der Entstehung einer Fremdkörper-assoziierten Infektion das Expressionsniveau beteiligter Gene variiert (Vandecasteele *et al.*, 2003) und diese durch globale Regulatoren und *quorum sensing* beeinflusst werden (Vuong *et al.*, 2004b).

Die Entstehung eines Biofilms von *S. epidermidis* verläuft charakteristischerweise in zwei Phasen (siehe Abbildung 1). Zunächst kommt es zu einer schnell ablaufenden Adhäsion an die Polymeroberfläche, der primären Bindung, der eine längere Phase der Proliferation und Akkumulation in vielen Zellschichten folgt (Mack *et al.*, 2004).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Modells der Biofilmbildung in *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 2005)

## 1.5 Die primäre Bindung von *S. epidermidis*

Die primäre Adhäsion wird durch spezifische und unspezifische Faktoren beeinflusst, und ist sowohl von Eigenschaften der Polymeroberfläche (Hogt *et al.*, 1986; Ludwicka *et al.*, 1984) als auch von Strukturen der Bakterienzellwand abhängig. Zunächst treten die Bakterien über hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte mit der Oberfläche in Kontakt (Hogt *et al.*, 1985; Ludwicka *et al.*, 1984). Fremdmaterialien werden nach Implantation häufig mit einer Schicht aus körpereigenen Plasmaproteinen, extrazellulären Matrixproteinen oder Thrombozyten überzogen. Die Anwesenheit von Fibronectin, Fibrinogen und aktivierten Thrombozyten begünstigt die Adhäsion der Bakterien (Vaudaux *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1993), wohingegen Serum, Plasma und Albumin die primäre Bindung inhibieren können (Espersen *et al.*, 1990; Hogt *et al.*, 1985; Vaudaux *et al.*, 1989).

Es sind auch einige spezifische bakterielle Faktoren bekannt, die an der primären Bindung beteiligt sind. Eine Übersicht gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Spezifische Adhäsionsfaktoren von *S. epidermidis*

Adhäsionsfaktor	Oberfläche	Referenz
Fibrinogenbindendes Protein (Fbe)	Fibrinogen	(Nilsson <i>et al.</i> , 1998; Pei <i>et al.</i> , 1999)
Autolysin E (AtlE)	Polystyrol (Sarstedt)	(Heilmann <i>et al.</i> , 1996a; Heilmann <i>et al.</i> , 1997)
<i>Staphylococcal surface protein</i> (SSP-1)	Polystyrol (Sanbio)	(Timmerman <i>et al.</i> , 1991; Veenstra <i>et al.</i> , 1996)
Kapsuläres Polysaccharid/Adhäsion (PS/A)	Silikonkatheter, nicht Polyethylen	(Higashi <i>et al.</i> , 1998; Muller <i>et al.</i> , 1993; Tojo <i>et al.</i> , 1988)
Embp	Fibronectin	(Williams <i>et al.</i> , 2002)

## 1.6 Faktoren der Akkumulation

Eine wesentliche Voraussetzung für die Akkumulation in einem vielschichtigen Biofilm, in dem nur wenige Bakterien direkten Kontakt zur Polymeroberfläche haben, sind Faktoren, die die Adhäsion untereinander vermitteln.

Als wesentlich hierfür wird das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) angesehen. PIA ist ein lineares Homoglykan bestehend aus durchschnittlich 130  $\beta$ -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten (Mack *et al.*, 1996a). Es wurde erstmals aus dem biofilm-positiven Stamm *S. epidermidis* 1457 isoliert (Mack *et al.*, 1992) und lässt sich in zwei Polysaccharidfraktionen aufreinigen, die als Polysaccharid I und II bezeichnet werden. Polysaccharid I macht mehr als 80 % der Gesamtmenge aus. 15–20 % davon liegen in nicht acetylierter Form vor, und ist positiv geladen. Polysaccharid II enthält Phosphat und Ester-gebundenes Succinat, was ihm einen anionischen Charakter verleiht. Außerdem sind mehr Glucosaminreste acetyliert als in Polysaccharid I (Mack *et al.*, 1996a). In einer Sammlung von 179 *S. epidermidis* Stämmen konnte die Korrelation zwischen biofilm-positivem Phänotyp und PIA-Produktion gezeigt werden (Mack *et al.*, 1996b). In der biofilm-negativen Transposonmutante M11 des biofilm-positiven *S. epidermidis* 13-1 lässt sich kein PIA nachweisen (Mack *et al.*, 1994).

Den für die PIA-Synthese verantwortlichen Genort identifizierten 1996 Heilmann *et al.*. Es handelt sich um das *ica* (*intercellular adhesion*)-Operon bestehend aus den vier in gleicher Transkriptionsrichtung organisierten Genen *icaA*, *icaD*, *icaB* und *icaC* (Gerke *et al.*, 1998; Heilmann *et al.*, 1996b). Ihm ist das Gen *icaR* vorgelagert, das als Repressor fungiert (Conlon *et al.*, 2002). IcaA hat die Funktion einer N-Acetylglucosaminyltransferase, die die Anwesenheit von IcaD benötigt, um seine volle Aktivität zu entfalten (Gerke *et al.*, 1998). IcaC ist als Transmembranprotein möglicherweise am Export von PIA beteiligt (Heilmann *et al.*, 1996b). IcaB hat die Funktion einer Deacetylase. Sie wird sezerniert und findet sich im Kulturüberstand (Vuong *et al.*, 2004a).

Unabhängig von PIA wurde bei *S. aureus* ein Poly-N-Succinyl- $\beta$ -(1,6)-verknüpftes Glucosamin (PNSG) gefunden (McKenney *et al.*, 1999), welches mit großer Wahrscheinlichkeit mit PIA identisch ist (Maira-Litran *et al.*, 2002).

Das *accumulation associated protein* (Aap) ist an der Bildung eines proteinvermittelten Biofilms beteiligt. Es ist ein 220 kDa großes Zellwandprotein, das aus zwei Domänen besteht. Die Domäne A zeigt Homologien zum Oberflächenprotein SasG von *Staphylococcus aureus*, die 140 kDa große Domäne B besteht aus fünf repetitiven Einheiten von jeweils 128 Aminosäuren Länge und einer unvollständigen Einheit von 68 Aminosäuren Länge. Sie vermittelt interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung. Die Domäne B erlangt ihre Funktionsfähigkeit durch proteolytische Spaltung des nativen Aap (Hussain *et al.*, 1997; Rohde *et al.*, 2005).

Das *biofilm-associated protein* (Bap) wurde als Pathogenitätsfaktor bei der Genese einer chronischen Mastitis durch *Staphylococcus aureus* bei Rindern isoliert. Es handelt sich um ein 2276 Aminosäuren großes Zellwand-assoziiertes Protein, das sowohl an der primären Bindung als auch an der interzellulären Adhäsion und Biofilmbildung beteiligt ist. (Cucarella *et al.*, 2001; Ubeda *et al.*, 2003). Durch Homologie-Recherche konnte eine Homologie von Bap bei *S. epidermidis* RP62A nachgewiesen werden. Dieses als Bap-homologes Protein (Bhp) bezeichnete Molekül findet sich jedoch nur in weniger als 10 % der invasiven *S. epidermidis* Isolate (Rohde *et al.*, 2004).

## 1.7 Die Regulation der Biofilmbildung in *S. epidermidis*

Phänotypische Untersuchungen zeigen, dass Änderungen externer Bedingungen wie die Entstehung anaerober Verhältnisse (Cramton *et al.*, 2001), höhere Temperaturen (Rachid *et al.*, 2000), hohe Osmolarität (Knobloch *et al.*, 2001; Rachid *et al.*, 2000) und Eisenmangel (Deighton und Borland, 1993) die Biofilmbildung in *S. epidermidis* verstärken können.

Es kann aber auch zu spontanen Phasenvariationen kommen. Diese können sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet werden (Baddour *et al.*, 1990; Ziebuhr *et al.*, 1997). Eine Ursache hierfür ist beispielsweise die reversible Integration des Insertionselementes IS256 in das *ica*-Operon. Sie führt zu einem biofilm-negativen Phänotyp (Ziebuhr *et al.*, 1999).

Der wichtigste an der Biofilmbildung von *S. epidermidis* beteiligte Faktor ist PIA, das durch die Genprodukte des *icaADBC*-Genclusters synthetisiert wird. Durch Transposonmutagenese wurde gezeigt, dass an der Regulation der *ica*-Expression der alternative Sigmafaktor  $\sigma^B$  beteiligt ist (Knobloch *et al.*, 2001). Durch einen noch unbekanntem Mechanismus reprimiert er den negativen Regulator *icaR*, wodurch die Biofilmbildung verstärkt wird. Die Aktivität von  $\sigma^B$  selbst wird durch das  $\sigma^B$ -Operon gesteuert. Es enthält die positiven Regulatoren *rsbU* und *rsbV* sowie den negativen Regulator *rsbW* (Knobloch *et al.*, 2004). Ein globales Genregulationssystem, der *accessory gene regulator (agr)*, nimmt Wachstumsphasen-abhängigen Einfluss auf die Biofilmbildung. In der exponentiellen Wachstumsphase, in der die Zelldichte gering ist, werden unter Einfluss von *agr* vermehrt Oberflächenproteine wie beispielsweise Autolysin E (AtlE) exprimiert, was die primäre Adhäsion der Bakterien fördert. In der stationären Wachstumsphase dagegen ist die Expression von Exoproteinen erhöht. *Agr* nimmt aber keinen Einfluss auf die PIA-Synthese. Das *agr*-Operon ist also ein *quorum sensing* System, das über Verstärkung und Hemmung der primären Bindung die Biofilmbildung in *S. epidermidis* steuert (Vuong *et al.*, 2000; Vuong *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2005).

Das Detergens-ähnliche Peptid Hämolyisin delta (Hld), das unter der Kontrolle von *agr* exprimiert wird, nimmt Einfluss auf die dreidimensionale Struktur des Biofilms. Der amphipatische Charakter des  $\delta$ -Toxin-Moleküls führt möglicherweise zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Bakterien, sodass es partiell zur Ablösung und

Bildung von Kanälen innerhalb des Biofilms kommen kann (Vuong *et al.*, 2003; Vuong *et al.*, 2004b).

Conlon konnte zeigen, dass die Insertion von IS256 in den *staphylococcal accessory regulator (sarA)* zu einem biofilm-negativen Phänotyp führt (Conlon *et al.*, 2004). In *S. aureus* wird die Expression von Virulenzfaktoren durch *sarA* reguliert (Cheung und Projan, 1994). Auch die Expression des *agr*-Locus wird durch Produkte des *sarA*-Genortes kontrolliert. Welche genaue Funktion *sarA* bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung hat, ist bisher noch unklar.

## 1.8 Reporterogene

Um komplexe Stoffwechselfänomene, wie sie bei der Biofilmbildung auftreten, direkt *in vivo* studieren zu können, bedient man sich so genannter Reporterogene, deren Genprodukte als Marker für Promotoraktivität genutzt werden. Dazu exprimiert man die genetische Information für den Reporter unter der Kontrolle des zu untersuchenden regulatorischen Elementes (Voet und Voet, 1995c). Reporterogene sollten ein Genprodukt haben, das leicht und mit hoher Sensitivität zu detektieren ist. Die Konzentration sollte sich quantitativ erfassen lassen, um auf diese Weise die Promotoraktivität exakt abbilden zu können. Beispiele hierfür sind Enzym-basierte Systeme wie die  $\beta$ -Galaktosidase, die Chloramphenicol-Acyltransferase, die Luciferase oder das *green fluorescent protein* (Meighen, 1993; Tsien, 1998; Voet und Voet, 1995a, 1995b).

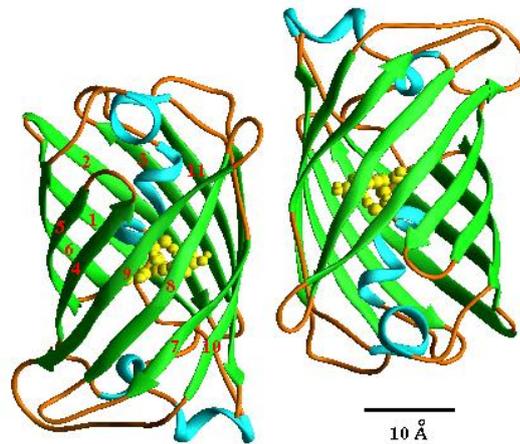
Für die Untersuchung der Genexpression auf Einzelzellebene innerhalb eines lebenden Biofilms sind Reporterogene von Vorteil, die ohne den Zusatz von Substraten auskommen, denn aufgrund der Dicke des Biofilms wäre eine gleichmäßige Verteilung des Substrates nicht sicher zu gewährleisten (Andersen *et al.*, 1998). Das *green fluorescent protein* hat sich daher als Reporterogen in der Biofilmforschung bewährt (Davies *et al.*, 1998; Sternberg *et al.*, 1999). Die Entstehung und Architektur sowie die differentielle Genexpression in verschiedenen Schichten lässt sich durch Betrachtung unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop direkt optisch sichtbar machen (Cowan *et al.*, 2000). Außerdem lassen sich quantitative Angaben über das Niveau der Genexpression erheben, indem man die Fluoreszenzintensität bestimmt (Southward und Surette, 2002). Verwendet man Fluoreszenzmarker unterschiedlicher Wellenlänge, so

lassen sich auf diese Weise auch mehrere Gene gleichzeitig untersuchen (Cowan *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 2001). Zur Untersuchung von *S. epidermidis* Biofilmen wurde bislang ausschließlich eine andere Mutante des GFP, das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) verwendet (Vuong *et al.*, 2004b).

## 1.9 Das Green Fluorescent Protein (GFP)

Fluoreszenz ist eine Leuchterscheinung, die nach Anregung von Atomen durch Absorption von Energie bei der Rückkehr auf ihr ursprüngliches Energieniveau ausgesandt wird (Kuchling).

Das *green fluorescent protein* (GFP) wurde erstmals 1962 in der Pazifikqualle *Aequorea victoria* beschrieben (Shimomura *et al.*, 1962). Diese Quallen weisen im Zytoplasma der Zellen ihrer Tentakeln feine Granula auf, die zwei zur Biolumineszenz befähigte Proteine enthalten, das Aequorin und das *green fluorescent protein*. Das GFP wandelt die durch strahlungsfreien Energietransfer übertragene blaue Chemilumineszenz des Aequorins in grünes Licht um (Morise *et al.*, 1974). Es handelt sich um ein äußerst stabiles, 238 Aminosäuren großes Protein (Prasher *et al.*, 1992), dessen Exzitationsmaximum bei 395 nm mit einem zweiten kleineren Peak bei 475 nm liegt. Die Emission grünen Lichtes erfolgt bei einem Emissionsmaximum von 508 nm (Morise *et al.*, 1974; Tsien, 1998). Das Besondere am GFP ist, dass im Gegensatz zu vielen anderen fluoreszierenden Proteinen das Chromophor kein kovalent gebundener Kofaktor, sondern ein Teil des Proteins selbst ist (Prasher *et al.*, 1992). Es liegt innerhalb einer zentral gelegenen  $\alpha$ -Helixstruktur und besteht aus den Aminosäuren Ser<sup>65</sup>-Tyr<sup>66</sup>-Gly<sup>67</sup>, deren Seitenketten sich zu einem 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidinon verbinden (siehe Abbildung 2). Dieser Vorgang ist sauerstoffabhängig (Cody *et al.*, 1993; Heim *et al.*, 1994; Prasher *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1996).



**Abbildung 2:** Tertiärstruktur des GFP: Zylinderförmig angeordnete  $\beta$ -Faltblattstrukturen umgeben eine zentrale  $\alpha$ -Helixstruktur, in deren Mitte sich das Chromophor befindet (Yang *et al.*, 1996).

Nach der Klonierung des GFP durch Prasher *et al.* 1992 konnten Chalfie und Inouye (Chalfie *et al.*, 1994; Inouye und Tsuji, 1994) erstmals zeigen, dass bei Expression des GFP in eukaryontischen (*Caenorhabditis elegans*) und prokaryontischen (*E. coli*) Zellen ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Zur posttranslationalen Faltung des Proteins und zur Bildung des Chromophors sind also keine spezifischen Enzyme der Qualle notwendig (Heim *et al.*, 1994; Tsien, 1998), was auch Experimente in einem zellfreien Translationssystem zeigen (Kahn *et al.*, 1997). GFP liegt in Bakterien als zytoplasmatisches Molekül vor und weist eine geringe Toxizität auf (Chalfie *et al.*, 1994; Valdivia *et al.*, 1996). Diese Entdeckungen ebneten den Weg zur breiten Anwendung des GFP als Reportergen in den unterschiedlichsten Wirten (Tsien, 1998). Die Höhe der Fluoreszenzintensität, die bei Expression des GFP in einem heterologen Wirt gemessen werden kann, ist von vielen Faktoren abhängig. Eine Übersicht gibt Tabelle 2 (modifiziert nach Tsien, 1998).

Die Übersicht zeigt, dass sowohl wirtsabhängige Faktoren als auch Eigenschaften des GFP selbst Einfluss auf die Höhe der Fluoreszenzintensität nehmen.

**Tabelle 2:** Einflussfaktoren auf die Aktivität von GFP

Kopienzahl des Gens pro Zelle, Dauer der Transkription
Stärke des Promotors und positiver Regulatoren
Translationseffizienz
Effizienz der posttranslationalen Faltung des Proteins und der Bildung des Fluorophors
Verfügbarkeit von Chaperonen
Temperatur sowie Verfügbarkeit von O <sub>2</sub>
Lokalisation des GFP diffus im Zytoplasma oder innerhalb einer definierten Zellorganelle
Stärke der Eigenfluoreszenz des Mediums und der Wirtszellen

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit der Frage beschäftigt, wie man die Leuchtintensität des GFP erhöhen und die posttranslationale Faltung des Proteins und die Bildung des Chromophors beschleunigen kann (Remington, 2000; Tsien, 1998). Die posttranslationale Faltung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für das Monitoring von Genexpression (Cubitt *et al.*, 1995). Es wurde auch versucht, die Temperatur-abhängige Fehlfaltung des Proteins zu umgehen, die vor allem auftritt, wenn GFP in Wirten exprimiert wird, die 37 °C zum Wachstum benötigen (Siemering *et al.*, 1996; Tsien, 1998; Yokoe und Meyer, 1996). Auf diese Weise ist eine große Anzahl von Mutanten mit unterschiedlichen Eigenschaften entstanden. Einige von ihnen verfügen über ein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Exzitations- und Emissionsspektrum (Crameri *et al.*, 1996; Delagrave *et al.*, 1995; Heim *et al.*, 1994; Heim *et al.*, 1995; Heim und Tsien, 1996; Patterson *et al.*, 1997; Siemering *et al.*, 1996). 1996 stellte Cormack drei Klassen von GFP-Mutanten vor, die durch gezielte Mutagenese mit Basenaustausch im Bereich des Chromophors und der umgebenden 20 Aminosäuren erzeugt worden waren (Cormack *et al.*, 1996). Bei allen drei Klassen war das Serin<sup>65</sup> ausgetauscht, zusätzlich hat es noch mindestens einen weiteren Aminosäureaustausch gegeben. Im GFPmut3, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, ist das Serin<sup>65</sup> durch ein Glycin und das Serin<sup>72</sup> durch ein Alanin ersetzt worden. Das GFPmut3 wurde von der Firma Clontech unter dem Namen GFP<sub>mut3.1</sub> lizenziert. Im Folgenden wird statt GFPmut3 der Handelsname GFP<sub>mut3.1</sub> verwendet. Das

Exzitationsmaximum von GFP<sub>mut3.1</sub> liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bleibt nahezu unverändert bei 511 nm. Exprimiert man das GFP<sub>mut3.1</sub> und den Wildtyp in *E. coli*, so ist die Leuchtintensität des GFP<sub>mut3.1</sub> 21fach höher als die des Wildtyps bei identischer Proteinmenge pro Zelle. Die Mutationen haben einen signifikanten Effekt auf die Faltungseigenschaften des Proteins. Wildtyp-GFP wird bei Expression in *E. coli* häufig in unlöslicher und nichtleuchtender Form in Einschlusskörperchen gefunden (Cormack *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 1994). Das GFP<sub>mut3.1</sub> dagegen wird effektiver und schneller gefaltet und liegt fast vollständig in aktiver und gelöster Form vor (Cormack *et al.*, 1996). Auch ist die heterologe Expression in Bakterien in einem Temperaturbereich von 37 °C möglich (Clontech). Somit ergibt sich für diese GFP-Mutante ein breites Anwendungsspektrum (Cormack *et al.*, 1996).

### 1.10 Voraussetzungen für diese Arbeit

Mit dem Ziel, die Eigenschaften des GFP in Staphylokokken zu charakterisieren, war GFP<sub>mut3.1</sub> im Shuttle-Plasmid pAS1 exprimiert worden (pASgfp<sub>icaA</sub>). In diesem Vektor wird ein Gen unter der Kontrolle von *xyIA/xyIR*, einem Xylose-induzierbaren Promotor aus *S. xylosus* exprimiert. Dem GFP war im Bereich der Ribosomen-Bindungsstelle 10 Basen aufwärts vom Startcodon die Shine-Dalgarno-Sequenz von *icaA* vorangestellt worden. Es wurden quantitative und qualitative Untersuchungen der Fluoreszenzintensität dieses Konstruktes in *S. epidermidis* 1457 unter Induktion mit Xylose durchgeführt. Fluoreszenzmikroskopisch findet sich ein inhomogenes Zellbild. Während die meisten Bakterienzellen ein schwaches Fluoreszenzsignal aussenden, leuchten einige wenige Zellen mit stärkerer Intensität, die aber insgesamt für die Darstellung von Promotoraktivität zu gering ausfällt. Somit ist dieses Konstrukt für die Untersuchung von Genaktivität in *S. epidermidis* Biofilmen nicht geeignet.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die Tatsache, dass die Translations-effizienz von heterologem Genmaterial in grampositiven Bakterien häufig äußerst gering ausfällt. An der Initiation der Translation und der Bildung des Initiationskomplexes ist die Shine-Dalgarno- (SD) -Sequenz entscheidend beteiligt. Sie ermöglicht der 16S rRNA das korrekte Auffinden des Startcodons. Die Translationseffizienz lässt sich jedoch durch Modifikation der SD-Sequenz optimieren (Qazi *et al.*, 2001).

## 1.11 Ziele der Arbeit

Expressionsuntersuchungen von an der Biofilmbildung beteiligten Genen in *Staphylococcus epidermidis* wurden bisher mittels Gesamt-RNA-Präparation und anschließender Analyse durch Northernhybridisierung oder *real time* PCR durchgeführt. Diese Methoden ermöglichen allerdings weder ein Monitoring der differentiellen Genexpression innerhalb eines *S. epidermidis* Biofilms über einen längeren Zeitraum hinweg, noch lassen sich Aussagen über die Situation auf Einzelzellebene treffen. Die Etablierung des *green fluorescent protein* (GFP) als Reportergensystem würde es hingegen gestatten, Untersuchungen in lebenden Biofilmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Schichten des Biofilms durchzuführen.

Ziel dieser Arbeit war die Adaptation des GFP<sub>mut3.1</sub> als Reporter gen in *S. epidermidis* 1457. Hierzu wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Evaluation der Bedeutung verschiedener Shine-Dalgarno-Sequenzen für die Fluoreszenzintensität von GFP<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* 1457 und *S. aureus* RN4220.
2. Einfluss verschiedener Shine-Dalgarno-Sequenzen auf die Transkriptions- und Translationseffizienz von *gfp*<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* 1457 und *S. aureus* RN4220.
3. Charakterisierung der biologischen Eigenschaften von GFP<sub>mut3.1</sub> nach Expression unter Verwendung einer optimierten SD-Sequenz.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Einwegartikel

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) in *Pro-analyse*-Qualität bezogen. Plastikartikel und Einwegmaterialien stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA), Eppendorf (Hamburg) und Greiner (Nütingen).

#### 2.1.2 Laborgeräte

**Tabelle 3:** Übersicht über verwendete Laborgeräte

	Gerätebezeichnung	Hersteller
Digital-pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick (Berlin)
Elektroporator	Gene Pulser <sup>®</sup> II	BioRad (Hercules, USA)
Fluoreszenzobjektträger	-/-	BioMérieux (Marcy l'Etoile, Frankreich)
Fluorometer	Versa Fluor	BioRad (Hercules, USA)
Geldokumentations- systeme	ChemiDoc <sup>™</sup> XRS	BioRad (Hercules, USA)
	UV-Transilluminator	Phase (Lübeck)
Gelelektrophoresekammern		
Horizontal	-/-	Keutz (Reiskirchen)
Vertikal	X Cell Sure Lock <sup>™</sup>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	Protean <sup>®</sup> II Xi Cell	BioRad (Hercules, USA)
Konfokales Laserscanning- Mikroskop	TCS AP2 AOBS	Leica (Solms)
Küvetten	Gene Pulser <sup>®</sup> 0,1 cm electrode gap	Biorad (Hercules, USA)
	VersaFluor <sup>™</sup> 4 ml	Biorad (Hercules, USA)

Photometer	DU <sup>®</sup> 530	Beckman (Fullerton, USA)
	Smart Spec <sup>™</sup> 3000	BioRad (Hercules, USA)
	GeneQuant	Pharmacia
	ELISA Processor II	Behring (Marburg)
Schüttelinkubator	-/-	New Brunswick Scientific Co (New Brunswick, USA)
Spannungsquelle	Power Pac 1000	BioRad (Hercules, USA)
Sterilfilter 0,22 µm	Spritzenvorsatzfilter	Merck (Darmstadt)
Thermocycler	Primus 96 plus	MWG (Eberswalde)
	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
	icycler IQ <sup>™</sup>	BioRad (Hercules, USA)
Thermoinkubator	Blockthermostat BT 100	Kleinfeld
Ultraschallzerkleinerer	Digital Sonifier <sup>®</sup>	Branson (Danbury, USA)
Waagen	PC 4400	Mettler (Giessen, Schweiz)
	Sartorius 4232	Sartorius (Göttingen)
Westernblotkammern	Semi Dry Elektrobloetter	Keutz (Reiskirchen)
	X Cell II <sup>™</sup> Blot Module	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Zellkulturschalen	Deckglasboden- 96-Loch-Schalen, beide NunclonΔ <sup>™</sup> -beschichtet	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus (Osterode)
	Biofuge 28 RS	
	Megafuge 1.0 R	

### 2.1.3 Medien

Alle Medien wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert.

#### **B-Brühe zur Protoplastentransformation (Götz und Schumacher, 1987), pH 7,4**

Pepton (Difco Laboratories, Detroit, USA) 10 g/l

Hefeextrakt (Difco) 5 g/l

NaCl 5 g/l

Glucose 1 g/l

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l

### **B2-Brühe zur Elektroporation**

Caseinhydrolysat 10 g/l

Hefeextrakt (Difco) 25 g/l

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l

Glucose 5 g/l

NaCl 25 g/l

### **Columbia Blutagar, pH 7,0**

Columbia-Agar (Difco) 42 g/l

Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) 1 g/l

Glucose 2,2 g/l

Schafsblut 72 ml/l

### **CY-Softagar (Götz und Schumacher, 1987)**

Caseinhydrolysat 25 g/l

Hefeextrakt (Difco) 25 g/l

NaCl 14,75 g/l

Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) 10 g/l

Der CY-Softagar wurde aufgekocht und in 25 ml-Portionen autoklaviert. Vor dem Einsatz in der Protoplastentransformation wurde er erneut durch Erhitzen verflüssigt, auf 50 °C abgekühlt, mit einem Volumen gleich temperierten, sterilen 1 M Natriumsuccinat und 4 ml Mix gemischt, und nach Bedarf mit Tetracyclin in einer Konzentration von 20 µg/ml versetzt.

