

**Untersuchungen zur Struktur und Funktion des
interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (PIA)
in *Staphylococcus epidermidis* Biofilmen**

Der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Department Biologie der Universität Hamburg
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
vorgelegte Dissertation

von

Stephanie Karin Frankenberger

aus Bamberg

2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. M. AEPFELBACHER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. A. POMMERENING-RÖSER
Tag der Disputation: 07. November 2008

Hamburg, den 23. Oktober 2008



J. Ganzhorn
Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von August 2004 bis August 2008 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene durchgeführt.

Dissertationsgutachter:

Prof. Dr. Martin Aepfelbacher & PD Dr. Andreas Pommerening-Röser

Disputationsgutachter:

PD Dr. Klaus Ruckdeschel & PD Dr. Eva Spieck

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Martin Aepfelbacher bedanken, für die Bereitschaft diese Arbeit als Gutachter zu betreuen und die Möglichkeit diese Doktorarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene durchführen zu können.

Herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Holger Rohde, für die Bereitstellung des Themas dieser Doktorarbeit und der Möglichkeit zur Durchführung in seiner Arbeitsgruppe. Seine zahlreichen Ideen und Ratschläge waren unentbehrlich für diese Arbeit.

Herrn PD Dr. Andreas Pommerening-Röser danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter seitens des Department Biologie der Universität Hamburg zu betreuen.

Herrn Prof. Ulrich Zähringer vom Forschungszentrum Borstel gilt mein besonderer Dank für die konstruktive Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, weit über die Kooperation des SFB-470 hinaus.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Joachim Hauber und Frau Dr. Ilona Hauber vom Heinrich-Pette-Institut bedanken, für die stetige Unterstützung zum guten Gelingen dieser Arbeit.

Frau PD Dr. Christine Heilmann vom UK Münster und den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe möchte ich herzlich danken, für die Unterstützung bei der „phage display“ Analyse.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE's und der Abteilung Zellbiologie und Virologie des Heinrich-Pette-Instituts für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Bei Frau Gesche Kroll möchte ich mich für eine wunderbare Zusammenarbeit und für ihre stets hilfsbereite Unterstützung bedanken.

Ein großes Dankeschön an all' meine Freunde, die mir geholfen haben trotz privater schicksalhafter Ereignisse im Verlauf dieser Arbeit, nicht den Boden unter den Füßen zu verlieren!

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Staphylokokken.....	3
2.2 Infektionen durch Staphylokokken.....	4
2.3 Pathogenese Fremdkörper-assoziiierter <i>S. epidermidis</i> Infektionen.....	5
2.4 Die <i>S. epidermidis</i> Biofilmbildung.....	6
2.5 Nutzung von Phage display zur Identifikation von Interaktionspartnern	14
2.6 Ziel der Dissertation	18
3 MATERIAL	19
3.1 Bakterien-Stämme.....	19
3.2 Medien für die Anzucht von Bakterien.....	20
3.2.1 Medien für die Anzucht von Staphylokokken	20
3.2.1.1 Festmedien.....	20
3.2.1.2 Flüssigmedien.....	21
3.2.2 Medien für die Anzucht von <i>E. coli</i> Bakterien	22
3.2.2.1 Festmedium	22
3.2.2.2 Flüssigmedium.....	23
3.3 Nucleinsäuren	23
3.3.1 Oligonukleotide	23
3.3.1.1 Oligonukleotide zur Klonierung von <i>icaADBC</i>	23
3.3.1.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung des pAS1 Plasmidvektors.....	23
3.3.1.3 Oligonukleotide zur Sequenzierung des pG8SAET Phagmidvektors.....	24
3.3.1.4 Oligonukleotide zum Integrationsnachweis von Tn917	24
3.3.1.5 Oligonukleotide zum Integrationsnachweis <i>icaADBC</i>	24
3.3.2 Plasmidvektoren	25
3.3.3 Sonstige Nucleinsäuren	25
3.4 Bakteriophagen	26
3.5 Enzyme	26
3.5.1 Restriktionsnucleasen/Puffer.....	26
3.5.2 Sonstige Enzyme	27
3.6 Antikörper.....	27
3.6.1 Primäre Antikörper.....	27
3.6.2 Sekundäre Antikörper.....	28
3.7 Reagenzsysteme (Kits).....	29
3.8 Reagenzien und Laborhilfsmittel	29
3.9 Lösungen und Puffer.....	31
3.9.1 Reagenzien	31
3.9.2 Reagenzien für Agarosegelelektrophorese	32
3.9.3 Lösungen für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	32
3.9.4 Reagenzien für die Protoplastentransformation.....	32
3.9.5 Reagenzien für colorimetrische Assays.....	33
3.9.5.1 Hexosamin Bestimmung.....	33
3.9.5.2 Uronsäure Bestimmung	33
3.9.5.3 Kohlenhydrat Bestimmung.....	34
3.9.6 Reagenzien für die Benutzung der Phagenbibliothek	34
3.10 Laborgeräte	35
4 METHODEN	36
4.1 Bakterienkulturen.....	36
4.1.1 Kultivierung der Bakterien	36
4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	36
4.1.3 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	36
4.1.4 Elektroporation elektrokompenter <i>E. coli</i> Bakterien	37
4.1.5 Herstellung phagenkompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	37
4.1.6 Herstellung elektrokompenter Staphylokokken.....	38
4.1.7 Elektroporation elektrokompenter Staphylokokken	38
4.1.8 Herstellung von Staphylokokken-Protoplasten (Götz and Schumacher, 1987).....	38
4.1.9 Transformation von Staphylokokken-Protoplasten (Götz and Schumacher, 1987).....	39

4.1.10	Herstellung von <i>S. aureus</i> Cowan-I für den Koagglutinationstest.....	39
4.2	DNA-Methoden	40
4.2.1	DNA-Standardmethoden	40
4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).....	41
4.2.2.1	PCR zur Amplifikation von DNA für die Klonierung	41
4.2.2.2	PCR zum Insertionsnachweis	42
4.2.3	Sequenzierung	42
4.2.4	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	42
4.3	Proteinmethoden	43
4.3.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	43
4.3.2	Trennung von Proteinen mit SDS-PAGE	43
4.4	Polysaccharid Gewinnung.....	44
4.4.1	Anzucht der Bakterienstämme.....	44
4.4.3	Gelpermeationschromatographie (GPC)	45
4.4.4	Anionenaustauschchromatographie (anion exchange chromatography, AEC)	45
4.4.5	Bestimmung von Hexosamin (Lane-Smith and Gilkerson, 1979).....	46
4.4.6	Bestimmung von Kohlenhydraten (Dubois, 1956).....	46
4.4.7	Bestimmung von Uronsäure (Blumenkrantz, 1973).....	47
4.4.8	PIA Aufarbeitung zur NMR-Spektroskopie	47
4.4.9	NMR-Spektroskopie.....	47
4.5	Quantifizierung von Biofilmbildung.....	48
4.5.1	Biofilmtest (Christensen et al., 1982; Mack et al., 1992)	48
4.6	Methoden zur Verwendung der Phagenbibliothek	49
4.6.1	Bestimmung von Ligand-Phagen Interaktionspartnern	49
4.6.2	Herstellung von Phagenlysat	50
4.6.3	Anreicherung isolierter Phagen	50
4.6.4	Bestimmung der Phagenkonzentration im Lysat	51
4.7	Immunochemische Nachweisverfahren	51
4.7.1	Absorption polyklonaler Kaninchenantisera	51
4.7.2	Herstellung des Koagglutinationsreagenz	52
4.7.3	Semi-quantitativer Koagglutinationstest	52
4.7.4	Dot-Immuno-Assay (DIA)	53
4.7.5	Kompetitions-DIA.....	53
4.7.6	Kolonie Blot	54
4.7.7	Immunfluoreszenztest.....	54
4.7.8	FP-ELISA (<i>filamentous phage</i> , FP)	55
5	ERGEBNISSE	56
5.1	Charakterisierung des Biofilmphänotyps von <i>S. epidermidis</i> 939	56
5.2	Expression von <i>icaABDC</i> aus <i>S. epidermidis</i> 939 und 1457 in <i>S. carnosus</i> TM300	62
5.3	Reinigung von Extrakt aus dem Wildtypstamm <i>S. epidermidis</i> 939 und 1457	68
5.4	Analyse von Biofilmmatrixextrakten der Stämme <i>S. epidermidis</i> 939 und 1457 nach AEC	79
5.5	Identifizierung von <i>S. epidermidis</i> Proteinen mit Biofilmmatrix-bindender Aktivität mittels phage display.....	88
6	DISKUSSION	95
7	LITERATURVERZEICHNIS	109
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	123
9	ANHANG	125
9.1	Aminosäurepolymorphismen	125

1 Zusammenfassung

Das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) von *S. epidermidis* ist ein essentieller Faktor für die Biofilmmakkumulation, dem wichtigsten Virulenz Faktor im Kontext Fremdkörper-assoziierten Infektionen. Das PIA ist ein homopolymer aus β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosamin (GlcNAc) Einheiten. PIA ist ein zentraler Bestandteil der von *S. epidermidis* gebildeten extrazellulären Biofilmmatrix. Diese stabilisiert nicht nur die mehrlagige Biofilmarchitektur, sondern schützt *S. epidermidis* auch vor Angriffen durch das Immunsystem. Interessant ist Deacetylierung eines signifikanten Anteils der GlcNAc Reste, durch welche eine positive Nettoladung des Polymers resultiert, welche wiederum funktionell für die Biofilmbildung wie auch den PIA-vermittelten Schutz vor Effektoren der angeborenen Immunität notwendig ist (Vuong, 2004b). Die exakten Determinanten insbesondere der interzellulär adhäsiven Funktion von PIA sind jedoch bislang nicht bekannt.

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war es, durch die strukturelle Charakterisierung einer durch *S. epidermidis* 939 gebildeten hypothetischen serologischen Variante von PIA (PIAv) und den Abgleich mit PIA des *S. epidermidis* Referenzstamms 1457 Erkenntnisse über Struktur-Funktionsbeziehungen von PIA bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung zu erhalten. *S. epidermidis* 939 zeichnet sich durch einen stark Biofilm-positiven Phänotyp bei nur schwacher Reaktivität mit einem spezifischen anti-PIA-Antiserum aus.

In phänotypischen Untersuchungen zur Stabilität des Biofilms gegenüber der Aktivität des PIA-spaltenden Enzyms DspB und Trypsin konnte gezeigt werden, dass bei *S. epidermidis* 939 wie auch *S. epidermidis* 1457 PIA oder ein nahe verwandetes Molekül funktionell an der Ausprägung eines biofilmpositiven Phänotyps ist. Durch die serologische Charakterisierung von *S. carnosus* TM300 nach *in trans* Expression von *icaADBC* des Stamms 1457 oder 939 kann gezeigt werden, dass Punktmutationen in *icaA* des Stamms 939 keinen Einfluss auf die Substratspezifität der hier kodierten N-Acetylglucosaminyltransferase haben. Somit werden mögliche Modifikationen von PIA des Stamms 939 sekundär in das Molekül eingeführt.

Durch die Optimierung von Wachstumsbedingungen war es möglich, relevante Mengen extrazellulärer Biofilmmatrix des Stamms 939 zu gewinnen und deren Bestandteile durch GPC und AEC weiter aufzureinigen. Das komplexe Stoffgemisch der extrazellulären Biofilmmatrix der Stämme *S. epidermidis* 1457 und 939 weisen in der Gelpermeationschromatographie das gleiche Elutionsverhalten auf. In der Anionenaustauschchromatographie jedoch lässt sich das durch GPC gewonnene Material des Stamms 939 in drei immunreaktive *peaks* A-C trennen, bei *S. epidermidis* 1457 konnten

hingegen nur *peaks A* und *B* nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um eine neutrale (*A*), eine schwach anionische (*B*) und bei *S. epidermidis* 939 um eine stark anionische (*C*) Fraktion. Im *peak C* kann, trotz der Immunreaktivität mit anti-PIA-Antiserum, nicht wie bei *peak A* und *B* Hexosamin durch biochemische Verfahren dargestellt werden. Bei *peak A* handelt es sich bei *S. epidermidis* 939 wie auch 1457 um PIA. Die strukturelle Analyse von *peak B* zeigt keinen wesentlichen Unterschied zwischen *S. epidermidis* 939 und 1457, bei den isolierten Strukturen handelt es sich um die *wall teichoic acid* (WTA), jedoch nicht wie erwartet um β -(1,6)-N-Acetylglukosamin. Die strukturelle Analyse des *peaks C* identifizierte Lipoteichonsäure (LTA) als zusätzliche Komponente im Biofilmmatrixextrakt von *S. epidermidis* 939. Die Ergebnisse zeigen, dass offensichtlich *S. epidermidis* 939 wie auch 1457 PIA bildet, welches sich hinsichtlich seiner Eigenschaften in GPC und AEC nicht von PIA des Stamms 1457 unterscheidet. Die Unterschiede in der Zusammensetzung der Biofilmmatrix zwischen *S. epidermidis* 939 und 1457 könnten die Beobachtung eines stark biofilmpositiven Phänotyps trotz geringer PIA-Synthese bei *S. epidermidis* erklären.

Durch den Einsatz des gefilterten PIA_v als Ligand im „*phage-display*“ System ist neben verschiedenen Proteinen ein Fragment des YpfP Proteins identifiziert worden. Eine Diacylglycerol Glucosyltransferase, die für die Biosynthese von Glykolipid der LTA verantwortlich ist. Des weiteren ist das Fragment eines Oberflächenproteins, Embp identifiziert worden. Embp ist an der Entstehung von *S. epidermidis* Biofilmen beteiligt und besitzt eine FIVAR (*found in various architectures*) Domäne, die in anderen Organismen N-Acetylglukosamin-bindende Aktivität aufweist.

Die hier vorgestellten Ergebnisse motivieren einer weitere Analyse der Wechselwirkung zwischen Teichonsäuren und PIA. Außerdem wird der Hinweis auf eine potentielle Verbindung von Embp und PIA gestützt.

2 Einleitung

2.1 Staphylokokken

Schon berühmte Bakteriologen wie Robert Koch (1878) und Louis Pasteur (1880) beschäftigten sich mit Staphylokokken. Auch in dieser Epoche war bereits die Bedeutung dieses Bakteriums als Eitererreger bei Wundinfektionen mit besonderer Aufmerksamkeit betrachtet worden. Zusammen mit den Gattungen *Micrococcus*, *Planococcus* und *Stomatococcus* gehören die Staphylokokken zur Familie der *Micrococcaceae*. Bei Staphylokokken (griech. Staphyle, die Traube) handelt es sich um grampositive Kugelbakterien von durchschnittlich 1 µm Durchmesser, die sich in alle Ebenen des Raumes teilen. Durch ihre Unbeweglichkeit ordnen sich die Zellen vor allem bei Wachstum in flüssigen Medien in Haufen oder Trauben an (Otto, 2004). Staphylokokken Kolonien stellen sich bei Kultur auf festen Nährmedien als porzellanweiß oder gelblichen dar. Staphylokokken sind fakultativ anerobe Bakterien, die über das Enzym Katalase verfügen. Hierüber sind sie im klinisch mikrobiologischen Labor leicht von Streptokokken unterscheidbar. Als besondere Eigenschaft enthält ihr Zellwandpeptidoglycan eine Glycin-haltige Pentapeptidbrücke (Navarre and Schneewind, 1999). Dies führt zu einer Empfindlichkeit gegenüber dem speziell an Glycin-Glycin-Bindungen angreifenden Enzym Lysostaphin.

Derzeit sind 50 Staphylokokken Taxa bekannt (Kloos et al., 1997) (Kloos et al., 1998) (Lambert et al., 1998) (Probst et al., 1998) (Place et al., 2003) (Spergser et al., 2003) (Takahashi et al., 1999) (Trulzsch et al., 2002) (Vernozy-Rozand et al., 2000)). Der Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Plasmakoagulase erlaubt die Einteilung in koagulase-positive und koagulase-negative Staphylokokken (KNS) (Sperber and Tatini, 1975). *Staphylococcus aureus* ist die einzige humanpathogene, koagulase-positive Spezies, alle anderen sind koagulase-negativ (Kloos and Bannerman, 1994a) (Waldvogel, 1989). Die koagulase-negativen Staphylokokken-Spezies kommen beim Menschen als Besiedlungsflora der Haut und Schleimhaut vor (Kloos et al., 1997); (Kloos and Bannerman, 1994). Die höchste Populationsdichte mit 10^3 – 10^6 CFU/cm² findet sich an den Ausführungsgängen von Talg- und Schweißdrüsen sowie auf den Schleimhäuten von natürlichen Körperöffnungen (Kloos and Bannerman, 1994) (Nobel, 1997). Einige der Staphylokokken Arten 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 Staphylokokken-Spezies (Kloos et al., 1997) (Kloos and Bannerman, 1994) (Nobel, 1997).

2.2 Infektionen durch Staphylokokken

Der Koagulase-positive *S. aureus* bildet den Erreger mit dem größten pathogenen Potential und ist die best untersuchteste Staphylokokken Spezies. *S. aureus* kann ein weites Spektrum von invasiven Organinfektionen wie zum Beispiel Haut- und Weichteilinfektionen, Pneumonien, Endokarditiden, Osteomyelitiden und Septikämien hervorrufen. Zudem ist *S. aureus* in der Lage, durch Toxinbildung zum Beispiel Lebensmittelvergiftungen und das Toxic-Schock-Syndrom zu verursachen (Tenover and Gaynes, 2000) (Peters and Pulverer, 2001) (Waldvogel, 1989). Die große Gruppe der Koagulase-negative Staphylokokken galt lange Zeit als weitestgehend apathogen. Ihr Nachweis in klinischen Materialien wurde daher in der Regel als Folge einer Kontamination im Rahmen der Probengewinnung betrachtet. Seit Mitte der achtziger Jahre werden die Koagulase-negativen Staphylokokken jedoch als wichtige Erreger nosokomialer Infektionen erkannt (Banerjee et al., 1991) (Schaberg et al., 1991). Die 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 (NNIS, 1999). Insgesamt gehören sie heutzutage zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen (Karlowsky et al., 2004) (NNIS, 1996). Hierbei stellt *Staphylococcus epidermidis* die am häufigsten isolierte Spezies dar (Mack et al., 2006). Charakteristischerweise werden koagulase-negative Staphylokokken im Rahmen einer spezifischen oder unspezifischen Immunsuppression als nosokomiale Sepsiserreger gefunden. Schwere Verbrennungen, Traumata, Tumorleiden und Frühgeburtlichkeit gelten als typische prädisponierende Faktoren für die Entstehung einer *S. epidermidis* Infektion. (Archer, 2000) (Wisplinghoff et al., 2003).