Der Mix wurde aus seinen Komponenten frisch angesetzt und bestand aus:

50 % Glucose (gelöst in *aqua ad iniectabilia*, Braun, Melsungen) 1 ml

1 M MgCl<sub>2</sub> 2 ml

1,5 M β-Glycerophosphat Dinatiumsalz 4 ml

5 % BSA (*Albumin bovine fraction V*, pH 7, Serva, Heidelberg) 2 ml

Das β-Glycerophosphat wurde zur Sterilisation 1 h im Wasserbad gekocht und anschließend bei 4 °C gelagert. Stammlösungen von Glucose und BSA wurden sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

**Dico Antibiotic Medium No. 3**

Zur Verwendung in der Protoplastentransformation wurde Dico Antibiotic Medium No. 3 in konzentrierter Lösung mit 70 g/l (pH  $7 \pm 0,5$ ) hergestellt.

**DM3-Agar (Götz und Schumacher, 1987)**

Die Komponenten für den DM3-Agar wurden in 7 detergentienfreien Flaschen mit dH<sub>2</sub>O angesetzt, separat autoklaviert und bei einer Temperatur von etwa 70 °C zusammengeführt. Für das Wachstum von transformierten Protoplasten wurden Platten mit einem Volumen von etwa 30 ml gegossen.

Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) 10 g in 250 ml

Natriumsuccinat (1 M, pH7,3 mit Bernsteinsäure eingestellt) 135 g in 500 ml

Caseinhydrolysat/Hefeextrakt (Difco) 5 g/5 g in 100 ml

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3 H<sub>2</sub>O/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g/1,5 g in 100 ml

Glucose (sterilfiltriert) 5 g in 10 ml

MgCl<sub>2</sub> 1 M 20 ml

BSA (*Albumin bovine fraction V*), pH 7 (Serva), sterilfiltriert 0,5 g in 10 ml

**Hirn-Herz-Medium (*BrainHeart Infusion*, BHI), pH 7,4**

BHI-Brühe pH  $7,4 \pm 0,2$  (Difco) 37 g/l

Zur Verwendung bei der Phagentransduktion wurde dem Medium 5 g/l Natriumcitrat beigelegt.

Für Agarplatten wurde 15 g/l Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) zugesetzt.

Für Softagar wurde dem Medium 7 g/l Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) sowie Natriumcitrat 5 g/l hinzugelegt.

**Luria Bertani-Medium (LB), pH 7**

Trypton (Oxoid, Ltd., Basingstoke, England) 10 g/l

Hefeextrakt (Difco) 5 g/l

NaCl 10 g/l

Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) zugesetzt.

**NB2+ Brühe zur Phagentransduktion**

Nutrient Broth No. 2 (Oxoid) 20 g/l

CaCl<sub>2</sub> 0,4 g/l

**NYE-Agar, pH 7,2**

Caseinhydrolysat 10 g/l

Hefeextrakt (Difco) 5 g/l

NaCl 5 g/l

Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) 15 g/l

**ST-Agar (*Staphylococcus Typing Agar*)**

Nutrient Broth No. 2 (Oxoid) 20 g/l

CaCl<sub>2</sub> 0,4 g/l

NaCl 5 g/l

Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) 12 g/l

Für Softagar wurde das Medium mit 7 g/l Bacto<sup>®</sup>-Agar (Difco) versetzt.

**Trypticase Soya Broth (TSB-BBL)**

TSB-BBL pH 7,3 ± 0,5 (Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA) 30 g/l

**TSB ohne Glucose (TSBØ), pH 7,3**

Trypton (Oxoid) 17 g/l

*Neutralized Soya Pepton* (Oxoid) 3 g/l

NaCl 5 g/l

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/l

**2.1.4 Lösungen**

Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit entionisiertem Wasser angesetzt, und ohne vorheriges Autoklavieren verwendet.

**Anodenpuffer I für Westernblot**

Tris (Invitrogen) 300 mM

Methanol 20 % [v/v]

**Anodenpuffer II für Westernblot**

Tris (Invitrogen) 25 mM

Methanol 20 % [v/v]

**DNA-Ladepuffer**

Bromphenolblau 0,25 %

Xylen Cyanol FF 0,25 %

Ficoll 15 %

**5x Elektrophoresepuffer (Laemli) zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Tris (Invitrogen) 15 g/l

Glycin 72 g/l

SDS 5 g/l

**Ethidiumbromid-Stammlösung**

Es wurde eine Ethidiumbromidlösung mit 10 mg/ml in dH<sub>2</sub>O angesetzt.

**Kathodenpuffer für Westernblot**

Tris (Invitrogen) 25 mM

6-Aminohexansäure 40 mM

Methanol 20 % [v/v]

**10x MOPS, pH 7**

Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) 200 mM

Natriumacetat 50 mM

EDTA 10 mM

**PBST-Puffer**

Phosphatgepufferte Salzlösung versetzt mit Tween<sup>®</sup> 20 0,1 % [v/v]

**Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4**

NaCl 8 g/l

KCl 0,2 g/l

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l

**4x Probenpuffer zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 1 ml

Glycerin 87 % 1,6 ml

SDS 10 % 1,6 ml

$\beta$ -Mercaptoethanol 0,4 ml  
Bromphenolblau 0,5 % [w/v] 0,4 ml  
dH<sub>2</sub>O 3 ml

Der Probenpuffer wurde für 4 min auf 95 °C erhitzt und ohne Sterilisation verwendet.

### **SDS**

Es wurde eine 20 %ige Stammlösung Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS) in dH<sub>2</sub>O angesetzt.

### **SMM, pH 6,5**

Saccharose 1 M  
Maleinsäure 0,04 M  
MgCl<sub>2</sub>·6 h<sub>2</sub>O 0,04 M

SMM wurde zur Sterilisation 1 h im Wasserbad gekocht und anschließend bis zum Gebrauch in 40 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

### **SMMP, pH 6,5**

SMM 16 ml  
Difco Antibiotic Medium No. 3 4 ml  
BSA 5 % (Serva, sterilfiltriert) 1 ml

Die Lösung wurde vor Gebrauch aus ihren Komponenten frisch angesetzt.

### **20x SSC, pH 7**

NaCl 3 M  
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 0,3 M

SSC wurde vor Gebrauch frisch angesetzt und ohne Sterilisation verwendet.

### **5x TBE**

Tris (Invitrogen) 54 g/l  
Borsäure 27,5 g/l  
EDTA 0,5 M, pH 8 20 ml/l

### **TE, pH 8**

Tris (Invitrogen) 10 mM  
EDTA 1 mM

TE-Puffer wurde vor Gebrauch 15 min bei 121 °C autoklaviert.

### Tris-HCl

1,5 M Tris (Invitrogen) wurde mit 1 M HCl auf pH 8,8 eingestellt.

1,5 M Tris (Invitrogen) wurde mit 1 M HCl auf pH 6,8 eingestellt.

### X-Gal-Lösung

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid wurde in einer Konzentration von 40 mg/ml in Dimethylformamid gelöst.

## 2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

**Tabelle 4:** Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> Wirt zur Klonierung von Plasmiden	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>S. aureus</i> RN4220	8325-4r <sup>-</sup> , Restriktionsdefizienter Klonierungswirt	(Fairweather <i>et al.</i> , 1983)
M 12	<i>purR::Tn917</i> -knockout-Mutante von <i>S. epidermidis</i> 1457, biofilm-negativ, elektroporierbar, transformierbar durch Bildung von Protoplasten	(Knobloch <i>et al.</i> , 2004; Mack <i>et al.</i> , 2000)
<i>S. epidermidis</i> 1457	Blutkulturisolat (Institut für Infektions- medizin, UKE), biofilmbildend, <i>ica</i> -positiv	(Mack <i>et al.</i> , 1992)
<i>S. epidermidis</i> 1457 -M10	<i>icaA::Tn917</i> , biofilm-negativ	(Mack <i>et al.</i> , 1994)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ x pAS1	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ enthält pAS1	(Tegmark <i>et al.</i> , 2000)

**Tabelle 5:** Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pAS1	Shuttlevektor zur Propagierung in <i>E. coli</i> und in Staphylokokken, <i>xylR</i> -abhängige Transkriptions- initiation eines Gens durch vorgeschalteten <i>xylA</i> - Promotor	(Morfeldt <i>et al.</i> , 1996; Tegmark <i>et al.</i> , 2000)

pCR2.1	Plasmid zur TA-Klonierung von PCR-Produkten, <i>blue-white screening</i> durch $\beta$ -Galactosidase-Gen	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pGFP <sub>mut3.1</sub>	Plasmid enthält <i>gfp</i> <sub>mut3.1</sub>	Clontech (Palo Alto, CA; USA)
pAS <i>gfp</i> <sub>icaA</sub>	<i>gfp</i> <sub>mut3.1</sub> in pAS1 unter Kontrolle von <i>xylA/xylR</i> unter Voranstellung der <i>icaA</i> -SD-Sequenz (GenBank-Zugangsnummer U43366)	Dobinsky, unveröff. Daten
pAS <i>gfp</i> <sub>sarA</sub>	<i>gfp</i> <sub>mut3.1</sub> in pAS1 unter Kontrolle von <i>xylA/xylR</i> unter Voranstellung der SD-Sequenzen verschiedener Gene vor dem GFP-Startcodon:	diese Arbeit
pAS <i>gfp</i> <sub>GC</sub>	- <i>sarA</i> : staphylokokkeneigener Regulator A (Cheung <i>et al.</i> , 1998)	
pAS <i>gfp</i> <sub>sod</sub>	- GC: Konsensus-SD-Sequenz für grampositive Bakterien (Qazi <i>et al.</i> , 2001; Vellanoweth, 1993)	
pAS <i>gfp</i> <sub>hld</sub>	- <i>sod</i> : Superoxiddismutase aus <i>S. epidermidis</i> (GenBank-Zugangsnummer AF462457)	
	- <i>hld</i> : Hämolyisin delta (GenBank-Zugangsnummer Z49220)	

### 2.1.6 Oligonukleotide und Sonden

**Tabelle 6:** Übersicht über die verwendeten Primer

Name	Sequenz	Verwendung
M 13 for	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	Sequenzierung von pCR2.1-Inserts
M 13 rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	Sequenzierung von pCR2.1-Inserts
GFP for	5'-CTTGTTGAATTAGATGGTGATG-3'	Northernhybridisierung, DIG-markierte Sonde
GFP rev	5'-GTACATAACCTTCGGGCATG-3'	Northernhybridisierung, DIG-markierte Sonde

Gfp foricycl	5`-ATGGAAGCGTTCAACTAGCAGAC-3`	Relative Transkriptionsanalyse
Gfp revicycl	5`-CGAAAGGGCAGATTGTGTGGAC-3`	Relative Transkriptionsanalyse
SD <i>sarA</i> - S	5`-ACGCCTCGGGTAGGGAGAGGTTTT AAACATGCGTAAAGGAGAAGAACTT-3`	Amplifikation GFP, <i>sarA</i> -SD-Sequenz unterstrichen, <i>Ava</i> I fett
SD GC-S	5`-ACGCCTCGGGTTAACAAAGGAGGAAT AAAAAATGCGTAAAGGAGAAGAACT-3`	Amplifikation GFP, Konsensus-SD-Sequenz Unterstrichen, <i>Ava</i> I fett
SD <i>sod</i> -S	5`-ACGCCTCGGGATTTTAGGAGGATG ATTATTTATGCGTAAAGGAGAAGAAC-3`	Amplifikation GFP, <i>sod</i> -SD-Sequenz unterstrichen, <i>Ava</i> I fett
SD <i>hld</i> -S	5`-ACGCCTCGGGTTCGAAAGGAGTGA AGTTATGCGTAAAGGAGAAGAACTT - 3`	Amplifikation GFP, <i>hld</i> -SD-Sequenz unterstrichen, <i>Ava</i> I fett
GFPmut3 <i>Sac</i> Iterm	5`-AGGAGCTCAAAATCCCTTATTCAA GCACATAAGCCATAGCTTGAATAAGGG ACTTTTTTTTATTTGTATA-3`	Amplifikation GFP, <i>Sac</i> I fett
<i>gyrB</i> real 1	5`-CTGACAATGGCCGTGGTATTC 3`	Relative Transkriptionsanalyse
<i>gyrB</i> real 2	5`-GAAGATCCAACACCGTGAAGAC-3`	Relative Transkriptionsanalyse
<i>Ava</i> lica Pm3-S	5`-ACGCCTCGGGAGGTAGGTGAAAAAA TGCGTAAAGGAGAAGAACTT 3`	Amplifikation GFP, <i>icaA</i> -SD-Sequenz unterstrichen, <i>Ava</i> I fett
GFPm3 <i>Sac</i> I-AS	5`-ACGAGCTCTTATTTGTATAGTTCATC CAT-3`	Amplifikation GFP, <i>Sac</i> I Schnittstelle fett

### 2.1.7 Datenbanken und Programme

Die durch PCR und Sequenzierreaktion gewonnenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI (InforMax, Oxford, UK) bearbeitet und analysiert.

Oligonukleotidsequenzen für die relative Transkriptionsanalyse wurden mit dem Programm Beacon Designer 2 (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) generiert. Die statistische Auswertung der quantitativen Fluoreszenzanalyse erfolgte mit dem Programm WinSTAT<sup>®</sup> (Staufen). Die Bearbeitung von Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop erfolgte mit dem Programm Leica Confocal Software, Lite Version (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien**

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden in der Regel bei 37 °C in Flüssigmedien kultiviert. Vorkulturen wurden entweder für 6 h oder über Nacht inkubiert und anschließend für die Hauptkulturen 1:100 im gewünschten Medium verdünnt. Schüttelkulturen wurden bei 200 rpm in sterilen Glasgefäßen inkubiert. Für eine Stammhaltung wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend bei 4 °C gelagert. Gegebenenfalls wurden den Agarmedien Antibiotika zur Selektion zugesetzt.

#### **2.2.1.2 Resistenztestung**

Die Resistenzmuster der verwendeten Stämme wurden in regelmäßigen Abständen im Agardiffusionstest bestimmt. Bei dieser Methode werden Filterplättchen, die mit Antibiotika getränkt sind, auf eine gleichmäßig über die ganze Fläche mit dem zu testenden Keim beimpfte Platte aufgelegt, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wird. Durch Diffusion entstehen Konzentrationsgradienten um die Filterplättchen herum. In Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des Teststammes entstehen Hemmhöfe, deren Durchmesser in quantitativer Beziehung zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) für das Antibiotikum steht. Die Testung wurde für folgende Substanzen durchgeführt: Penicillin G, Flucloxacillin, Ampicillin, Gentamicin, Netilmicin, Clindamycin, Erythromycin, Tetracyclin, TMP/SMZ (Bactrim) und Ciprofloxacin (alle Becton Dickinson).

### 2.2.1.3 Biofilmtestung

Die Fähigkeit von *S. epidermidis* Stämmen zur Bildung von Biofilmen wurde mittels eines semiquantitativen Biofilmtests beurteilt (Christensen *et al.*, 1985). Als Positivkontrolle diente *S. epidermidis* 1457 (biofilm-positiv), als Negativkontrolle *S. epidermidis* 1457-M10 (biofilm-negativ). Standardmäßig wurde eine Einzelkolonie in 2 ml TSB-BBL suspendiert und für 6 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine 1:100-Verdünnung im gleichen Medium hergestellt. Hiervon wurden je viermal 200 µl in die Näpfe einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (NunclonΔ, Nunc) gegeben. Für die Untersuchung von plasmidtragenden Stämmen wurde antibiotikahaltiges Medium verwendet. Der Hauptkultur wurden 2 % Xylose zugesetzt. Nach etwa 20-stündigem Wachstum bei 37 °C wurde das Medium abgegossen und die Platte dreimal mit 200 µl PBS pro Napf gewaschen. Die Platte wurde anschließend bei 37 °C getrocknet und die anheftenden Bakterien mit 50 µl Kristallviolett pro Napf für 5 min gefärbt. Die Färbelösung wurde unter fließendem Wasser vorsichtig ausgespült und nach erneutem Trocknen die Absorption im ELISA Processor II (Behring) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt. Der Biofilm-Phänotyp wurde durch Bildung des Mittelwertes von 2 x 4 Einzelwerten beurteilt. Hierbei galt ein *cut off* von  $A_{570}$  von 0,1 als Trennpunkt zwischen biofilm-positiven und -negativen Phänotyp.

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die horizontale Gelelektrophorese wurde zur größenabhängigen Auftrennung von Plasmiden, von Fragmenten gespaltener Plasmide oder dem Nachweis von Amplifikaten aus der PCR eingesetzt (Sambrook *et al.*, 1989). Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 0,8–1,5 %ige [w/v] Agarosegele verwendet. Hochreine Agarose (SeaKem ME Agarose, Cambrex Bioscience Rockland Inc., Rockland, ME USA) wurde in 100 ml 0,5fach TBE-Puffer aufgeköcht, mit 3,3 µl Ethidiumbromidkonzentrat versetzt und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 2 µl DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Eine Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 3–6 V/cm in 0,5fach TBE als Laufpuffer. Als Größenstandard wurde ein Mix aus *Hind*III gespaltener λ-DNA und *Hae*III gespaltener φX174-DNA (Finnzymes, Espoo, Finnland) aufgetragen. Er

enthält 19 Fragmente der folgenden Größen: 23 kb, 9,4 kb, 6,5 kb, 4,3 kb, 2,3 kb, 3 kb, 1,3 kb, 1 kb, 872 bp, 564 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 234 bp, 194 bp, 125 bp, 118 bp, 72 bp.

### 2.2.2.2 Plasmidpräparation

Plasmidpräparation aus *E. coli* wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das System beruht auf alkalischer Lyse der Bakterienzellen, gefolgt von einer Denaturierung und Präzipitation der chromosomalen DNA sowie der Proteine, wobei die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt (Birnboim und Doly, 1979). Zur Aufreinigung erfolgte eine Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silikatmatrix in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Anschließend wurde die DNA in salzarmem Puffer eluiert. Für Plasmidpräparationen aus *E. coli* wurden die Bakterien in der Regel über Nacht in LB-Medium unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin angezüchtet. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Da sich die Zellwände von Staphylokokken durch das beschriebene Verfahren nicht aufschließen lassen, wurde das Protokoll für *S. aureus* RN4220, *S. epidermidis* 1457 und M12 um einen weiteren Lyseschritt ergänzt. Zunächst wurden die Bakterien auf antibiotikahaltigen Selektivagarplatten angezogen und direkt in Puffer 1 (Kit) resuspendiert, der mit 15 U/ml Lysostaphin versetzt war. Die Suspension wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Die Eluate wurden zur Sequenzierung oder zu Restriktionsanalysen eingesetzt.

### 2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standardmäßig wurde die PCR mit Hilfe des DyNAzyme<sup>TM</sup> Polymerasekit (Finnzyme) in einem DNA Thermal Cycler (MWG) mit beheiztem Deckel durchgeführt. In einem 50 µl Ansatz wurde ca. 100 ng *template* DNA, Primer in einer Konzentration von 10 pM/µl, dNTPs mit je 200 µM, 1 U Polymerase und der zugehörige Mg<sup>2+</sup>-haltige Puffer (1,5 mM) eingesetzt. Initial wurde die DNA 2 min bei 94 °C denaturiert, in den anschließenden Zyklen nur für 15 s. Für die Anlagerung der Primer wurde die Temperatur für 30 s auf 55 °C abgesenkt. Der Zweitstrang wurde bei 72 °C synthetisiert. Nach in der Regel 30 Zyklen schloss sich eine siebenminütige Synthesephase an, um eine vollständige Komplementierung aller Einzelstränge zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. Die Kontrolle der PCR fand in einer Agarosegelelektrophorese statt. Für die Amplifizierung des GFP und seiner

Mutanten aus dem Originalplasmid und um sie in der Klonierung zu verwenden, wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche, Indianapolis, USA) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Es enthält eine *proofreading* DNA-Polymerase mit inhärenter Exonukleaseaktivität, die auftretende Synthesefehler reparieren kann und so eine höhere Genauigkeit gewährleistet.

#### **2.2.2.4 Restriktionsverdau**

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* oder Staphylokokken extrahiert und einer Spaltung mit Restriktionsenzymen unterzogen (Sambrook *et al.*, 1989). Die Restriktionsansätze enthielten 5–15 µl DNA, 1 µl Enzym sowie den geeigneten Puffer und wurden mit sterilem dH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation für 4–24 h bei 37 °C. Die DNA wurde dann in einer horizontalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus wurde durch Betrachtung unter dem Transilluminator dokumentiert. Gegebenenfalls wurden die Banden ausgeschnitten und zur weiteren Verarbeitung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

#### **2.2.2.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Das System beruht auf Lyse des Agarosegels, gefolgt von einer Adsorption der DNA an eine Silikatmatrix. Das Bindungsverhalten war dabei abhängig vom pH-Wert und dem Salzgehalt der Lösung. Die anschließende Elution erfolgte in einem EDTA-freien Puffer. Zunächst wurden die gewünschten Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und dann mit dem Kit aufgereinigt. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. So gereinigte Fragmente wurden zur Ligation in den linearisierten Shuttlevektor pAS1 eingesetzt.

#### **2.2.2.6 Ligation**

Ligationen wurden durchgeführt, um einzelne Gene über Restriktionsschnittstellen in den linearisierten Staphylokokkenvektor pAS1 einzufügen. Alle Ligationen fanden über Nacht bei 16 °C unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (Roche) und dem dazugehörigen Puffer statt. Anschließend wurden die Konstrukte in chemokompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert.

### 2.2.2.7 Klonierung

Eine Klonierung von PCR-Amplifikaten erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, K4700, Vers. J) nach Angaben des Herstellers. Dabei besitzt der linearisierte Vektor pCR2.1-TOPO beidseitig 3'-Desoxyadenosin-Überhänge. Mit Hilfe der Topoisomerase I wurden Vektor und Amplifikate ligiert und danach in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Die *multiple cloning site* des Vektors liegt in einem *lacZ*-Gen. Somit können Klone mit erfolgreicher Insertion anhand eines *blue/white screenings* (Sambrook *et al.*, 1989) identifiziert werden. Es wurden 1–4 µl eines PCR-Amplifikats und 1 µl Salzlösung mit sterilem dH<sub>2</sub>O auf 5 µl aufgefüllt und mit 1 µl Vektor gemischt. Die Ligation fand für 5 min bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt.

### 2.2.2.8 Chemische Transformation

Chemokompetente *E. coli* TOP10 Zellen (im Kit enthalten) wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und erneut auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit 250 µl SOC-Medium (Kit) versetzt und für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Für die Transformation von pCR2.1 wurde zunächst 40 µl X-Gal auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Platten bei 37 °C vorgewärmt. Die Bakteriensuspension wurde unverdünnt auf 4 LB-Agarplatten ausplattiert. Nach 24 h wurden weiße Kolonien zur weiteren Analyse ausgewählt. Die Blaufärbung der Kolonien zeigte β-Galaktosidaseaktivität an, die nur im Falle einer erfolgreichen Integration in den Vektor aufgehoben wird.

### 2.2.2.9 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden aus mit den QIA-quick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigten PCR-Amplifikaten unter Verwendung der Primer M 13 for und M 13 rev und des CEQ<sup>™</sup> DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Fullerton, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. In einem Thermocycler mit beheiztem Deckel (MWG) wurde die DNA zunächst für 2 min denaturiert. Es schlossen sich 30 Zyklen mit jeweils 20 s Denaturierung bei 96 °C, Anlagerung der Primer bei 50 °C für 20 s und 4 min Synthesezeit bei 60 °C an. Am Ende wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt. Eine Fällung mit eiskaltem Alkohol reinigte die Sequenzierreaktion von überschüssigen Nukleotiden, anschließend wurde die Sequenz mit dem automatischen 8-Kanal-

Kapillar-Sequencer (Beckman-Coulter) analysiert. Eine weitere Beurteilung der Sequenzen im Vergleich zur Originalsequenz des GFP und seiner Mutanten (Clontech) erfolgte mit dem Programm Vector NTI Version 8 (InforMaX).

### 2.2.2.10 Transformation durch Elektroporation

#### Herstellung elektrokompenter Zellen (Augustin und Götz, 1990)

Eine Bakterienkolonie wurde in B2-Brühe eingerührt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde 1:25 in B2-Brühe verdünnt und für etwa drei weitere Stunden inkubiert. Die Zellen wurden bei einer optischen Dichte  $OD_{578}$  von 0,6–0,7 geerntet. Um weiteres Zellwachstum zu verhindern, wurden alle nachfolgenden Schritte der Zellernte auf Eis bzw. mit vorgekühlten Gefäßen und Lösungen durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten alle Zentrifugationsschritte für 10 min bei 4 °C und 6238xg.

Um die Bakterien von jeglichen Salzurückständen zu befreien, wurde das Medium abzentrifugiert und die Zellen durch dreimaliges Resuspendieren und Zentrifugieren in 25 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen. Daran schloss sich ein Waschschrift in 5 ml Glycerin 10 % und Zentrifugation für 5 min an. Das Pellet wurde in 2,5 ml Glycerin 10 % resuspendiert, für 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um eine Zellkonzentration von  $10^9$ – $10^{10}$  zu erhalten, wurden die Zellen in ca. 800 µl Glycerin 10 % resuspendiert und entweder sofort weiterverarbeitet, oder in Aliquots von 70 µl bei –80 °C eingefroren. Durch die Lagerung trat allerdings eine Verminderung der Transformationseffizienz um etwa den Faktor 100 auf. Zur Dokumentation der Zellzahl wurde eine Verdünnungsreihe der Bakteriensuspension auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

**Elektroporation** Für die Transformation wurden entweder frische elektrokompente Zellen oder auf Eis aufgetaute Aliquots eingesetzt und mit 2–6 µl eines Plasmids versetzt. 60 µl dieser Mischung wurden blasenfrei in den Spalt einer 0,1 cm *gap* Küvette (Biorad) eingefüllt. Die Elektroporation erfolgte bei 100 Ω, 2,3 kV und Raumtemperatur für etwa 2,3–2,5 ms. Die transformierten Zellen wurden für 1 h in 390 µl B2-Brühe bei 37 °C geschüttelt, um die Expression der plasmidkodierten

Resistenzgene zu gewährleisten, und sodann auf NYE-Agarplatten mit 20 µg/ml Tetracyclin ausplattiert. Transformanten erschienen in der Regel nach 2–4 Tagen.