Die Mehrzahl der *S. epidermidis* Infektionen wird jedoch typischerweise im Zusammenhang mit implantierten Polymermaterialien beobachtet (Fidalgo et al., 1990). Der breite Einsatz von Polymermaterialien 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 and Gaynes, 1993) (Kloos et al., 1997) (Kloos and Bannerman, 1994) (Rupp and Archer, 1994). Die Größe des Problems wird daran deutlich, dass in Deutschland allein mit etwa 100.000 Fremdmaterial-assoziierten Infektionen jährlich gerechnet werden muss (Mack et al., 2004). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass weltweit Millionen von Patienten betroffen sind. Somit sind Fremdmaterial-assoziierte Infektionen nicht nur eine signifikante Ursache für die ansteigende Morbidität und Mortalität nosokomialer Infektionen, sie erzeugen auch erhebliche Kosten für das Gesundheitssystem. Aus diesem Grunde wurden große Anstrengungen unternommen, durch die Aufklärung der Pathogenese Fremdmaterial-assoziiertes *S. epidermidis* Infektionen neue Ansatzpunkte für die Prophylaxe und Therapie dieser Infektionsform zu finden.

2.3 Pathogenese Fremdmaterial-assoziiertes *S. epidermidis* Infektionen

Frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen an *ex vivo* gewonnenen Kathetern machten deutlich, dass *S. epidermidis* Fremdkörperoberflächen in Form von fest haftenden, mehrlagigen Bakterienkonsortien, so genannten Biofilmen, besiedelt (Costerton et al., 1999) (Peters, 1981). Bei einem bakteriellen Biofilm handelt es sich um eine organisierte Gruppe von Bakterien, die, umgeben von einer selbst synthetisierten, polymeren Matrix, fest an einer Oberfläche haftet (Hall-Stoodley et al., 2004). Dabei können diverse Bakterienspezies unterschiedlichste Arten von Biofilmen erzeugen (Costerton et al., 1999) (O'Toole et al., 2000). Der Biofilm ist ein komplexes Gebilde, das den Bakterien günstige Lebensbedingungen und Schutz vor Umwelteinflüssen bietet (Hall-Stoodley et al., 2004). Biofilmbildung spielt auch bei verschiedenen humanen Infektionen eine Rolle. Hervorzuheben sind Biofilme auf den Zähnen, hauptsächlich aus acidogenen, gram-positiven Streptokokken, die Karies und Parodontose hervorrufen. Sehr gut untersucht ist auch die Rolle der Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* im Rahmen der Pathogenese von Pneumonien bei Patienten mit Cystischer Fibrose (Gacesa, 1998). Die Fähigkeit zur Biofilmbildung kann als wesentlicher Pathogenitätsmechanismus von *S. epidermidis* aufgefasst werden (Götz, 2002; Mack, 2006; Rohde et al., 2006a). Daher stellen *S. epidermidis* Infektionen prototypische, Biofilmassoziierte Infektionen dar (Götz, 2002; Rupp and Archer, 1994).

2.4 Die *S. epidermidis* Biofilmbildung

Die Ausbildung des Biofilms von *S. epidermidis* erfolgt in zwei charakteristischen Phasen: Zunächst kommt es zur initialen Anheftung der Bakterien an die Polymeroberfläche, der sogenannten primären Adhäsion. Die zweite Phase ist eine Proliferation und Akkumulation der Bakterien in vielschichtigen Zellclustern, die eine interzelluläre Adhäsion erfordert (Mack et al., 2004). Insgesamt ist die Biofilmbildung von *S. epidermidis* ein äußerst komplexer Vorgang, der von einer Vielzahl Faktoren abhängt, von denen bisher erst ein Teil erforscht und verstanden ist.

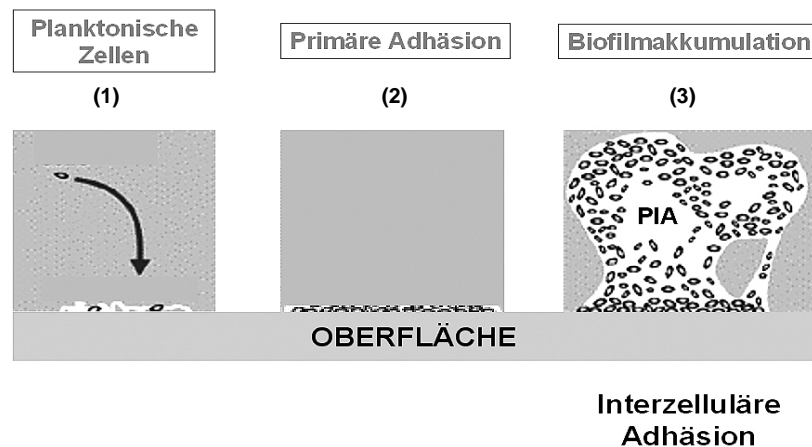


Abbildung 1: Phasen der Biofilm-Entstehung bei *S. epidermidis*. (1) Planktonische Zellen setzen sich auf einer Polymeroberfläche ab, der die (2) primäre Adhäsion und (3) Akkumulation der Zellen in vielen Zellschichten folgt. Hierzu ist die Fähigkeit zur interzellulären Adhäsion vermittelt durch interzelluläres Polysaccharid-Adhäsion (PIA) essentiell.

Die primäre Adhäsion wird durch spezifische und unspezifische Faktoren beeinflusst, und ist sowohl von Eigenschaften der Polymeroberfläche (Hogt et al., 1986) (Ludwicka A. 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. Das Fibrinogen-bindende Protein (Fbe) konnte als spezifischer Faktor identifiziert werden (Hartford et al., 2001). Ein weiteres Adhäsionsmolekül von *S. epidermidis* ist das Autolysin E (AtlE), das durch Transposon Mutagenese identifiziert wurde (Heilmann et al., 1997). Das Zellwand-assoziierte *Staphylococcal surface protein* (SSP-1) vermittelt die Anheftung der Bakterien an Polymer-Oberflächen (Timmerman et al., 1991; Veenstra et al., 1996). Das Fibronectin-bindende Protein Embp ist ebenfalls in der Mehrzahl der klinischen Isolate vorhanden (Rohde et al., 2004b; Rohde et al., 2007) und könnte funktionell an der Biofilmentstehung beteiligt sein. Neben Proteinfaktoren ist zudem bekannt, dass Wandteichonsäuren die Bindung von *S. epidermidis* an immobilisiertes Fibronectin stabilisiert und somit ebenfalls eine pathogenetische Rolle erfüllen könnte (Hussain et al., 2001).

Die zweite Phase der Biofilmbildung ist durch Proliferation und Akkumulation der Bakterien zu einem vielschichtigen Biofilm gekennzeichnet. Die Struktur dieser Organisationsform erlaubt nur wenigen Organismen den direkten Kontakt zur Polymeroberfläche. Somit müssen in dieser Phase Faktoren aktiv sein, welche durch Vermittlung interzellulärer Adhäsion die Biofilmarchitektur stabilisieren. Hierbei spielt offensichtlich vor allem die Ausbildung einer extrazellulären Biofilmmatrix eine entscheidende Rolle. Frühe Untersuchungen zeigten, dass diese Matrix offensichtlich eine komplexe Struktur darstellt, in welcher neben Polysacchariden vor allem auch Teichonsäuren und Proteine nachgewiesen werden können (Hussain et al., 1992a). Es ist inzwischen gelungen, verschiedenen Faktoren, die am Aufbau der extrazellulären Biofilmmatrix beteiligt sind, näher zu charakterisieren.

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. Die Domäne-B vermittelt interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung, jedoch erst nach proteolytischer Spaltung und Entfernung der Domäne-A (Hussain et al., 1997) (Rohde et al., 2005). Neben Proteinfaktoren ist jedoch insbesondere die Funktion von Polysacchariden als interzelluläre Adhäsine hervorzuheben. Die folgende (Tabelle 1) zeigt die Polysaccharide der Glycokalyx von *S. epidermidis*.

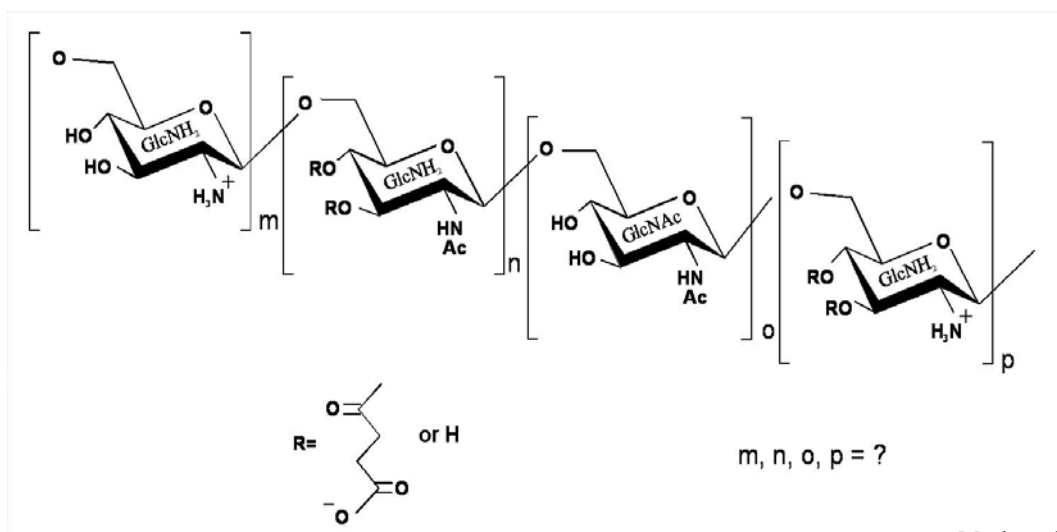
Das derzeit am beste charakterisierte Polysaccharid ist das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin PIA.

Tabelle 1: Polysaccharide der Glycokalyx von *S. epidermidis*

Polysaccharid	Hauptkomponenten	Referenz
Interzelluläres		
Polysaccharid-Adhäsion (PIA)		
Polysaccharid I	GlcNAc, GlcN	
Polysaccharid II	GlcNAc, GlcN, Succinat, Phosphat	(Mack et al., 1996a)
Zellwand-Teichonsäure	Glc, Glyc, Ala, GlcNAc, Phosphat	(Hussain et al., 1992a)
Schleim-assoziiertes Antigen (SAA)		
	Glc, GlcN, GlcA, GalA	(Christensen et al., 1990)
-	GlcNAc	(Baldassarri et al., 1996)
Kapsuläres		
Polysaccharid/Adhäsion (PS/A)		
	Gal, GalN, GlcN, Urs	(Tojo M, 1988)
-	GlcN, Succinat, Acetat	(McKenney et al., 1998)
Extrazelluläre		
Schleimsubstanz (ESS)		
	Gal, Man, Glc, GlcNAc	(Ludwicka et al., 1984)
Sulfatiertes		
Schleimpolysaccharid	GlcN, Glc, Fuc, Xyl, Sulfat	(Arvaniti et al., 1994)
<u>Abkürzungen:</u> Glc: Glucose; Gal: Galactose; Man: Mannose; Fuc: Fucose; Xyl: Xylose; GlcN: Glucosamin; GlcNAc: N-Acetyl-glucosamin; GalN: Galactosamin; Urs: Uronsäuren; GlcA: Glucuronsäure; Gal: Galacturonsäure; Ala: D-Alanin; Glyc: Glycerol		

Das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsins (PIA)

PIA ist ein lineares Homoglykan bestehend aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglukosamin Einheiten (Mack et al., 1996a). Es wurde erstmals aus der Biofilmmatrix des Stamms *S. epidermidis* 1457 isoliert und lässt sich durch Anionenaustausch-Chromatographie in zwei unterschiedlich geladene Fraktionen trennen (Mack et al., 1992). Diese werden als „Polysaccharid I“ und „II“ bezeichnet. Polysaccharid I macht dabei mehr als 80 % der Gesamtmenge aus. 15–20 % der Reste liegen im Polysaccharid in nicht acetylierter Form vor. Folglich weist dieses Molekül eine positive Nettoladung auf. Das Polysaccharid II enthält einen größeren Anteil acetylierter Reste und ist zusätzlich durch Ester-gebundenes Succinat und Phosphat gekennzeichnet (Mack et al., 1996a). Unabhängige Untersuchungen konnten diese Ergebnisse im wesentlichen bestätigen (Sadovskaya et al., 2005). Hieraus resultiert eine anionische Nettoladung. (Mack et al., 1996a). Das gleichzeitige Auftreten von positiven und negativen Ladungen ist offensichtlich von funktioneller Relevanz für die interzellulären Adhäsionseigenschaften von Polysaccharid I. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei Synthese von nicht de-acetyliertem PIA keine Biofilmbildung vermittelt wird (Vuong et al., 2004b). PIA bewirkt nicht nur die interzelluläre Adhäsion zwischen den Bakterienzellen im Biofilm, sondern ist als Hämagglutinin von *S. epidermidis* auch an einer Interaktion mit Erythrozyten beteiligt (Fey et al., 1999; Mack et al., 1999b).



Mack et al., 2006

Abbildung 2: Schematische Darstellung des interzellulären Polysaccharid-Adhäsins (PIA). Das Rückrad dieser linearen Struktur besteht aus β -(1,6)-N-Acetylglukosamin. 15% dieser Zuckereinheiten sind nicht N-acetyliert und O-succinyliert.

Die genetische Basis der PIA-Synthese wurde durch den Einsatz von Transposonmutagenese-Experimenten in zwei genetisch unabhängigen *S. epidermidis* Stämmen 1457 und O-47 gefunden. (Heilmann et al., 1996a; Mack et al., 1994).

PIA wird durch die Genprodukte des *icaADBC* (*intercellular adhesion ADBC*) Lokus synthetisiert (Heilmann et al., 1996b) (Gerke et al., 1998). IcaA hat die Funktion einer N-Acetylglukosaminyl Transferase, welche die Anwesenheit von IcaD benötigt, um 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, welche an den Amin-Resten von PIA die Acetylierung abspaltet und dadurch eine positive Nettoladungen einbringt. IcaB wird sezerniert und findet sich im Kulturüberstand (Vuong et al., 2004b). Erst die Koexpression der Proteine IcaA, IcaD und IcaC führt zur Synthese von Oligomeren mit ausreichender Kettenlänge, um diese mit einem PIA-spezifischen Antikörper reagieren zu lassen (Gerke et al., 1998), ohne dass es hierbei eine quantitative Korrelation zwischen der *icaADBC*-Transkriptionsaktivität und der PIA-Synthese gibt (Conlon et al., 2002a; Conlon et al., 2002b; Dobinsky et al., 2003). Dem *ica*-Operon ist das Gen *icaR* vorgelagert, welches als Repressor der *icaADBC* Transkription fungiert (Conlon et al., 2002a; Conlon et al., 2002b; Knobloch et al., 2005).

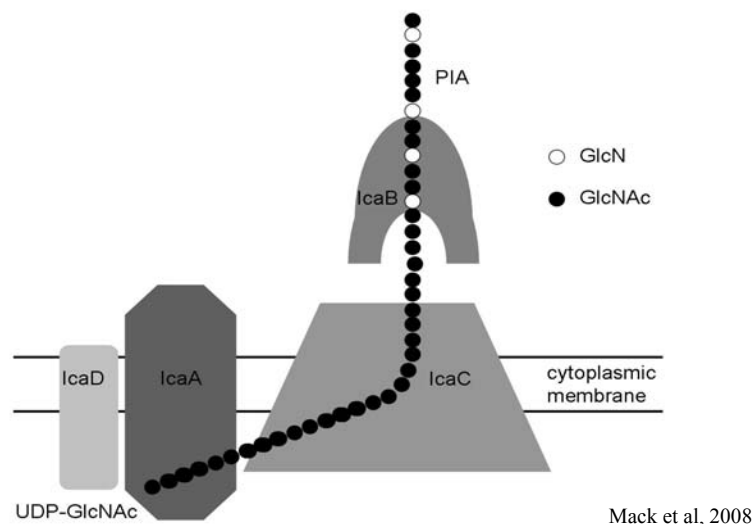


Abbildung 3: Modell der PIA-Synthese bei *S. epidermidis*. Die N-Acetylglukosaminyl Transferase (IcaA) benötigt IcaD um seine volle Aktivität bei der Synthese von Oligomeren aus UDP-N-Acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) zu entfalten. Das IcaC ist vermutlich am Transport von PIA an die Zelloberfläche beteiligt. An der Oberfläche funktioniert IcaB als Deacetylase, die N-Glucosamin (GlcN) entstehen lässt.

Die essentielle Bedeutung von PIA für die akkumulative Phase der Biofilmbildung konnte anhand einer linearen Korrelation zwischen PIA-Produktion und Biofilmbildung in einer Population von 179 *S. epidermidis* Stämmen gezeigt werden (Mack et al., 1996b). Zusätzlich konnte in zwei Tiermodellen die Bedeutung von PIA als Virulenzfaktor in der Genese Fremdkörper-assoziiierter Infektionen belegt werden. Dafür wurden sowohl in dem Mausmodell als auch in dem Rattenmodell der Biofilm-positive, PIA-exprimierende Stamm *S. epidermidis* 1457 und die isogene, Biofilm- sowie PIA-negative Mutante 1457 M10 verwendet. In beiden Modellen konnte gezeigt werden, dass der Wildtypstamm *S. epidermidis* 1457 signifikant häufiger zu Infektionen führte und seltener durch die wirtseigene Abwehr eradiziert werden konnte als die isogene Mutante 1457 M10 (Rupp et al., 1999b; Rupp et al., 1999a). Diese Ergebnisse konnten kürzlich in einem *Caenorhabditis elegans* Modell nachvollzogen werden (Begun et al., 2007). Eine Bedeutung von PIA könnte bei der Pathogenese vor allem auch die Interferenz mit Effektormechanismen der frühen Immunantwort sein (Vuong et al., 2004c).