#### 2.2.2.11 Protoplastentransformation

Zur Transformation von M12-Protoplasten wurde im Wesentlichen das Protokoll von Götz verwendet (Götz und Schumacher, 1987). Um sicherzustellen, dass sich keine Detergenzienreste in den verwendeten Gefäßen befanden, wurden alle Glasgeräte und Zentrifugenbecher vor Gebrauch gründlich mit entionisiertem Wasser und dH<sub>2</sub>O gespült. Außerdem wurden ausschließlich Glaspipetten verwendet, um die Einwirkung von Scherkräften auf die empfindlichen Protoplasten gering zu halten.

**Herstellung der Protoplasten** Eine Kolonie M12 wurde in 15 ml B-Brühe eingärert und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurden 2,5 ml in 800 ml B-Brühe überführt und für etwa drei weitere Stunden inkubiert. Die Zellen wurden bei einer optischen Dichte von OD<sub>578</sub> von exakt 0,5 geerntet. Um weiteres Zellwachstum zu verhindern, wurden alle nachfolgenden Schritte der Zellernte auf Eis und mit kalten Lösungen durchgeführt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 6232xg und 4 °C für 15 min pelletiert und von Restmedium befreit. Das Pellet wurde in 100 ml SMMP resuspendiert und in 4 100 ml Erlenmeyerkolben aufgeteilt. Zur Lyse der Zellwände wurden die Kolben mit 10, 20, 40 und 80 µl Lysostaphin (1500 U/ml) beschickt und für 16 h bei 30 °C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert. Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation bei 27000xG und 4 °C für 40 min geerntet und die Pellets durch Abgießen vom Restmedium befreit. Die Protoplasten wurden in 2 ml SMMP ohne BSA durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und in 300 µl Aliquots in 10 ml Polystyrolröhrchen bei –80 °C gelagert.

**Transformation** Zur Transformation wurden frische Protoplasten oder bei Raumtemperatur aufgetaute Aliquots eingesetzt und mit 10–35 µl eines Plasmids versetzt. Die Fusion der Protoplasten mit dem Plasmid wurde durch Zugabe von 2 ml Fusogen (40 % [w/v] Polyethylenglycol in 50 % [v/v] SMM, pH 6,5) ausgelöst. Zur Sterilisation war das Fusogen zuvor eine Stunde im Wasserbad gekocht worden. Die Suspension wurde vorsichtig durch Schwenken des Röhrchens gemischt, bis kaum noch Schlieren zu sehen waren. Nach 2 min wurde das Fusogen durch Zugabe von 7 ml SMMP verdünnt, und dadurch die Fusion gestoppt. Die Protoplasten wurden bei Raumtemperatur für 20 min bei 6232xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Das Pellet wurde in

2 ml SMMP durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert und die Protoplasten unverdünnt auf DM3-Agar ausplattiert. Um die Expression der plasmidkodierten Gene zu gewährleisten, erfolgte ein vierstündiger Inkubationsschritt bei 37 °C. Zur Selektion wurden die Bakterien dann mit 3 ml CY-Softagar mit 20 µg/ml Tetracyclin überschichtet. Transformanten erschienen in der Regel nach etwa 48 h.

#### **2.2.2.12 Phagentransduktion (Mack *et al.*, 2001)**

Bei der Phagentransduktion handelt es sich um ein Verfahren, bei dem genetisches Material eines Donors im Rahmen des Vermehrungszyklus eines Bakteriophagen mobilisiert und bei der Infektion des Rezipienten in diesen eingeführt (transduziert) wird. Hierfür wurde der von Vibeke T. Rosdahl (Statens Serum Institute, Copenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellte Phage 71 verwendet.

**Herstellung eines plasmidtragenden Phagenlysates** Um ein Plasmid durch Phagentransduktion in einen anderen Stamm zu überführen, wurde ein Phagenlysat hergestellt, indem man eine Vorkultur des plasmidtragenden Stammes in NB2+ (mit 20 µg/ml Tetracyclin) 1:100 im gleichen Medium zur Hauptkultur verdünnte und unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte  $OD_{578}$  von 0,1–0,2 wachsen ließ. Man vermischte 1 ml der Bakteriensuspension mit 1 ml Phagensuspension und 3 ml auf 42 °C erwärmten STA-Softagar und verteilte die Mischung zügig auf vorbereitete ST-Agarplatten, die über Nacht bei 30 °C bebrütet wurden.

Um die Phagen aus dem Softagar zu extrahieren, wurden 5 ml NB2+-Brühe dazugegeben, die Softagarschicht mit einem Glasspatel zerkleinert, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen für 1 min kräftig geschüttelt und der Agar durch zweimalige Zentrifugation bei 1560xg für je 10 min von dem Phagenlysat abgetrennt. Dieses wurde sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Die Titer von mit dieser Methode gewonnener Lysate lagen bei etwa  $10^9$ – $10^{10}$  PFU/ml.

**Plaquetitration** Die Phagenkonzentration eines Lysates wurde durch Erstellen einer Verdünnungsreihe ermittelt. Hierzu kultivierte man den Empfängerstamm, wie für die Herstellung eines Phagenlysates beschrieben, und inkubierte ihn in gleicher Weise mit dem in Stufen von  $10^{-3}$ – $10^{-9}$  in NB2+ verdünnten plasmidtragenden Phagenlysat auf ST-Agar für 24 h. Die entstandenen Plaques wurden ausgezählt, wobei die optimale

Konzentration durch das Vorhandensein eines gerade nicht konfluierenden Plaquemusters gekennzeichnet ist.

**Transduktion** Der über Nacht auf Blutagar kultivierte Empfängerstamm *S. epidermidis* 1457 wurde in einer Konzentration von  $0,5-1 \times 10^{10}$  CFU/ml entsprechend einer OD<sub>578</sub> von 11 in NB2+ suspendiert. Hiervon wurde 1 ml mit dem gleichen Volumen des plasmidtragenden Phagenlysats in einem Phagen-Bakterien-Verhältnis von 0,1–1 für 30 min in einem Schüttelinkubator bei 37 °C infiziert. Die Adsorption der Phagenpartikel wurde durch Zugabe von 40 µl 1 M Natriumcitrat gestoppt. Das Medium wurde bei 1560xg abzentrifugiert, die Zellen zweimal in 2 ml BHI-Brühe mit 20 mM Natriumcitrat gewaschen und in 3 ml des gleichen Mediums resuspendiert. Um die Expression der plasmidkodierten Resistenzgene zu gewährleisten, inkubierte man die Bakterien in diesem Medium für 1 h in einem Schüttelinkubator bei 37 °C. Die Suspension wurde mit 3 ml BHI-Softagar, der mit 20 mM Natriumcitrat und 20 µg/ml Tetracyclin versetzt war, gemischt, und auf BHI-Agarplatten mit 20 µg/ml Tetracyclin verteilt. Transduktanden wurden in der Regel nach 24–48 h isoliert.

#### **2.2.2.13 Extraktion von Ribonukleinsäuren (RNA) aus *S. epidermidis***

Für die Extraktion von Ribonukleinsäuren aus *S. epidermidis* 1457 wurde im Wesentlichen nach der von Dobinsky beschriebenen Methode verfahren (Dobinsky und Mack, 2001).

Es wurden Schüttelkulturen in TSBØ der stationären Wachstumsphase verwendet, denen Xylose zugesetzt worden war. Für die Zellernte nach 24 h wurden die Bakterien direkt in xylosehaltigem Medium angezüchtet. Für die Ernte nach 6 h Induktion wurden einer stationären Kultur 2 % Xylose zugesetzt und diese für weitere 6 h bebrütet. Zur Zellernte wurden 10 ml der Kulturen auf Eis entnommen, 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert und mit 2 ml eiskaltem PBS überschichtet. Biofilm-bildende Bakterienstämme wie *S. epidermidis* 1457 wurden einer Behandlung mit Ultraschall sowie einem Verdau mit Lysostaphin unterzogen, um den Biofilm zu zerstören, die Zellen besser aufzuschießen und so die Ausbeute an RNA zu erhöhen. Nach Zugabe von 3 ml RNA protect™ Bacteria Reagent (Qiagen) wurden die Zellen einmal 10 s mit 70 % Leistung und in zwei Durchgängen jeweils 3 x 30 s bei 70 % Leistung auf Eis geschallt und danach 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde jeweils wieder mit 10 ml eiskaltem

PBS überschichtet. Danach wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer resuspendiert und unter Schütteln für 10 min bei 37 °C mit 150 U/ml Lysostaphin verdaut. Nach Zugabe von 700 µl RLT-Puffer (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, Qiagen), 7 µl β-Mercaptoethanol und 15 s Vortexen wurde die Probe in eine 2 ml Lysing Matrix Tube (Bio 101<sup>®</sup> Systems, Qbione, Morgan Irvine, CA, USA) mit Silikapartikeln überführt. Der Zellaufschluss erfolgte im FastPrep<sup>™</sup> celldisruptor (FB 120, BIO 101, Savant instruments, Farmingdale, NY, USA) dreimal 20 s bei maximaler Geschwindigkeit. Sofort wurde der Ansatz auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zelltrümmer 1 min bei Maximalgeschwindigkeit abzentrifugiert. Die weitere Bearbeitung des Überstandes wurde unter Verwendung des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch im GeneQuant Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.2.14 Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA**

Durch Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese kann RNA der Größe nach aufgetrennt werden. Auf diese Weise lässt sich zum einen die Integrität der RNA überprüfen, zum anderen kann das Gel für eine Northernhybridisierung verwendet werden. Zunächst wurden die Elektrophoresekammer sowie Gelträger und Kamm gründlich nacheinander mit 1 M HCl, 1 M NaOH und 70 % [v/v] Ethanol gewaschen, um DNA-Reste zu entfernen. Es wurde ein Agarose-Formaldehyd-Gel hergestellt, indem 1,5 g Agarose in 15 ml 10x MOPS und 127,5 ml autoklaviertem dH<sub>2</sub>O aufgekocht wurde und mit 7,5 ml Formaldehyd (Fluka, Buchs, Schweiz) und 5 µl Ethidiumbromidkonzentrat gemischt wurde. Aliquots mit einer RNA-Konzentration von 0,1–10 µg wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 µl frischem Probenpuffer (Formamid/Formaldehyd/10x MOPS/dH<sub>2</sub>O im Verhältnis 15:5:3:3) versetzt, 10 min bei 65 °C erhitzt und direkt anschließend wieder auf Eis gestellt. Die so vorbereiteten Proben wurden mit 2,5 µl Ladepuffer (50 % [v/v] Glycerin, 0,4 % [w/v] Bromphenolblau, 0,2 % [w/v] Xylen-Cyanol) gemischt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 1 V/cm für 15–20 h mit 1x MOPS als Laufpuffer. Die Wanderung der RNA im Gel wurde auf einem Transilluminator (Phase) dokumentiert.

### 2.2.2.15 Kapillärer Transfer von RNA auf Nitrozellulosemembranen (Northernblot)

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennte RNA wurde durch kapillären Transfer auf eine Zeta-Probe<sup>®</sup> Blotting Membran (BioRad) übertragen. Dem ging eine Equilibrierung des Agarose-Formaldehyd-Gels für 15 min in 20x SSC voraus.

Zwei Puffertanks, die mit einer aufliegenden Glasplatte verbunden waren, wurden mit 20x SSC gefüllt. Über 2 Lagen Filterpapier (Schleicher und Schüll, Dassel) waren die Tanks mit einer Brücke verbunden. Darauf wurden 2 weitere Lagen Filterpapier platziert. Das von den Taschen befreite Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf die feuchten Filter gelegt und mit einer zuvor in 20x SSC getränkten Nitrozellulosemembran bedeckt, deren Größe der des Agarosegels entsprach. Es folgten 10 Lagen getränktes Filterpapier und ein Stapel trockener Papierhandtücher entsprechend der Gelgröße. Beim Auflegen aller Lagen wurde auf Luftblasenfreiheit geachtet. Anschließend wurde eine Glasplatte aufgelegt und diese mit ca. 500 g Gewicht beschwert. Die Puffertanks wurden mit Klarsichtfolie (Saran, Dow Chemicals, MI, USA) bedeckt und das Gel mit dieser umrandet, sodass der kapilläre Fluß nur über die Membran stattfinden konnte. Nach 18 h konnte die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und 2 h bei 80 °C getrocknet werden.

**Herstellung der Sonde** Die DNA-Sonde wurde mit Digoxigenin-markierten Nukleotiden unter Verwendung des PCR DIG probe Synthesis Kit (Roche) und der Primer GFP for und GFP rev nach den Angaben des Herstellers in einem Thermocycler mit beheiztem Deckel synthetisiert, wobei die Primeranlagerung bei 56 °C erfolgte.

Die **Hybridisierung** wurde mit Hilfe des DIG Wash and Block Buffer Set (Roche) nach den Angaben des Herstellers über Nacht in einem verschließbaren Plastikbeutel bei 50 °C unter leichtem Schwenken in einem Schüttelwasserbad durchgeführt. Die Hybridisierungslösung bestand aus 4 µl bei 95 °C denaturierter Digoxigenin-markierter DNA-Sonde und 3,5 ml vorgewärmter Prähybridisierungslösung (Kit), die luftblasenfrei in den Beutel eingefüllt wurde. Für die Chemilumineszenz-Detektion wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper zugegeben. Als Substrat diente CDP-Star (Roche), ein Chlor-substituiertes 1,2-Dioxetan, das nach enzymatischer Dephosphorylierung sichtbares Licht emittiert. Die Detektion erfolgte durch Exposition von Röntgenfilmen (Chemilumineszenz Detection Film, Roche) für 5–30 min.

### 2.2.2.16 Transkriptionsanalyse durch *real time* PCR

Bei der quantitativen oder *real time* PCR ist dem Ansatz ein fluoreszierender Farbstoff beigelegt, der unspezifisch an Doppelstrang-DNA bindet. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenzintensität der Proben gemessen. Diese steht in quantitativer Beziehung zur DNA-Ausgangskonzentration der Probe.

Die Extraktion der Ribonukleinsäure wurde wie oben beschrieben durchgeführt und diese nach photometrischer Konzentrationsbestimmung in Aliquots von 5 µg Gesamt-RNA aufgeteilt. Um auszuschließen, dass die Probe durch DNA-Reste verunreinigt ist, wurde ein Verdau mit der RQ1 RNase-freien DNase (Promega, Madison, USA) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Der Erfolg wurde mittels PCR im Vergleich zur unverdauten Probe überprüft. Diese wurde im icycler (BioRad) unter Verwendung des IQ™ SYBR® Green Supermix Kit (BioRad) und der Primer gpf for icycl und gfprev icycl nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 3 min bei 95 °C folgten 40 Zyklen mit Denaturierung der DNA bei 95 °C für 30 s, Anlagerung der Primer bei 56,5 °C für 30 s und Synthese des Zweitstranges bei 72 °C für 30 s. Am Ende wurde das System auf 4 °C heruntergekühlt. Die mit DNase verdauten RNA-Proben wurden nun mit dem iScript™ cDNA Synthese Kit (BioRad) und der darin enthaltenen reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wurde in einem Thermocycler mit beheiztem Deckel (MWG) nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Nun erfolgte die relative Transkriptionsanalyse im icycler (BioRad) unter Verwendung des IQ™ SYBR® Green Supermix Kit (BioRad) und der Primer gpf for icycl und gfprev icycl. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen, und ein 35 Zyklen umfassendes Programm nach den oben beschriebenen Bedingungen verwendet.

Transkriptionelle Unterschiede wurden nach der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) berechnet. Diese Methode geht davon aus, dass es zu Beginn einer PCR in jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der Amplifikat-Kopienzahl kommt. Durch Bindung des im PCR-Ansatz enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffes an die entstandene Doppelstrang-DNA kommt es im Verlauf des PCR-Programms zu einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz. Übersteigt die nach jedem Zyklus gemessene Fluoreszenzintensität der Probe einen festgelegten Grenzwert, der weit am Beginn des exponentiellen Anstiegs liegt, so wird dies vom Gerät registriert. Parallel wird die

Transkription eines bekanntermaßen konstitutiv exprimierten Gens mit untersucht, dessen Wert jeweils als Referenzwert abgezogen wird. Aus der zahlenmäßigen Distanz der Grenzwertüberschreitungen unterschiedlicher Proben ( $\Delta\Delta CT$ ) können Unterschiede in der DNA-Ausgangskonzentration berechnet werden.

## 2.2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1 Präparation von Proteinen aus *S. epidermidis*

Für die Extraktion von Proteinen wurden Schüttelkulturen der stationären Wachstumsphase in TSBØ mit 2 % Xylose (Ernte nach 24 h) eingesetzt. Zur Zellernte wurden 5 ml der Kulturen auf Eis entnommen und 15 min bei 5242xg und 4 °C zentrifugiert und einmal im gleichen Volumen PBS gewaschen.

Um die Bakterienzellwände aufzuschließen, verdaute man das in 750 µl PBS resuspendierte Pellet mit 150 U Lysostaphin unter Zugabe von 1 mM Prefabloc (Roche) zur Proteinaseinhibition für 30 min bei 37 °C. Nach Zugabe von 250 µl 4x Probenpuffer wurde der Ansatz für 5 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Zelltrümmer 30 min bei 13280xg und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert werden.

### 2.2.3.2 Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

Die Konzentration einer Proteinpräparation wurde photometrisch bei 595 nm im DU<sup>®</sup> 530 (Beckman) unter Verwendung des Protein Assay Farbstoffkonzentrates (BioRad) gemessen. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Der Vergleich mit einer zuvor erstellten Standardkurve einer Albumin-Verdünnungsreihe ließ die Bestimmung der Konzentration zu.

### 2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen

**Minigel** Ein NuPage<sup>™</sup> 4–12 % Bis-Tris Gradientengel (Invitrogen) wurde mit Aliquots einer Proteingesamtkonzentration von 0,01–1,0 µl, die mit 1x Probenpuffer versetzt waren, beladen. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in einer X Cell Sure Lock<sup>™</sup> Elektrophoresekammer bei 200 V für 1 h. Als Laufpuffer diente der NuPage<sup>®</sup> MES SDS Running Buffer (Invitrogen).

**Maxigel** Ein SDS-Polyacrylamidgel, bestehend aus Sammelgel und Trenngel, wurde in einer Protean<sup>®</sup> II Xi Cell (BioRad) Kammer hergestellt. Zuerst wurde das 11 %ige Trenngel (11 % Acrylamid, 33,5 ml dH<sub>2</sub>O, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,2 % Ammoniumpersulfat (APS) und 0,2 % TEMED) gegossen, wobei APS und TEMED die Polymerisation auslösen. APS wurde vor Gebrauch als 10 % [w/v] Stammlösung frisch angesetzt. Zur Entfernung von Luftblasen wurde das frische Gel mit 500 µl Butanol überschichtet und härtete 1 h aus. Nach Abgießen des Butanols wurde das 4 %ige Sammelgel (4 % Acrylamid, 6,1 ml dH<sub>2</sub>O, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,2 % SDS, 0,2 % APS und 0,2 % TEMED) gegossen und Probenaschen durch das Einstecken eines Kamms erzeugt. Das Gel wurde mit Aliquots einer Proteingesamtkonzentration von 0,01–10 µg beladen, die mit 10 µl 1x Probenpuffer versetzt waren. Man ließ die Proben bei 25 mA in das Sammelgel einlaufen und trennte sie bei 35 mA für ca. 3 h nach ihrer Größe auf. Als Laufpuffer diente 1x Elektrophoresepuffer.

#### 2.2.3.4 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF- und Nitrozellulosemembranen (Westernblot)

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF) oder Nitrozellulosemembranen (NCF) übertragen.

**Minigele** wurden im X Cell II<sup>™</sup> Blot Module (Invitrogen) für 1 h bei 30 V auf eine Invitrolon<sup>™</sup> PVDF-Membran (Invitrogen) transferiert. Als Laufpuffer diente der NuPage<sup>®</sup> Transferpuffer. Es wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

**Maxigele** wurden im Semi Dry Elektrobloetter (Keutz) auf Nitrozellulosemembranen (Schleicher und Schüll Nr. 401236) transferiert. Dem ging eine Equilibrierung des SDS-Acrylamidgels für 10 min in entionisiertem Wasser voraus.

Die untere Graphitplatte der Blotkammer wurde mit entionisiertem Wasser angefeuchtet und mit 6 Lagen Filterpapierstreifen (Schleicher und Schüll Nr. 401236) bedeckt, die zuvor in Anodenpuffer I getränkt wurden. Es folgten 3 Lagen in Anodenpuffer II getränkte Filterpapierstreifen. Darauf wurde eine in Anodenpuffer II angefeuchtete Nitrozellulosemembran platziert. Das vom Sammelgel befreite Trenngel wurde blasenfrei auf die Membran gelegt, gefolgt von 6 in Kathodenpuffer getränkten Filterpapierstreifen. Bei allen Lagen wurde darauf geachtet, dass sie blasenfrei aufgelegt und auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten waren. Zum Abschluss wurde die

ebenfalls mit entionisiertem Wasser angefeuchtete obere Graphitplatte aufgesetzt. Der Elektrotransfer erfolgte bei 200 mA und 300 V für 1,5 h. Die Membran konnte bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Für die **Detektion** des GFP wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Bei Verwendung des WesternBreeze<sup>®</sup> Chromogenic Immunodetection Protocol (Invitrogen) wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Als Anti-GFP-Antikörper wurde ein BD Living Colors<sup>™</sup> *Aequorea victoria* Peptid-Antikörper (Clontech, #632377, hergestellt im Kaninchen) in einer 1:200-Verdünnung eingesetzt. Spezifisch gebundene Anti-GFP-Antikörper wurden durch Inkubation mit einem alkalische-Phosphatase-konjugierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper dargestellt. Die enzymatische Spaltung des zugegebenen Substrates bewirkte das Sichtbarwerden der Antigen-Antikörperkomplexe in Form blauer Banden auf der Membran.

Als zweite Methode kam Chemilumineszenz-Detektion zum Einsatz. Hierzu wurde eine geblottete Nitrozellulosemembran in 30 ml PBST mit 5 % Membrane blocking reagent (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  geblockt. Alle weiteren Schritte wurden auf einem Schüttelinkubator durchgeführt. Gewaschen wurde die Membran zwischen den Inkubationsschritten jeweils 15 min und zweimal 5 min in PBST. Zum Nachweis des GFP wurde die Membran mit dem BD Living Colors<sup>™</sup> *Aequorea victoria* Peptid-Antikörper (Clontech, #632377, hergestellt im Kaninchen, 1:400 in PBST verdünnt) für 2 h inkubiert. Danach wurde dieser mit einem biotinylierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Sigma), der 1:5000 in PBST verdünnt war, gekoppelt. Es folgte die Konjugation des Zweitantikörpers mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Amersham Bioscience). Das Konjugat wurde in einer Konzentration von  $6,25\text{ }\mu\text{l}$  auf 10 ml PBST eingesetzt und für eine Stunde inkubiert. Vor Zugabe des Substrats wurde die Membran 2 min in entionisiertes Wasser eingelegt. Die Chemilumineszenz-Detektion der GFP-spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte mit 10 ml ECL Western blotting detection reagent (Amersham Bioscience) für 1 min. Die Detektion der Banden erfolgte unter dem Gel-Dokumentationssystem ChemiDoc<sup>™</sup> XRS (BioRad).

## 2.2.4 Messung der Fluoreszenz

### 2.2.4.1 Messung im Fluorometer

Zur quantitativen Bestimmung der Fluoreszenzintensität des GFP<sub>mut3.1</sub> in Staphylokokken wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes in TSB BBL mit 20 µg/ml Tetracyclin eingerührt und für 6 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator bebrütet. Diese Vorkultur wurde 1:100 in TSBØ mit Antibiotikazusatz verdünnt und für 24 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. *E. coli* wurde auf die gleiche Weise in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Die Hauptkulturen wurden für 6 oder 24 h mit jeweils 2 % Xylose (50 % Stocklösung in *aqua ad iniectabilia* sterilfiltriert) versetzt. Ein Ansatz bestand neben dem zu untersuchenden Stamm aus 2 parallel mitgeführten Kontrollen: dem zu testenden Stamm in xylosefreiem Medium sowie dem nicht plasmidtragenden Originalstamm. Die Messung wurde im Fluorometer (BioRad) ausgeführt, wobei die Anregung bei einer Wellenlänge von 490 nm erfolgte und Licht der Wellenlänge 525 nm detektiert wurde. Die Messwerte wurden zur optischen Dichte OD<sub>600</sub> und der Eigenfluoreszenz der unter nicht induzierten Bedingungen angezüchteten Bakterienkultur nach der Formel  $RFU_{corr} = RFU_{induziert}/OD_{induziert} - RFU_{nicht\ induziert}/OD_{nicht\ induziert}$  in Beziehung gesetzt.

### 2.2.4.2 Bestimmung der Halbwertszeit

Zur Bestimmung der Halbwertszeit des GFB<sub>mut3.1</sub> wurden die Bakterien unter den oben beschriebenen Bedingungen angezüchtet, und dabei die Expression des GFP für 24 h induziert. Dann wurde das xylosehaltige Medium abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem xylosefreiem Medium resuspendiert und weiter bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Entzug der Xylose aus dem Medium wurde quantitativ im Fluorometer (BioRad) in stündlichen Intervallen gemessen. Die Messwerte wurden zur optischen Dichte OD<sub>600</sub> und der Eigenfluoreszenz der unter nicht induzierten Bedingungen angezüchteten Bakterienkultur nach der Formel  $RFU_{corr} = RFU_{induziert}/OD_{induziert} - RFU_{nicht\ induziert}/OD_{nicht\ induziert}$  in Beziehung gesetzt. Der Verlauf der Fluoreszenzintensität wurde mit dem Programm Microsoft Excel graphisch dargestellt. Die Halbwertszeit  $T_{1/2}$  wurde nach der Formel  $T_{1/2} = -\ln 2/\mu$  (Andersen *et al.*, 1998) als Funktion der Fluoreszenzintensität über die Zeit berechnet. In der allgemeinen Formel für negatives exponentielles Wachstum ist die

Geschwindigkeit der Abnahme durch die Zerfallskonstante  $\mu$  bestimmt.  $\mu$  entspricht der Steigung der Kurve, die aus der graphischen Darstellung entnommen wurde.

#### **2.2.4.3 Bestimmung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität nach Xyloseinduktion**

Zur Bestimmung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität nach Xyloseinduktion wurden die Bakterien wie oben beschrieben angezüchtet. Zu der xylosefreien über-Nacht-Kultur wurde 2 % Xylose zugegeben und die Fluoreszenz quantitativ in stündlichen Intervallen gemessen. Die Messwerte wurden zur optischen Dichte  $OD_{600}$  und der Eigenfluoreszenz einer unter nicht induzierten Bedingungen angezüchteten Bakterienkultur nach der Formel  $RFU_{corr} = RFU_{induziert}/OD_{induziert} - RFU_{nicht\ induziert}/OD_{nicht\ induziert}$  in Beziehung gesetzt.

#### **2.2.4.4 Fluoreszenzmikroskopie**

20  $\mu$ l einer auf die  $OD_{600}$  von 0,1–0,3 verdünnten Bakterienkultur wurde auf Fluoreszenzobjektträger (BioMérieux) aufgebracht. Die getrockneten Proben wurden in Methanol auf dem Objektträger fixiert und bei 1000facher Vergrößerung mikroskopiert, wobei die Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm erfolgte und Licht der Wellenlänge 500 bis 600 nm detektiert wurde.

#### **2.2.4.5 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)**

Zur Untersuchung eines *S. epidermidis* Biofilms mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurde der Stamm *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> in Deckglasboden-Zellkulturschalen (Nunc) angezüchtet. Um die Anheftung der Bakterien zu verbessern, wurde die Oberfläche der Zellkulturschale mit Poly-L-Lysin beschichtet. Hierzu wurden die Vertiefungen mit je 200  $\mu$ l Poly-L-Lysin-Lösung in einer Konzentration von 20  $\mu$ g/ml über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Anzucht der Bakterien unter induzierten Bedingungen erfolgte wie für die Biofilmtestung beschrieben (Kap. 2.2.1.3). Nach etwa 20stündigem Wachstum bei 37 °C wurde das Medium abgegossen und die Platte dreimal mit 200  $\mu$ l PBS pro Napf gewaschen. Die mit 200  $\mu$ l PBS gefüllten Zellkulturschalen wurden bei 630facher Vergrößerung mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica) mikroskopiert, wobei die Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm erfolgte und Licht der Wellenlänge 500 bis 600 nm detektiert wurde.

Bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie wird das Objekt mit einem (monochromatischen) punktförmigen Laserstrahl zeilenweise abgetastet. Das emittierte Licht wird durch eine Lochblende geleitet. Auf diese Weise werden nicht im Fokus befindliche Anteile des Lichtstrahls eliminiert. Somit werden in jedem Abstand des Objektisches vom Objektiv jeweils nur die in einer Ebene befindlichen Bakterienzellen aufgenommen, was die Auflösung des Bildes erhöht. Durch Verstellen des Objektisches in gleichmäßigen Abständen kann ein intaktes dreidimensionales Objekt wie beispielsweise ein Biofilm in verschiedenen Ebenen untersucht werden, ohne ihn zuvor in kleinere Einheiten zu zerteilen. Unter Verwendung der Leica Confocal Software (Leica) kann anschließend aus den resultierenden Einzelaufnahmen ein dreidimensionales Bild erstellt werden.

## 3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung des GFP<sub>mut3.1</sub> als Reportersystem in *Staphylococcus epidermidis* 1457. Hierzu wurde zunächst in vier unterschiedlichen Konstrukten untersucht, welchen Einfluss verschiedene Shine-Dalgarno-Sequenzen auf die Transkriptions- und Translationseffizienz des GFP sowie auf die Intensität und Homogenität des Fluoreszenzsignals in Staphylokokken ausüben. Zudem sollten seine biologischen Eigenschaften unter optimierten Expressionsbedingungen in *S. epidermidis* 1457 und *S. aureus* RN4220 charakterisiert werden.

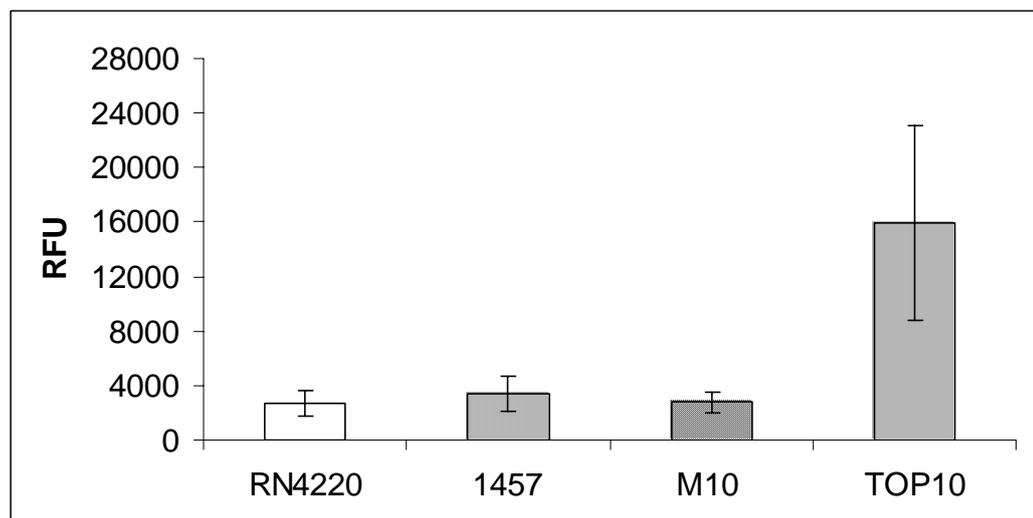
### 3.1 Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensität von pASgfp<sub>icaA</sub>

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war das Plasmid pASgfp<sub>icaA</sub>. Dieses Plasmid besteht aus dem Shuttle-Vektor pAS1, in dem GFP<sub>mut3.1</sub> unter Kontrolle des *xylA/xylR*-Promotors exprimiert wird. Dem GFP-Startcodon ist die *icaA* SD-Sequenz inklusive ihrer natürlichen *spacer* Region vorangestellt. Die Fluoreszenzintensität dieses Konstruktes wurde vergleichend in *E. coli* TOP10 und in verschiedenen Staphylokokkenstämmen (*S. aureus* RN4220, *S. epidermidis* 1457 und in seiner biofilm-negativen Mutante M10) durch quantitative Fluoreszenzmessung im Fluorometer untersucht. Die dargestellten Ergebnisse beruhen jeweils auf drei unabhängigen Experimenten, bei denen pro Messzeitpunkt drei Messwerte erhoben wurden. Zunächst wurde diese Untersuchung nach 6 h Induktion durchgeführt. Vor allem in Staphylokokken ist nach dieser Zeitspanne das detektierte Fluoreszenzsignal noch so niedrig, dass sich keine sinnvollen Vergleichsuntersuchungen durchführen lassen. Aus diesem Grund wurde ein anderes Kulturverfahren gewählt, bei dem die Xylose mit in die Hauptkultur hineingegeben und diese für 24 h bebrütet wird. Wenn nicht anders angegeben, wurde dieses Verfahren bei allen weiteren Induktionsversuchen zugrunde gelegt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

Nach 24 h Xyloseinduktion betrug die Fluoreszenz in *E. coli* 15939 relative Fluoreszenz-Einheiten (RFU). In *Staphylococcus aureus* RN4220 wurden 2664 RFU gemessen, in *S. epidermidis* 1457 3419 RFU und in der Mutante 1457 M10 2788 RFU.

Das Fluoreszenzniveau in den verschiedenen Staphylokokkenarten betrug also im Mittel weniger als  $\frac{1}{4}$  des in *E. coli* gemessenen Wertes.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die Tatsache, dass die Translationseffizienz von heterologem Genmaterial in grampositiven Bakterien häufig äußerst gering ausfällt (Qazi *et al.*, 2001; Vellanoweth, 1993). Essentiell für die Initiation der Translation an den Ribosomen ist eine starke Bindung der 16S rRNA an die Shine-Dalgarno-Sequenz des zu translatierenden Gens. Zur Optimierung der Fluoreszenzeigenschaften des GFP<sub>mut3.1</sub> in Staphylokokken wurde der Einfluss verschiedener staphylokokkeneigener SD-Sequenzen auf die Transkriptions- und Translationseffizienz untersucht.



**Abbildung 3:** Graphische Darstellung der quantitativen Fluoreszenzmessung von pASgfp<sub>icaA</sub> in *E. coli* TOP10, *S. aureus* RN4220, *S. epidermidis* 1457 und *S. epidermidis* 1457-M10 nach 24 h Xyloseinduktion angegeben in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU).

### 3.2 Klonierung

Um den Einfluss der Shine-Dalgarno-Sequenz auf die Transkriptions- und Translationseffizienz des GFP in Staphylokokken zu untersuchen, sollte das GFP<sub>mut3.1</sub> unter Vorschaltung vier ausgewählter Shine-Dalgarno-Sequenzen aus grampositiven Organismen im Shuttlevektor pAS1 exprimiert werden. Dabei kamen die SD-

Sequenzen des staphylokokkeneigenen Regulators (*sarA*, exprimiert in der früh-exponentiellen Phase, Cheung *et al.*, 1998), der Superoxiddismutase aus *S. epidermidis* (*sod*, exprimiert in der spät-exponentiellen und stationären Phase, GenBank-Zugangsnummer AF462457), des Hämolysin delta (*hld*; exprimiert in der spät-exponentiellen und stationären Phase, GenBank-Zugangsnummer Z49220) sowie die Konsensus-SD-Sequenz für grampositive Bakterien (GC) zum Einsatz (Qazi *et al.*, 2001; Vellanoweth, 1993). Die Klonierungsstrategie ist in Abbildung 4 dargestellt.

In pAS1 sollte das GFP<sub>mut3.1</sub> unter der Kontrolle von *xyIA/xyIR*, einem xyloseinduzierbaren Promotor aus *Staphylococcus xylosus* exprimiert werden (Sizemore *et al.*, 1991; Tegmark *et al.*, 2000). Seine Verwendung erlaubt die gezielte Steuerung der Promotoraktivität durch Zugabe oder Entzug von Xylose aus dem Medium und ermöglicht auf diese Weise eine Untersuchung der biologischen Eigenschaften des GFP unter definierten Bedingungen (Abbildung 6).

Das GFP<sub>mut3.1</sub> wurde unter Verwendung der *forward* Primer SD *sarA*-S, SD GC-S, SD *sod*-S, und SD *hld*-S und des *reverse* Primers GFPmut3SacIterm amplifiziert. Über den *forward* Primer wurde eine *AvaI*-Schnittstelle und über den *reverse* Primer eine *SacI*-Schnittstelle eingefügt. Der jeweilige *forward* Primer determiniert die vor dem Startcodon des GFP<sub>mut3.1</sub> befindliche SD-Sequenz. Als *template* diente das Plasmid pGFP<sub>mut3.1</sub> (Clontech) (Abbildung 5 und 6).

Die Amplifikate wurden in den Vektor pCR2.1 kloniert und diese Konstrukte in *E. coli* TOP10 propagiert. Zunächst wurde die Intaktheit des jeweiligen Inserts überprüft. Dies erfolgte durch Amplifikation mit den Primern M13 for und M13 rev, Sequenzierung und nachfolgender Analyse der Sequenzen mit dem Programm Vector NTI. Es konnte gezeigt werden, dass das GFP sowie die vor dem Startcodon befindliche SD-Sequenz und die Schnittstellen ohne Punktmutationen und in korrekter Lage in das Insert integriert waren.

Das jeweilige Insert wurde aus dem Vektor über die *AvaI*- und *SacI*-Schnittstellen herausgeschnitten, durch Gelaufreinigung präpariert und in den durch *AvaI/SacI*-Verdau linearisierten Shuttlevektor pAS1 ligiert. Mit den entstandenen Konstrukten wurde wiederum *E. coli* TOP10 transformiert.

Die aus *E. coli* TOP10 präparierten Plasmide pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> wurden durch Elektroporation in *S. aureus* RN4220 eingeführt. In diesem

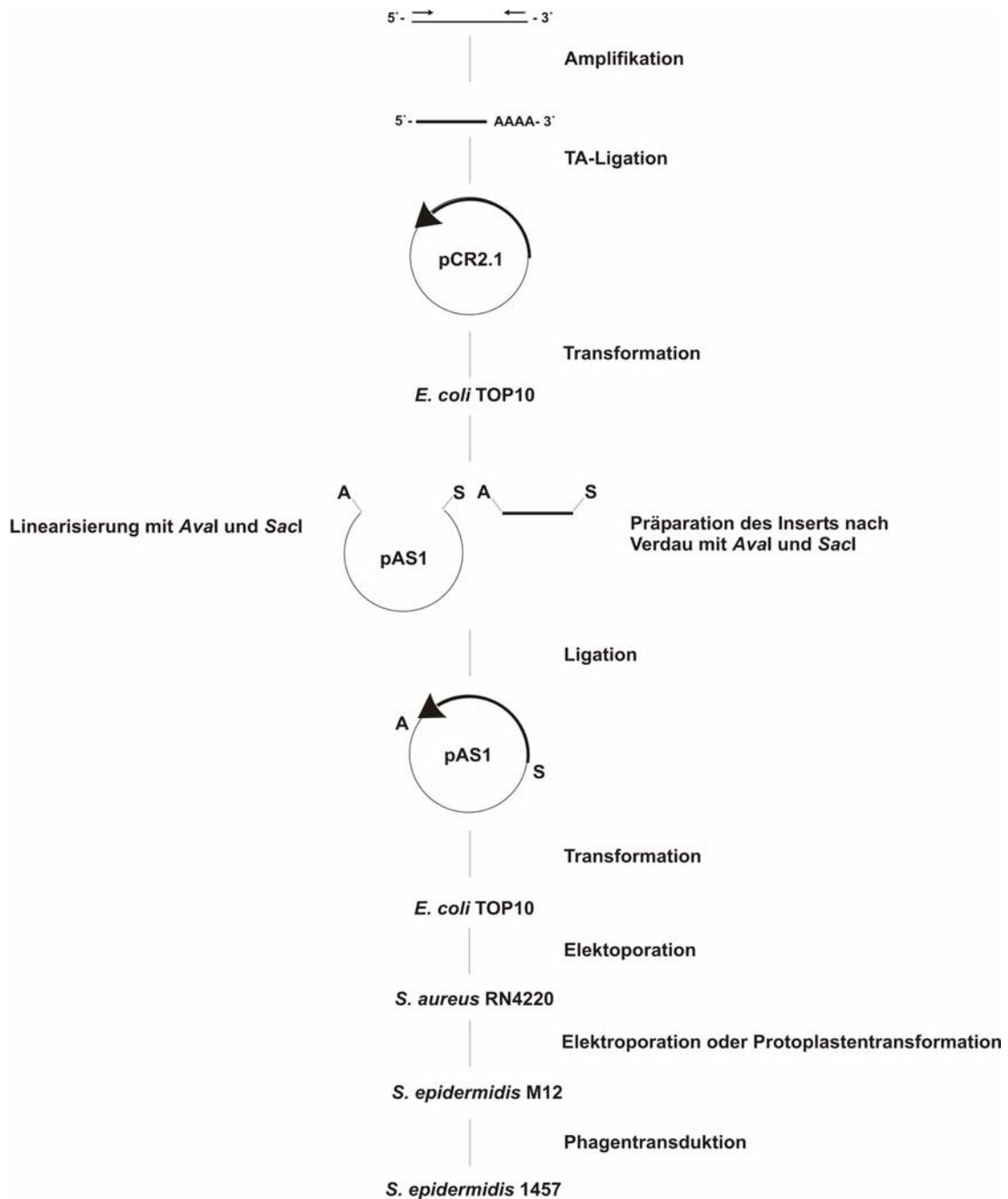
restriktionsdefizienten Wirt erhält die Plasmid-DNA das für Staphylokokken typische Methylierungsmuster.

Die so modifizierten Konstrukte konnten durch Elektroporation in M12 eingeführt werden. Da die Transformationseffizienz dieses Stammes durch Elektroporation sehr gering ist, wurde in zwei Fällen (pASgfp<sub>GC</sub> und pASgfp<sub>sod</sub>) auf Protoplastentransformation zurückgegriffen. Über Phagentransduktion wurden die Plasmide aus M12 in *S. epidermidis* 1457 überführt.

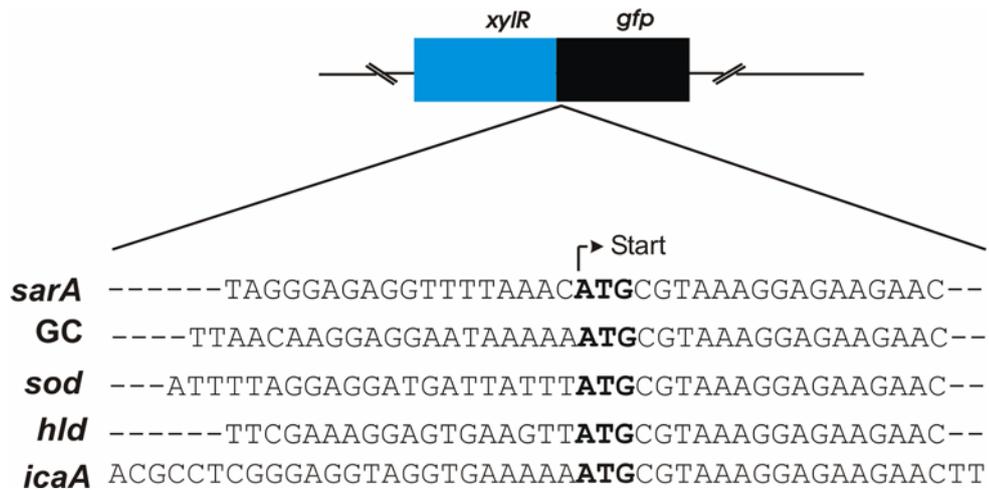
An jeden Transformationsschritt schlossen sich eine Plasmidpräparation sowie ein Kontrollverdau mit *Ava*I und *Sac*I an. In der nachfolgenden Gelelektrophorese konnte durch Vergleich mit dem Größenstandard jeweils gezeigt werden, dass Plasmid und Insert in vollständiger Form in dem jeweiligen Wirt vorlagen (Abbildung 6B).

### **3.3 Einfluss von pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> auf den Biofilm-Phänotyp von *S. epidermidis* 1457**

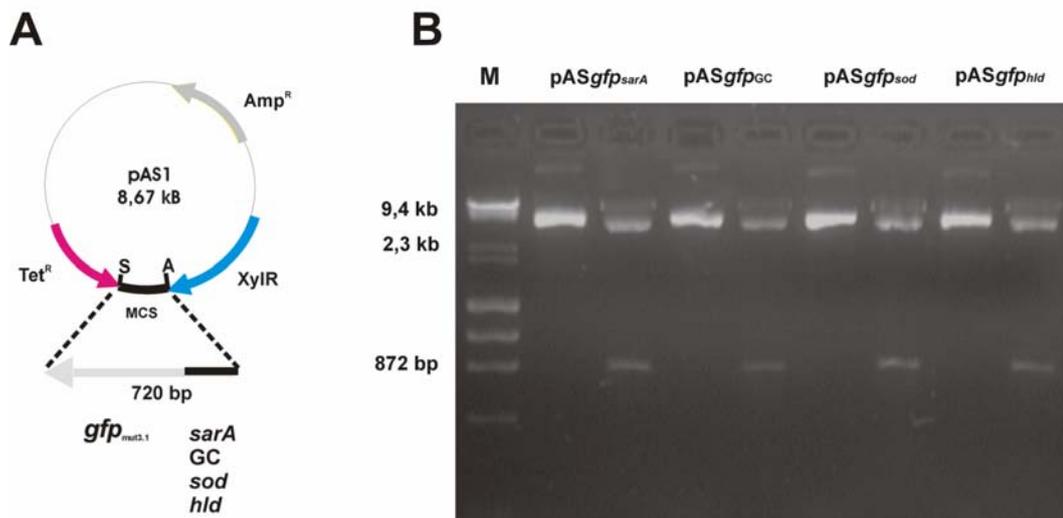
Das GFP<sub>mut3.1</sub> soll in *S. epidermidis* als Reporter gen zur Untersuchung von in Biofilmen exprimierten Genen genutzt werden. Um auszuschließen, dass die Anwesenheit der Plasmide oder die Bildung des GFP in xylosehaltigem Medium den biofilm-positiven Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 beeinflusst, wurde der Biofilm Phänotyp bei Wachstum unter induzierenden und nicht induzierenden Bedingungen geprüft. Hierzu wurden die Fähigkeit zur Biofilmbildung der plasmidtragenden Stämme *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> mit der des Wildtyps und der biofilm-negativen Mutante M10 verglichen. Nach Färbung wurde die Absorption im ELISA Processor II (Behring) bei 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm bestimmt. Der Biofilm-Phänotyp wurde durch Bildung des Mittelwertes aus 2 x 4 Einzelwerten beurteilt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Strategie zur Klonierung von GFP<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* 1457. Nach Amplifikation des GFP unter Einfügen von 4 verschiedenen staphylokokkeneigenen SD-Sequenzen vor dem Startcodon wurden die Amplifikate in pCR2.1 kloniert und in *E. coli* TOP10 propagiert. Über die Restriktionsschnittstellen *Ava*I (A) und *Sac*I (S) wurden die Inserts in pAS1 ligiert. Die Konstrukte wurden zunächst in *E. coli* TOP10 kloniert und von dort über Elektroporation in den restriktionsdefizienten Klonierungswirt *S. aureus* RN4220 und durch Protoplastentransformation und Elektroporation in M12 eingeführt. Von dort wurden die Plasmide durch Phagentransduktion in *S. epidermidis* 1457 übertragen. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.



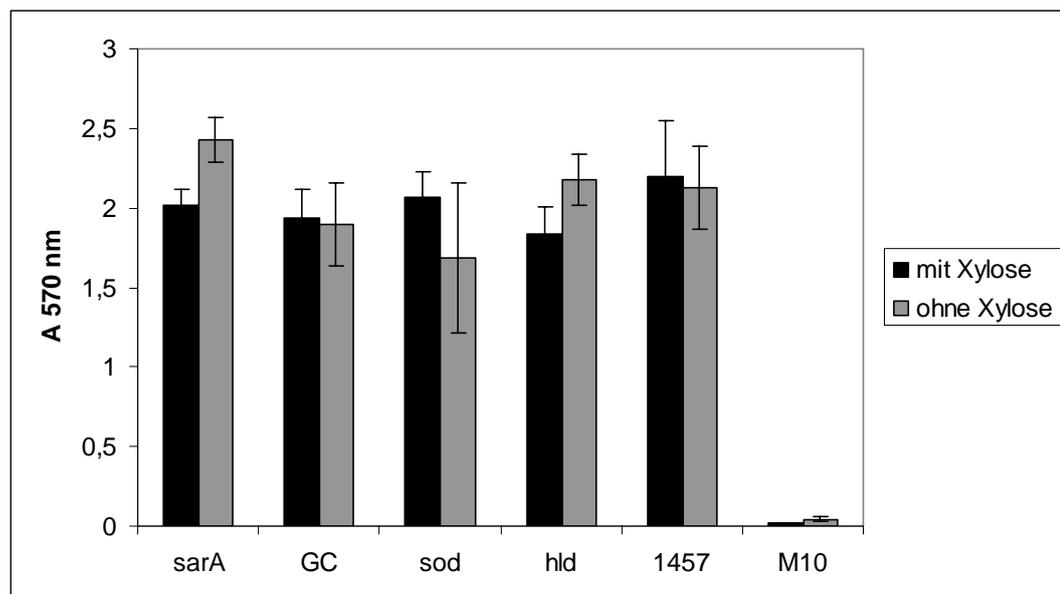
**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Region vor dem Startcodon (fett) des GFP<sub>mut3.1</sub> integriert in pAS1. Man erkennt die Sequenzunterschiede der in den *forward* Primer integrierten SD-Sequenzen. *XylR* steht für das Gen des Xyloseoperons aus *S. xylosus*. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.



**Abbildung 6:** (A) Schematische Darstellung des Plasmids pAS1 sowie der über die Restriktionsschnittstellen *AvaI* (A) und *SacI* (S) integrierten Inserts bestehend aus *gfp*<sub>mut3.1</sub> unter Voranstellung der SD-Sequenzen von *sarA*, *sod* und *hld* sowie der Konsensus-SD-Sequenz für grampositive Bakterien GC. *Tet<sup>R</sup>* und *Amp<sup>R</sup>* kodieren für Resistenzen gegen Tetracyclin zur Selektion in Staphylokokken und gegen Ampicillin zur Selektion in *E. coli*. *xylR* steht für das Gen des xyloseinduzierbaren Promotors aus *S. xylosus* (Sizemore *et al.*). MCS = *multiple cloning site*. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu. (B) Elektrophoretische Auftrennung einer mit *AvaI* und *SacI* verdauten Präparation von pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> aus *E. coli* TOP10. Das kleine Fragment repräsentiert das herausgeschnittene *gfp* mit der jeweiligen SD-Sequenz. Als Größenstandard (M) wurde ein Mix aus *HindIII* gespaltener  $\lambda$ -DNA und *HaeIII* gespaltener  $\phi$ X174-DNA (Finnzyme) verwendet.

Sowohl in xylosefreiem als auch in xylosehaltigem Medium zeigen die plasmidtragenden Stämme einen eindeutig biofilm-positiven Phänotyp. Auch die Positivkontrolle *S. epidermidis* 1457 ist in beiden Medien deutlich biofilm-positiv, die Negativkontrolle M10 biofilm-negativ. Hierbei galt ein *cut off* von  $A_{570}$  0,1 als Trennpunkt zwischen biofilm-positivem und -negativem Phänotyp.

Es konnte mithilfe dieses Tests gezeigt werden, dass weder xylosehaltiges Medium noch die Plasmide selbst oder die Bildung von GFP Einfluss auf den biofilm-positiven Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 nehmen. Das zu untersuchende Merkmal wird durch die Anwesenheit des Reportergens nicht beeinflusst. Somit sind die grundsätzlichen Vorbedingungen erfüllt, um weitere Untersuchungen der vorliegenden GFP-Konstrukte bezüglich ihrer Eigenschaften als Reportergene durchführen zu können.



**Abbildung 7:** Graphische Darstellung eines semiquantitativen Biofilmtests der plasmidtragenden Stämme *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> in TSB<sub>BBL</sub> mit und ohne Zusatz von 2 % Xylose im Vergleich zu *S. epidermidis* 1457 Wildtyp und zu seiner biofilm-negativen Mutante M10. Die Messung der Absorption erfolgte im ELISA Processor II (Behring) bei 570 nm. Dabei galt ein *cut off* von  $A_{570}$  0,1 als Trennpunkt zwischen biofilm-positivem und -negativem Phänotyp.

### 3.4 Messung der Fluoreszenz

Die vorliegenden Konstrukte pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> sollten in *S. aureus* RN4220, M12 und *S. epidermidis* 1457 unter induzierten Bedingungen hinsichtlich der Intensität und in *S. epidermidis* 1457 bezüglich der Homogenität des resultierenden Fluoreszenzsignals charakterisiert werden.

Die quantitative Fluoreszenzanalyse erfasst die Gesamtkonzentration des in der Probe vorhandenen GFP. Mit der qualitativen Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop lässt sich die Verteilung der gfp-Expression in einer Bakterienpopulation beurteilen.

#### 3.4.1 Quantitative Fluoreszenzanalyse

Die Fluoreszenzintensität der Konstrukte pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> wurde vergleichend in den Staphylokokkenstämmen *S. aureus* RN4220, *S. epidermidis* 1457 und in der biofilm-negativen Mutante M12 durch quantitative Fluoreszenzmessung im Fluorometer untersucht.

Dazu wurde die Fluoreszenzintensität nach 24 h Xyloseinduktion im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle sowie im Vergleich zum nicht plasmidtragenden Originalstamm quantitativ im Fluorometer gemessen. Die dargestellten Ergebnisse beruhen jeweils auf drei unabhängigen Experimenten, bei denen pro Messzeitpunkt drei Messwerte erhoben wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

Der Vergleich der Fluoreszenzintensität zwischen nicht induziertem plasmidtragendem und nicht plasmidtragendem Originalstamm zeigen keinerlei Unterschiede. Die Fluoreszenzintensität des nicht induzierten plasmidtragenden Stammes übersteigt nicht das Niveau der Eigenfluoreszenz der Bakterien. Das bedeutet, dass xyIR offensichtlich in Abwesenheit von Xylose nahezu vollständig reprimiert ist und keinerlei GFP-Transkription stattfindet.