Die Bedeutung von *icaADBC* und PIA für die Pathogenese von *S. epidermidis* Infektionen wird auch durch epidemiologische Studien gestützt (Arciola et al., 2001; Arciola et al., 2002). Studien, die Verbreitung von Virulenzfaktoren in verschiedenen *S. epidermidis* Populationen untersuchten, ergaben bisher eine wesentlich höhere Prävalenz von *icaADBC* bei Infektions-Stämmen als bei kommensalen *S. epidermidis* Stämmen (Frebourg et al., 2000; Galdbart et al., 2000; Ziebuhr et al., 1997) (Rohde et al., 2007) (Arciola et al., 2006; Klingenberg et al., 2007) (Ninin et al., 2006). *icaADBC* negative Stämme wurden daraufhin zunächst als apathogen definiert (Zhang et al., 2003). Die Detektion von *icaADBC* sollte als Marker zur Unterscheidung von invasiven und Besiedlungs-Stämmen genutzt werden (Frebourg et al., 2000; Galdbart et al., 2000). Weitere epidemiologische Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Prävalenz von *icaADBC* bei kommensalen *S. epidermidis* Isolaten hospitalisierter Patienten nach Knochenmarkstransplantation ähnlich hoch ist wie bei invasiven Isolaten, die im Rahmen Katheter-assoziiierter Infektion isoliert wurden (Rohde et al., 2004b). Somit spielt *icaADBC* offensichtlich nicht nur bei Infektionen eine Rolle, sondern ist auch für die Besiedlung des natürlichen Habitats unter stark selektiven Krankenhausbedingungen notwendig (Klingenberg et al., 2007).

Der *icaADBC*-Lokus wurde später auch bei *S. aureus* (Cramton et al., 1999; McKenney et al., 1999) und *S. caprae* (Allignet et al., 2001) identifiziert. *IcaADBC*-homologe DNA-Sequenzen fanden sich zudem in einer Vielzahl weiterer Koagulase-negativer Staphylokokken wie *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. auricularis*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius*, *S. piscifermentans*, *S. simulans*, *S. condimenti*, *S. cohnii*, *S. lentus*, *S. caseolyticus* und *S. schleiferi* (Cramton et al., 1999; Moretro et al., 2003).

Das durch *icaADBC*-kodierte Enzymsysteme synthetisierte Polysaccharid wurde bei *S. aureus* strukturell näher charakterisiert. Es fand sich, dass *IcaADBC* auch bei *S. aureus* ein Poly-N-acetyl- β -(1,6)-Glukosamin (PNAG) synthetisiert (McKenney et al., 1998) (Maira-Litran et al., 2002). Weitere Untersuchungen zeigten, dass dieses Polysaccharid dem von *S. epidermidis* gebildeten PIA strukturell ähnlich, wenn nicht sogar identisch ist (Sadovskaya et al., 2005) (Joyce et al., 2003). Vor allem bei *S. aureus* wurde unter der Annahme, dass es sich bei PIA um den zentralen Virulenzfaktor handelt, versucht, PIA als Basis eines Impfstoffes nicht nur zur Prävention von *S. aureus*-Infektionen, sondern auch *S. epidermidis*-Infektionen zu verwenden (Götz, 2004; Maira-Litran et al., 2004; Maira-Litran et al., 2005; McKenney et al., 2000). Ebenso erscheint es möglich, PIA/PNAG als diagnostischen Marker zur gezielten Erkennung von Fremdmaterial-assoziierten Infektionen zu verwenden (Sadovskaya et al., 2007).

Über die Staphylokokken hinaus, bei gramnegativen Bakterien wie *E. coli*, *Y. pestis* und *A. actinomycetemcomitans* ist ein *icaADBC*-homologer Genorte beschrieben, welcher bei *E. coli* und *Y. pestis* den Apparat für die Synthese eines strukturell mit PIA praktisch identischen Polysaccharides kodiert (Kaplan et al., 2004b) (Wang, 2004).

Die Regulation der Biofilmbildung bei S. epidermidis

Die *S. epidermidis* Biofilmbildung unterliegt bei veränderten Kulturbedingungen, dynamischen Veränderungen. Dies war aus verschiedenen phänotypischen Untersuchungen hervorgegangen (Rohde et al., 2001a; Rohde et al., 2001b). Das Entstehen von anaeroben Verhältnissen (Cramton et al., 2001), erhöhten Temperaturen (Rachid et al., 2000), hoher Osmolarität (Knobloch et al., 2001) oder Eisenmangel (Deighton and Borland, 1993) kann die Biofilmbildung in *S. epidermidis* verstärken. Es kann jedoch auch zu spontanen Phasenvariationen, wie beispielsweise durch die reversible Insertion eines mobilen genetischen Elementes kommen (Baddour et al., 1990) (Ziebuhr et al., 1999). Durch Transposonmutagenese wurde gezeigt, dass an der Regulation der *ica*-Expression und damit

der Biofilmbildung der alternative Sigmafaktor σ_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 σ_B selbst wird durch das σ_B -Operon gesteuert. Es enthält die positiven Regulatoren *rsbU* und *rsbV* sowie den negativen Regulator *rsbW* (Knobloch et al., 2004). Ein globales Regulationssystem, 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 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). Durch die verschiedenen regulatorischen Elemente ist *S. epidermidis* in der Lage, sich rasch an Änderungen der Umweltbedingungen anzupassen. Eine weitere Konsequenz ist, dass die Bedingungen, unter denen *icaADBC* exprimiert und damit PIA synthetisiert wird, von Stamm zu Stamm verschieden sein können. Um das Ziel, PIA eines *S. epidermidis* Wildtypstamms zu präparieren, ist es daher notwendig, die optimalen Wachstumsbedingungen im Einzelnen festzustellen.

Zerstörung von PIA-abhängigen Biofilmen

Das Enzym Dispersin B (DspB) aus *A. actinomycetemcomitans* ist in der Lage Staphylokokken Biofilm aufzulösen (Kaplan et al., 2004b). Auch die Biofilme von *E. coli*, *Y. pestis* (Itoh et al., 2005) oder *Bordetella spp.* (Parise et al., 2007) werden desintegriert, genauso wie jener von *A. actinomycetemcomitans* selbst. DspB gehört als β -Hexosaminidase zur Familie der Glykosid Hydrolasen (GH-20) mit unterschiedlichen Substratspezifitäten und Aktivitäten (Ramasubbu et al., 2005). DspB spaltet spezifisch β -(1,6)-verknüpftes N-Acetylglukosamin. Tatsächlich konnte eine degradierende Wirkung von DspB auf durch *S. epidermidis* gebildetes PIA nachgewiesen werden (Kaplan et al., 2004a; Rohde et al., 2007) (Itoh Y, 2008). Die langkettigen PIA Moleküle werden durch das Enzym zu Oligosacchariden und bis hin zu Monomeren degradiert (Itoh et al., 2005). Es hat sich gezeigt, dass neben anderen Biofilmen besonders bei Staphylokokken ein etablierter Biofilm nahezu vollständig desintegriert wird (Itoh et al., 2005; Kaplan et al., 2004a) (Izano et al., 2008). Die Beschichtung der Oberfläche von Polyurethan und Teflon Kathetern mit DspB

verhindert die Biofilmbildung von *S. epidermidis*. Möglicherweise wird dieses Enzym zu einem nützlichen „biologischen Werkzeug“, um Fremdkörper-assoziierte Infektionen durch Staphylokokken zu vermeiden (Kaplan et al., 2004b). Im Labor kann DspB zudem genutzt werden, um die funktionelle Beteiligung von PIA an der Biofilmbildung eines *S. epidermidis* Stamms orientierend festzustellen.

Derzeit sind zwar viele strukturelle Aspekte von PIA geklärt, jedoch war es bislang noch nicht möglich einen direkten Interaktionspartner von PIA als interzelluläres Adhäsion zu identifizieren. Deshalb wurde in einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit versucht, mittels einer *S. epidermidis* Phagenbibliothek, auf mögliche Interaktionspartner hinweisende genomische Sequenzabschnitte zu finden.

2.5 Nutzung von *Phage display* zur Identifikation von Interaktionspartnern

Bakteriophagen oder kurz Phagen sind ein sehr nützliches Hilfsmittel bei der Suche nach molekularen Interaktionspartnern. Innerhalb der verwendeten Bibliothek wurde das Hüllprotein von Phagen gemeinsam mit einem inserierten Fremd-DNA-Abschnitt aus dem Genom von *S. epidermidis* durch das Phagmid pG8SAET (Jacobsson et al., 2003) exprimiert. Die rekombinanten Phagen besitzen dadurch ein Hüllprotein-VIII, welches zusätzlich mosaikartig mit den Genprodukten der Fremd-DNA durchsetzt ist. Durch den Phagen exprimierte Sequenzabschnitte von Proteinen liegen nativ vor und können direkt in Interaktionsexperimenten eingesetzt werden. Erstmals wurde diese Methode 1985 beschrieben und als „*phage display*“ bezeichnet (Smith, 1985). Die Methode wurde genutzt um Rezeptor-bindende Epitope von bakteriellen Adhäsinen zu identifizieren (Jacobsson and Frykberg, 2001) (Bjerketorp et al., 2004b; Bjerketorp et al., 2004a) (Mullen et al., 2006). Eine weitere Verwendungsmöglichkeit besteht darin, gezielt nach Liganden oder Oberflächen-affinen Molekülen zu suchen (Bjerketorp et al., 2002) (Bishop-Hurley et al., 2005). Vielfach werden die Phagen als molekulares Werkzeug für Antikörper- und Peptidbibliotheken herangezogen (Somers et al., 2002; van Beijnum et al., 2002). Auch für die Erstellung von cDNA Bibliotheken finden sie Verwendung (He et al., 2008). Der Einsatz durch „*shotgun cloning*“ erzeugter Phagenbibliotheken nennt sich „*shotgun phage display*“ (Jacobsson and Frykberg, 2001). Dabei wird die chromosomale DNA der Bakterien fragmentiert und willkürlich in einen Phagmid Vektor inseriert. Theoretisch präsentiert sich

dadurch jedes Fragment des bakteriellen Genomes mindestens einmal in der Phagenbibliothek. Gewöhnlich wird der hybride Phagmid Vektor pG8SAET für die Konstruktion von „*shotgun libraries*“ genutzt (Zhang et al., 1999) (siehe Abbildung 4).

Die wesentlichen Strukturelemente des Phagmids pG8SAET bestehen aus Klonierungsschnittstelle *SnaBI*, Staphylokokken Protein A (Spa) Promoter und Signalpeptid, dem Expressionstag (E-Tag), dem Phagen-Hüllprotein VIII sowie dem Replikationsursprung vom Plasmid ColE1 und dem filamentösen Phagen M13. Wird ein Wirtsorganismus (*E.coli* TG1) durch einen Phagen infiziert, injiziert dieser seine (+) einzelsträngige DNA in den Wirtsorganismus. Im Bakterium wird daraufhin der komplementäre (-) DNA Strang gebildet und es entsteht dadurch das doppelsträngige Phagen genom. Alle Phagmid kodierten Proteine können dann Wirt-assoziiert transkribiert und translatiert werden. Dieses *template* dient auch der Synthese von (+) einzelsträngiger DNA für die viralen Nachkommen (Virione) (Hoess, 2001) (Hoess, 1993) (Mullen et al., 2006).

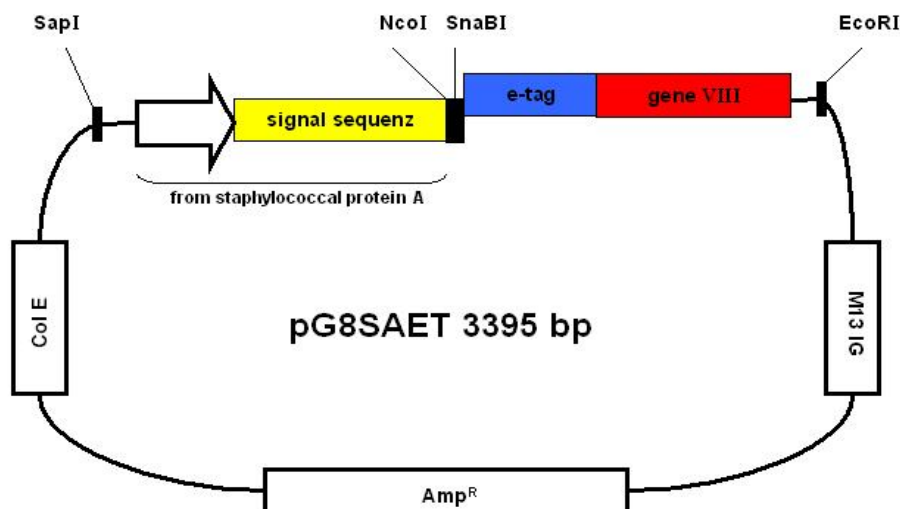


Abbildung 4: Schematische Darstellung Phagmid pG8SAET. Das Phagmid pG8SAET ist ein Gen VIII-basierender Vektor mit einer universalen Reportersequenz (E-tag). Es befinden sich die Restriktionsschnittstellen *SapI*, *NcoI*, *SnaBI* und *EcoRI* auf dem Phagmid. Desweiteren findet sich darauf der Promotor und eine Signalsequenz aus dem Staphylokokken Protein A. Ein Antibiotikaresistenzgen für Ampicillin, der Replikationsursprung ColE1 für die Expression in *E. coli* und der von M13IG für die Generation rekombinanter Phagen sind ebenfalls auf dem Phagmid kodiert.

Zur Synthese von Virionen muss *E.coli* TG1 x pG8SAET jedoch erst durch den Helferphagen R408 (Promega/Madison, WI) infiziert werden. R408 stellt die notwendigen Faktoren, um die (+) einzelsträngige Phagen-DNA in Virione zu verpacken. Die Expression des Signalpeptides ist notwendig für die Translokation der Phagen-Proteine an die innere Membran von *E. coli*. Dort werden die Phagenpartikel zusammengesetzt und aus der Zelle exportiert (Russel, 1995) (Russel et al., 1997). Die Verwendung des Spa-Promotors erwies sich am effizientesten für die Expression des Phagmides pG8SAET (Jacobsson and Frykberg, 1998). Ist keine Insertion im Phagmid enthalten, besteht an dieser Stelle ein Leserahmen „*shift*“ und die Transkription wird nach Expression des Signalpeptides abgebrochen. In einigen Fällen kommt es durch das Phänomen des „*ribosomal slippage*“ dazu, dass der Leserahmen „*shift*“ überwunden wird und auch ohne Insertion der E-tag exprimiert wird (Jacobsson and Frykberg, 1998). Die Sequenz des E-Tag kodiert für ein Peptid aus 15 Aminosäuren, welches mit einem monoklonalen Antikörper detektiert werden kann. Diese Reportersequenz ermöglicht es, Klone welche eine Insertion exprimieren, aus einer großen Menge, schnell zu isolieren. Bei der Reinigung von rekombinantem Protein z.B. Antikörper, kann der E-Tag als Selektions-tag eingesetzt werden (Jacobsson et al., 2003). Das verwendete Gen-VIII-System führt meist auch bei geringen Affinitäten zu Interaktionen. Besonders bei der Identifikation von natürlichen Interaktionen führt dies zu einer effizienten Selektion, allerdings auch mit dem Risiko, dass die Anzahl irrelevanter Klone dabei ansteigen kann (Jacobsson et al., 2003).

Durch die Isolation von Kandidaten für eine mögliche Interaktion sollte ein weiterer Schritt zum entfernten Ziel gemacht werden, die molekulare Organisation im Biofilm von *S. epidermidis* aufzuklären.

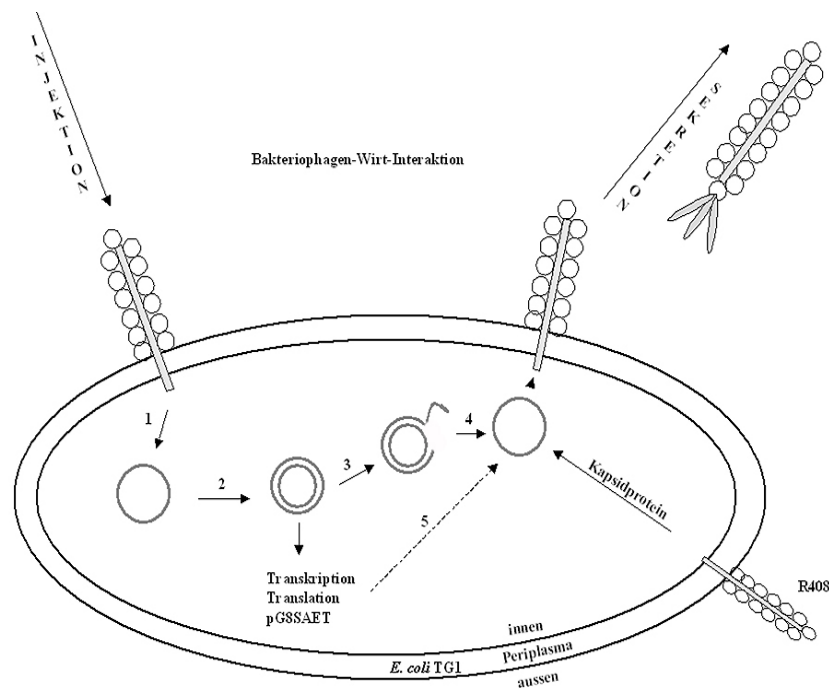


Abbildung 5: Lebenszyklus eines pG8SAET basierenden Phagen in *E. coli* TG1. Der Phage infiziert die *E. coli* TG1 Zelle indem er an deren F-Pili adhärert und das einzelsträngige Virus-Genom injiziert (1). Ein komplementärer DNA-Strang wird synthetisiert, der das doppelsträngige Phagen-Genom bildet (2). Durch den „rolling circle“ Mechanismus (3) wird erneut einzelsträngiges Virus-Genom zur Reproduktion repliziert (4). Durch die Wirt-vermittelte Proteinbiosynthese der viralen Protein (Helferphage R408) wird das reproduzierte, einzelsträngige Virus-Genom als Virion verpackt (5). Zusammengesetzte Virione werden aus der Zelle sekretiert. Die Wirtszelle bleibt bei diesem lysogenen Mechanismus erhalten

2.6 Ziel der Dissertation

Wesentliches pathogenetisches Merkmal von *S. epidermidis* Fremdkörper-assoziierten Infektionen ist die Ausbildung mehrschichtiger Biofilme auf der Oberfläche eines Implantats. Als wichtigster funktioneller Faktor für die Akkumulation von *S. epidermidis* in Biofilmen hat sich das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) erwiesen (Mack et al., 1996a) (Mack et al., 1994) (Mack et al., 1992). PIA wird von den meisten klinischen biofilmbildenden *S. epidermidis* Stämmen produziert (Mack et al., 1996b) (Ziebuhr et al., 1997). Die strukturellen Determinanten der interzellulär adhäsiven Funktion von PIA sind jedoch weiterhin unbekannt. Im Rahmen von epidemiologischen Untersuchungen wurden mehrere stark biofilmbildende *S. epidermidis* Stämme isoliert, die nicht oder nur sehr schwach mit dem PIA-spezifischen Kaninchen-Antiserum reagierten (Knobloch et al., 2002). Zur Gruppe dieser Stämme gehört auch *S. epidermidis* 939. Die Herstellung von 939-spezifischen Antiserum, welches an der isogenen Δ -ica-Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 absorbiert wurde, zeigte bei der Analyse von Extrakten aus *S. epidermidis* 939 nahezu gleiche PIA-Titer wie beim Referenzstamm 1457. Diese Ergebnisse legen nahe, dass *S. epidermidis* 939 ein mit PIA nahe verwandtes, serologisch kreuzreaktives Antigen produziert, das funktionell PIA ersetzt und vorläufig als PIAv bezeichnet wird (Knobloch et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit sollte durch NMR-Spektrometrie die Struktur der immunreaktiven PIAv Isoform aufgeklärt werden. Vorausgehend sollte der Einfluss von Wachstumsbedingungen auf die Synthese von PIAv analysiert werden. Die Immunreaktivität mit PIA-spezifischen Antiserum sollten geprüft werden. Durch die Expression der PIAv-Synthesenzyme im Surrogatwirt *S. carnosus* TM300 sollte die Fähigkeit zur Biofilmbildung und PIAv-Synthese charakterisiert werden. Für die Funktion von PIA als interzelluläres Adhäsion ist die Interaktion mit bakteriellen Zelloberflächenstrukturen notwendig. Solche Interaktionspartner sollten in einem zweiten Teil dieser Arbeit, durch Untersuchungen mit einer Bakteriophagenbibliothek gefunden werden.

Die Charakterisierung der serologischen Variante von PIA (PIAv) soll Hinweise auf eine veränderte Struktur-Funktionsbeziehung bei der Vermittlung interzellulärer Adhäsion erbringen. Aufgrund der Identifikation von strukturellen Veränderungen würden Rückschlüsse auf essentielle Struktur- und Funktionszusammenhänge möglich.

3 Material

3.1 Bakterien-Stämme

E. coli TG1 (Stratagene/Heidelberg)

F⁻ *traD36 lacI^qΔ (lacZ)M15 proA⁺B⁺/supEΔ (hsdM-mcrB)5(r_k⁻m_k⁺McrB⁻)
thiΔ(lac-proAB)*

E. coli One Shot®Top10 (Invitrogen/Karlsruhe)

F⁻ *mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139
Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

*S. carnosus*TM300 (F. Götz/Tübingen)

Wirtsorganismus zur Expression von Staphylokokken-Genen, geringe
extrazelluläre, proteolytische Aktivität (Götz et al. 1998)

*S. epidermidis*939 (D. Mack/Hamburg)

Klinisches Isolat, Blutkultur (Mack et al. 1996b)

*S. epidermidis*1457 (D. Mack/Hamburg)

Wildtyp, Isolat Zentralvenenkatheter (Mack et al. 1992 [1999])

*S. epidermidis*1457-M10 (D. Mack/Hamburg)

Isogene Transposonmutante, *icaA*::Tn917, biofilm-negativ (Mack et al. 1999)

S. epidermidis Stamm2 (K. Jacobsson/Uppsala, SE)

Wildtyp, Klinisches Isolat, Fibronektinbindung (pers. Mitteilung K. Jacobsson)

S. aureus RN4220 (D. Mack/Hamburg)

8325-4r, restriktionsdefizienter Stamm (Fairweather et al. 1983)

S. aureus CowanI (D. Mack/Hamburg)

Protein A präsentierender Stamm (Kessler et al. 1975)

3.2 Medien für die Anzucht von Bakterien

Hersteller Bakterienmedien:

Oxoid Ltd. (Basingstoke, UK)
BD, Becton Dickinson
(Cockseyville, MD)
Difco Laboratories (Detroit, MI)
Carl Roth (Karlsruhe)
Merck (Darmstadt)

3.2.1 Medien für die Anzucht von Staphylokokken

3.2.1.1 Festmedien

NYE-Agar:

1 % (w/v) Caseinhydrolysat
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,085 M NaCl

DM3-Agar:

4 % (w/v) Agar
(ad. 250 ml MQ-Wasser)
0,5 M Natriumsuccinat
(ad. 500 ml MQ-Wasser)
pH 7,3 mit Bernsteinsäure
einstellen
5 % Caseinhydrolysat, 5 %
Hefeextrakt
(ad. 100 ml MQ-Wasser)

0,026 M K_2HPO_4

0,011 M KH_2PO_4

(ad. 100 ml MQ-Wasser)

20 ml $MgCl_2$ [1 M]

10 ml Glukose 50 % (w/v)

10 ml BSA 5 % (w/v)

Die Agar-Komponenten wurden jeweils in separaten Flaschen autoklaviert, abgekühlt auf 55°C, vereinigt und in 10 cm Petrischalen (Nerbe plus/Winsen) vergossen

CY-Softagar:	2,5 % (w/v) Caseinhydrolysat
	2,5 % (w/v) Hefeextrakt
	0,255 M NaCl
	1 % (w/v) Agar

Komponenten wurden autoklaviert, abgekühlt zu 50°C und mit 1 x Volumen Natriumsuccinat [1 M], 4 ml Mix-Lösung, Tetrazyklin [20 mg/ml] versetzt

M9-Agar:	1,7 % Agar
	(ad. 450 ml MQ-Wasser)
	50 ml M9 Stocklösung (10x)
	4 ml Glukose 50 % (w/v)
	0,5 ml MgSO ₄ [1 M]
	1 ml CaCl ₂ [0,05 M]
	1,5 ml FeSO ₄ [0,001 M]
	1 ml Thiamin [1 mg/ml]

Fertig-Agarplatten:	Columbia Agar mit Schafblut Plus (Oxoid)
	Müller-Hinton Agar (Oxoid)

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem jeweiligen Medium 1,5 %, zur Herstellung von Softagar 0,5 % Bacto Agar (BD) zugesetzt

3.2.1.2 Flüssigmedien

Fertige Flüssigmedien:	<u>M</u> üller- <u>H</u> inton-Brühe (MH/BD)
	<u>b</u> rain- <u>h</u> eart- <u>i</u> nfusion (BHI/Oxoid)
	<u>t</u> rypticase- <u>s</u> oya- <u>b</u> roth (TSB/BD)
	<u>a</u> ntibiotic <u>m</u> edium No. <u>3</u> (AM3/Difco)

TSB-Medium ohne Glukose:	2,2 % (w/v) Tryptone 0,4 % (w/v) Neutralized Soya Pepton 0,085 M NaCl 0,0145 M K ₂ HPO ₄
B-Medium:	1 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,1 % (w/v) Glukose 0,085 M NaCl 0,006 M K ₂ HPO ₄ pH 7,4 mit NaOH einstellen
B2-Medium:	1 % (w/v) Caseinhydrolysat 2,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,006 M K ₂ HPO ₄ 0,5 % (w/v) Glukose 0,424 M NaCl

3.2.2 Medien für die Anzucht von *E. coli* Bakterien

3.2.2.1 Festmedium

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5 %, zur Herstellung von Softagar 0,5 % Bacto Agar (BD) zugesetzt. Nach dem autoklavieren wurde der LB-Agar zu 50°C abgekühlt und mit 2 % (v/v) Glukose [50 %] und Ampicillin [50 mg/ml] versetzt.

3.2.2.2 Flüssigmedium

Luria-Bertani (LB/Roth)

thym-broth-medium (TBM)

2 % (w/v) Bacto-Trypton

5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt

0,1 M NaCl

0,01 M MgCl₂

3.2.3 Stammhaltung der Bakterien

Zur Langzeitlagerung der Mikroorganismen bei (-80°C) wurde das Stammhaltungssystem Cryobank™ (Mast Diagnostica/Reinfeld) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.3 Nukleinsäuren

3.3.1 Oligonukleotide

3.3.1.1 Oligonukleotide zur Klonierung von *icaADBC*

5'_ica_Ava: 5'-CTC GGG ATA TGC TTT ACA ACC TAA CTA ACG-3'

3'_ica_Sac: 5'-GAG CTC TAT TAA TTC CAG TAA GGC TGG-3'

3.3.1.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung des pAS1 Plasmidvektors

5'_MCS: 5'-GTC TGA GTT ATA AAA TAG ATA TCT CGG-3'

3'_MCS: 5'-GAG AAT ATA GAA ATA GCG TTA AAG C-3'

3.3.1.3 Oligonukleotide zur Sequenzierung des pG8SAET Phagmidvektors

5'_MCS: 5'-TAT CTG GTG GCG TAA CAC CTG CT-3'

3'_MCS: 5'-GAT CGT CAC CCT CGG ATC CCT AGG-3'

3.3.1.4 Oligonukleotide zum Integrationsnachweis von Tn917

5'_Tn917ermB1243: 5'-GCC ATA CCA CAG ATG TTC CAG-3'

3'_Tn917res2166: 5'-CAA TAA TAA TAT CCC GTT CCA GT-3'

(Tn917 flankierend, M. Christner)

5'_Tn917: 5'-GCA ATA ACC GTT ACC TGT TTG TGC-3'

3'_Tn917: 5'-GCA ATA AGT ATA TGG AAC GCC GTC T-3'

(Tn917 zentral, M. Christner)

3.3.1.5 Oligonukleotide zum Integrationsnachweis *icaADBC*

5'_ica1: 5'-GCT TTA CAA CCT AAC TAA CG-3'

5'_ica2: 5'-TCA TTG ATG ACG ATG CGC C-3'

(*icaA* zentral, H. Rohde)

3'_icaA: 5'-GAG TTT CCA TGA AAC AGC-3'

3'_icaD: 5'-CAG GTG TGA TAT TGG TGT TGC-3'

(*icaA* zentral, *icaD* flankierend, S. Frankenberger)

5'_icaA: 5'-CTG TTT CAT GGA AAC TCC-3'

3'_icaA: 5'-TCG ATG CGA TTT GTT CAA ACA T-3'

(*icaA* flankierend, Heilmann et al. 1996)

3.3.2 Plasmidvektoren

pCR4

TA-Klonierung (Invitrogen/Karlsruhe)

pAS1

Propagation in *E. coli* und in Staphylokokken;

Dieser Vektor ermöglicht Expression von Genen unter Kontrolle der *xylR*-abhängigen Transkriptionsinitiation durch vorgeschalteten *xylA*-Promotor

pG8SAET

Dieser Phagmidvektor beinhaltet das Hüllprotein (pVIII) fusioniert mit dem *e-tag*-Gen. Der Leserahmen zur vorangestellten Sequenz ist durch einen „*frame shift*“ unterbrochen. Kommt es zur Insertion eines DNA Fragmentes innerhalb der MCS, wird dadurch die ursprüngliche Leserahmen Verschiebung reguliert. Der Promotor stammt vom Staphylokokken Protein A und steht nach Insertion nicht nur für die Transkription einer ebenfalls aus Staphylokokken Protein A stammenden Signalsequenz, sondern kann „*in frame*“ die Expression der inserierten DNA Fragmente sowie die des Reporterproteins zulassen. Es handelt sich hierbei um ein Reporterplasmid das zur Herstellung einer Phagen Bibliothek verwendet wurde.

3.3.3 Sonstige Nukleinsäuren

λ -DNA-Längenstandard

Finnzyme (Espoo, FIN)

3.4 Bakteriophagen

Helferphage R408

Promega (Madison, WI)

Phagenbibliothek (*S. epidermidis* Stamm2)

PD Dr. C. Heilmann (Institut für
medizinische Mikrobiologie, UK
Münster)

Die verwendete *S. epidermidis* Stamm2 Phagenbibliothek wurde von PD Dr. Christine Heilmann zur Verfügung gestellt und stammt von Dr. Karin Jacobsson (*Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, UPPSALA, Sweden*). Die Bibliothek besteht aus $2,7 \times 10^6$ Klonen, von denen 50 % DNA-Fragmente des oben genannten Stammes tragen. Die Größe der inserierten DNA-Fragmente variiert theoretisch zwischen 500 und 3000 Basenpaaren (bp). Die Bibliothek wurde nach dem *shotgun phage display cloning* Verfahren (Jacobsson et al., 2003) hergestellt. Nach der Lagerung bei (-20°C) beträgt der finale pG8SAET-Phagmid Titer $1,2 \times 10^9$ cfu/ml. Mit dieser Konzentration wurde die Phagenbibliothek im Experiment eingesetzt.

3.5 Enzyme

3.5.1 Restriktionsnukleasen/Puffer

Restriktionsendonukleasen wurden von Amersham (Freiburg), New England Biolabs (Frankfurt a. M.) sowie von Roche (Mannheim) bezogen und in den geeigneten Puffersystemen nach Herstellerangaben verwendet.

<i>SnaBI</i>	TAC/GTA
<i>NcoI</i>	C/GATGG
<i>EcoRI</i>	G/AATTC
<i>AvaI</i>	C/C(T)CGA(G)
<i>SacI</i>	GAGCT/C

3.5.2 Sonstige Enzyme

Trypsin	Roche (Mannheim)
Lysostaphin (1500U/ml)	Sigma (München)
Dispersin B	J. Kaplan (Newark, NJ)
Krabben Alkaline Phosphatase	USB (Staufen)
Expand Long Template Enzyme mix	Roche (Mannheim)
Triple Master Enzym mix	Eppendorf (Hamburg)
DyNAzyme™DNA-Polymerase	Finnzymes (Espoo, FIN)
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes (Espoo, FIN)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)

3.6 Antikörper

3.6.1 Primäre Antikörper

DM 385-2-4	Polyklonales Antiserum aus dem Kaninchen, welches spezifisch das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) des <i>S. epidermidis</i> 1457 Biofilms erkennt. (Prof. D. Mack, Swansea, UK)
Anti-e-tag-AK	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, welcher eine spezifische Peptid-Sequenz (E-tag) im rekombinanten Phagen System erkennt (Amersham/Freiburg)

HRP/Anti-M13- Antikörper

HRP (*horseradish peroxidase*)
konjugierter monoklonaler
Antikörper aus der Maus, welcher
spezifisch das Bakteriophagen
Hüllprotein M13, Genprodukt von
Gen VIII (gp8) erkennt
(Amersham/Freiburg)

3.6.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Maus-IgG

Antikörper aus dem Schaf,
konjugiert mit HRP
(Amersham/Freiburg)

Anti-Maus-IgG

AP (*alkaline phosphatase*)
konjugierter Antikörper aus der
Ziege (Sigma/München)

Anti-Kaninchen-IgG

Antikörper aus der Ziege,
konjugiert mit HRP
(Sigma/München)

Anti-Kaninchen-IgG

AP konjugierter Antikörper aus der
Ziege (Sigma/München)

Anti-Kaninchen-IgG

Antikörper aus der Ziege,
konjugiert mit Alexa Fluor[®] 488
(Molecular Probes/Eugene, OR)

3.7 Reagenzsysteme (Kits)

Biorad Protein Assay	Biorad (München)
DNA Minipräp-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA Midipräp-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA Gel-Extraktions-Kit	Qiagen (Hilden)
PCR-Purification-Kit	Qiagen (Hilden)
QIAamp DNA Mini-Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA-Ligations-Kit	Roche (Mannheim)
NuPAGE [®] -SDS-Gel-System	Invitrogen (Karlsruhe)
SilverSNAP [®] Stain for Mass Spectrometry	Pierce (Rockford, IL)
Western blotting Reagent1+2	Amersham (Freiburg)
Western Blue [®]	Promega (Madison, WI)
Bernsteinsäure Bestimmung	Ribopharm (Darmstadt)

3.8 Reagenzien und Laborhilfsmittel

Aceton	Merck (Darmstadt)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
<u>A</u> mmoniumsulfamat	Fluka (Neu-Ulm)
Ammoniumeisen-(III)-sulfat	Merck (Darmstadt)
Ammoniummolybdathxahydrat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Dialyseschlauch	Serva (Heidelberg)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe)
Eisenchlorid (FeCl ₂)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, NL)
<u>E</u> thidiumbromid (EtBr)	Roth (Karlsruhe)

D-Glukose	Merck (Darmstadt)
D-Glukoronsäure- γ -laktone	Merck (Darmstadt)
Glyzerin	Merck (Darmstadt)
β -Di-glycerophosphat Di-natriumsalz	Merck (Darmstadt)
β -Hydroxidiphenyl	Fluka (Neu-Ulm)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kälberserumalbumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Kalium-Acetat (KOAc)	Sigma (München)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Merck (Darmstadt)
Magermilchpulver	Heirler (Radolfzell)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumnitrat	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck (Darmstadt)
Maleinsäure	Merck (Darmstadt)
3-Methyl-2-Benzo-Thiazolinone Hydrozone (MBTH)	Sigma (München)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
N-Acetyl-D-Glukosamin	Sigma (München)
3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)	Sigma (München)
Natrium-Acetat	Sigma (München)
Natrium-Citrat	Merck (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt)
Natriumnitrit	Merck (Darmstadt)
Orcine	Fluka (Neu-Ulm)
Phenol (Feststoff)	Fluka (Neu-Ulm)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohl (25:24:1)	Sigma (München)
Polyacrylamid	Biorad (München)
Polyethylenglycol 6000 (PEG)	Serva (Heidelberg)
Proteinstandard	Biorad (München)
Röntgenfilme	Fuji (Düsseldorf)

Saccharose	Merck (Darmstadt)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck (Darmstadt)
Sigma-104 Phosphatase Substrat	Sigma (München)
Tetraborat (Na ₂ B ₄ O ₇)	Roth (Karlsruhe)
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochlorid	Sigma (München)
Tetrazyklin	Sigma (München)
Thiamin	Sigma (München)
Trichloressigsäure	Fluka (Neu-Ulm)
Tris	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
D-Xylose	Merck (Darmstadt)

3.9 Lösungen und Puffer

3.9.1 Reagenzien

PBS-Puffer: (*phosphat buffered saline*, ohne CaCl₂ und MgCl₂)