Für die Berechnung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) wurde daraufhin als Referenzwert die Intensität der nicht induzierten plasmidtragenden Stämme zugrunde gelegt. In dieser Formel ( $RFU_{\text{corr}} = RFU_{\text{induziert}}/OD_{\text{induziert}} - RFU_{\text{nicht induziert}}/OD_{\text{nicht induziert}}$ ) werden die Messwerte zur optischen Dichte (OD) und der Eigenfluoreszenz der Bakterienkultur ( $RFU_{\text{nicht induziert}}$ ) in Beziehung gesetzt.

Einheitlich in allen verwendeten Staphylokokkenstämmen zeigen pASgfp<sub>sarA</sub> und pASgfp<sub>GC</sub> ein äußerst schwaches Fluoreszenzsignal, das kaum das Niveau der

Eigenfluoreszenz der nicht xyloseinduzierten Kontrolle übersteigt. In *S. epidermidis* 1457 sind es 152 RFU für pASgfp<sub>sarA</sub>, für pASgfp<sub>GC</sub> 36 RFU; in M12 werden 258 RFU bzw. 291 RFU gemessen. In *S. aureus* RN4220 beträgt die Fluoreszenzintensität für pASgfp<sub>sarA</sub> 291 RFU und für pASgfp<sub>GC</sub> 60 RFU.

Mit pASgfp<sub>sod</sub> wurden in *S. aureus* RN4220 698 RFU und in M12 749 RFU gemessen; in *S. epidermidis* 1457 sind es 3909 RFU. Der in *S. epidermidis* 1457 gemessene Wert liegt damit etwa 5fach höher als in *S. aureus* RN4220 und M12. Vergleicht man die Fluoreszenzstärke von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sod</sub> mit *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sarA</sub>, so liegt der Wert für pASgfp<sub>sod</sub> 26fach höher als für pASgfp<sub>sarA</sub>. Der Vergleich mit pASgfp<sub>GC</sub> ergibt eine 109fach höhere Fluoreszenzstärke für pASgfp<sub>sod</sub>.

Das Konstrukt pASgfp<sub>hld</sub> erbrachte einheitlich in allen untersuchten Wirten eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität als die anderen Plasmide. In *S. aureus* RN4220 betrug die Fluoreszenz 7154 RFU, in M12 7583 RFU und in *S. epidermidis* 1457 7465 RFU. Stellt man die Fluoreszenzstärke von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> und pASgfp<sub>sarA</sub> gegenüber, so leuchtet pASgfp<sub>hld</sub> 49fach stärker als pASgfp<sub>sarA</sub>. Im Vergleich zu pASgfp<sub>GC</sub> lässt sich eine 207fache Verstärkung berechnen. Im Vergleich zu *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sod</sub> ist die Fluoreszenzintensität verdoppelt.

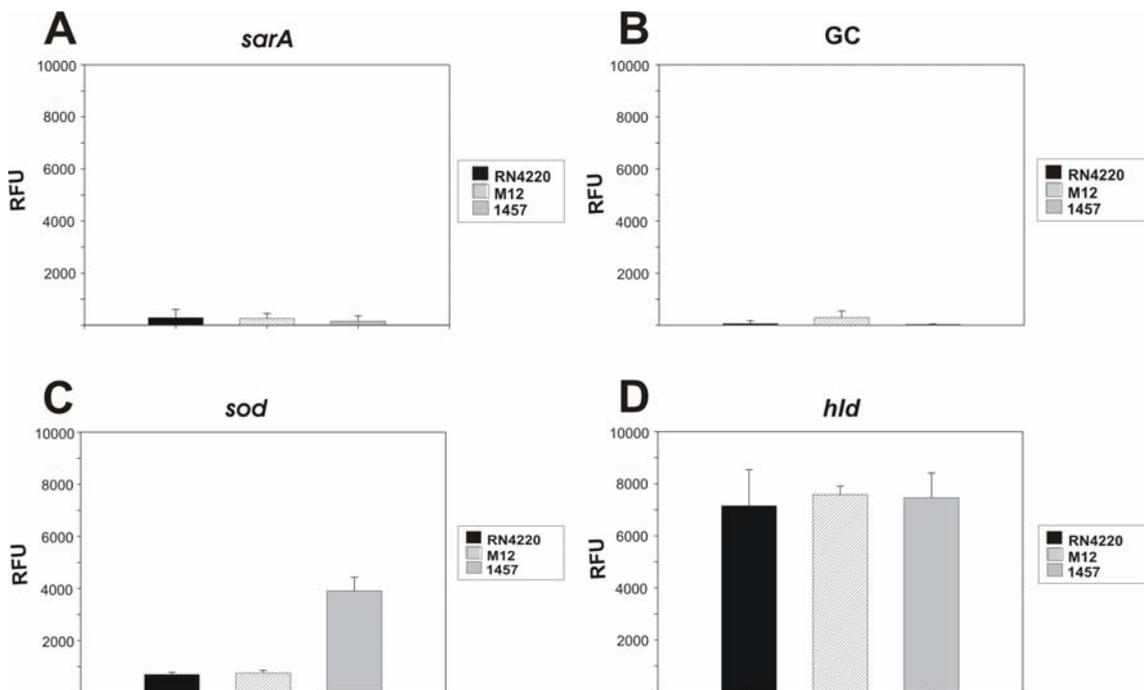
Zusätzlich erfolgte eine statistische Auswertung der Fluoreszenzunterschiede zwischen den Konstrukten. Es sollte geklärt werden, ob die gemessenen Differenzen zwischen dem stark fluoreszierenden pASgfp<sub>hld</sub> einerseits und den Konstrukten pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> andererseits statistisch signifikant sind. Diese Berechnung wurde getrennt in jedem verwendeten Wirt mit dem Programm WinSTAT unter Verwendung des U-Testes (Mann-Whitney) durchgeführt.

Es ergibt sich sowohl in *S. aureus* RN4220 als auch in M12 und in *S. epidermidis* 1457 jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Fluoreszenzintensität von pASgfp<sub>hld</sub> zu pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub> oder pASgfp<sub>sod</sub> von  $p < 0,001$ .

Aus der Gegenüberstellung von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> (7465 RFU) und dem ursprünglich verwendeten Konstrukt *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>mut3.1</sub> (3419 RFU) ergibt sich, dass das Einfügen der *hld*-SD-Sequenz vor dem GFP Startcodon zu einer Verdoppelung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu pASgfp<sub>mut3.1</sub> geführt hat. Die *sod*-SD-Sequenz (3909 RFU in *S. epidermidis* 1457) wiederum hat zu keiner Verstärkung des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu pASgfp<sub>mut3.1</sub> geführt, während in

den die *sarA*-SD-Sequenz (152 RFU) und die Konsensus-SD-Sequenz (GC) (36 RFU) tragenden Konstrukten eine Verminderung der Fluoreszenzintensität eingetreten ist.

Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der SD-Sequenz vor dem GFP-Startcodon für das resultierende quantitative Fluoreszenzsignal in Staphylokokken, und zeigen, dass durch Modifikationen in diesem Bereich Optimierungen des Fluoreszenzniveaus möglich sind.



**Abbildung 8:** Graphische Darstellung der quantitativen Fluoreszenzanalyse von pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> in *S. aureus* RN4220, M12 und *S. epidermidis* 1457 nach 24 h Xyloseinduktion.

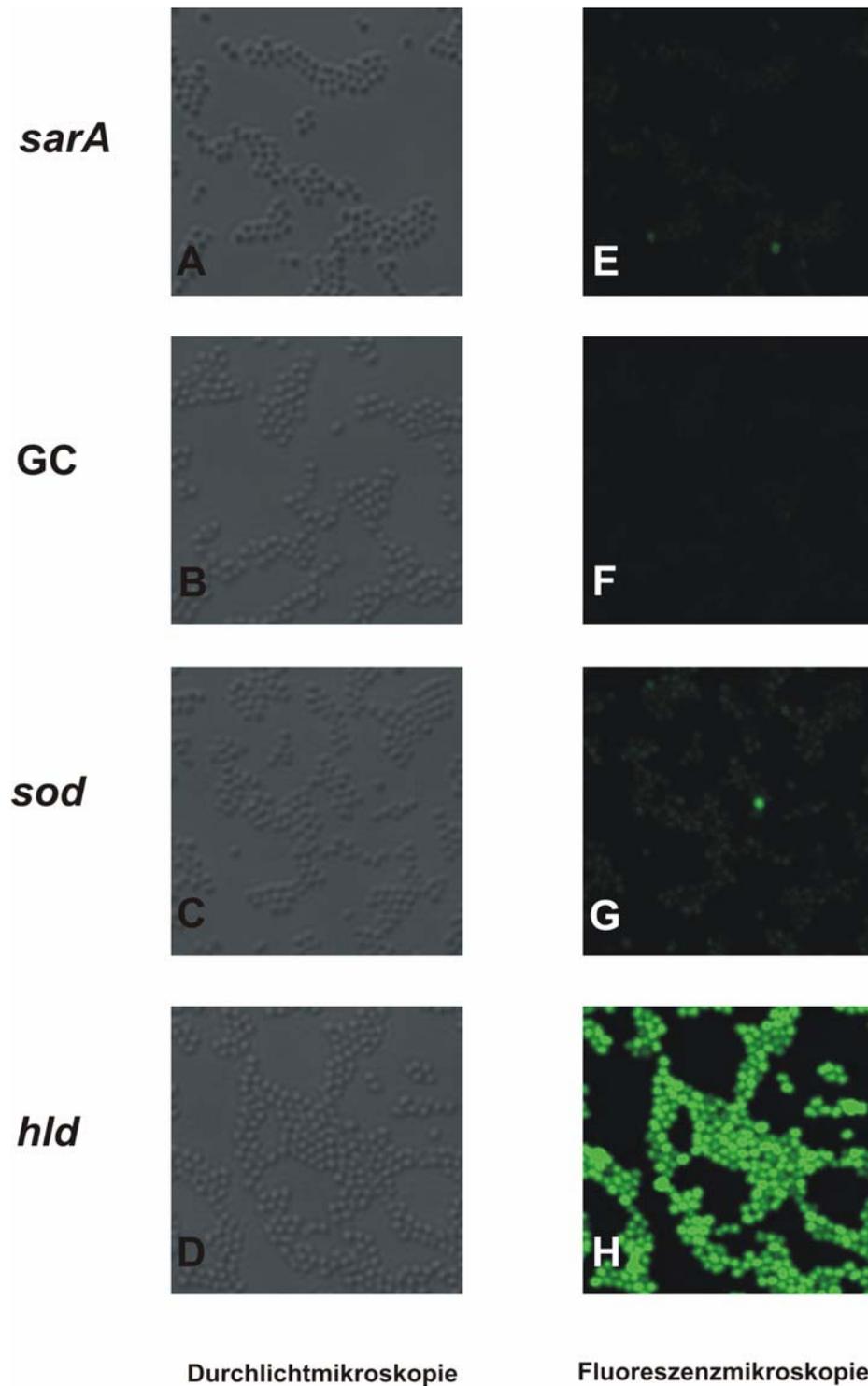
### 3.4.2 Qualitative Fluoreszenzanalyse

Die Intensität und Homogenität des Fluoreszenzsignals der vier Konstrukte pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> in *S. epidermidis* 1457 wurde qualitativ unter dem Fluoreszenzmikroskop unter identischen Induktionsbedingungen und bei identischer Anregung untersucht. Hierzu wurden die Bakterien nach 24 h Xyloseinduktion auf Fluoreszenzobjektträger aufgetragen und fixiert. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 9.

*S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sarA</sub> zeigt vereinzelt schwach leuchtende Bakterienzellen, wobei die Mehrheit der Zellen kein Fluoreszenzsignal aussendet. Das Konstrukt

pASgfp<sub>GC</sub> zeigt in *S. epidermidis* 1457 gar kein Fluoreszenzsignal. *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sod</sub> präsentiert ein inhomogenes Bild einer vorherrschend schwachen Fluoreszenz aller Bakterienzellen, während einige wenige stärker fluoreszierende Zellen sichtbar sind. Mit dem Konstrukt pASgfp<sub>hld</sub> entsteht in der Mehrzahl der Bakterienzellen ein starkes Fluoreszenzsignal, das eine deutliche Unterscheidung von Einzelzellen zulässt. Dazwischen erkennt man einzelne schwächer leuchtende Zellen. Neben einer höheren Intensität lässt sich erkennen, dass die Intensitätsunterschiede zwischen den Einzelzellen mit pASgfp<sub>hld</sub> geringer sind als bei pASgfp<sub>sarA</sub> und pASgfp<sub>sod</sub>, wodurch das Zellbild insgesamt homogener ist.

Der Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung in *S. epidermidis* 1457 mit der quantitativen Messung zeigt, dass das mikroskopisch sichtbare Fluoreszenzniveau insgesamt mit dem quantitativen korrespondiert. Mit dem Konstrukt pASgfp<sub>hld</sub> ließen sich quantitativ die höchsten Werte messen, bei Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop entsprechend qualitativ die höchste Fluoreszenzintensität. pASgfp<sub>sarA</sub> und pASgfp<sub>GC</sub> weisen in beiden Methoden ein kaum messbares Fluoreszenzsignal auf, pASgfp<sub>sod</sub> liegt jeweils in einem mittleren Bereich zwischen den bereits beschriebenen. Gleichzeitig wird deutlich, dass bei der Auswahl eines Konstruktes für die Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie nicht allein der quantitative Gesamtwert der fluorometrischen Messung zugrunde gelegt werden kann. Das Vorhandensein eines homogenen Fluoreszenzsignals innerhalb einer Bakterienpopulation ist für die spätere Anwendung als Expressionsmarker von entscheidender Bedeutung.



**Abbildung 9:** Aufnahmen der Konstrukte  $pASgfp_{sarA}$ ,  $pASgfp_{GC}$ ,  $pASgfp_{sod}$  und  $pASgfp_{hld}$  in *S. epidermidis* 1457 nach Xyloseinduktion unter dem Fluoreszenzmikroskop (Exzitation 488 nm, Emissionsspektrum 500–600 nm) bei identischer Laserleistung. **Abb. A–D:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme **Abb. E–H:** Aufnahme des gleichen Bildausschnittes unter Laseranregung. Vergrößerung 1000fach.

### 3.5 Transkriptions- und Translationsanalyse

Untersuchungen der RNA und des Gesamtproteins von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> sollten prüfen, welchen Einfluss die verwendeten Shine-Dalgarno-Sequenzen auf die Transkriptions- und Translations-effizienz des GFP<sub>mut3.1</sub> haben, um so die Ursache für die unterschiedliche Fluoreszenzintensität der Konstrukte zu finden. Die Transkriptionseffizienz wurde mit Northernhybridisierung und *real time* PCR überprüft, und die Translationseffizienz mit einem spezifischen anti-GFP Antikörper im semiquantitativen Westernblot untersucht.

#### 3.5.1 Relative Transkriptionsanalyse von gfp<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* 1457

Zunächst wurde die Transkriptionseffizienz des GFP in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase nach 6 und nach 24 h Xyloseinduktion sowie im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle untersucht. Hierfür wurde RNA aus *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> präpariert. Nach Bestimmung der RNA-Gesamtmenge wurde eine Verdünnungsreihe der auf eine identische RNA-Gesamtkonzentration eingestellten Präparationen zunächst elektrophoretisch aufgetrennt, dann geblottet und unter Verwendung einer DIG-markierten, GFP-spezifischen Sonde (*primer* GFP for und GFP rev) durch Northernhybridisierung untersucht. Mit dieser Methode ließ sich keine GFP-Transkription nachweisen. Möglicherweise reicht die Sensitivität dieser Technik nicht aus, um das *gfp*-Transkript nachzuweisen.

Deshalb wurde die *real time*-PCR für weitere Transkriptionsuntersuchungen ausgewählt (*primer* gfp foricycl und gfp revicycl). Als Referenzwert diente jeweils die Transkription des konstitutiv exprimierten Gens *gyrB* (*primer* gyrB real1 und gyrB real2). Unterschiede wurden mit der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) berechnet, wobei eine  $\geq 2,5$ fach erhöhte oder verminderte Transkription als signifikant galt. Die dargestellten Ergebnisse beruhen auf drei unabhängigen Experimenten, bei denen für jedes Konstrukt und dessen Referenzwerte jeweils ein 3fach-Ansatz gewählt und der Mittelwert der Einzelergebnisse berechnet wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. Angegeben ist jeweils der Faktor, um den die *gfp*-Transkription der Konstrukte pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub> und pASgfp<sub>sod</sub> im Vergleich zu pASgfp<sub>hld</sub> erhöht oder vermindert ist. Zusätzlich wurde die Effizienz des Xyloseoperons in pASgfp<sub>hld</sub> nach Induktion mit Xylose geprüft.

Die Berechnungen zeigen für die Konstrukte pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub> und pASgfp<sub>sod</sub> in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase eine im Vergleich zu pASgfp<sub>hld</sub> geringfügig erniedrigte Transkriptionseffizienz des GFP. Insgesamt sind die Differenzen als nicht signifikant anzusehen und reichen nicht aus, um die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten der Konstrukte zu erklären. Nach Zugabe von Xylose steigt die *gfp*-Transkription im Konstrukt pASgfp<sub>hld</sub> in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle um das 60fache an. Nach 24 h Induktion beträgt sie das 32fache. Aus der Tatsache, daß sich auf der Ebene der *gfp* Transkription keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Konstrukten finden, kann geschlossen werden, dass die Effizienz des Xyloseoperons auch bei pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub> und pASgfp<sub>sod</sub> jeweils auf einem vergleichbaren Niveau liegt. Gleichzeitig weisen die Daten auf die gute Steuerbarkeit des Promotors hin, die für eine sinnvolle Charakterisierung eines Reportergens unabdingbar ist. Dies bedeutet, dass unter Abwesenheit des Induktors keine oder nur eine äußerst geringe Expression des zu untersuchenden Gens stattfindet, während es gleichzeitig zu einer effektiven Transkription unter induzierten Bedingungen kommt.

**Tabelle 7:** Transkriptionsanalyse von *gfp<sub>mut3.1</sub>* in *S. epidermidis* 1457

Konstrukt / Zeitpunkt	relative Transkription im Vergleich zu pASgfp <sub>hld</sub> <sup>a</sup>	
	nach 6 h Xyloseinduktion	nach 24 h Xyloseinduktion
pASgfp <sub>sarA</sub>	-1,93 ± 0,84	-1,77 ± 0,77
pASgfp <sub>GC</sub>	-1,72 ± 0,24	-1,68 ± 0,88
pASgfp <sub>sod</sub>	-1,31 ± 0,67	-1,71 ± 0,81
pASgfp <sub>hld</sub> nicht induziert	-60,6 ± 41,98	-32,73 ± 6,97

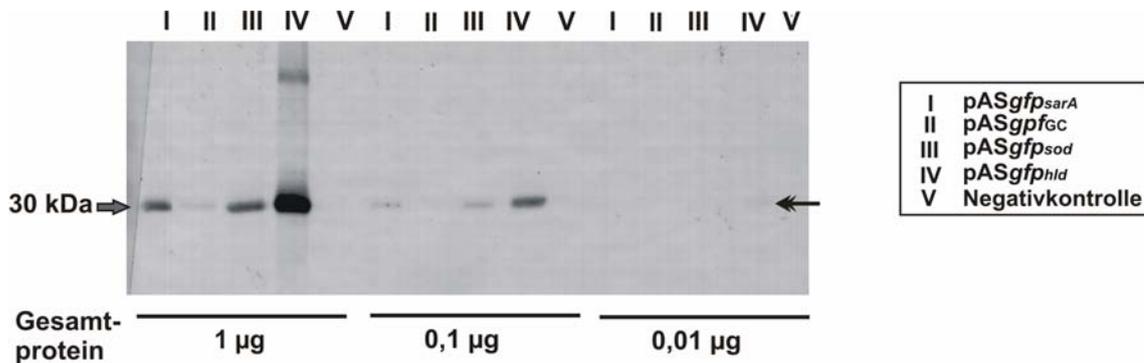
<sup>a</sup> Die relative Transkription wurde entsprechend der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) zu 2 Zeitpunkten berechnet. Es ergibt sich ein Faktor, um den die Transkription im Vergleich zur jeweiligen Bezugsgröße (hier pASgfp<sub>hld</sub> nach 6 und 24 h Induktion) erhöht oder erniedrigt ist.

### 3.5.2 Semiquantitative Translationsanalyse von GFP<sub>mut3.1</sub>

Der Einfluss der unterschiedlichen SD-Sequenzen auf die Translationseffizienz des GFP<sub>mut3.1</sub> wurde in *S. epidermidis* 1457 unter induzierten und unter nicht induzierten Bedingungen untersucht. Hierzu wurde nach 24 h eine Gesamtprotein-Präparation der Stämme *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub> durchgeführt. Eine Verdünnungsreihe der auf eine gleiche Gesamtproteinkonzentration von 1 µg eingestellten Präparationen wurde elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Das GFP<sub>mut3.1</sub> wurde mit einem Kaninchen-Anti-GFP-Antikörper sowie einem alkalische-Phosphatase-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG detektiert. Durch diesen Versuchsaufbau ergibt sich die Möglichkeit, semiquantitativ Konzentrationsunterschiede des GFP<sub>mut3.1</sub> zwischen den Konstrukten durch Intensitätsvergleich der Banden festzustellen. Diese lassen Rückschlüsse auf den Einfluss der Shine-Dalgarno-Sequenz auf die Translationseffizienz zu. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 10. Das GFP stellt sich als 30 kDa großes Protein dar. Bereits in der ersten Verdünnungsstufe von 1 µg Gesamtprotein erkennt man deutliche Unterschiede in der Intensität der Banden. Die niedrigste Intensität findet sich bei pASgfp<sub>GC</sub>, die höchste bei pASgfp<sub>hld</sub>. Dort findet sich als Ausdruck einer extremen GFP-Konzentration oberhalb der 30 kDa-Bande des GFP<sub>mut3.1</sub> eine weitere Bande, bei der es sich um multimere Zusammenlagerungen von GFP handelt. In der zweiten Verdünnungsstufe von 0,1 µg Gesamtprotein ist bei pASgfp<sub>GC</sub> keine Bande mehr sichtbar. In der dritten Verdünnungsstufe von 0,01 µg Gesamtprotein zeigt lediglich pASgfp<sub>hld</sub> noch eine schwache Bande. Es ergibt sich also eine 100fach höhere Translationseffizienz des GFP<sub>mut3.1</sub> im Konstrukt pASgfp<sub>hld</sub> im Vergleich zu pASgfp<sub>GC</sub>. Im Vergleich zu pASgfp<sub>sarA</sub> und pASgfp<sub>sod</sub> ist sie verzehnfacht. Unter nicht induzierten Bedingungen lässt sich kein GFP-spezifisches Signal nachweisen.

Der Vergleich der durch Westernblot erhobenen Daten mit denen der quantitativen Fluoreszenzuntersuchung zeigt, dass sich die fluorometrisch gewonnenen Befunde in dieser Methode widerspiegeln. Das am stärksten leuchtende Konstrukt pASgfp<sub>hld</sub> zeigt unter gleichen Kulturbedingungen im Westernblot die höchste GFP-Konzentration. Somit lässt sich die erhöhte Fluoreszenzintensität dieses Konstruktes auf eine verbesserte Translationseffizienz zurückführen.

Zudem weisen die Daten auf die gute Steuerbarkeit des Promotors hin. Unter Abwesenheit des Induktors findet sich keine messbare Translation des zu untersuchenden Gens bei gleichzeitig effektiver Transkription und Translation unter induzierten Bedingungen.



**Abbildung 10:** Semiquantitativer Westernblot von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>sarA</sub>, pASgfp<sub>GC</sub>, pASgfp<sub>sod</sub> und pASgfp<sub>hld</sub>. Untersuchung der Translationseffizienz des GFP<sub>mut3.1</sub> in drei Verdünnungsstufen des Gesamtproteins mit einem Anti-GFP-Peptidantikörper unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen. Der Doppelpfeil weist auf eine schwache Bande von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> bei einer Gesamtproteinkonzentration der Probe von 0,01 µg hin.

### 3.6 Charakterisierung von GFP<sub>mut3.1</sub> in Staphylokokken

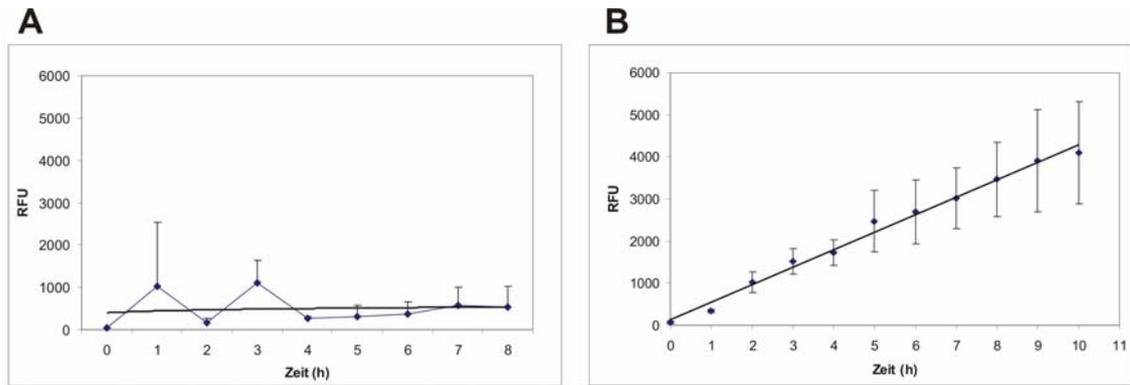
Für die Anwendung des GFP<sub>mut3.1</sub> als Expressionsmarker beim Monitoring einer Transkriptionsdynamik sind der Zeitraum zwischen Promotorinduktionsbeginn und Erreichen eines messbaren Fluoreszenzsignals und die Halbwertszeit im Hinblick auf die Sensitivität und Flexibilität des Reportergens von besonderem Interesse. Qualitative und quantitative Fluoreszenzmessungen sowie Untersuchungen der Translationseffizienz demonstrieren, dass die Insertion der *hld*-SD-Sequenz vor dem *gfp*-Startcodon zu einer optimierten Expression in *S. epidermidis* führt. Unter diesen Bedingungen konnten nun die biologischen Eigenschaften des GFP<sub>mut3.1</sub> in diesem Stamm näher charakterisiert werden. Messungen der Dynamik der Fluoreszenzintensität nach Zugabe und Entzug von Xylose aus dem Medium sollten Aufschluss über die Synthese- und Faltungsgeschwindigkeit zum biologisch aktiven Molekül und die Abbau-geschwindigkeit des GFP in *S. epidermidis* 1457 und *S. aureus* RN4220 geben. Zudem wurden die Fluoreszenzeigenschaften innerhalb eines *S. epidermidis* 1457 Biofilms untersucht.

### 3.6.1 Messung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität nach Xylose-induktion

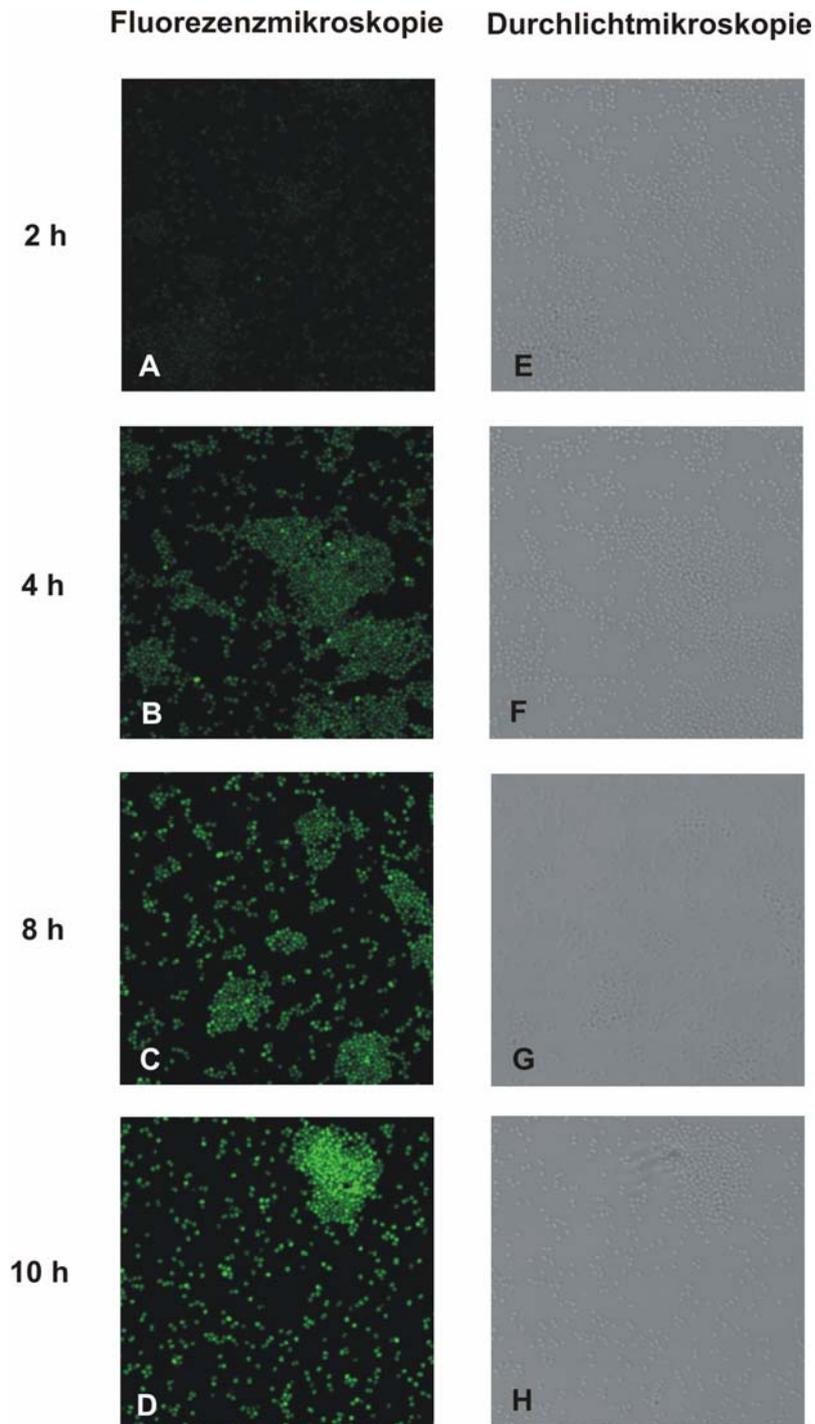
Um abschätzen zu können, über welchen Zeitraum hinweg eine Induktion des Promotors notwendig ist, um ein eindeutiges Fluoreszenzsignal detektieren zu können, wurde die Fluoreszenzintensität quantitativ und qualitativ in stündlichen Intervallen nach Zugabe von Xylose gemessen. Eine Schüttelkultur von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> der stationären Wachstumsphase wurde mit Xylose versetzt, und einer fluorometrischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung zugeführt. Zusätzlich wurde eine quantitative Messung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Xylose in *S. aureus* RN4220 x pASgfp<sub>hld</sub> durchgeführt. Die Ergebnisse der fluorometrischen Untersuchung beruhen jeweils auf drei unabhängigen Experimenten, bei denen pro Messzeitpunkt drei Messwerte erhoben wurden. Die Berechnung der relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) erfolgte nach der Formel  $RFU_{corr} = RFU_{induziert}/OD_{induziert} - RFU_{nicht\ induziert}/OD_{nicht\ induziert}$ . Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

Die fluorometrische Untersuchung von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> zeigt einen linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Xylose. Sie liegt 8 h nach Induktion bei einem Wert, der der Hälfte der maximal erreichbaren Fluoreszenzintensität entspricht. Bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennt man im zeitlichen Verlauf einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Induktion, wobei nach 4 h erstmals ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich ein heterogenes Zellbild. Einige Bakterienzellen leuchten deutlich heller als andere, wobei sich nach 8–10 h Induktion die Leuchtintensität der Zellen untereinander weitgehend angeglichen hat.

Im Gegensatz zu *S. epidermidis* 1457 kommt es nach Induktion einer stationären Schüttelkultur von *S. aureus* RN4220 x pASgfp<sub>hld</sub> nicht zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die Werte bleiben über den gesamten Messzeitraum hinweg in einem Bereich nahe der Eigenfluoreszenz der Bakterien. Im Rahmen der Charakterisierung der GFP-Konstrukte (Kap. 3.4) konnte allerdings gezeigt werden, dass unter Kulturbedingungen, bei denen die Xylose direkt zur Hauptkultur dazugegeben wurde, das resultierende Fluoreszenzniveau in *S. aureus* dem Niveau von *S. epidermidis* entsprach.



**Abbildung 11:** Graphische Darstellung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Xylose zu einer stationären Kultur von (A) *S. aureus* RN4220 x pASgfp<sub>hld</sub> und (B) *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> angegeben in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU).



**Abbildung 12:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> unter induzierten Bedingungen 2, 4, 8, und 10 Stunden nach Zugabe von Xylose zu einer stationären Kultur (Exzitation 488 nm, Emissionsspektrum 500–600 nm) bei identischer Laserleistung. **Abb. A–D:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen **Abb. E–H:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme des gleichen Bildausschnittes Vergrößerung 1000fach.

### 3.6.2 Messung der Halbwertszeit von GFP<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* 1457 und *S. aureus* RN4220

Die Halbwertszeitmessung wurde in *S. epidermidis* 1457 pASgfp<sub>hld</sub> und *S. aureus* RN4220 pASgfp<sub>hld</sub> durchgeführt. Nach 24 h Induktion wurden die Zellen zur Repression der Promotoraktivität in xylosefreiem Medium aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität in stündlichen Intervallen quantitativ im Fluorometer gemessen. Die Berechnung der relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) erfolgte nach der Formel  $RFU_{corr} = RFU_{induziert}/OD_{induziert} - RFU_{nicht\ induziert}/OD_{nicht\ induziert}$ .

Die Halbwertszeit des GFP<sub>mut3.1</sub> wurde nach der Formel  $T_{1/2} = -\ln 2/\mu$  (Andersen *et al.*) berechnet, wobei  $\mu$  die Steigung der Kurve repräsentiert, die in der allgemeinen Formel für negatives exponentielles Wachstum eine Abnahmegeschwindigkeit beschreibt. Die dargestellten Ergebnisse beruhen jeweils auf drei unabhängigen Experimenten, bei denen pro Messzeitpunkt drei Messwerte erhoben wurden. Parallel zur quantitativen Fluoreszenzmessung wurde die Halbwertszeit des GFP<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13 und 15 illustriert.

Nach Entzug der Xylose aus dem Medium zeigt die quantitative Messung sowohl in *S. epidermidis* 1457 als auch in *S. aureus* RN4220 über die Zeit eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität, die einer negativ exponentiellen Dynamik folgt. Der Abfall der Kurve beträgt für *S. epidermidis* 1457  $-0,0998\text{ min}^{-1}$  und für *S. aureus* RN4220  $-0,1249\text{ min}^{-1}$ . Somit ließ sich für *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> eine Halbwertszeit von 6 h 57 min und in *S. aureus* RN4220 x pASgfp<sub>hld</sub> von 5 h 33 min berechnen. Auch fluoreszenzmikroskopisch lässt sich der Abfall der Fluoreszenzintensität nachvollziehen. 3 und 6 h nach Entzug der Xylose aus dem Medium erkennt man jeweils einen deutlichen Intensitätsabfall.

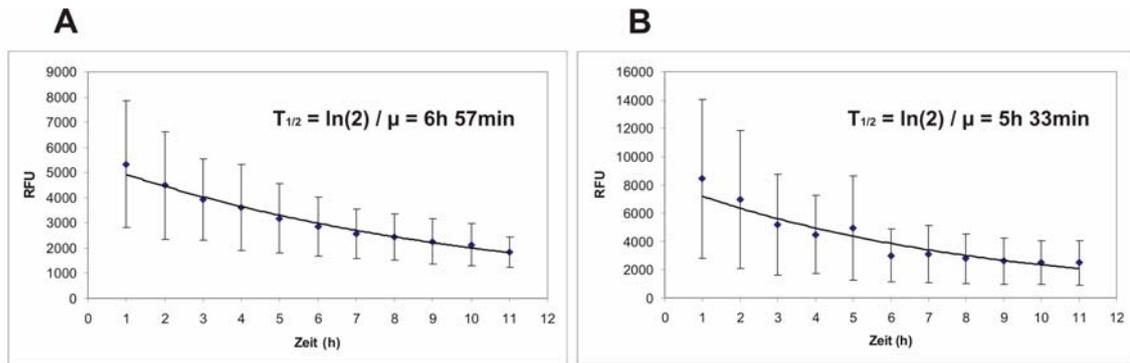
Die hier erhobenen Daten stehen im Kontrast zu Ergebnissen aus *E. coli*, in dem eine Halbwertszeit von mehr als 24 h beschrieben ist (Andersen *et al.*, 1998). Mögliche Ursachen hierfür sind ein beschleunigter proteolytischer Abbau oder die Entfaltung des Moleküls, der mit dem Übergang in eine inaktive Form einhergeht.

Um eine Erklärung für die verminderte Halbwertszeit in *S. epidermidis* 1457 zu finden, wurde eine Translationsanalyse von GFP<sub>mut3.1</sub> mittels Westernblot zu verschiedenen Zeitpunkten nach Repression der Promotoraktivität durchgeführt.

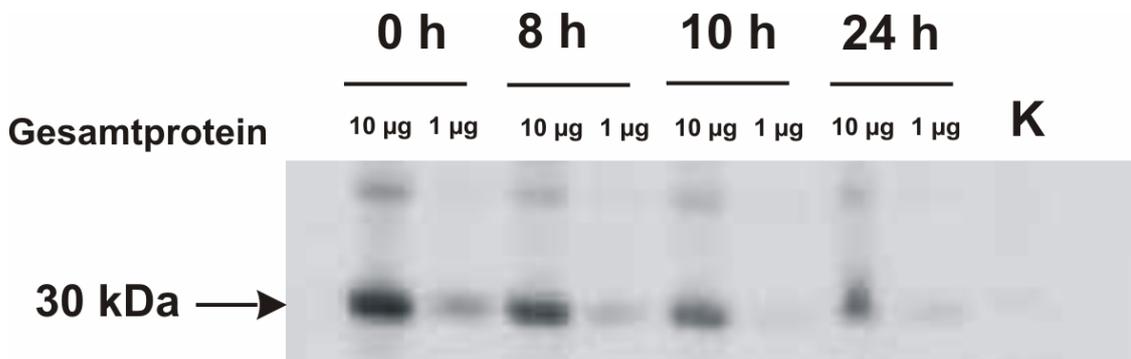
Hierzu wurde eine Gesamtproteinpräparation aus *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> nach 24 h Xyloseinduktion sowie 8, 10 und 24 h nach Entzug der Xylose aus dem Medium durchgeführt und zur Kontrolle die Fluoreszenz zu diesen Zeitpunkten quantitativ bestimmt. Die Proben wurden jeweils auf eine gleiche Gesamtproteinkonzentration von 1 und 10 µg eingestellt, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Das GFP<sub>mut3.1</sub> wurde mit einem Kaninchen-Anti-GFP-Antikörper sowie einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Anti-Kaninchen-IgG gekoppelt und durch Chemilumineszenz-Detektion dargestellt. Durch diesen Versuchsaufbau ergibt sich die Möglichkeit, semiquantitativ Konzentrationsunterschiede zwischen den Präparationszeitpunkten festzustellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

Vergleicht man die Intensität der Banden zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Entzug der Xylose aus dem Medium, so kann man einen Abfall der Intensität feststellen. Zum Zeitpunkt Null bei Aufnahme in xylosefreies Medium erkennt man eine hohe Intensität, die nach 8 und 10 h jeweils deutlich abnimmt. Diese Abnahme ist auf eine geringere GFP-Konzentration in der Probe zurückzuführen, die am ehesten auf dem Abbau durch Proteasen beruht. Diese Befunde korrespondieren mit dem fluorometrisch gemessenen Abfall der Fluoreszenzintensität von 5336 RFU auf 2257 RFU nach 8 h und 1830 RFU nach 10 h.

Nach 10 h kommt es zu einer Dissoziation der Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Proteindegradation. Während die Fluoreszenzintensität weiter bis auf das Niveau der Eigenfluoreszenz der Bakterien abnimmt, ist in diesem Zeitraum kein Proteinabbau im Westernblot zu verzeichnen. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der Abfall der Fluoreszenzintensität hauptsächlich auf den Abbau des GFP durch Proteasen zurückzuführen ist. Daran anschließend läßt sich der Fluoreszenzabfall im Hinblick auf die Ergebnisse des Westernblot am ehesten durch funktionelle Inaktivierung im Sinne von Entfaltung erklären.

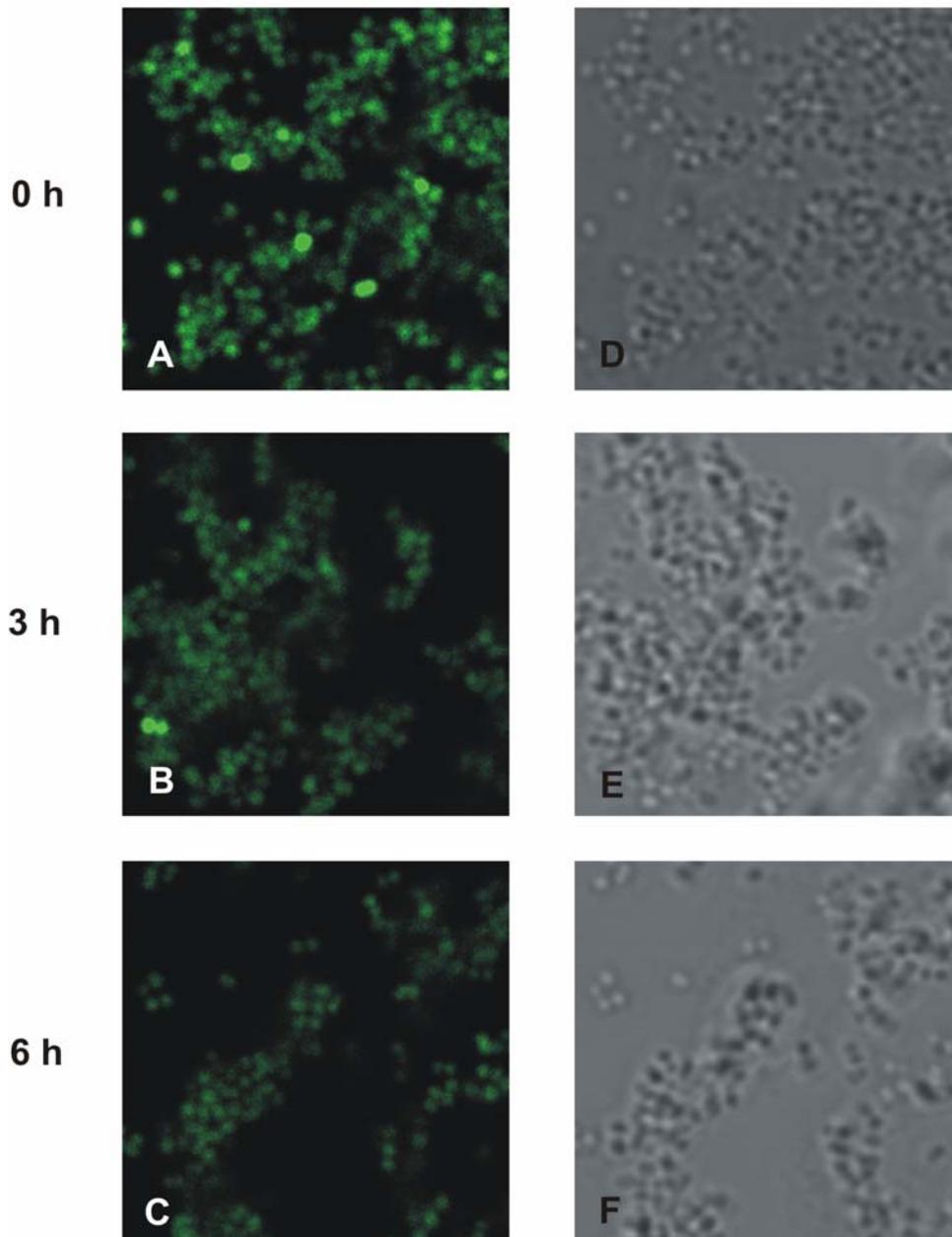


**Abbildung 13:** Graphische Darstellung der Halbwertszeitmessung von GFP<sub>mut3.1</sub> in **(A)** *S. epidermidis* und **(B)** *S. aureus* RN4220 x pASgfp<sub>hld</sub>. Nach Entzug der Xylose aus dem Medium erfolgte eine stündliche Messung der Fluoreszenzintensität sowie eine Berechnung der Halbwertszeit ( $T_{1/2}$ ) nach der Formel  $T_{1/2} = -\ln(2)/\mu$  als Funktion der Fluoreszenzintensität über die Zeit.



**Abbildung 14:** Semiquantitativer Westernblot von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub>. Untersuchung der Konzentration des GFP<sub>mut3.1</sub> zum Zeitpunkt Null nach 24 h Induktion sowie 8, 10 und 24 h nach Entzug der Xylose aus dem Medium. Es sind jeweils zwei Verdünnungsstufen des Gesamtproteins (1:1 und 1:10) aufgetragen worden. Die Darstellung GFP-spezifischer Banden erfolgte durch Chemilumineszenz-Detektion. K steht für Negativkontrolle ohne Zugabe von Xylose.

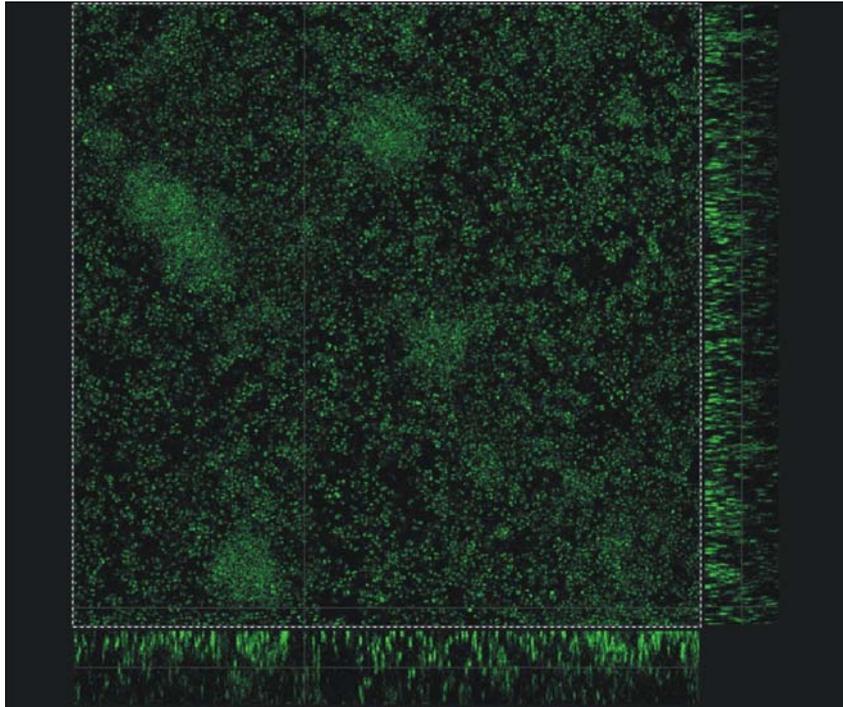
## Fluoreszenzmikroskopie    Durchlichtmikroskopie



**Abbildung 15:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *S. epidermidis* 1457 x pASgfp<sub>hld</sub> nach Entzug der Xylose aus dem Medium (Exzitation 488 nm Emissionsspektrum 500–600 nm) bei identischer Laserleistung. Die Bilder wurden nach 24 h Induktion sowie 3 und 6 h nach Entzug der Xylose aus dem Medium aufgenommen. **Abb. A–C:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen **Abb. D–F:** Zugehörige durchlichtmikroskopische Aufnahmen. Vergrößerung 1000fach. Auf den durchlichtmikroskopischen Aufnahmen ist eine mehrschichtige Lagerung der Bakterien zu erkennen. Dies bedingt, dass sich nicht alle Bakterienzellen in der gleichen optischen Ebene befinden. Somit erscheint die Fluoreszenzintensität der in einer tieferen Ebene gelegenen Zellen in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen weniger ausgeprägt und das Gesamtbild dadurch heterogen.

### 3.6.3 Untersuchung der Fluoreszenzintensität von GFP<sub>mut3.1</sub> innerhalb eines *S. epidermidis* Biofilms

Der Übergang von einer planktonischen in eine sessile Lebensform geht mit Verteilungsunterschieden von Nährstoffen und Sauerstoff innerhalb des Biofilms einher (Kjelleberg und Molin, 2002). Die Synthese von GFP ist ein Vorgang, der sowohl von wirtsabhängigen als auch von äußeren Faktoren beeinflusst wird. Die Anwesenheit von ausreichend Sauerstoff ist dabei von entscheidender Bedeutung (Tsien, 1998). Um zu überprüfen, ob die Expression von GFP in verschiedenen Schichten des Biofilms durch die unterschiedliche Nährstoffverteilung beeinflusst wird, wurde ein unter induzierten Bedingungen angezüchteter Biofilm von *S. epidermidis* x pASgfp<sub>hld</sub> unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht. Die Anzucht erfolgte in Poly-L-Lysin beschichteten Glasbodenzellkulturschalen unter Zugabe von 2 % Xylose. Die Untersuchung des Biofilms wurde unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop TCS SP2 AOBS durchgeführt, wobei die Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm stattfand, und Licht der Wellenlänge 500–600 nm detektiert wurde. Unter Verwendung des Programms Leica Confocal Software (Leica) wurde eine dreidimensionale Darstellung aus den resultierenden Einzelbildern anfertigt, die den Biofilm ausgehend von der basalen Zellschicht in seiner räumlichen Ausdehnung zeigt. Im unteren Abschnitt des Bildes ist die vertikale Ausdehnung zu sehen, der seitliche Abschnitt bildet die Tiefenausdehnung des Biofilms in der Zellkulturschale ab und im mittleren Teil ist die Bodenschicht dargestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Nach 24 h Induktion ist ein Fluoreszenzsignal sichtbar, das in allen Schichten des Biofilms nachweisbar ist. Die Verteilung des Fluoreszenzsignals innerhalb des Biofilms zeigt, dass die gegebenen Unterschiede im Sauerstoffangebot mit geringeren Konzentrationen insbesondere in den basalen Schichten des Biofilms die GFP-Synthese und -Faltung unter induzierten Bedingungen nicht beeinträchtigen. Diese Befunde decken sich mit Erfahrungen aus Experimenten in Biofilmen gramnegativer Bakterien (Sternberg *et al.*, 1999). Unter diesen Voraussetzungen stellt GFP<sub>mut3.1</sub> als Reportergen ein geeignetes Instrument dar, um Aussagen über Änderungen der Transkriptionseffizienz zu untersuchender Gene im Rahmen von Expressionsstudien im Verlauf der *S. epidermidis* Biofilmbildung zu treffen.



**Abbildung 16:** Dreidimensionale Darstellung eines Biofilms von *S. epidermidis* x pASgfp<sub>hld</sub> unter induzierten Bedingungen nach Untersuchung unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop und Bearbeitung mit dem Programm LCS Lite. Exzitation 488 nm, Emissionsspektrum 500–600 nm, Vergrößerung 630fach. Es wurden 80 Einzelbilder einer Schichtdicke von 162,81 nm aufgenommen, was einer untersuchten Gesamtdicke von 12,86 µm entspricht. Das große umpunktete Feld entspricht einem XY-Schnitt, der untere Teil des Bildes stellt einen XZ-Schnitt und der rechte Teil des Bildes einen YZ-Schnitt durch den Biofilm dar.

## 4 Diskussion

*S. epidermidis* spielt im Rahmen von Fremdkörper-assoziierten Infektionen eine bedeutende Rolle (Banerjee *et al.*, 1991; National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, 1999; Wisplinghoff *et al.*, 2003). Die Fähigkeit zur Bildung mehrlagiger Biofilme auf Polymeroberflächen macht ihn bei diesem Krankheitsbild zum am häufigsten isolierten Erreger. Allein in Deutschland muss jährlich mit bis zu 100.000 Infektionen gerechnet werden (Mack *et al.*, 2004). Fremdkörper-assoziierte Infektionen zeichnen sich durch eine außerordentliche Resistenz gegenüber einer Therapie mit Antibiotika aus, sodass es in einer Mehrzahl der Fälle erst nach der Entfernung des Fremdmaterials zu einem endgültigen Therapieerfolg kommt (Götz und Peters, 2000; Younger *et al.*, 1987).

An der Etablierung eines Biofilms sind sowohl Polysaccharide als auch Proteine beteiligt, deren Expression einer komplexen Regulation unterworfen ist (Conlon *et al.*, 2004; Knobloch *et al.*, 2004; Mack *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2005; Vuong *et al.*, 2004b). Um das Expressionsmuster der beteiligten Faktoren auch direkt *in situ* untersuchen zu können, sind leistungsfähige Reportergensysteme notwendig. Die Anwendung des *green fluorescent protein* (GFP) hat sich für das Studium lebender Biofilme bereits in anderen Organismen wie *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* bewährt (Davies *et al.*, 1998; Sternberg *et al.*, 1999).