0,138 M NaCl

0,0027 M KCl

0,0065 M Na₂HPO₄

0,0015 M KH₂PO₄

PBS-Tween-Puffer:

(PBST)

PBS-Puffer

0,05 % (v/v) Tween 20

0,1 % (v/v) Tween 20

PBS_{NaN₃}-Puffer:

PBS-Puffer

0,05 % (v/v) NaN₃

M9-Stocklösung (10x):	0,9 M Na ₂ HPO ₄
	0,22 M KH ₂ PO ₄
	0,187 M NH ₄ Cl
	0,085 M NaCl

3.9.2 Reagenzien für Agarosegelelektrophorese

Farbmarker für Agarosegele:	40 % Saccharose
	1 mM EDTA
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau

5x TBE-Puffer:	0,445 M Tris-Base
	0,445 M Borsäure
	20 ml EDTA [0,5 M], pH 8,0

3.9.3 Lösungen für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

TbfI-Puffer:	0,03 M KOAc
	0,05 M MnCl ₂
	0,1 M KCl
	0,01 M CaCl ₂
	15 % (v/v) Glyzerin

TbfII-Puffer:	0,01 M Na-MOPS, pH 7,0
	0,075 M CaCl ₂
	0,01M KCl
	15 % (v/v) Glyzerin

3.9.4 Reagenzien für die Protoplastentransformation

SMM-Lösung:	1 M Saccharose
	0,04 M Maleinsäure
	0,04 M MgCl ₂
	pH 6,5 einstellen mit NaOH

SMMP-Lösung:	16 ml SMM-Lösung 4 ml AM3-Medium 1 ml BSA 5 % (w/v)
Fusogen-Lösung:	40 % (w/v) PEG 6000 50 % (v/v) SMM-Lösung
Mix-Lösung:	1 ml Glukose 50 % (w/v) 2 ml MgCl ₂ [1M] 4 ml β-Glycerophosphat Dinatriumsalz [1,5 M]

3.9.5 Reagenzien für colormetrische Assays

3.9.5.1 Hexosamin Bestimmung

Reagenz 1:	2,5 % (w/v) Natriumnitrit
Reagenz 2:	12,5 % (w/v) Ammoniumsulfamat
Reagenz 3:	0,25 % (w/v) 3-methyl-2-benzo- thiazolinone Hydrazone (MBTH)
Reagenz 4:	0,5 % (w/v) Eisenchlorid

3.9.5.2 Uronsäure Bestimmung

Reagenz 1:	0,0123 M Di-natrium-tetraborat
Reagenz 2:	0,15 % (w/v) β-hydroxydiphenyl
Reagenz 3:	0,5 % (w/v) NaOH

3.9.5.3 Kohlenhydrat Bestimmung

Reagenz 1:	5 % (w/v) Phenol
Reagenz 2:	Schwefelsäure [96 %]

3.9.6 Reagenzien für die Benutzung der Phagenbibliothek

Citrat-Puffer:	0,05 M Na-Citrat 0,14 M NaCl pH 5,5, pH 3,7; pH 2,1 mit HCl
Neutral-Puffer:	2 M Tris base; pH 8,0 mit HCl
Block-Puffer:	1 % (w/v) BSA PBST [0,1 %]
Färbe-Puffer:	0,1 M Tris base 0,001 M MgCl ₂ pH 9,5 mit HCl einstellen
PEG-Lösung:	20 % (w/v) PEG 6000 1 M NaCl

3.10 Laborgeräte

Tabelle1: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Äkta „purifier“ (P-900)	Amersham (Freiburg)
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co (New Brunswick, NJ)
Schüttelinkubator Certomat [®] BS-1	Sartorius (Göttingen)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Multifuge 1 S-R	Heraeus (Osterode)
Megafuge 3.0 R	Heraeus (Osterode)
Sorvall RC5B	DuPont (Wilmington, DE)
Primus 96 <i>plus</i> Thermocycler	MWG (Eberswalde)
Gene Pulser [®] II Elektroporator	BioRad (München)
Smart Spec plus Spektralphotometer	BioRad (München)
Infinite M 200 Photometer	Tecan (Männedorf, CH)
Digital Sonifier [®]	Branson (Danbury, CT)
Digital pH-Meter 646	Knick (Berlin)
ChemiDoc [™] XRS Geldokumentationssystem	BioRad (München)
Curix 60 Entwicklergerät	Agfa (Mortsel, B)
Axioplan Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Jena)

4 Methoden

4.1 Bakterienkulturen

4.1.1 Kultivierung der Bakterien

Zur Kultivierung der Bakterien wurde der jeweils verwendete Stamm aus der Stammhaltung (-80°C) durch Ausstreichen auf eine Blutagarplatte bzw. selektive Agarplatte reaktiviert. Die Agarplatten wurden daraufhin bei 37°C im Brutschrank für 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien direkt für die Subkultivierung, entsprechend ihres experimentellen Verwendungszweckes eingesetzt. Die Aufbewahrung bewachsener Stammplatten erfolgte bei 4°C. Für Vorkulturen im Flüssigmedium wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml des jeweiligen Mediums, 5 Stunden bei 160 Upm und 37°C inkubiert.

4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Bakterien

5 ml Thym-Broth-Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E.coli*-Stammes von einer Stammplatte (10 mM MgSO₄, ohne Antibiotikum) beimpft und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurden 250 ml Thym-Broth-Medium (ohne Antibiotikum) beimpft und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600 nm}) von etwa 0,5 bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Hauptkultur wurde anschließend für 20 min bei 0°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz 15 min bei 4°C und 6232 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 75 ml eiskaltem, sterilem TbfI-Puffer resuspendiert und bei 0°C für 30 min inkubiert. Der Ansatz wurde erneut 15 min bei 4°C und 6232 x g zentrifugiert und die Bakterien in 10 ml 0,1 M TbfII-Puffer resuspendiert. Dieser Ansatz wurde in Portionen von 200 µl in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80°C aufbewahrt.

4.1.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Bakterien auf Eis langsam aufgetaut, mit dem Ligationsansatz versetzt, vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt und

für 45 min bei 0°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz im Wasserbad für 2 min bei 42°C erwärmt und dann 45 sek in einem Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium auf den Ansatz gegeben und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 60 min wurden die Bakterien abzentrifugiert, auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Klone wurden auf das Vorhandensein von rekombinierter DNA mit Hilfe der analytischen Plasmidisolierung untersucht.

4.1.4 Elektroporation elektrokompenter *E. coli* Bakterien

Für die Elektroporation wurden elektrokompente Zellen *E. coli* One Shot®Top10 Electrocomp™ (Invitrogen/Karlsruhe) verwendet. Die bei (-80°C) aufbewahrten Zellen wurden in 80 µl Portionen im Eis aufgetaut. Es wurde 10 bis 100 ng der zu transformierenden Plasmid-DNA vorsichtig durch Rühren zugegeben. Daraufhin wurde der Ansatz für 30 min bei 0°C inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette (BioRad/München) überführt. Die Durchführung der Elektroporation erfolgte bei einem Widerstand von 200 Ω, Spannung 1,5 kV und 25 µF Kapazität. Die Zellen wurden in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika, in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 425 x g abzentrifugiert, resuspendiert, auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.5 Herstellung phagenkompetenter *E. coli* Bakterien

Für die Herstellung phagenkompetenter Bakterien wird eine Kolonie *E. coli* TG1 auf eine thiaminhaltige M9-Agarplatte ausgestrichen. Die Agarplatte wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Von der über Nacht bewachsenen Stammpalte werden 50 ml LB-Medium beimpft und für 5 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 4°C gelagert. Die phagenkompetenten Bakterien konnten 5 Tage zur Transfektion durch Phagen eingesetzt werden.

4.1.6 Herstellung elektrokompetenter Staphylokokken

5 ml B2 Brühe wurden mit einer Kolonie *S. aureus* RN4220 von einer Stammplatte beimpft und über Nacht bei 37°C, 160 Upm kultiviert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurden 24 ml frische B2 Brühe beimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bis 0,8 im Schüttelinkubator kultiviert. Die Hauptkultur wurde anschließend 10 min bei 4°C und 5155 x g zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde dreimal mit je 25 ml sterilem MQ-Wasser gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 5 ml sterilem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert und erneut 10 min bei 4°C und 5155 x g zentrifugiert, der Überstand wurde abermals verworfen. Das Pellet wurde nochmals in 2,5 ml sterilem 10 % (v/v) Glycerin gelöst und 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei RT und 5155 x g wurden die Zellen entsprechend einer Konzentration von 10⁹ Zellen pro ml (~ 600 bis 800 µl) in 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden in Portionen von 70 µl in sterilen Reaktionsgefäßen aliquotiert und direkt zur Elektroporation eingesetzt. Verbleibende Zellen von *S. aureus* RN4220 konnten ohne entscheidende Verringerung der Transformationseffizienz bei (-80°C) gelagert werden.

4.1.7 Elektroporation elektrokompetenter Staphylokokken

Einer Portion von 70 µl elektrokompetenter Bakterien wurde unter vorsichtigem Rühren 10 bis 100 ng Plasmid-DNA zugegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in eine 0,1 cm Elektroporationsküvette (BioRad/München) überführt. Die Durchführung der Elektroporation erfolgte bei einem Widerstand von 100 Ω, Spannung 2,3 kV und 25 µF Kapazität. Die Zellen wurden in 390 µl B2 Brühe, in ein 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in 100 µl Portionen auf antibiotikahaltigem NYE Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.1.8 Herstellung von Staphylokokken-Protoplasten (Götz and Schumacher, 1987)

15 ml B-Brühe wurden mit einer Kolonie *S. carnosus* TM300 von einer Stammplatte beimpft und über Nacht bei 37°C, 160 Upm kultiviert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurden 800 ml B-Brühe beimpft und bis zu einer OD_{600nm} von exakt 0,5 im Schüttelinkubator kultiviert. Die Hauptkultur wurde mit Erreichen der Zelldichte bei 0°C gekühlt und in bereits vorgekühlte

Zentrifugengefäße überführt. Die Zentrifugation erfolgte für 15 min bei 4°C und 6232 x g. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Pellet bei 0°C in 100 ml SMMP Puffer resuspendiert. Es wurden viermal 25 ml Bakteriensuspension jeweils in einen sterilen Erlenmeyerkolben gegeben und mit 10 µl, 20 µl, 40 µl und 80 µl Lysostaphin [1500 U/ml] versetzt. Die folgende Inkubation von 16 Stunden wurde im Wasserbad bei 30°C durchgeführt. Die Protoplasten wurden anschließend für 40 min bei 4°C und 27000 x g zentrifugiert. Das verbleibende Pellet konnte nun in 2 ml SMMP (ohne BSA) Puffer vorsichtig gelöst werden. Die Protoplasten wurden in 300 µl Portionen in 10 ml Röhrchen überführt und direkt weiterverwendet oder bei (-80°C) gelagert.

4.1.9 Transformation von Staphylokokken-Protoplasten (Götz and Schumacher, 1987)

Zur Transformation wurden entweder vorausgehend hergestellte Protoplasten direkt weiterverwendet oder die bei (-80°C) gelagerten Portionen bei Raumtemperatur aufgetaut. Die 300 µl Protoplasten wurden mit 10 bis 100 ng Plasmid-DNA und 2 ml Fusogen versetzt. Der Ansatz wurde für 2 min vorsichtig gemischt, dann mit 7 ml SMMP Puffer verdünnt und weiter durch vorsichtiges invertieren gemischt. Die folgende Zentrifugation wurde für 25 min bei Raumtemperatur und 6232 x g durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet behutsam in 2 ml SMMP Puffer resuspendiert und auf DM3-Agarplatten ausplattiert. Nach einer Inkubation von 4 Stunden bei 37°C wurden die Agarplatten mit 3 ml antibiotikahaltigem CY-Softagar überschichtet. Daraufhin folgte eine weitere Inkubation der Agarplatten für 48 Stunden bei 37°C.

4.1.10 Herstellung von *S. aureus* Cowan-I für den Koagglutinationstest

Von einer 3 ml Vorkultur wurden 800 µl TSB-Medium beimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 6232 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden zweimal mit 100 ml PBS/0,05 % NaN₃ resuspendiert und zentrifugiert für 15 min bei 4°C und 6232 x g. In Abhängigkeit der Zellmasse wurden die Bakterien in einer Konzentration von 10 % (w/v) PBS/0,05 % NaN₃ und 1,5 % (v/v) Formaldehyd aufgenommen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 120 min bei Raumtemperatur und ständigem Rühren inkubiert. Die Zellen wurden erneut für 15 min bei 4°C und 6232 x g zentrifugiert und wieder in 100 ml PBS/0,05 % NaN₃ aufgenommen. Nach Inkubation für 5 min bei 80°C im Wasserbad unter ständigem

Schwenken wurden die Zellen für 5 min bei 0°C abgekühlt. Die Bakterien wurden daraufhin zweimal in 100 ml PBS/0,05 % NaN₃ gewaschen und final nach Bestimmung der Zellmasse in einer Konzentration von 10 % (w/v) PBS/0,05 % NaN₃ aufgenommen. Die Zellen wurden in 1,5 ml Portionen bei (-80°C) gelagert.

4.2 DNA-Methoden

4.2.1 DNA-Standardmethoden

- Agarose-Gelelektrophorese (MWG)
- Dephosphorylierung mit Krabben bzw. Kalbsphosphatase, nach Angaben des Herstellers
- Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem DNA-Gel-Extraktionskit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers
- Fällung von Nukleinsäuren mit 0,1 Volumen NaCl [5M] und 2,5 Volumen Ethanol; Entfernung von Salzen mit 70% Ethanol
- Präparation chromosomalert Bakterien-DNA mit dem QIAamp DNA Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers
- Plasmidpräparation in größerer Menge mit dem Midipräp-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers
- Plasmidpräparation in kleinerer Menge mit dem Minipräp-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers
- Ligation mit Hilfe des Rapid DNA-Ligation-Kits der Firma Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers
- Ligation mit Hilfe des TA-Cloning-Kits der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers
- Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung in einem Spektralphotometer Smart Speck Plus der Firma BioRad (München)
- Restriktionsanalysen nach Angaben des Herstellers

Zur Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmide dienten die *E.coli*-Stämme Top10 und TG1 sowie die Staphylokokken-Stämme *S. aureus* RN4220 und *S. carnosus* TM300. Alle in *E. coli* verwendeten Konstrukte enthielten das Ampicillin-Resistenzgen. Dementsprechend

wurden die plasmidtragenden Bakterien auf LB-Agarplatten bzw. in LB-Flüssigmedium mit 50 mg/ml Ampicillin kultiviert. Das in Staphylokokken-Stämmen verwendete Konstrukt enthielt das Tetrazyklin Resistenzgen, deshalb wurden die plasmidtragenden Bakterien hier auf TSB-Agar bzw. TSB-Medium mit 20 mg/l Tetrazyklin kultiviert. 3 ml Übernachtskulturen in LB-Medium dienten als Vorkultur für präparative Plasmidisolierungen. Zur Extraktion mittlerer oder größerer DNA-Mengen wurden 100 ml LB-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben mit jeweils 3 ml einer 5 Stunden gewachsenen Kultur beimpft und bei 37°C für 12 bis 16 Stunden im Schüttelinkubator inkubiert. Für die Langzeitlagerung wurden die Bakterien im Stammhaltungssystem und bei (-80°C) aufbewahrt.

4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem thermoregulierbaren Heizblock mit Deckelheizung Primus 96 (MWG/Eberswalde) durchgeführt. Als Matritze für die Vervielfältigung wurde die chromosomale DNA des jeweiligen Bakterienstammes eingesetzt. Alle PCR-Reaktionen konnten unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden.

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	94°C	2 min	Initiale Denaturierung
35	94°C	30 sek	Denaturierung
	55°C	30 sek	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	4 min	Elongation
1	72°C	7 min	Finale Elongation
1	4°C	∞	

4.2.2.1 PCR zur Amplifikation von DNA für die Klonierung

Die PCR-Produkte wurden mit dem Phusion High-Fidelity PCR Kit (Finnzymes/Espoo, FIN) amplifiziert. Die Phusion™-Polymerase besitzt eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität („*proofreading*“) erlaubt. Die verwendeten Primer enthielten neben den komplementären Amplifikatsequenzen auch Restriktionsschnittstellen. Der Ansatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl.

<u>Ansatz (50µl):</u>	50–100 ng	DNA-Matritze
	1,5 µl	Primer1 [10 pmol/µl]
	1,5 µl	Primer2 [10 pmol/µl]
	1,0 µl	dNTP-Mix
	5,0 µl	PCR-Puffer (5x)
	0,5 µl	Enzym
	<hr/>	
	ad. 50 µl	steriles Wasser

4.2.2.2 PCR zum Insertionsnachweis

Der Nachweis von Genorten im Bakteriengenom wurde durch eine PCR mit der DyNAzyme™DNA-Polymerase (Finnzymes/Espoo, FIN) erbracht. Hierbei handelt es sich um ein TAQ-Polymerases System, ohne 3'->5' Exonukleaseaktivität, welches für diese Anwendung nicht erforderlich war. Es wurde ebenfalls ein Reaktionsansatz von 50 µl gewählt (siehe 4.2.2.1).

4.2.3 Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmid DNA wurden von der Firma MWG (Martinsried) durchgeführt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde die Konzentration von 1 µg Plasmid-DNA pro Ansatz durch die Messung im Spektralphotometer bestimmt und getrocknet. Die spezifischen Oligonukleotide [10 pmol/µl] wurden für die Sequenzierreaktion beigelegt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm „Vektor NTI“ ausgewertet.

4.2.4 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE-Analysen wurden von Cand. med. Stefanie Scherpe am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene (UKE/Hamburg) durchgeführt.

4.3 Proteinmethoden

4.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Reagenz bestimmt. Hierzu wurde die zu messende Lösung in einem Endvolumen von 800 μ l eingesetzt und mit 200 μ l Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Nullwert wurde der Lösungspuffer unter den gleichen Bedingungen eingesetzt. Aus der gemessenen Absorption wurde anhand einer vorher erstellten BSA-Eichgerade die jeweilige Proteinkonzentration ermittelt.

4.3.2 Trennung von Proteinen mit SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen wurde mit SDS-Gradienten Gel NuPAGE[®] 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen/Karlsruhe) durchgeführt. Das Probenvolumen von 18 μ l wurde mit 6 μ l NuPAGE[®]LDS sample buffer (4x) versetzt und bei 70°C für 10 min im Heizblock inkubiert. Zur Größenbestimmung von Proteinen wurden 3 μ l Precisien Plus Protein[™]Dual color Standard (BioRad/München) verwendet. Es wurden 25 ml NuPAGE[®]MES (20x) Stammlösung mit 475 ml MQ-Wasser verdünnt und als Laufpuffer für die Gelelektrophorese eingesetzt. Die Auftrennung von Proteinen erfolgte bei konstanten 200 V für 45 min. Das Gel wurde mit Simply Blue[™]Safe Stain (Invitrogen/Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers angefärbt. Um Protein in geringer Menge darzustellen wurde das Gel mit SilverSNAP[®]Stain for Mass Spectrometry (Pierce/Rockford, IL) nach Angaben des Herstellers angefärbt.

4.4 Polysaccharid Gewinnung

4.4.1 Anzucht der Bakterienstämme

Zur Anzucht der Bakterien für die PIA (*polysaccharid intercellular adhesin*) Extraktion wurde der jeweils verwendete Stamm aus der Stammhaltung, durch Ausstreichen auf eine Blutagarplatte reaktiviert. Die Agarplatte wurde daraufhin für 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml TSB-Medium ohne Glukose überimpft und für 5 Stunden bei 37°C und 160 Upm inkubiert. Mit 50 µl dieser Vorkultur wurden 50 ml TSB-Medium ohne Glukose Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C und 160 Upm inkubiert. Für einen PIA-Extraktions-Ansatz wurden vierfach 1000 ml Aussendialysat-TSB-Medium (BD/Cockseyville, MD) mit 10 ml Übernachtkultur angeimpft. Die Hauptkulturen wurden für 22 Stunden bei 37°C und 100 Upm inkubiert. Die Dialyse von 100 ml TSB-Medium (10x) gegen 900 ml MQ-Wasser erfolgte mittels Dialyseschlauch MWCO 10.000 (Serva/Heidelberg) für 16 Stunden bei Raumtemperatur und ständigem Rühren.

4.4.2 Extraktion von PIA

Die unter 4.4.1 beschriebenen Hauptkulturen wurden für 10 min bei 6232 x g bei 4°C abzentrifugiert. Der Medium Überstand wurde verworfen und die pelletierten Bakterien in 40 ml PBS resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgt durch dreimaliges sonifizieren für 30 sek mit jeweils 30 sek Unterbrechung bei 0°C. Anschließend wurde zweimal 10 min bei 4332 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde, nachdem der Überstand in Zentrifugengefäße überführt war, verworfen. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 1 Stunde bei 17210 x g und 4°C. Abschließend wurde der gewonnene Gesamtzellextrakt mit Centriprep YM-10 (Millipore/Billerica, MA) in 5 ml eingeeengt, sterilfiltriert und direkt chromatographisch weiterverarbeitet.

4.4.3 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die GPC wurde mit einer C16/100 Säule (Amersham/Freiburg) bei 4°C durchgeführt. Als Säulenmaterial für diese Säule wurde in PBS äquilibriertes Sephacryl S-200 (Amersham/Freiburg) verwendet. Es wurden 5 ml des Gesamtzellextraktes mit 45 ml PBS auf die Säule gespült. Anschließend wurden 40 Fraktionen zu je 1,5 ml aufgefangen. Zur Regeneration wurde die Säule mit 360 ml PBS gespült. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,3 ml/min. Für die Bestimmung der spezifischen Antigenkonzentrationen in den Fraktionen wurden die Elutionsprofile bei einer Wellenlänge von 230/255/280 nm herangezogen. Die Detektion bei diesen Wellenlängen konnte mittels eines PIA-spezifischen Antiserums (DM 385-2-4) im Dot-Immuno-Assay bestätigt werden. Alle antigenreaktiven Fraktionen wurden vereinigt und durch Centriprep YM-10 in 10 ml Probenvolumen konzentriert. Pflege und Aufbewahrung der Säule wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.4.4 Anionenaustauschchromatographie (*anion exchange chromatography*, AEC)

Die AEC wurde mit der Q-Resource Säule (Amersham/Freiburg), äquilibriert in PBS, bei 4°C durchgeführt. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min wurden 31 Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen. Es wurden 5 ml des Gesamtzellextraktes mit 14 ml PBS über die Säulenmatrix gespült. Anschließend wurden 44 ml Natriumchlorid-Lösung [1 M] durch einen linear ansteigenden Gradient von [0 M] bis [1 M] über die Säule geleitet. Zur Regeneration wurde die Säule mit 25 ml PBS gespült. Für die Bestimmung der Antigenkonzentrationen in den Fraktionen wurde das Elutionsprofil bei einer Wellenlänge von 230 nm herangezogen. Die Detektion bei diesen Wellenlängen konnte mittels eines PIA-spezifischen Antiserums im Dot-Immuno-Assay bestätigt werden. Die zusätzlich für Hexosamin positiv getesteten Fraktionen wurden vereinigt und weiterverarbeitet. Pflege und Aufbewahrung der Säule wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.4.5 Bestimmung von Hexosamin (Lane-Smith and Gilkerson, 1979)

Für eine absolute Hexosamin-Bestimmung wurde 300 µl Probe mit 300 µl Salzsäure [1 N] versetzt und für 2 Stunden bei 110°C deacetyliert. Anschließend wurden 200 µl der Proben-Lösung entnommen und mit 400 µl Natriumnitrit-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 200 µl Ammoniumsulfamat-Lösung zu dem Ansatz gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem dritten Schritt wurden 200 µl MBTH-Lösung zu dem Ansatz gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der folgenden Zugabe von 200 µl Eisenchlorid-Lösung wurde die Probe erneut für 5 min bei 37°C inkubiert. Die resultierende Farbreaktion konnte bei einer Wellenlänge von 650 nm im Spektralphotometer gemessen werden. Der Ansatz wurde nach jedem Reaktionsschritt für 10 sek durch vortexen vermengt. Als Nullwert wurde der Lösungspuffer unter den gleichen Bedingungen eingesetzt. In unabhängigen Messungen wurde jeweils eine N-Acetyl-Glukosamin Standardreihe mitgeführt. Aus der gemessenen Absorption der mitgeführten Standardreihe wurde eine N-Acetyl-Glukosamin-Eichgerade erstellt und die jeweilige Hexosaminkonzentration ermittelt.

4.4.6 Bestimmung von Kohlenhydraten (Dubois, 1956)

Für die Bestimmung von Hexose mit diesem Test wurde 200 µl Probe eingesetzt. Zur Probe wurden 200 µl Phenol-Lösung gegeben und in einem zweiten Schritt 1 ml Schwefelsäure [96 %]. Daraufhin wurde die Probe im geöffneten Reaktionsgefäß für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wurde anschließend für 10 sek durch vortexen vermengt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die resultierende Farbreaktion konnte bei einer Wellenlänge von 490 nm im Spektralphotometer gemessen werden. Als Nullwert wurde der Lösungspuffer unter den gleichen Bedingungen eingesetzt. In unabhängigen Messungen wurde jeweils eine Glukose Standardreihe mitgeführt. Aus der gemessenen Absorption der mitgeführten Standardreihe wurde eine Glukose-Eichgerade erstellt und die jeweilige Hexosekonzentration ermittelt.

4.4.7 Bestimmung von Uronsäure (Blumenkrantz, 1973)

Für die Bestimmung von Uronsäure mit diesem Test wurde die Probe in Natriumacetat [50 mM], pH 5 umgepuffert. Die Lösungen und die Proben wurden bei 0°C vorgekühlt und bearbeitet. Zu 200 µl Probe wurde 1,2 ml Di-Natrium-Tetraborat/Schwefelsäure [96%] pipettiert und für 10 sek durch vortexen vermenzt. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert und direkt in Folge für 5 min im Eis gekühlt. Dem Ansatz wurden dann 20 µl Hydroxidiphenyl-Lösung zugegeben. Nach der Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur konnte die Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 520 nm im Spektralphotometer gemessen werden. Als Nullwert wurde der Lösungspuffer unter den gleichen Bedingungen eingesetzt. In unabhängigen Messungen wurde jeweils eine D-Galakuronsäure Standardreihe mitgeführt. Aus der gemessenen Absorption der mitgeführten Standardreihe wurde eine Galakuronsäure-Eichgerade erstellt und die jeweilige Uronsäurekonzentration ermittelt.

4.4.8 PIA Aufarbeitung zur NMR-Spektroskopie

Die hexosaminhaltigen Fraktionen aus der AEC, die im Dot-Immuno-Assay mit spezifischen PIA-Antiserum ein Signal zeigten wurden weiterverarbeitet. Die Proben wurden in einem Dialyseschlauch-MWCO 10.000 (Serva/Heidelberg) zusammengeführt und gegen (5x) Probenvolumen in MQ-Wasser für 2 Stunden bei 4°C auf dem Drehrad dialysiert. Anschließend wurde der, die Probe enthaltende Dialyseschlauch, in ein Becherglas mit 500 ml MQ-Wasser überführt und unter ständigem Rühren für weitere 4 Stunden bei 4°C dialysiert. Daraufhin wurde das MQ-Wasser nocheinmal erneuert und für weitere 16 Stunden bei 4°C dialysiert. Die Probe wurde dann in ein 15 ml Röhrchen überführt, im flüssigen Stickstoff eingefroren und in der Lyophylle getrocknet. In diesem Zustand wurden die Proben zur NMR-Spektroskopie weitergegeben.

4.4.9 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie wurde von Prof. U. Zähringer, Forschungszentrum Borstel durchgeführt (Kooperation SFB 470).

4.5 Quantifizierung von Biofilmbildung

4.5.1 Biofilmtest (Christensen et al., 1982; Mack et al., 1992)

Die Biofilmbildung von Staphylokokken wurde durch einen quantitativen Plattentest in 96-Loch-Zellkulturplatten (Nunc/Wiesbaden) untersucht. 3 ml TSB-Medium ohne Glukose wurden mit einer Kolonie des entsprechenden Bakterienstammes von einer Stammplatte beimpft und 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Für den Test wurden 30 µl dieser Vorkultur in 3 ml des jeweiligen Mediums verdünnt. Es wurden pro Loch 200 µl der verdünnten Bakteriensuspension auf die Platte überführt. Die Platten wurden für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit PBS gespült und die Platte für 4 Stunden bei 37°C getrocknet. Der trockene Biofilm wurde pro Loch mit 50 µl Gentianaviolett-Lösung (Medion Diagnostics/Düdingen, CH) angefärbt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundene Färbelösung wurde daraufhin mit Leitungswasser ausgespült und die Platten für 4 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Quantifizierung des gefärbten Biofilms wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 570 nm (A_{570}) und einer Referenzwellenlänge von 405 nm gemessen. Pro untersuchtem Stamm wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Messwerten ermittelt. Stämme mit einer $A_{570} < 0,1$ wurden als biofilm-negativ betrachtet, Stämme mit einer $A_{570} > 0,1 < 0,5$ als schwache, die mit $A_{570} > 0,5 < 1,0$ als mäßige und solche mit einer $A_{570} > 1,0$ als starke Biofilmbildner.

4.6 Methoden zur Verwendung der Phagenbibliothek

Die verwendete *S. epidermidis* Stamm2 Phagenbibliothek wurde von PD Dr. Christine Heilmann (Institut für medizinische Mikrobiologie, UK Münster) zur Verfügung gestellt.

4.6.1 Bestimmung von Ligand-Phagen Interaktionspartnern

Die Bestimmung von Interaktionspartnern zwischen der *S. epidermidis* Stamm2 Phagenbibliothek und einem spezifischen Liganden wurde in 96-Loch-Maxisorp-Platten (Nunc/Wiesbaden) durchgeführt. Zunächst wurde eine Platte mit 100 µl der Ligand-Lösung pro Loch beschichtet und für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Anschließend wurde die Platte mit 200 µl PBST [0,1 %] pro Loch gewaschen. 200 µl Block-Puffer wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann erneut mit 200 µl PBST [0,1 %] gewaschen. Die beschichtete Platte wurde nun für 4 Stunden bei Raumtemperatur mit der Phagenbibliothek inkubiert, es folgten 20 Waschschrte mit 200 µl PBST [0,1 %] und zwei mit 200 µl Natrium-Citrat-Puffer pH 5,5. Die verbliebenen Phagen wurden je dreimal, erst mit 200 µl Natrium-Citrat-Puffer pH 3,7 dann mit pH 2,1 eluiert. Die Phagen-Suspensionen wurden mit Neutral-Puffer auf pH 7 eingestellt. Es wurden 50 µl phagenkompetente *E.coli* TG1 mit 100 µl der jeweils eluierten Phagen transfiziert, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf 2 % Glukose und Ampicillin [50 mg/ml] enthaltenden LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden für 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Selektionierte Kolonien wurden für die Herstellung von Phagenlysate verwendet, welches erneut zur Interaktions-Bestimmung eingesetzt wurde. Nach drei Interaktions-Bestimmungen in Folge wurden die einzelnen Bakterienkolonien isoliert und die darin enthaltenen Phagmide sequenziert. Phagmide mit integriertem DNA-Fragment wurden mittels BLASTn Algorithmus (www.ncbi.nlm.nih.gov) ausgewertet.

4.6.2 Herstellung von Phagenlysat

Selektionierte, phagmidtragende Bakterien wurden für die Herstellung von Phagenlysat eingesetzt. In 500 μ l LB-Medium wurden 500 Bakterienkolonien resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 50 μ l Helferphage R408 (Promega/Madison, WI) infiziert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in 5 ml LB-Softagar aufgenommen, auf 2 % Glukose und ampicillinhaltige [50 mg/ml] LB-Agarplatten überführt und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde der LB-Softagar von der Agarplatte gelöst, in 2 ml LB-Medium aufgenommen und 2 Stunden bei Raumtemperatur und 160 Upm inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 17210 x g wurde der phagenhaltige Überstand durch einen 45 μ m Spritzenvorsatzfilter (Millipore/Billerica, MA) sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

4.6.3 Anreicherung isolierter Phagen

Eine Kolonie *E. coli* TG1, deren Phagmid ein identifiziertes Insert trägt wurde in 3 ml ampicillinhaltiges LB-Medium angeimpft und für 16 Stunden bei 37°C und 160 Upm inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min und 4°C bei 4332 x g wurde das Zellsediment zweimal in 1 ml antibiotikafreiem LB-Medium gewaschen und daraufhin in 5 ml dieses Mediums aufgenommen. Anschließend wurde die Kultur mit 100 μ l Helferphagen R408 (Promega/Madison, WI) infiziert und für 2 Stunden bei 37°C und 160 Upm inkubiert. 5 ml der Bakterienkultur wurden in 75 ml ampicillinhaltigem LB-Medium verdünnt und weitere 16 Stunden bei 37°C und 160 Upm inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 10 min bei 4°C und 4332 x g zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit 6,5 ml PEG6000/Natriumchlorid-Lösung versetzt. Nachdem Vermengen wurde der Ansatz für 16 Stunden bei 0°C im Kühlraum inkubiert. Das Phagen-Pellet wurde durch eine Zentrifugation für 15 min bei 4332 x g und 4°C gewonnen. Der dekantierte Kulturüberstand wurde verworfen. Nun wurde das Phagen-Pellet in 1 ml PBS resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und noch einmal für 10 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 1/6 (v/v) PEG6000/Natrimchlorid-Lösung versetzt. Für eine Stunde wurde der Ansatz daraufhin im Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde der Überstand mit der Pipette abgenommen und verworfen. Das verbleibende phagenhaltige Pellet wurde in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 min bei 4°C und

12000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der phagenhaltige Überstand durch einen 45 µm Spritzenvorsatzfilter (Millipore/Billerica, MA) sterilfiltriert und zu 4 ml Endvolumen mit LB-Medium aufgefüllt. Die Phagensuspension wurde bei 4°C aufbewahrt.

4.6.4 Bestimmung der Phagenkonzentration im Lysat

Zur Bestimmung der Phagenkonzentration im Lysat wurde im Volumen von 1 ml LB-Medium eine logarithmische Verdünnungsreihe hergestellt. Es wurden 100 µl phagenkompetente *E.coli* TG1 mit 100 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe des Phagenlysates für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde in 3 ml LB-Softagar aufgenommen, auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten überführt und für 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Der Titer wurde über die höchste, noch Kolonien hervorbringende Verdünnungsstufe bestimmt.

4.7 Immunochemische Nachweisverfahren

4.7.1 Absorption polyklonaler Kaninchenantiseren

Die Absorption von polyklonalem Kaninchenantiserum wurde an der isogenen Transposonmutante *S. epidermidis* M10 durchgeführt, da diese keinen PIA-abhängigen Biofilm mehr bilden kann. Zur Anzucht der Bakterien wurde der Stamm aus der Kryostammsammlung (-80°C) durch Ausstreichen auf eine Blutagarplatte reaktiviert. Die Agarplatte wurde daraufhin für 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml TSB-Medium ohne Glukose überimpft und für 5 Stunden bei 37°C und 160 Upm inkubiert. Mit 200 µl Vorkultur wurden 20 ml TSB-Medium Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 160 Upm inkubiert. Die Bakterien wurden für 15 min bei 4°C und 4332 x g zentrifugiert und in 1 ml des in PBS verdünnten Antiserums [1:50] resuspendiert. Bei 37°C und 160 Upm wurde die Bakteriensuspension für 3 Stunden inkubiert und für 10 min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert. Der antikörperhaltige Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei (-20°C) aufbewahrt.

4.7.2 Herstellung des Koagglutinationsreagenz

Für die Herstellung des Koagglutinationsreagenz wurde *S. aureus* Cowan-I vorausgehend präpariert oder eine 1,5 ml Portion der bei -80 °C gelagerten Bakterien auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden für 1 min bei 4°C und 16000 x g zentrifugiert und dreimal in 1 ml PBS_{NaN₃} gewaschen. Anschließend wurden die sedimentierten Bakterien in 900 µl PBS_{NaN₃} aufgenommen, durch vortexen wurden 100 µl polyklonales Antiserum untermischt und der Ansatz wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterienzellen wurden für 1 min bei 4°C und 16.000 x g zentrifugiert, zweimal mit 10 ml PBS_{NaN₃} gewaschen und letztlich in 10 ml PBS_{NaN₃} aufgenommen. Das fertige Koagglutinationsreagenz wurde bei 4 °C gelagert.