Ziel dieser Arbeit war es, das GFP<sub>mut3.1</sub> als Reporter gen in *S. epidermidis* 1457 zu exprimieren und bezüglich seiner Eigenschaften genauer zu charakterisieren. Hierzu wurde in vier unterschiedlichen Konstrukten untersucht, welchen Einfluss verschiedene Shine-Dalgarno-Sequenzen auf die Transkriptions- und Translationseffizienz des GFP sowie auf die Intensität und Homogenität des Fluoreszenzsignals in Staphylokokken ausüben. Zudem wurden die biologischen Eigenschaften unter optimierten Expressionsbedingungen in *S. epidermidis* 1457 und *S. aureus* RN4220 beschrieben. Für diese Untersuchungen wurde der *icaADBC*- und biofilm-positive Stamm *S. epidermidis* 1457 herangezogen, der als Prototyp eines Erregers Fremdkörper-assoziiierter Infektionen angesehen wird und an dem die meisten Arbeiten zur

Aufklärung von Regulationsmechanismen der Biofilmbildung durchgeführt wurden (Mack *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2005).

#### 4.1 Die Rolle der Shine-Dalgarno-Sequenz im Rahmen der Translationsinitiation von heterologen Genen in Staphylokokken

Expriert man GFP<sub>mut3.1</sub> im Plasmid pAS1 unter der Kontrolle eines *xylA/xylR*-Promotors (Sizemore *et al.*, 1991; Tegmark *et al.*, 2000) unter Voranstellung der Shine-Dalgarno-(SD)-Sequenz von *icaA* (Konstrukt pASgfp<sub>icaA</sub>) in Staphylokokken, so findet sich nur ein schwaches Fluoreszenzsignal, welches für die qualitative und quantitative Darstellung von Promotoraktivität zu gering ausfällt.

Grundsätzlich lassen sich verschiedene Ursachen für eine geringe Expression Vektor-kodierter Gene unterscheiden. Zum einen kann sich die Kopienzahl des Plasmids pro Zelle, zum anderen auch die Stärke des gewählten Promotors oder der Shine-Dalgarno-Sequenz auf die Expression des Gens in einem bestimmten Wirt auswirken (Ohashi *et al.*, 2003).

Das Plasmid pAS1 liegt in Staphylokokken in niedriger Kopienzahl vor (Novick *et al.*, 1986). Es enthält den starken *xylA/xylR*-Promotor, nach dessen Induktion es zu einem signifikanten Anstieg der *gfp*-Transkription kommt. Dies konnte durch Transkriptionsanalyse im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Eine zu schwache Promotoraktivität und daraus resultierend eine zu geringe Transkriptmenge konnten daher nicht als Ursache für quantitative Unterschiede der Fluoreszenzintensität angenommen werden. Vielmehr lässt sich in diesem System der Einfluss verschiedener SD-Sequenzen auf die Translationsinitiation untersuchen.

Der Shine-Dalgarno-Sequenz kommt im Rahmen der Translationsinitiation eine Schlüsselfunktion zu (Rocha *et al.*, 1999). Ihre Rolle besteht in der Vermittlung einer Interaktion zwischen der mRNA und der ribosomalen RNA. Sie bindet dabei an eine partiell komplementäre, pyrimidinreiche Basensequenz, die am 3'-Ende der 16S rRNA gelegen ist. Diese Interaktion ermöglicht der 30S-Ribosomen-Untereinheit das korrekte Auffinden des Startcodons (Rocha *et al.*, 1999; Shine und Dalgarno, 1974; Voet und Voet, 1995c). Hierbei kommt vor allem der Stärke der Bindung zwischen der 16S rRNA und der SD-Sequenz, bezogen auf die Bindungsenergie sowie dem Grad der

Übereinstimmung der beteiligten Basen, eine Bedeutung zu (Vellanoweth, 1993). Betrachtet man die zusätzlich an der Translation beteiligten Kofaktoren, so findet sich in vielen gramnegativen Bakterien wie zum Beispiel *E. coli* ein ribosomales Protein S1, das in der Lage ist, die mRNA unspezifisch zu binden, wodurch die Bindung der 30S-Untereinheit an die mRNA erleichtert wird. Diese Interaktion setzt die Notwendigkeit einer starken SD-Sequenz für die Initiation der Translation herab. Vielen grampositiven Organismen fehlt ein Äquivalent zu diesem größten ribosomalen Protein. Bakteriengattungen, die S1 natürlicherweise tragen, zeigen die Fähigkeit zur unspezifischen Translation heterologer Gene, während Gattungen, denen das Protein S1 fehlt, translational spezifisch sind. Zu den Bakterien, denen S1 fehlt, zählt unter anderem die Gattung *Bacillus*, wie auch andere grampositive Bakterien mit niedrigem Gehalt von G und C in ihrer DNA (Rocha *et al.*, 1999; Vellanoweth, 1993).

Der optimale Abstand zwischen SD-Sequenz und Startcodon, der in *E. coli* und Staphylokokken zwischen 6 und 10 Basen liegt, ist für die Translationseffizienz ebenfalls von Bedeutung (Hartz *et al.*, 1991; Vellanoweth und Rabinowitz, 1992). Zudem ist beschrieben, dass die Bevorzugung bestimmter Startcodons innerhalb einer Bakterienspezies zu einer verstärkten oder abgeschwächten Translationseffizienz der jeweiligen Gene führt. Fast alle Gene in *E. coli* beginnen mit ATG, während 30 % der Gene in *B. subtilis* mit TTG oder GTG beginnen. Dieser Einfluss relativiert sich aber in Anwesenheit einer starken SD-Sequenz, was wiederum deren Bedeutung für die Translations-Initiation unterstreicht (Vellanoweth und Rabinowitz, 1992).

Vor diesem Hintergrund könnte die schwache Fluoreszenzintensität des Konstruktes pASgfp<sub>icaA</sub> in *S. epidermidis* also auf eine verminderte Translationseffizienz des heterologen GFP<sub>mut3.1</sub> aufgrund einer schwachen Bindung der 16S rRNA an die verwendete Shine-Dalgarno-Sequenz zurückgeführt werden.

Um die Expressionsbedingungen des GFP<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* 1457 zu optimieren wurden neben der von Vellanoweth beschriebenen Konsensus-SD-Sequenz (Vellanoweth, 1993) die SD-Sequenzen dreier gut charakterisierter Staphylokokkengene bezüglich ihres Einflusses auf die Translationseffizienz des GFP untersucht: die SD-Sequenz des staphylokokkeneigenen akzessorischen Regulators (*sarA*), der Superoxiddismutase (*sod*) aus *S. epidermidis* und die SD-Sequenz des

Hämolysin delta Gens (*hld*). Sie wurden in ihrem natürlichen Abstand vor das GFP-Startcodon kloniert.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten demonstrieren, dass die Anwendung des GFP als Reporterogen in Staphylokokken vor allem auf der Ebene der Translation Limitierungen aufweist, die durch den Einsatz einer optimierten SD-Sequenz überwunden werden konnten.

Die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Fluoreszenzanalysen zeigen, dass in *S. epidermidis* 1457 der die *hld* SD-Sequenz enthaltende GFP-Vektor pASgfp<sub>*hld*</sub> eine Anwendung als Reporterogen zulässt. Mit diesem Konstrukt lässt sich in diesem Wirt ein starkes und homogenes Fluoreszenzsignal erzielen. Dagegen zeigen die Konstrukte, die die *sarA*- und die Konsensus-SD-Sequenz enthalten, in Staphylokokken fast überhaupt keine messbare Fluoreszenz.

Ähnliche Ergebnisse finden sich auch für andere grampositive Bakterien mit geringem G/C-Gehalt ihrer DNA. So haben Qazi *et al.* für Listerien einen GFP-Vektor entwickelt, in welchem dem GFP<sub>mut3.1</sub> eine der Konsensus-Shine-Dalgarno-Sequenz für grampositive Bakterien entsprechende Sequenz (Vellanoweth, 1993) vorangestellt ist. Die Anwendung dieser SD-Sequenz bedingt in Listerien ein starkes Fluoreszenzsignal, welches bei Expression desselben Vektors in *B. subtilis* noch verstärkt wird (Qazi *et al.*, 2001). Auch führt der Einsatz dieser *ribosome binding site* bei der Expression des GFP<sub>uv</sub> in *Bacillus subtilis* zu befriedigenden Ergebnissen (Ohashi *et al.*, 2003). Cheung *et al.* entwickelten Konstrukte, in denen das GFP<sub>uv</sub> als Reporterogen unter Voranstellung der SD-Sequenz von *sarA* verwendet wurde. Das GFP wurde unter der Kontrolle der *sarA*-Promotoren in *Staphylococcus aureus* exprimiert, deren Aktivität sich mittels dieses Reportergensystems untersuchen ließ (Cheung *et al.*, 1998).

Offensichtlich gibt es zwischen verschiedenen Expressionssystemen und verschiedenen grampositiven Bakterienspezies Unterschiede in der Effektivität bestimmter SD-Sequenzen. Während die Konsensus-SD-Sequenz zu guten Ergebnissen bei der GFP-Expression in *B. subtilis* führt, ist sie für die gleiche Anwendung in *S. epidermidis* ungeeignet. Die Sequenz stammt ursprünglich aus *B. subtilis* und wurde dort zur Verstärkung von Translation eingesetzt (Qazi *et al.*, 2001). Das Versagen in *S. epidermidis* könnte also mit einer relativen Speziespezifität erklärt werden, wengleich in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass in Staphylokokken

auch verschiedene staphylokokkeneigene SD-Sequenzen ein unterschiedliches Maß an Translationsverstärkung von GFP bewirken.

Es gibt bis heute wenig Erfahrung mit der Expression heterologen Genmaterials in *S. epidermidis*. In der Literatur finden sich bislang keine Hinweise darauf, welche Bedingungen der unterschiedlichen Effizienz verschiedener SD-Sequenzen in diesem Organismus zugrunde liegen. Die Konditionen, die zu einer ausreichenden Translationseffizienz des gewünschten Gens führen, müssen jeweils neu evaluiert werden. Grundsätzlich zeigen die vorliegenden Daten sowie die bereits in der Literatur vorhandenen Beispiele, dass das GFP ein leistungsfähiges Instrument zur Untersuchung von Genexpression in lebenden Biofilmen darstellt. Expressionssysteme, die sich in anderen Wirten bewährt haben, können jedoch nicht ohne vorherige Charakterisierung oder simultane Kontrolle durch ein unabhängiges Reportergensystem in *S. epidermidis* eingesetzt werden. Es muss zunächst belegt werden, dass sich die Befunde auf diesen Organismus übertragen lassen, und dass das System für Expressionsuntersuchungen in *S. epidermidis* geeignet ist.

## **4.2 Charakterisierung des Reportergensystems bezogen auf die biologischen Eigenschaften des Wirtes**

GFP ist vor allem in gramnegativen Bakterien ein häufig für Untersuchungen der Genexpression in Biofilmen verwendetes Reportergen (Andersen *et al.*, 1998; Sternberg *et al.*, 1999; Werner *et al.*, 2004). Nicht zuletzt diese Arbeiten haben gezeigt, dass Biofilmbildung in Bakterien ein komplexes Geschehen ist, das sowohl von genetischen als auch von äußeren Gegebenheiten beeinflusst wird (Kjelleberg und Molin, 2002). Untersuchungen der Biofilmbildung in *S. epidermidis* zeigen die Beteiligung einer Vielzahl von Genen, die einer komplexen Regulation unterliegen (Conlon *et al.*, 2004; Knobloch *et al.*, 2004; Mack *et al.*, 2004; Vuong *et al.*, 2004b). Einer der Haupteinwände, der gegen die Verwendung von Reportergenen bei der Untersuchung bakterieller Pathogenitätsmechanismen erhoben werden kann, besteht darin, dass die Expression dieser Gene in hoher Kopienzahl in einer signifikanten Stoffwechselbelastung der Bakterien resultiert. Dies kann einerseits zu Plasmidinstabilität und Verlust des Plasmids, andererseits aber auch zu Veränderungen der physiologischen Eigenschaften des Bakteriums *in vitro* oder *in vivo* führen (Qazi *et*

*al.*, 2001; Valdivia *et al.*, 1996). Im Plasmid pAS1 wird GFP unter der Kontrolle von *xylR*, einem hochaktiven Promotor, in signifikanter Kopienzahl exprimiert. Um sicherzustellen, dass die resultierende Proteinexpression nicht durch Stoffwechselbelastung in die Regulationsmechanismen der Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 eingreift, erfolgte eine Untersuchung des Biofilm-Phänotyps der plasmidtragenden Stämme im Vergleich zum Wildtyp unter induzierten und nicht induzierten Bedingungen. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass weder die Plasmide selbst noch die Bildung von GFP Einfluss auf den biofilm-positiven Phänotyp von *S. epidermidis* 1457 nehmen. Die Tatsache, dass die Expression des GFP keine Auswirkungen auf physiologischen Eigenschaften oder die Pathogenitätsfaktoren eines Bakteriums hat, konnte auch von anderen Autoren für grampositive Bakterien nachgewiesen werden (Qazi *et al.*, 2001; Vuong *et al.*, 2004b). Ausgangsbasis für das Studium differentieller Genexpression innerhalb eines Biofilms ist das Erreichen eines vergleichbaren Fluoreszenzniveaus in allen Bakterienzellen in verschiedenen Schichten des Biofilms. Der Übergang von einer planktonischen in eine sessile Lebensform geht mit Verteilungsunterschieden von Nährstoffen und Sauerstoff innerhalb eines Biofilms einher (Kjelleberg und Molin, 2002). Vor allem die Faltung des Chromophors des GFP ist ein sauerstoffabhängiger Vorgang (Tsien, 1998). Somit besteht die Möglichkeit, dass äußere Gegebenheiten das Fluoreszenzniveau der Bakterien beeinflussen und auf diese Weise die Ergebnisse einer Expressionsstudie verfälschen könnten. Für das Konstrukt pASgfp<sub>hld</sub> konnte zunächst gezeigt werden, dass es in planktonischen Bakterien zu einer homogenen GFP-Expression kommt. Auch innerhalb eines *S. epidermidis* 1457 Biofilms präsentiert es eine gleichmäßig verteilte Fluoreszenzintensität in den verschiedenen Schichten des Biofilms. Die hier vorlegten Daten belegen, dass GFP<sub>mut3.1</sub> grundsätzlich für Untersuchungen der Genexpression von an der Biofilmbildung beteiligten Genen in *S. epidermidis* geeignet ist.

### **4.3 Evaluierung der Eigenschaften von GFP<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis***

Die Kenntnis der biologischen Eigenschaften des Reporters ist für die Auswahl des geeigneten Systems bei einer bestimmten Fragestellung oder einem bestimmten Wirt von besonderer Bedeutung. Hervorzuheben sind dabei vor allem die Zeitspanne

zwischen Aktivierung des Promotors und erstmaliger Nachweisbarkeit des erwarteten Signals sowie die Halbwertszeit des Reporters.

Das GFP<sub>mut3.1</sub> ist im Bereich der gramnegativen Bakterien gut charakterisiert. Im *E. coli* lässt sich 8 min nach Induktion des Promotors erstmals ein Fluoreszenzsignal nachweisen, die maximale Fluoreszenzintensität ist nach 2 h erreicht. Die Halbwertszeit beträgt mindestens 24 h (Andersen *et al.*, 1998; Cormack *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften des GFP<sub>mut3.1</sub> in Staphylokokken evaluiert, wobei der besondere Schwerpunkt auf Untersuchungen der Charakteristika in *S. epidermidis* lag. Im Kontrast zu den in *E. coli* erhobenen Daten, ist erst nach 4-stündiger Induktion fluoreszenzmikroskopisch ein eindeutig detektierbares Fluoreszenzsignal erkennbar, nach 8 h Induktion beträgt die Fluoreszenzintensität etwa die Hälfte des maximal erreichbaren Wertes. Die Halbwertszeit von GFP<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* ist mit 7 h wesentlich kürzer als in gramnegativen Bakterien. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, beruht sie teilweise auf Proteindegradation, zum Teil aber auch auf Überführung des GFP in einen inaktiven Zustand, der wahrscheinlich auf Entfaltung des Proteins zurückgeht. Während sich das GFP<sub>mut3.1</sub> in *E. coli* durch ein rasches Ansteigen der Fluoreszenzintensität bei hoher Stabilität auszeichnet, ist in *S. epidermidis* eine langsam steigende Intensität und eine deutlich verkürzte Halbwertszeit zu beobachten. Vergleicht man die hier gewonnenen Daten mit einer Evaluation des GFP<sub>mut3.1</sub> in Listerien (Qazi *et al.*, 2001), so zeigt sich, dass nach 8 h Induktion ein für die Untersuchung ausreichend starkes Fluoreszenzsignal messbar ist, dass das Protein aber ähnlich wie in *E. coli* eine hohe Stabilität aufweist. Die Ergebnisse unterstreichen, dass sich die Eigenschaften des GFP in einem Wirt nicht vorhersagen lassen, und dass es nicht möglich ist, aufgrund einmal gefundener Charakteristika Rückschlüsse auf das Verhalten in anderen Spezies zu ziehen.

Ursachen für die unterschiedlichen biologischen Eigenschaften des GFP in grampositiven und gramnegativen Bakterien könnten auf unterschiedlichen Faltungseigenschaften und Degradationswegen beruhen.

Die posttranslationale Prozessierung und Faltung des Moleküls verläuft beim GFP unabhängig von zellulären Kofaktoren. Sie ist abhängig von Geschwindigkeit und Effektivität der Zusammenlagerung des Chromophors (Tsien, 1998). Für das in dieser Arbeit verwendete GFP<sub>mut3.1</sub> wurde in gramnegativen Bakterien eine im Vergleich zum

Wildtyp beschleunigte Faltung gezeigt. Gleichzeitig ist der Anteil an inaktivem, ungefaltetem, in Einschlusskörperchen vorliegendem GFP deutlich geringer (Cormack *et al.*, 1996). Die hier vorgelegten Daten weisen im Vergleich zu *E. coli* deutliche Unterschiede in der Geschwindigkeit des Anstiegs der Fluoreszenzintensität nach Induktion auf. Ein ähnlicher Verlauf konnte auch in Listerien beobachtet werden (Qazi *et al.*, 2001). Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keinerlei Erkenntnisse darüber, worauf dieser langsamere Fluoreszenzanstieg beruht, und ob es sich dabei um ein allgemein für grampositive Bakterien spezifisches Phänomen handelt. Systematische Untersuchungen dieser Fragestellung wären vor allem im Hinblick auf eine verbesserte Verlässlichkeit und Aussagekraft von Expressionsuntersuchungen unter Verwendung des GFP in diesen Bakterienspezies wünschenswert.

Proteasen spielen im Stoffwechsel von Bakterien eine wichtige Rolle. Sie befreien die Zellen von Proteinresten, fungieren als Chaperone und haben regulatorische Aufgaben während des Zellzyklus, bei der Regulation von Pathogenitätsfaktoren und im Rahmen der Anpassung an Stress- und Umweltbedingungen (Frees *et al.*, 2004; Gottesman, 1999; Yao *et al.*, 2005). Eine Untersuchung der differentiellen Genexpression von planktonischen zu in Biofilmen organisierten Bakterien anhand von *S. epidermidis* zeigt, dass verschiedene Proteasen in Biofilmen auf einem höheren Niveau exprimiert werden als in planktonisch wachsenden Zellen (Yao *et al.*, 2005). Bisher gibt es keine Daten zu der Fragestellung, welche Proteasen in grampositiven oder gramnegativen Bakterien für den Abbau des GFP und seiner stabilen Mutanten verantwortlich sind. Auch ist unbekannt, worauf die Divergenzen in der Halbwertszeit zwischen *E. coli* und *S. epidermidis* beruhen, ob sich also die beschleunigte Abnahme der Fluoreszenzintensität in Staphylokokken mehr auf den Abbau des Proteins aufgrund erhöhter Proteaseaktivität oder auf seine Entfaltung zurückführen lässt.

Die bisherigen Überlegungen zeigen aber, dass der *turnover* des GFP von Systemen abhängig ist, die in unterschiedlichen Wachstumsphasen und unter verschiedenen Anzuchtbedingungen differentiell exprimiert werden. Es wäre also vorstellbar, dass der Abbau des GFP unter Konditionen, die zu einer erhöhten Expression von Proteasen führen, beschleunigt und seine Halbwertszeit damit verkürzt wird. Es käme zu einem Nachlassen der Fluoreszenzintensität bei gleichbleibender Promotoraktivität. Die anhand

von Experimenten in planktonisch wachsenden Bakterien gewonnenen Daten sollten also nicht ohne weiteres auf die Situation in Biofilmen übertragen werden.

#### **4.4 Verwendungsmöglichkeit und Limitierungen von pASgfp<sub>hld</sub> im Rahmen von Expressionsstudien in *S. epidermidis***

Die Biofilmbildung in *S. epidermidis* folgt einem zweiphasigen Verlauf. Nach Anheftung der Bakterien an die zu besiedelnde Oberfläche kommt es im Weiteren zu einer Akkumulation der Bakterienzellen in einem mehrschichtigen Biofilm (Mack *et al.*, 2004). Die Entstehung und Reifung eines Biofilms erfolgt normalerweise in einem Zeitraum von 24 h. Im Vergleich zur Biofilmbildung in gramnegativen Bakterien, in denen sich der Prozeß der Reifung eines Biofilms über mehrere Tage hinziehen kann (Heydorn *et al.*, 2002; Reisner *et al.*, 2003; Vuong *et al.*, 2004b), folgt die Biofilmbildung in *S. epidermidis* einer raschen Dynamik. In diesem System ist die Darstellung von Genexpression nur mit Reporter genen möglich, die selbst einem raschen *turnover* unterliegen. Insofern ist die kurze Halbwertszeit des GFP<sub>mut3.1</sub> ein besonderer Vorteil für diese Anwendung. Andererseits weist dieses System möglicherweise eine Limitierung auf, die im vergleichsweise verzögerten Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Induktion des Promotors begründet ist. Kurzfristige Änderungen der Promotoraktivität werden durch das langsamere Ansprechen des Reporter gens nicht dargestellt. Somit scheinen die Vorteile dieses Reporter gensystems eher in Anwendungsbereichen zu liegen, in denen der Abfall von Genaktivität gemessen werden soll oder wenn Bedingungen gegeben sind, bei denen man die Bakterien zunächst in die stationäre Phase wachsen lässt. Es gibt neue Hinweise darauf, dass die Biofilme von *S. aureus* und *S. epidermidis* über einen Zeitraum von 12 Tagen in einem Infektionsmodell stabil bleiben (Fluckiger *et al.*, 2005). Ein derartiger Ansatz stellt für das GFP<sub>mut3.1</sub> ein mögliches Anwendungsgebiet dar. In der Literatur findet sich bisher als Beispiel einer erfolgreichen Anwendung von GFP als Reporter gen in *S. epidermidis* Biofilmen die Untersuchung des Einflusses von *agr* auf die Regulation der Biofilmbildung unter Verwendung eines EGFP-Reporter gensystems (Vuong *et al.*, 2004b). Dabei wurde die Sequenz des EGFP unter der Kontrolle des Promotors P3 von *agr* exprimiert, wobei keinerlei Angaben zur genauen Klonierungsstrategie und zur verwendeten SD-Sequenz gemacht werden. Die Bakterien wurden als Biofilm

angezüchtet und nach 24 h einmalig unter Verwendung der konfokalen Laserscanning Mikroskopie untersucht. Zu diesem Zeitpunkt liegt die *agr*-Expression auf einem hohen Niveau. In der Publikation werden die biologischen Eigenschaften des EGFP in *S. epidermidis* nicht näher charakterisiert. Auch die Dynamik der Bildung des EGFP im zeitlichen Verlauf wird nicht dargestellt. Daher kann nicht beurteilt werden, ob das verwendete Konstrukt zur Untersuchung von Transkriptionsdynamik geeignet wäre.

Grundsätzlich gesehen liegen die Vorteile des GFP bei Genexpressionsanalysen innerhalb eines Biofilms in seiner substratunabhängigen Signalgebung. Substrat-Verteilungsunterschiede zwischen verschiedenen Schichten des Biofilms, die zur Verfälschung der Ergebnisse führen könnten, werden auf diese Weise umgangen. Einschränkend könnte sich allerdings die Tatsache auswirken, dass die Emittierung eines messbaren Fluoreszenzsignals von einer Reihe von Faktoren abhängig ist. Zum einen unterliegt die Intensität vor allem zu Beginn der Expression nach der Promotoraktivierung, bezogen auf die einzelne Bakterienzelle, einer relativ starken Schwankungsbreite. In *S. epidermidis* zeigt sich ein heterogenes Zellbild, das sich erst nach einer Induktionszeit von bis zu 24 h angleicht. Zum anderen muss eine ausreichende Menge des funktionell aktiven Proteins pro Zelle vorliegen, um Promotoraktivität darstellen zu können. Das bedeutet, dass bei geringer Aktivität eines untersuchten Promotors eventuell nicht ausreichend viele Genäquivalente des Reporters pro Zelle zur Verfügung stehen, um diese optisch sichtbar machen zu können. Auch eine verkürzte Halbwertszeit, bei der es zu einer geringeren Akkumulation des GFP in der Zelle kommt, kann in diesem Zusammenhang eine Einschränkung darstellen.

Das Verhalten des hier vorgestellten Reportergens bei der Anwendung in *S. epidermidis* Biofilmen und bei der Untersuchung von an seiner Entstehung und Regulation beteiligten Genen muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Hierbei wird vor allem von Interesse sein, inwieweit der Austausch der ungeeigneten *icaA*-SD-Sequenz durch die *hld*-SD-Sequenz zu einer Verbesserung der GFP-Expression führt.

## 5 Zusammenfassung

Ausgehend von seiner Fähigkeit zur Biofilmbildung stellt *Staphylococcus epidermidis* im Rahmen von Fremdkörper-assoziierten Infektionen den am häufigsten isolierten Erreger dar.

Die *S. epidermidis* Biofilmbildung verläuft typischerweise in zwei Phasen. Nach der primären Bindung der Bakterien an die zu besiedelnde Oberfläche kommt es zur Akkumulation in einem mehrlagigen Biofilm, an dessen Entstehung sowohl Polysaccharide als auch Proteine beteiligt sind. Die Expression der beteiligten Faktoren unterliegt dabei einer komplexen Regulation.

Ziel der hier vorgelegten Arbeit war die Etablierung eines *green fluorescent protein* (GFP) basierten Reportersystems in *S. epidermidis*, das *in-situ*-Untersuchungen differentieller Genexpressionsmuster innerhalb eines lebenden Biofilms und im Verlauf seiner Entstehung ermöglicht.

Exprimiert man GFP<sub>mut3.1</sub> unter der Kontrolle eines xyloseinduzierbaren Promotors im Plasmid pAS1 in *S. epidermidis* 1457, so lässt sich unter induzierten Bedingungen kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität messen. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf die in grampositiven, G und C armen Bakterien häufig herabgesetzte Translationseffizienz heterologer Gene zurückzuführen. Deshalb wurde zunächst durch Insertion verschiedener staphylokokkeneigener Shine-Dalgarno-Sequenzen vor dem *gfp*-Startcodon der Einfluss dieser Region auf die Expression in *S. epidermidis* 1457 mittels quantitativer und qualitativer Fluoreszenzanalyse untersucht. Die Voranstellung der SD-Sequenz des Hämolysin delta Gens (*hld*) führte zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Induktion, während unter Verwendung der SD-Sequenz der Superoxiddismutase (*sod*), des staphylokokken-eigenen akzessorischen Regulators (*sarA*) oder einer Konsensus-SD-Sequenz für grampositive Organismen kein ausreichendes Fluoreszenzsignal messbar war. Zusätzlich wurde die Auswirkung dieser SD-Sequenzen auf die *gfp*<sub>mut3.1</sub>-Transkription und -Translation untersucht. Es fand sich bei allen Konstrukten eine identische Transkriptionseffizienz. Gleichzeitig ließen sich auf Translationsebene deutliche Unterschiede im GFP-Gehalt der Proben ermitteln, die in Analogie zu den Ergebnissen

der quantitativen Fluoreszenzanalyse standen. Infolgedessen ist die Fluoreszenzintensität des GFP<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* also vor allem von der maßgeblich durch die SD-Sequenz beeinflussten Translationseffizienz abhängig.