4.7.3 Semi-quantitativer Koagglutinationstest

Die Detektion eines spezifischen Antigenes im Koagglutinationstest wurde auf einem Glas-Objektträger (Marienfeld/Lauda-Königshofen) durchgeführt. Es wurden 15 µl des entsprechenden Koagglutinationsreagenz mit 5 µl Probe versetzt und schwenkend für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Koagglutinationsansatz im Auflicht vor dunklem Hintergrund, hinsichtlich der Agglutinat-Quantität bestimmt. Zur Positivkontrolle wurde jeweils eine antigenhaltige Probe und als Negativkontrolle PBS mitgeführt. Für eine semiquantitative Analyse des Antigenes wurde eine geometrische Verdünnungsreihe jeder untersuchten Probe angefertigt.

4.7.4 Dot-Immuno-Assay (DIA)

Mit dem DIA wurde die Antigenkonzentration in Gesamtzelllysaten von Bakterien und allen Fraktionen des aufgereinigten Antigens bestimmt. Die Nitrozellulosemembran (Millipore/Billerica, MA) wurde nach Angaben des Herstellers aktiviert und in PBS äquilibriert. Von jeder Probe wurden 5 µl auf die, feucht gehaltene, Membran aufgetragen. Anschließend wurde die beladene Membran in 50 ml PBS mit 3 % (w/v) Milchpulver für 1 Stunde inkubiert. Alle Inkubationen und Waschschrte wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttelbrett durchgeführt. Die Membran wurde für 10 min in PBST gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation des ersten Antikörpers (absorbiertes polyklonales Kaninchen Antiserum) in einem Verhältnis [1:600]. Nach einer Stunde wurde die Membran dreimal für 10 min mit PBST gewaschen, dann wurde der Zweitantikörper, der direkt mit Merettich-Peroxidase gekoppelt (Dianova/Hamburg) war, für eine weitere Stunde inkubiert. Der monoklonale Antikörper wurde in einem Verhältnis [1:10000] eingesetzt. Die Membran wurde daraufhin zweimal für 10 min mit PBST gewaschen und einmal mit entionisiertem Wasser. Zum Entwickeln wurde die Membran mit ECL-Lösung (Amersham/Freiburg) nach Angabe des Herstellers inkubiert und Signale mittels Röntgenfilm detektiert. Zur Positivkontrolle wurde jeweils eine antigenhaltige Probe mitgeführt. Für eine semiquantitative Analyse des Antigens wurde eine geometrische Verdünnungsreihe der Probe angefertigt.

4.7.5 Kompetitions-DIA

Zur Kompetition wurde 20 µl einer antigenhaltigen Probe mit 60 µl absorbiertem Antiserum aus dem Kaninchen für 1 Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Das Antiserum wurde dann in einem Verhältnis [1:600] im DIA wie unter 4.7.4 beschrieben verwendet.

4.7.6 Kolonie Blot

Im Kolonie Blot wurden Phagmid pG8SAET tragende *E. coli* TG1 Kolonien hinsichtlich der Expression des *e-tag* Reportergenes (Amersham/Freiburg) untersucht. Die Bakterien wurden innerhalb eines Rasters, auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und für 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Die entstandenen Kolonien wurden direkt auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher u. Schüll/Dassel) transferiert, indem die Membran für 1 min bei Raumtemperatur auf die bewachsene Oberfläche der Agarplatte gelegt wurde. Für 1 Stunde wurde die Membran nun über dem Dampf von 1 ml Chloroform in einer geschlossenen Kammer inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 15 min in PBS gewaschen und dann für 1 Stunde in PBS mit 3 % (w/v) BSA inkubiert. Alle Inkubationen und Waschschrte wurden bei Raumtemperatur auf dem Schüttelbrett durchgeführt. Ein weiterer Waschschrte für 10 min mit PBST folgte. Der 1. Antikörper (monoklonaler anti-*e-tag* Antikörper) wurde für 1 Stunde im Verhältnis [1:5000] inkubiert. Daraufhin wurde die Membran dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Der Zweitantikörper (Sigma/München), der direkt mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, wurde für eine weitere Stunde inkubiert. Die Membran wurde erneut zweimal für 10 min mit PBST gewaschen. Zuletzt wurde die Membran einmal mit Färbepuffer gewaschen und anschließend 5 min mit 2 ml Western Blue[®], (Promega/Madison, WI) inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mit 5 ml MQ-Wasser gestoppt und die Membran getrocknet. Zur Negativkontrolle wurde eine Kolonie mitgeführt die das Phagmid ohne DNA-Insertion trägt und Positivkontrolle, ein Phagmid mit integrierter DNA.

4.7.7 Immunfluoreszenztest

Für einen weiteren Antigen Nachweis an Zellen und Zellclustern wurde ein Immunfluoreszenztest mit dem spezifischen Kaninchen Antiserum und einem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in PBS mit einer OD₅₇₀ von 0,2 bis 0,3 resuspendiert und je 20 µl dieser Bakteriensuspension in die Felder eines Objektträgers für Immunfluoreszenz (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) aufgebracht und getrocknet. Die Proben wurden für zwei Minuten in eiskaltem Aceton fixiert und erneut getrocknet. Es wurde auf jedes Feld 20 µl des [1:50] in PBS verdünnten absorbierten Antiserums aufgetragen und für 30 min bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für je drei Minuten in PBS

gewaschen und getrocknet. Es folgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 37 °C in der feuchten Kammer mit je 20 µl Alexa488®-Konjugat [1:500] verdünnt in PBS. Zuletzt wurden die Objektträger zweimal für je drei Minuten in PBS sowie einmal in entionisiertem Wasser gewaschen und getrocknet. Die Objektträger wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axioplan) bei 1.000-facher Vergrößerung beurteilt.

4.7.8 **FP**ELISA (*filamentous phage*, FP)

Um die Bindung spezifischer rekombinanter Phagen am Ligand zu bestimmen wurde eine 96-Loch-Maxisorp-Platten (Nunc/Wiesbaden) mit 100 µl der Ligand-Lösung pro Loch beschichtet und für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Anschließend wurde die Platte mit 200 µl PBST [0,1 %] pro Loch gewaschen. 200 µl Block-Puffer wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und dann erneut mit 200 µl PBST [0,1 %] gewaschen. Die beschichtete Platte wurde nun für 4 Stunden bei Raumtemperatur mit den angereicherten, spezifischen Phagen (3×10^5 [cfu/ml]) inkubiert, es folgten 20 Waschschrte mit 200 µl PBST [0,1 %]. Daraufhin wurde die Platte erneut für eine Stunde mit 200 µl Block-Puffer inkubiert und anschließend dreimal mit 200 µl PBST [0,1 %] gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit 200 µl HRP-(*horseradish peroxidase*) konjugierten anti-M13-Antikörper [1:5000] in PBS. Der Ansatz wurde drei weitere Male mit 200 µl PBST [0,1 %] gewaschen. Nach der Zugabe von 200 µl Tetramethylbenzidin (TMB: 10 ml [0,1 M] Natriumacetat pH 6,0; 100 µl TMB (Stock 10 mg/ml DMSO), 2 µl H₂O₂); wurde dieses durch die Peroxidase in einen blauen Farbstoff umgesetzt. Die Extinktion wurde bei 410 nm gegen 560 nm in einem *ELISA-Reader* gemessen.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des Biofilmphänotyps von *S. epidermidis* 939

Im ersten Teil der Arbeit sollte der Biofilmphänotyp des klinischen *S. epidermidis* Blutkulturisolates 939 weitest gehend untersucht werden. Der Stamm ist durch einen stark biofilmpositiven Phänotyp, vergleichbar mit dem des PIA-Referenzstamms *S. epidermidis* 1457, gekennzeichnet. Im Gegensatz zu *S. epidermidis* 1457 konnte in präliminären Experimenten nur eine schwache Reaktivität von einfachen Ultraschallextrakten des Stamms *S. epidermidis* 939 mit einem PIA-spezifischen Kaninchenantiserum gefunden werden (Knobloch et al., 2002; Mack et al., 1996b).

Untersuchung der Biofilmbildung bei S. epidermidis 939

Unter Verwendung des semiquantitativen Biofilmtest sollte zunächst die Fähigkeit von *S. epidermidis* 939 zur Biofilmbildung experimentell dargestellt werden. In diesen Experimenten wurde *S. epidermidis* 1457 (PIA- und biofilmpositive Positivkontrolle) und die Mutante 1457-M10 (PIA- und biofilmnegative Negativkontrolle) mitgeführt.

Beim Stamm *S. epidermidis* 939 wurde mit A_{570} 1,1 starke Biofilmbildung gemessen, genauso wie bei 1457 mit A_{570} 2,2. Das Ergebnis der Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 war mit $A_{570} < 0,1$ erwartungsgemäß negativ. Durch diese Untersuchung konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* 939 einen stark biofilmpositiven Phänotyp aufweist.

Neben PIA- sind auch Protein-abhängige Biofilme bekannt (Rohde et al., 2005). Um zu prüfen, ob Proteine und / oder PIA funktionell an der Biofilmbildung des Stamms *S. epidermidis* 939 beteiligt sind, wurden etablierte Biofilme der Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457 mit Dispersin B (DspB) und Trypsin behandelt. DspB ist eine spezifische β -(1,6)-Hexosaminidase und zerstört daher die β -(1,6)-N-Acetylglukosamin-Struktur von PIA.

Es zeigte sich, dass DspB in der Lage war, den Biofilm von *S. epidermidis* 939 genauso wie den PIA-abhängigen Biofilm von 1457 zu desintegrieren. Dieser Effekt kann auf eine Zerstörung von PIA zurückgeführt werden (Itoh et al., 2005). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung des Stamms *S. epidermidis* 5179-R1, welcher einen Aap-abhängigen Biofilm ausbildet (Rohde et al., 2005), zu keiner Zerstörung des Biofilms. Der Biofilm dieses Stamms

wurde jedoch durch Trypsin zerstört, während die Protease keinen Einfluss auf den Biofilm des Stamms 939 hatte (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine β -(1,6)-verknüpfte Hexosaminstruktur und nicht Proteine funktionell in die Biofilmbildung des Stamms *S. epidermidis* 939 involviert sind.

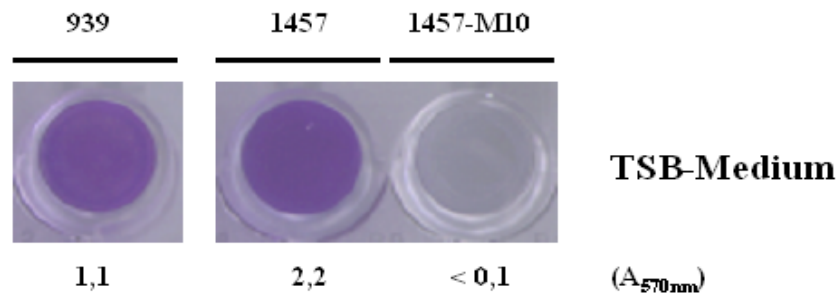


Abbildung 6: Biofilmbildung der Stämme *S. epidermidis* 939, 1457 und 1457-M10 in TSB-Medium. Die Stämme *S. epidermidis* 939, 1457 und der isogenen Δ *icaA*-Mutante 1457-M10 wurden in TSB-Medium kultiviert. Nach 16 Stunden wurden nicht adhärenente Zellen durch Spülen entfernt und angeheftete Zellen mit Gentianaviolett-Lösung angefärbt. Die bei 570 nm ermittelte Absorption ($A_{570\text{nm}}$) kann dann als Maß für die Biofilmbildung verwendet werden.

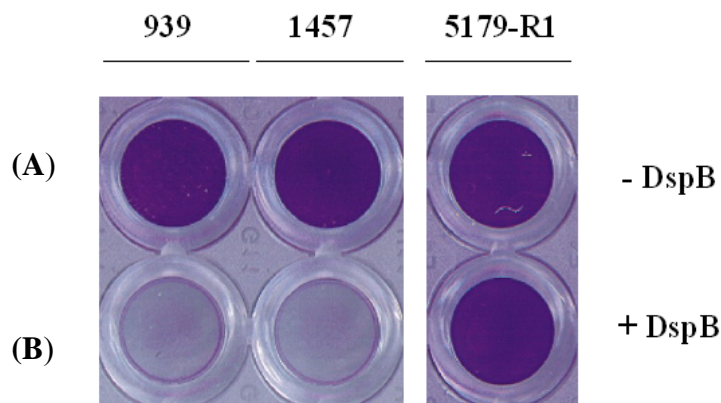


Abbildung 7: Wirkung von Dispersin B (DspB) auf Biofilme der Stämme *S. epidermidis* 939, 1457 (PIA-positiv) und 5179-R1 (PIA-negativ, Aap-positiv). Die PIA-abhängigen Biofilme von *S. epidermidis* 939, 1457 und des Protein-abhängigen von 5179-R1 wurden (A) ohne DspB und (B) supplementiert mit DspB ([10 μ g/ml]) inkubiert. Nach 6 Stunden wurden die verbleibenden Zellen mit Gentianaviolett-Lösung angefärbt und die Absorption (A_{570}) im Photometer gemessen.

Nachweis von PIA auf der Oberfläche von S. epidermidis 939 und 1457 mittels Immunfluoreszenztest (IFT)

Wenn bei *S. epidermidis* 939 PIA- oder eine strukturell eng verwandte Struktur an der Biofilmbildung beteiligt ist, so sollte dies immunologisch unter Verwendung eines PIA-spezifischen Antikörpers im Immunfluoreszenztest (IFT) nachweisbar sein. Der IFT bestätigte die Lokalisation von PIA oder einer immunologisch eng verwandten Struktur auf der Oberfläche von *S. epidermidis* 939 genauso wie bei 1457. Auf der Oberfläche von der Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 konnte erwartungsgemäß kein PIA dargestellt werden.

Der Stamm *S. epidermidis* 1457 präsentiert flächige, dicht aneinander und übereinander gelagerte Zellaggregate, eine typische Zellformation der biofilmbildenden Bakterien. In übereinandergelagerten Bereichen kommt es zu einer gesteigerten Fluoreszenzintensität, die als Resultat einer erhöhten lokalen PIA-Konzentration betrachtet werden kann. Auch bei *S. epidermidis* 939 kann im Bereich von Zellanhäufung diese gesteigerte Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Jedoch bildeten die Zellen hier keine großflächigen Zellcluster, vielmehr wurden viele kleinere Zellhäufen sichtbar. Die Tatsache das PIA an *S. epidermidis* 939 Zellen ebenfalls mit dem anti-PIA-Antiserum im Immunfluoreszenztest detektiert wird lässt auf ein strukturell sehr ähnliches Molekül schließen. Auffällig war jedoch im Vergleich zu *S. epidermidis* 1457 eine insgesamt inhomogenere Verteilung der Fluoreszenz auf der Zelloberfläche.

Mit dem Ziel, die PIA-Synthese der Stämme *S. epidermidis* 1457 und 939 zu quantifizieren, wurden Ultraschallextrakte der Biofilmmatrix beider Stämme semi-quantitativ im Dot-Immuno-Assay (DIA) analysiert.

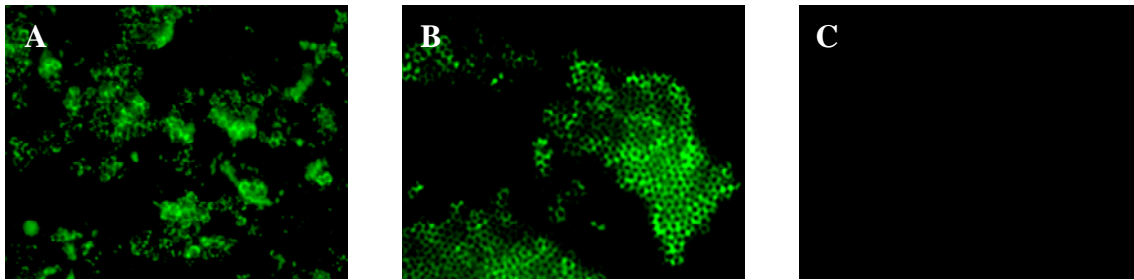


Abbildung 8: Lokalisation von PIA auf der Oberfläche von *S. epidermidis* 939, 1457 und 1457-M10. Die Bakterienstämme (A) *S. epidermidis* 939 (B) 1457 und (C) 1457-M10 wurden in TSB-Medium unter statischen Bedingungen in einer Zellkulturschale kultiviert. Nach 22 Stunden wurden die Zellen geerntet und auf eine OD_{600} von etwa 0,3 eingestellt. PIA wurde dann unter Verwendung eines spezifischen anti-PIA-Antiserums [1:30000] und einem Fluoreszenz gekoppelten sekundären Antikörper [1:500] auf der Oberfläche der Zellen dargestellt.

PIA Nachweis in Biofilmmatrixextrakten von S. epidermidis 939 und 1457 mittels Dot-Immuno-Assay

Durch eine milde Ultraschallbehandlung können an der Zelloberfläche von *S. epidermidis* lokalisierte, nicht-kovalent gebundene Matrixbestandteile einfach präpariert werden (Mack et al., 1996a). Die PIA-Konzentration in den gewonnenen Extrakten von *S. epidermidis* 939 und 1457 wurde dann dem Dot-Immuno-Assay (DIA) analysiert. Der PIA-negative Stamm *S. epidermidis* 1457-M10 (Mack et al., 1994) wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Das Standardmedium für die Kultivierung von *S. epidermidis* 1457 zur PIA Präparation ist *trypticase soya broth* (TSB). In Untersuchungen zu *S. epidermidis* RP62A wurde daneben, der Einfluss der Kultur in *brain heart infusion* (BHI) auf die PIA Synthese dokumentiert (Sadovskaya et al., 2005).