Unter Verwendung der *hld*-SD-Sequenz wurden die biologischen Eigenschaften des GFP<sub>mut3.1</sub> in *S. epidermidis* 1457 charakterisiert. 4 h nach Induktion ließ sich erstmals ein Fluoreszenzsignal detektieren, die Halbwertszeit betrug 7 h, wobei Westernblot-Untersuchungen zeigen, dass die Abnahme der Fluoreszenzintensität hauptsächlich auf dem Abbau des Proteins beruht. Untersuchungen des Biofilm-Phänotyps von *S. epidermidis* 1457 zeigen, dass die Anwesenheit des Reporters keinen Einfluss auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung dieses Stamms nimmt, und dass es innerhalb eines Biofilms zu einer homogenen GFP-Expression kommt. Somit stellt GFP<sub>mut3.1</sub> unter Verwendung einer optimierten SD-Sequenz ein geeignetes Reportersystem zur Untersuchung differentieller Genexpression in *S. epidermidis* dar.

## 6 Literaturverzeichnis

- Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M., and Molin, S. (1998) New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2240-2246.
- Archer, G.L., and Climo, M.W. (1994) Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 2231-2237.
- Archer, G.L. (2000) *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. (eds). Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 2092-2100.
- Augustin, J., and Götz, F. (1990) Transformation of *Staphylococcus epidermidis* and other staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation. *FEMS Microbiol Lett* **54**: 203-207.
- Baddour, L.M., Barker, L.P., Christensen, G.D., Parisi, J.T., and Simpson, W.A. (1990) Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. *J Clin Microbiol* **28**: 676-679.
- Banerjee, S.N., Emori, T.G., Culver, D.H., Gaynes, R.P., Jarvis, W.R., Horan, T., Edwards, J.R., Tolson, J., Henderson, T., and Martone, W.J. (1991) Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* **91**: 86S-89S.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* **7**: 1513-1523.
- Boyce, J.M. (1997) Epidemiology and Prevention of Nosocomial Infections. In *Staphylococci in Human Disease*. Crossley, K.B. and Archer, G.L. (eds). New York: Curchill Livingstone, pp. 309-329.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Burkhardt, F., and Schaal, K.P. (1992) Gewinnung und Verarbeitung von Untersuchungsmaterial - Bewertung von Befunden. In *Mikrobiologische Diagnostik*. Burkhardt, F. (ed). Stuttgart: Thieme, pp. 15-49.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805.
- Cheung, A.L., and Projan, S.J. (1994) Cloning and sequencing of *sarA* of *Staphylococcus aureus*, a gene required for the expression of *agr*. *J Bacteriol* **176**: 4168-4172.
- Cheung, A.L., Nast, C.C., and Bayer, A.S. (1998) Selective activation of *sar* promoters with the use of green fluorescent protein transcriptional fusions as the detection system in the rabbit endocarditis model. *Infect Immun* **66**: 5988-5993.

- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., and Beachey, E.H. (1982) Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun* **37**: 318-326.
- Christensen, G.D., Parisi, J.T., Bisno, A.L., Simpson, W.A., and Beachey, E.H. (1983) Characterization of clinically significant strains of coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* **18**: 258-269.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., and Beachey, E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* **22**: 996-1006.
- Cochrane, D.M., Brown, M.R., Anwar, H., Weller, P.H., Lam, K., and Costerton, J.W. (1988) Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. *J Med Microbiol* **27**: 255-261.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., and Ward, W.W. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**: 1212-1218.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., and O'Gara, J.P. (2002) *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **184**: 4400-4408.
- Conlon, K.M., Humphreys, H., and O'Gara, J.P. (2004) Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **186**: 6208-6219.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., and Ehrlich, G. (2003) The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* **112**: 1466-1477.
- Cowan, S.E., Gilbert, E., Khlebnikov, A., and Keasling, J.D. (2000) Dual labeling with green fluorescent proteins for confocal microscopy. *Appl Environ Microbiol* **66**: 413-418.
- Crameri, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., and Stemmer, W.P. (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol* **14**: 315-319.
- Cramton, S.E., Ulrich, M., Gotz, F., and Doring, G. (2001) Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **69**: 4079-4085.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995) Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448-455.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.

- Davenport, D.S., Massanari, R.M., Pfaller, M.A., Bale, M.J., Streed, S.A., and Hierholzer, W.J., Jr. (1986) Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **153**: 332-339.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-298.
- Deighton, M., and Borland, R. (1993) Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect Immun* **61**: 4473-4479.
- Deighton, M.A., and Balkau, B. (1990) Adherence measured by microtiter assay as a virulence marker for *Staphylococcus epidermidis* infections. *J Clin Microbiol* **28**: 2442-2447.
- Delgrave, S., Hawtin, R.E., Silva, C.M., Yang, M.M., and Youvan, D.C. (1995) Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Biotechnology (N Y)* **13**: 151-154.
- Diaz-Mitoma, F., Harding, G.K., Hoban, D.J., Roberts, R.S., and Low, D.E. (1987) Clinical significance of a test for slime production in ventriculoperitoneal shunt infections caused by coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* **156**: 555-560.
- Dobinsky, S., and Mack, D. (2001) Efficient RNA isolation method for analysis of transcription in sessile *Staphylococcus epidermidis* biofilm cultures. *Methods Enzymol* **336**: 255-262.
- Dunne, W.M., Jr., Nelson, D.B., and Chusid, M.J. (1987) Epidemiologic markers of pediatric infections caused by coagulase-negative staphylococci. *Pediatr Infect Dis J* **6**: 1031-1035.
- Emori, T.G., and Gaynes, R.P. (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **6**: 428-442.
- Espersen, F., Wilkinson, B.J., Gahrn-Hansen, B., Thamdrup Rosdahl, V., and Clemmensen, I. (1990) Attachment of staphylococci to silicone catheters *in vitro*. *Apmis* **98**: 471-478.
- Fairweather, N., Kennedy, S., Foster, T.J., Kehoe, M., and Dougan, G. (1983) Expression of a cloned *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin determinant in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **41**: 1112-1117.
- Fidalgo, S., Vazquez, F., Mendoza, M.C., Perez, F., and Mendez, F.J. (1990) Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. *Rev Infect Dis* **12**: 520-528.
- Fluckiger, U., Ulrich, M., Steinhuber, A., Doring, G., Mack, D., Landmann, R., Goerke, C., and Wolz, C. (2005) Biofilm Formation, *icaADBC* Transcription, and Polysaccharide Intercellular Adhesin Synthesis by Staphylococci in a Device-Related Infection Model. *Infect Immun* **73**: 1811-1819.
- Frees, D., Chastanet, A., Qazi, S., Sorensen, K., Hill, P., Msadek, T., and Ingmer, H. (2004) Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **54**: 1445-1462.
- Gerke, C., Kraft, A., Sussmuth, R., Schweitzer, O., and Gotz, F. (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of

- the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* **273**: 18586-18593.
- Gilbert, E.S., Khlebnikov, A., Cowan, S.E., and Keasling, J.D. (2001) Analysis of biofilm structure and gene expression using fluorescence dual labeling. *Biotechnol Prog* **17**: 1180-1182.
- Gottesman, S. (1999) Regulation by proteolysis: developmental switches. *Curr Opin Microbiol* **2**: 142-147.
- Götz, F., and Schumacher, B. (1987) Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol Lett* **40**: 285-288.
- Götz, F., Heilmann, C., and Cramton, S.E. (2000) Molecular basis of catheter associated infections by staphylococci. *Adv Exp Med Biol* **485**: 103-111.
- Götz, F., and Peters, G. (2000) Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative Staphylococci. In *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. Waldvogel, F.A. and Bisno, A.L. (eds). Washington DC: ASM Press, pp. 55-88.
- Hartz, D., McPheeters, D.S., and Gold, L. (1991) Influence of mRNA determinants on translation initiation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **218**: 83-97.
- Heilmann, C., Gerke, C., Perdreau-Remington, F., and Gotz, F. (1996a) Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun* **64**: 277-282.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., and Götz, F. (1996b) Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* **20**: 1083-1091.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G., and Gotz, F. (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**: 1013-1024.
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12501-12504.
- Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature* **373**: 663-664.
- Heim, R., and Tsien, R.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**: 178-182.
- Heinzelmann, M., Herzig, D.O., Swain, B., Mercer-Jones, M.A., Bergamini, T.M., and Polk, H.C., Jr. (1997) Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**: 705-710.
- Herwaldt, L.A., Geiss, M., Kao, C., and Pfaller, M.A. (1996) The positive predictive value of isolating coagulase-negative staphylococci from blood cultures. *Clin Infect Dis* **22**: 14-20.
- Heydorn, A., Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., and Molin, S. (2002) Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2008-2017.

- Higashi, J.M., Wang, I.W., Shlaes, D.M., Anderson, J.M., and Marchant, R.E. (1998) Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. *J Biomed Mater Res* **39**: 341-350.
- Hogt, A.H., Dankert, J., and Feijen, J. (1985) Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J Gen Microbiol* **131**: 2485-2491.
- Hogt, A.H., Dankert, J., Hulstaert, C.E., and Feijen, J. (1986) Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylenepropylene). *Infect Immun* **51**: 294-301.
- Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F., and Peters, G. (1997) A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* **65**: 519-524.
- Inouye, S., and Tsuji, F.I. (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* **341**: 277-280.
- Ishak, M.A., Groschel, D.H., Mandell, G.L., and Wenzel, R.P. (1985) Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia. *J Clin Microbiol* **22**: 1025-1029.
- Kahn, T.W., Beachy, R.N., and Falk, M.M. (1997) Cell-free expression of a GFP fusion protein allows quantitation *in vitro* and *in vivo*. *Curr Biol* **7**: R207-208.
- Karlowsky, J.A., Jones, M.E., Draghi, D.C., Thornsberry, C., Sahm, D.F., and Volturo, G.A. (2004) Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **3**.
- Kirchhoff, L.V., and Sheagren, J.N. (1985) Epidemiology and clinical significance of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococcus. *Infect Control* **6**: 479-486.
- Kjelleberg, S., and Molin, S. (2002) Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol* **5**: 254-258.
- Kleeman, K.T., Bannerman, T.L., and Kloos, W.E. (1993) Species distribution of coagulase-negative staphylococcal isolates at a community hospital and implications for selection of staphylococcal identification procedures. *J Clin Microbiol* **31**: 1318-1321.
- Kloos, W. (1997) Taxonomy and Systematics of Staphylococci Indigenous to Humans. In *Staphylococci in Human Disease*. Crossley, K.B. and Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 113-137.
- Kloos, W.E., and Bannerman, T.L. (1994) Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* **7**: 117-140.
- Kloos, W.E., Ballard, D.N., Webster, J.A., Hubner, R.J., Tomasz, A., Couto, I., Sloan, G.L., Dehart, H.P., Fiedler, F., Schubert, K., de Lencastre, H., Sanches, I.S., Heath, H.E., Leblanc, P.A., and Ljungh, A. (1997) Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 313-323.

- Kloos, W.E., George, C.G., Olgiate, J.S., Van Pelt, L., McKinnon, M.L., Zimmer, B.L., Muller, E., Weinstein, M.P., and Mirrett, S. (1998) *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 799-812.
- Knobloch, J.K., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.H., and Mack, D. (2001) Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J Bacteriol* **183**: 2624-2633.
- Knobloch, J.K., Von Osten, H., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D. (2002) Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **191**: 107-114.
- Knobloch, J.K., Jager, S., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Mack, D. (2004) RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene *icaR*. *Infect Immun* **72**: 3838-3848.
- Kuchling, H. *Physik Formeln und Gesetze*. Köln.
- Lambert, L.H., Cox, T., Mitchell, K., Rossello-Mora, R.A., Del Cueto, C., Dodge, D.E., Orkand, P., and Cano, R.J. (1998) *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 2**: 511-518.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Ludwicka, A., Uhlenbruck, G., Peters, G., Seng, P.N., Gray, E.D., Jeljaszewicz, J., and Pulverer, G. (1984) Investigation on extracellular slime substance produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg [A]* **258**: 256-267.
- Mack, D., Siemssen, N., and Laufs, R. (1992) Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect Immun* **60**: 2048-2057.
- Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., and Laufs, R. (1994) Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect Immun* **62**: 3244-3253.
- Mack, D., Fischer, W., Krokotsch, A., Leopold, K., Hartmann, R., Egge, H., and Laufs, R. (1996a) The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J Bacteriol* **178**: 175-183.
- Mack, D., Haeder, M., Siemssen, N., and Laufs, R. (1996b) Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J Infect Dis* **174**: 881-884.
- Mack, D. (1999) Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *J Hosp Infect* **43 Suppl**: S113-125.

- Mack, D., Rohde, H., Dobinsky, S., Riedewald, J., Nedelmann, M., Knobloch, J.K., Elsner, H.A., and Feucht, H.H. (2000) Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun* **68**: 3799-3807.
- Mack, D., Bartscht, K., Fischer, C., Rohde, H., de Grahl, C., Dobinsky, S., Horstkotte, M.A., Kiel, K., and Knobloch, J.K. (2001) Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Methods Enzymol* **336**: 215-239.
- Mack, D., Becker, P., Chatterjee, I., Dobinsky, S., Knobloch, J.K., Peters, G., Rohde, H., and Herrmann, M. (2004) Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *Int J Med Microbiol* **294**: 203-212.
- Mack, D., Horstkotte, M.A., Rohde, H., and Knobloch, J.K. (2005) Coagulase-negative staphylococci. In *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy*. Pace, J.L., Rupp, M.E. and Finch, G. (eds). London UK: CRC Press, pp. 109-153.
- Maira-Litran, T., Kropec, A., Abeygunawardana, C., Joyce, J., Mark, G., 3rd, Goldmann, D.A., and Pier, G.B. (2002) Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect Immun* **70**: 4433-4440.
- Marrie, T.J., Kwan, C., Noble, M.A., West, A., and Duffield, L. (1982) *Staphylococcus saprophyticus* as a cause of urinary tract infections. *J Clin Microbiol* **16**: 427-431.
- Marrie, T.J., and Costerton, J.W. (1984) Scanning and transmission electron microscopy of *in situ* bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. *J Clin Microbiol* **19**: 687-693.
- McKenney, D., Pouliot, K.L., Wang, Y., Murthy, V., Ulrich, M., Doring, G., Lee, J.C., Goldmann, D.A., and Pier, G.B. (1999) Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an *in vivo*-expressed antigen. *Science* **284**: 1523-1527.
- Meighen, E.A. (1993) Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the *lux* genes. *Faseb J* **7**: 1016-1022.
- Morfeldt, E., Tegmark, K., and Arvidson, S. (1996) Transcriptional control of the *agr*-dependent virulence gene regulator, RNAPIII, in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **21**: 1227-1237.
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H., and Winant, J. (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**: 2656-2662.
- Muller, E., Hubner, J., Gutierrez, N., Takeda, S., Goldmann, D.A., and Pier, G.B. (1993) Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect Immun* **61**: 551-558.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report (1996) data summary from October 1986-April 1996, issued May 1996. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. *Am J Infect Control* **24**: 380-388.

- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report (1999) data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am J Infect Control* **27**: 520-532.
- Nilsson, M., Frykberg, L., Flock, J.I., Pei, L., Lindberg, M., and Guss, B. (1998) A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **66**: 2666-2673.
- Noble, W.C. (1997) Staphylococcal Carriage and Skin and Soft Tissue Infection. In *Staphylococci In Human Disease*. Crossley, K.B. and Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 401-412.
- Novick, R.P., Edelman, I., and Lofdahl, S. (1986) Small *Staphylococcus aureus* plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes. *J Mol Biol* **192**: 209-220.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**: 49-79.
- Ohashi, Y., Ohshima, H., Tsuge, K., and Itaya, M. (2003) Far different levels of gene expression provided by an oriented cloning system in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **221**: 125-130.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R., and Piston, D.W. (1997) Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73**: 2782-2790.
- Pei, L., Palma, M., Nilsson, M., Guss, B., and Flock, J.I. (1999) Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **67**: 4525-4530.
- Peters, G., Locci, R., and Pulverer, G. (1981) Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* **173**: 293-299.
- Peters, G., Locci, R., and Pulverer, G. (1982) Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* **16**: 15-32.
- Peters, G., and Pulverer, G. (2001) Die Familie der Micrococcaceae. In *Medizinische Mikrobiologie*. Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H. and Pulverer, G. (eds). München: Urban und Fischer, pp. 250-260.
- Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R., and Teuber, M. (2003) *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst Appl Microbiol* **26**: 30-37.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., and Lejeune, P. (1999) Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 5993-6002.
- Probst, A.J., Hertel, C., Richter, L., Wassill, L., Ludwig, W., and Hammes, W.P. (1998) *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 651-658.

- Qazi, S.N., Rees, C.E., Mellits, K.H., and Hill, P.J. (2001) Development of *gfp* Vectors for Expression in *Listeria monocytogenes* and Other Low G+C Gram Positive Bacteria. *Microb Ecol* **41**: 301-309.
- Rachid, S., Cho, S., Ohlsen, K., Hacker, J., and Ziebuhr, W. (2000) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors: the possible involvement of the alternative transcription factor *sigB*. *Adv Exp Med Biol* **485**: 159-166.
- Reisner, A., Haagenzen, J.A., Schembri, M.A., Zechner, E.L., and Molin, S. (2003) Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* **48**: 933-946.
- Remington, S.J. (2000) Structural basis for understanding spectral variations in green fluorescent protein. *Methods Enzymol* **305**: 196-211.
- Ringberg, H., Thoren, A., and Bredberg, A. (1991) Evaluation of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. A prospective clinical and microbiological study. *Scand J Infect Dis* **23**: 315-323.
- Rocha, E.P., Danchin, A., and Viari, A. (1999) Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. *Nucleic Acids Res* **27**: 3567-3576.
- Rohde, H., Kalitzky, M., Kroger, N., Scherpe, S., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K., Zander, A.R., and Mack, D. (2004) Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J Clin Microbiol* **42**: 5614-5619.
- Rohde, H., Burdelski, C., Bartscht, K., Hussain, M., Buck, F., Horstkotte, M.A., Knobloch, J.K., Heilmann, C., Herrmann, M., and Mack, D. (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* **55**: 1883-1895.
- Rupp, M.E., and Archer, G.L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis* **19**: 231-243; quiz 244-235.
- Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., Bartscht, K., and Mack, D. (1999a) Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. *Infect Immun* **67**: 2627-2632.
- Rupp, M.E., Ulphani, J.S., Fey, P.D., and Mack, D. (1999b) Characterization of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *Infect Immun* **67**: 2656-2659.
- Rupp, M.E., Fey, P.D., Heilmann, C., and Gotz, F. (2001) Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model. *J Infect Dis* **183**: 1038-1042.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*.

- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., and Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140-1154.
- Schaberg, D.R., Culver, D.H., and Gaynes, R.P. (1991) Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* **91**: 72S-75S.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223-239.
- Shine, J., and Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 1342-1346.
- Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R., and Haseloff, J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr Biol* **6**: 1653-1663.
- Sizemore, C., Buchner, E., Rygus, T., Witke, C., Götz, F., and Hillen, W. (1991) Organization, promoter analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon. *Mol Gen Genet* **227**: 377-384.
- Southward, C.M., and Surette, M.G. (2002) The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. *Mol Microbiol* **45**: 1191-1196.
- Sperber, W.H., and Tatini, S.R. (1975) Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* **29**: 502-505.
- Spersger, J., Wieser, M., Taubel, M., Rossello-Mora, R.A., Rosengarten, R., and Busse, H.J. (2003) *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 2007-2011.
- Sternberg, C., Christensen, B.B., Johansen, T., Toftgaard Nielsen, A., Andersen, J.B., Givskov, M., and Molin, S. (1999) Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4108-4117.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187-209.
- Takahashi, T., Satoh, I., and Kikuchi, N. (1999) Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 725-728.
- Tegmark, K., Karlsson, A., and Arvidson, S. (2000) Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **37**: 398-409.
- Timmerman, C.P., Fleer, A., Besnier, J.M., De Graaf, L., Cremers, F., and Verhoef, J. (1991) Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* **59**: 4187-4192.
- Tojo, M., Yamashita, N., Goldmann, D.A., and Pier, G.B. (1988) Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **157**: 713-722.
- Trulzsch, K., Rinder, H., Trcek, J., Bader, L., Wilhelm, U., and Heesemann, J. (2002) "*Staphylococcus pettenkoferi*," a novel staphylococcal species isolated from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* **43**: 175-182.
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**: 509-544.

- Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I., and Penades, J.R. (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* **49**: 193-210.
- Valdivia, R.H., Hromockyj, A.E., Monack, D., Ramakrishnan, L., and Falkow, S. (1996) Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene* **173**: 47-52.
- Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., Merckx, R., and Van Eldere, J. (2003) Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during *in vitro* and *in vivo* foreign body infections. *J Infect Dis* **188**: 730-737.
- Vaudaux, P., Pittet, D., Haeberli, A., Huggler, E., Nydegger, U.E., Lew, D.P., and Waldvogel, F.A. (1989) Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. *J Infect Dis* **160**: 865-875.
- Veenstra, G.J., Cremers, F.F., van Dijk, H., and Flier, A. (1996) Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* **178**: 537-541.
- Vellanoweth, R.L., and Rabinowitz, J.C. (1992) The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* *in vivo*. *Mol Microbiol* **6**: 1105-1114.
- Vellanoweth, R.L. (1993) Translation and Its Regulation. In *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A. and Losick, R. (eds). Washington D.C.: American Society of Microbiology, pp. 699-711.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Meugnier, H., Bes, M., Lasne, Y., Fiedler, F., Etienne, J., and Freney, J. (2000) *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 4**: 1521-1527.
- Voet, D., and Voet, J. (1995a) Eukaryotic Gene Expression. In *Biochemistry*. Voet, D. and Voet, J. (eds). Somerset NJ: John Wiley and Sons, Inc., pp. 1123-1191.
- Voet, D., and Voet, J. (1995b) Nucleic Acid Structures and Manipulation. In *Biochemistry*. Voet, D. and Voet, J. (eds). Somerset NJ: John Wiley and Sons, Inc., pp. 848-914.
- Voet, D., and Voet, J. (1995c) The Expression And Transmission of Genetic Information. In *Biochemistry*. Voet, D. and Voet, J. (eds). Somerset NJ: John Wiley and Sons, Inc., pp. 829-1261.
- Vuong, C., Saenz, H.L., Gotz, F., and Otto, M. (2000) Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **182**: 1688-1693.
- Vuong, C., Gerke, C., Somerville, G.A., Fischer, E.R., and Otto, M. (2003) Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* **188**: 706-718.
- Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R., and Otto, M. (2004a) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881-54886.

- Vuong, C., Kocianova, S., Yao, Y., Carmody, A.B., and Otto, M. (2004b) Increased Colonization of Indwelling Medical Devices by Quorum-Sensing Mutants of *Staphylococcus epidermidis* In Vivo. *J Infect Dis* **190**: 1498-1505.
- Waldvogel, F.A. (2000) *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol. 2. Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. (eds). Philadelphia Churchill Livingstone, pp. 2069-2092.
- Wallmark, G., Arremark, I., and Telander, B. (1978) *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. *J Infect Dis* **138**: 791-797.
- Wang, I.W., Anderson, J.M., and Marchant, R.E. (1993) *Staphylococcus epidermidis* adhesion to hydrophobic biomedical polymer is mediated by platelets. *J Infect Dis* **167**: 329-336.
- Weinstein, M.P., Murphy, J.R., Reller, L.B., and Lichtenstein, K.A. (1983) The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. II. Clinical observations, with special reference to factors influencing prognosis. *Rev Infect Dis* **5**: 54-70.
- Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B., and Stewart, P.S. (2004) Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6188-6196.
- Whiteley, M., Lee, K.M., and Greenberg, E.P. (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13904-13909.
- Whiteley, M., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2000) Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**: 4356-4360.
- Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., and Greenberg, E.P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-864.
- Wilkinson, B.J. (1997) Biology. In *Staphylococci in Human Disease*. Crossley, K.B. and Archer, G.L. (eds). New York: Churchill Livingstone, pp. 1-38.
- Williams, R.J., Henderson, B., Sharp, L.J., and Nair, S.P. (2002) Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* **70**: 6805-6810.
- Wisplinghoff, H., Seifert, H., Tallent, S.M., Bischoff, T., Wenzel, R.P., and Edmond, M.B. (2003) Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr Infect Dis J* **22**: 686-691.
- Yang, F., Moss, L.G., and Phillips, G.N., Jr. (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**: 1246-1251.
- Yao, Y., Sturdevant, D.E., and Otto, M. (2005) Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* **191**: 289-298.
- Yokoe, H., and Meyer, T. (1996) Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement. *Nat Biotechnol* **14**: 1252-1256.

- Younger, J.J., Christensen, G.D., Bartley, D.L., Simmons, J.C., and Barrett, F.F. (1987) Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. *J Infect Dis* **156**: 548-554.
- Ziebuhr, W., Heilmann, C., Gotz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., and Hacker, J. (1997) Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infect Immun* **65**: 890-896.
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lossner, I., Gotz, F., and Hacker, J. (1999) A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Mol Microbiol* **32**: 345-356.

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. med. R. Laufs und Herrn Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. D. Mack, dem Leiter der Arbeitsgruppe, danke ich für die Überlassung des Themas. Hervorheben möchte ich seine stete Bereitschaft zum kritischen Gedankenaustausch, die mir immer wieder wertvolle Impulse beim Erstellen dieser Arbeit gegeben hat. Herrn PD Dr. med. I. Sobottka danke ich für die Übernahme der Aufgaben des Doktorvaters nach der Berufung von Herrn Prof. Mack an die Universität von Wales, Swansea.

Frau Dr. med. S. Dobinsky und Herrn Dr. med. H. Rohde gilt mein besonderer Dank für die wissenschaftliche Betreuung. Herrn Dr. Rohde danke ich für seine unermüdliche, von Freude an wissenschaftlicher Arbeit geprägte Unterstützung und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bei Herrn PD Dr. med. J. K.-M. Knobloch möchte ich mich für die Hilfe bei den Arbeiten am konfokalen Laserscanning-Mikroskop bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. H.-H. Feucht und Herrn PD Dr. med. B. Zöllner für die Hilfe bei den Sequenzierarbeiten und der statistischen Auswertung von Daten.

Frau Jumi Klettke und Herrn Martin Christner sei für Anregungen mathematischer Natur gedankt.

Abschließend möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe für die schöne gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors bedanken.

## **Erklärung**

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

---

(Gefion Franke)