Deshalb sollte auch in dieser Arbeit untersucht werden, ob es bei Kulturen von *S. epidermidis* 939 und 1457 in TSB und BHI zur Synthese unterschiedlicher PIA-Mengen kommt. Für die Untersuchung wurde antigenhaltiger Extrakte aus statischen Bakterienkulturen hergestellt und durch PIA spezifisches Antiserum mit dem DIA dargestellt. Der Antigen-Titer wurde durch geometrisches Ausverdünnen des Extraktes bestimmt. Bei *S. epidermidis* 1457 konnte nach Kultur in TSB, PIA bis zu einer Verdünnungsstufe von [1:64] nachgewiesen werden. Die Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 war erwartungsgemäß PIA-negativ. Bei Stamm *S. epidermidis* 939 wurde PIA bis zu einer Verdünnungsstufe von [1:8] nachgewiesen. Bei Kultur der Stämme in BHI zeigte sich im DIA, ein im Vergleich zur Kultur in TSB unterschiedliches Bild. Bei *S. epidermidis* 1457 war nur noch ein deutlich geringerer PIA-Titer von [1:16] bestimmt worden. Bei *S. epidermidis* 939 konnte gar kein PIA mehr nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise war dagegen bei der *icaA*-Mutante, die kein PIA mehr bilden kann, dass in BHI im DIA ein Signal bis zu einer Verdünnung von [1:4] nachweisbar war.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der Biofilmmatrix des Stamms *S. epidermidis* 939 offensichtlich eine PIA-verwandte Struktur vorhanden ist. Diese wird offenbar nur bei Kultur in TSB, nicht jedoch in BHI, synthetisiert. Es wird auch deutlich, dass im Vergleich zu *S. epidermidis* 1457 trotz eines quantitativ ähnlichen, biofilmpositiven Phänotyps geringere Mengen PIA gebildet werden. Dies kann, in Zusammenschau mit den oben beschriebenen phänotypischen Ergebnissen als möglicher Hinweis darauf gewertet werden, dass PIA des Stamms *S. epidermidis* 939 strukturelle Modifikationen aufweist, die letztlich in einer Veränderung der immologischen Reaktivität resultieren.

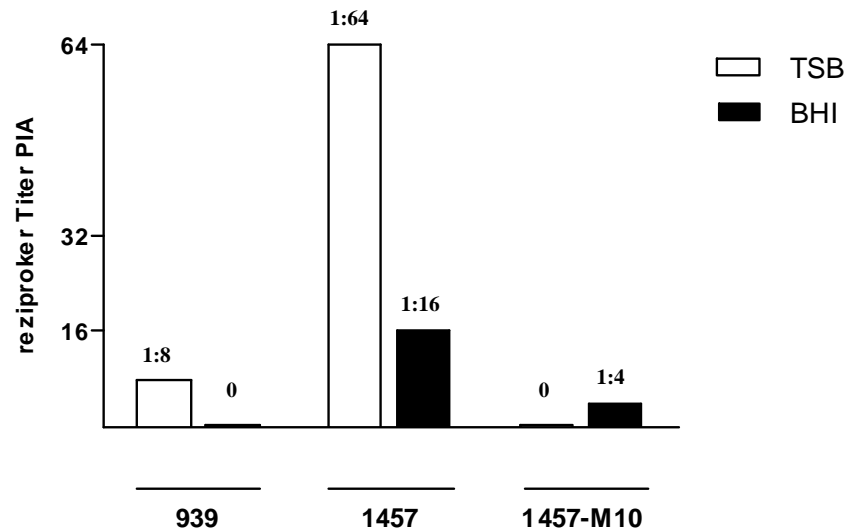


Abbildung 9: Quantitative Analyse der PIA-Synthese von *S. epidermidis* 939, 1457 und 1457-M10 bei Kultur in TSB oder BHI. Die Bakterienstämme *S. epidermidis* 939, 1457 und 1457-M10 wurden in (□) TSB (■) BHI als statische Kultur kultiviert. Nach 22 Stunden wurden die Zellen geerntet, die Zell assoziierte Biofilmmatrix wurde durch Ultraschallbehandlung gewonnen und die so erzeugten Rohextrakte wurden geometrisch verdünnt auf eine PVDF-Membran aufgebracht. PIA wurde mit dem spezifischen anti-PIA-Antiserum [1:30000] und einem Peroxidase gekoppelten, sekundären Antikörper [1:10000] im DIA nachgewiesen. Die dargestellten Balken entsprechen den reziproken Titern, bei welchen noch Reaktivität nachweisbar war.

5.2 Expression von *icaADBC* aus *S. epidermidis* 939 und 1457 in *S. carnosus* TM300

Durch Sequenzierung von *icaADBC* konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* 939 im Gen, welches für die N-Acetylglukosamintransferase IcaA kodiert, im Vergleich zur Sequenz des Gen *icaA* in *S. epidermidis* 1457 mehrere Punktmutationen aufweist, welche zu einer Änderung der abgeleiteten Aminosäuresequenz führen (siehe Anhang 9.1). Es ist erkannt, dass Aminosäurepolymorphismen zu einer veränderten Substratspezifität von Glykosyltransferasen führen können. Um zu prüfen, ob der in *icaADBC*-kodierte Enzymapparat des Stamms *S. epidermidis* 939 per se ein Polysaccharid mit einer im Vergleich zu PIA des Stamms *S. epidermidis* 1457 veränderten immunologischen Reaktivität bildet, sollten *icaADBC* beider Stämme in den Vektor pAS1 kloniert und im Surrogatwirt *S. carnosus* TM300 exprimiert werden.

Klonierung von icaADBC₉₃₉ und icaADBC₁₄₅₇ in pAS1

Um *icaADBC* der Stämme *S. epidermidis* 939 (*icaADBC₉₃₉*) und 1457 (*icaADBC₁₄₅₇*) in pAS1 zu klonieren wurden die Sequenzen zunächst unter Verwendung einer *proof reading* Polymerase amplifiziert. Anschließend mittels TA-Klonierung in den Vektor pCR4 (Invitrogen) eingebracht. Nach Spaltung der hierbei entstandenen Plasmide pCRica₉₃₉ und pCRica₁₄₅₇ durch die mit der Amplifikation eingebrachten Restriktionsschnittstellen *AvaI* und *SacI* wurden die Inserts durch Gelaufreinigung präpariert und in den Vektor pAS1 ligiert. Die resultierenden Konstrukte pSFicaADBC₉₃₉ und pSFicaADBC₁₄₅₇ konnten daraufhin in *E. coli* Top10 transformiert werden. Aus *E. coli* gewonnene Plasmide pSFicaADBC₉₃₉ und pSFicaADBC₁₄₅₇ wurden dann in den restriktionsdefizienten Stamm *S. aureus* RN4220 elektroporiert, um hierdurch ein staphylokokkenkompatibles DNA-Methylierungsmuster der Konstrukte zu erzeugen. Die aus *S. aureus* RN4220 präparierten Konstrukte wurden schließlich durch Protoplastentransformation in den *icaADBC*- und biofilmmnegativen *S. carnosus* TM300 eingebracht. In pAS1 kodiert *icaADBC* unter der Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors und somit kann die Expression der Gene und damit der PIA-Synthese durch Supplementierung des Mediums mit Xylose gesteuert werden (Abbildung). Die Korrektheit der Plasmide und Klone wurde an jedem Zwischenschritt durch Sequenzierung oder Restriktionsverdau dargestellt (Daten nicht gezeigt). Um vor Beginn der

phänotypischen Untersuchungen sicher zu stellen, dass die verwendeten Stämme *S. carnosus* (pSFicaADBC₉₃₉) und *S. carnosus* (pSFicaADBC₁₄₅₇) klonal mit dem Wildtypstamm *S. carnosus* TM300 identisch waren, wurden eine Typisierung mittels PFGE durchgeführt. Hierzu wurde *Sma*I gespaltene Ganz-Zell-DNA mittels Pulsfeldgelelektrophorese aufgetrennt. Die resultierenden Bandenmuster können dann genutzt werden, um Verwandtschaftsbeziehungen von Staphylokokkenstämmen zu untersuchen. Für die Plasmid tragenden Bakterienstämme *S. carnosus* SF939 und SF1457 wurde die Übereinstimmung mit dem Schnittmuster des Wildtyps *S. carnosus* TM300 bestätigt.

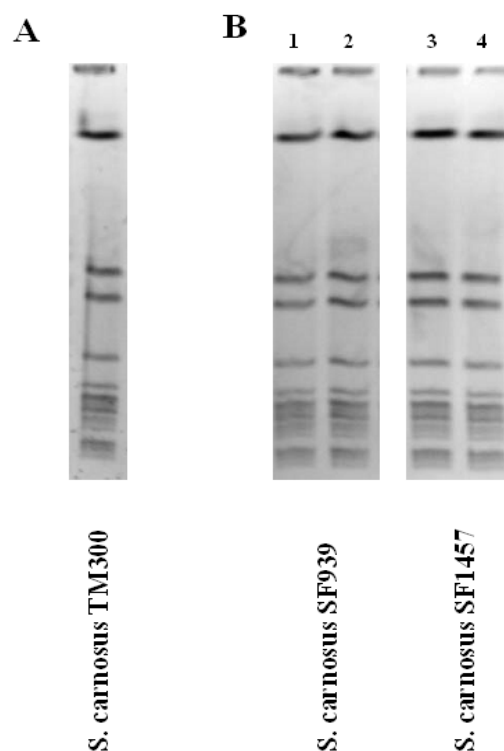


Abbildung 10: Pulsfeldgelelektrophorese von Wildtyp *S. carnosus* TM300, *S. carnosus* SF939 und SF1457. Die Pulsfeldgelelektrophorese (A) des heterologen Wildtypstamms *S. carnosus* TM300 und (B) von *S. carnosus* SF939 (Spuren 1 und 2) und, *S. carnosus* SF1457 (Spuren 3,4) zeigt die klonale Übereinstimmung der untersuchten Stämme. Die durch *Sma*I-Spaltung erzeugten Banden wurden durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromid dargestellt.

Analyse des BiofilmpHänotyps der Stämme *S. carnosus* SF939 und SF1457

Zunächst sollte geprüft werden, ob die Expression von *icaADBC* der Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457 nach *in trans* Expression einen biofilmpositiven Phänotyp von *S. carnosus* TM300 induziert. Hierzu wurde der BiofilmpHänotyp der Stämme *S. carnosus* SF939 und SF1457 in TSB supplementiert mit 1,5% Xylose getestet.

Die Mutante *S. carnosus* SF939 wie auch SF1457 bilden in Anwesenheit von Xylose, also unter *icaADBC* induzierbaren Bedingungen, einen Biofilm. Dabei war *S. carnosus* SF939 mit A_{570} 0,4 als schwacher und SF1457 mit A_{570} 0,8 als mäßiger Biofilmbildner einzuordnen. Somit scheinen sowohl *icaADBC* des Stamms *S. epidermidis* 939 und des Stamms 1457 funktionell aktive Enzymsysteme zu kodieren, die zur Synthese einer interzellulär adhäsiven Struktur führen. Um zu prüfen, ob es sich bei dieser tatsächlich um PIA handelt, wurden die Mutanten unter Verwendung des PIA-Antiserums im Immunfluoreszenztest und DIA untersucht.

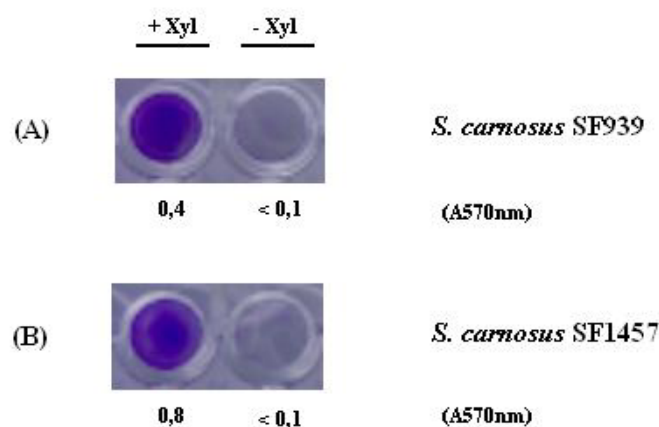


Abbildung 11: Untersuchung der Biofilmbildung von *S. carnosus* SF939 und SF1457 im Biofilmassay. Durch die Xylose-induzierte *in trans* Expression der PIA-Syntheseenzyme *icaADBC* kommt es bei (A) *S. carnosus* SF939 und (B) SF1457 zur Biofilmbildung. Nach 16 Stunden wurden die angehefteten Zellen mit Gentianaviolett-Lösung angefärbt und die Absorption (A_{570}) im Photometer gemessen.

Untersuchung der PIA-Synthese von S. carnosus SF939 und SF1457 im Immunfluoreszenztest

Um die Synthese von PIA nach *in trans* Expression von *icaADBC* der Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457 in *S. carnosus* zu prüfen, wurden die Stämme *S. carnosus* SF939 und SF1457 unter *icaADBC*-indizierenden Bedingungen über Nacht angezüchtet und mittels eines Immunfluoreszenztests untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl die Mutante SF939 wie auch SF1457 ein mit PIA-Antiserum reagierendes Material produzierten. Da die Mutanten nach Anzucht in TSB ohne Xylose wie auch der Wildtyp *S. carnosus* TM300 keinerlei Reaktivität mit dem Antiserum aufweisen, kann angenommen werden, dass die Expression von *icaADBC* sowohl des Stamms 1457 wie auch des Stamms 939 zur Synthese von PIA führen.

Die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests lassen lediglich eine qualitative Aussage über die PIA-Synthese zu. Um nun die Hypothese, dass die Expression von *icaADBC*₉₃₉ und *icaADBC*₁₄₅₇ zur Synthese von PIA mit einer unterschiedlichen anti-PIA-Antiserum Reaktivität führt, zu prüfen, wurden Zellextrakte semiquantitativ im DIA untersucht.

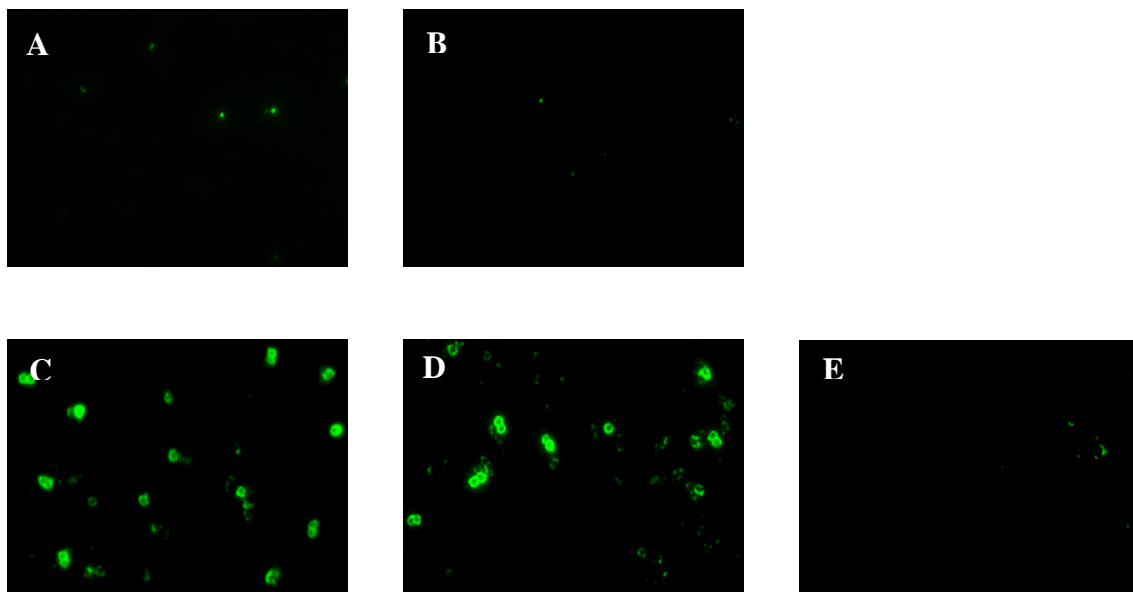


Abbildung 12: Untersuchung der PIA-Synthese von *S. carnosus* SF939 und SF1457. Die nicht induzierten Mutanten (A) SF939 (B) SF1457 blieben im IFT negativ. Bei den Xylose-induzierten induzierten Mutanten (C) SF939 und (D) SF1457 wurde PIA synthetisiert und durch das spezifische PIA-Antiserum nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurde (E) *S. carnosus* TM300 ohne Plasmid mitgeführt. Die Induktion der Plasmide erfolgte durch Zugabe von 1,5% (w/v) Xylose in glukosefreies TSB-Medium. Nach 22 Stunden wurden die Zellen präpariert ($OD_{600} \sim 0,3$). Mit dem spezifischen PIA-Antiserum [1:30000] und dem Fluoreszenz gekoppelten sekundären Antikörper [1:500] konnte PIA an der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden.

Untersuchung der PIA-Synthese von S. carnosus SF939 und SF1457 mittels Dot-Immuno-Assay (DIA)

Wesentliche Motivation zur heterologen Expression von *icaADBC*₉₃₉ und *icaADBC*₁₄₅₇ war die Frage, ob durch die auf den unterschiedlichen Allelen kodierten Enzymsystemen Polysaccharide mit differentiellen immunologischen Eigenschaften synthetisiert werden. Um diese Frage zu klären, wurden Ultraschallextrakte von Biofilmkulturen der Mutanten SF939 und SF1457 hergestellt und in einer geometrischen Verdünnungsreihe auf eine PVDF Membran aufgebracht. Die Analyse der quantitativen PIA-Synthese erfolgte dann unter Verwendung des spezifischen PIA-Antiserum. Bei Synthese von Molekülen mit unterschiedlichen immunologischen Eigenschaften sollten auch nach *in trans* Expression, wie auch beim Vergleich von *S. epidermidis* 939 und 1457, unterschiedliche PIA-Titer nachweisbar sein. In den Extrakten aus Xylose-induzierten Kulturen der Stämme *S. carnosus* SF939 und SF1457 konnten gleichermaßen ein PIA-Titer von 1:8 nachgewiesen werden. In den Extrakten der Negativkontrolle *S. carnosus* TM300 und den nicht induzierten Mutanten war mit dem Antiserum kein PIA-spezifisches Signal nachweisbar. Nach *in trans* Expression von *icaADBC* im heterologen Wirt konnte die unterschiedliche Immunoreaktivität von PIA der Stämme *S. epidermidis* 1457 und 939 nicht mehr nachgewiesen werden.

Dies spricht dafür, dass nicht die in *icaA* nachgewiesenen Nucleotid-Polymorphismen zu einer Veränderung der Substratspezifität der N-Acetylglukosaminyltransferase führt. Vielmehr wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass die veränderte immunologische Reaktivität möglicherweise aus sekundären Modifikationen von PIA resultiert. Um diese Hypothese zu prüfen, sollte PIA des Stamms *S. epidermidis* 939 aufgereinigt und strukturell charakterisiert werden.

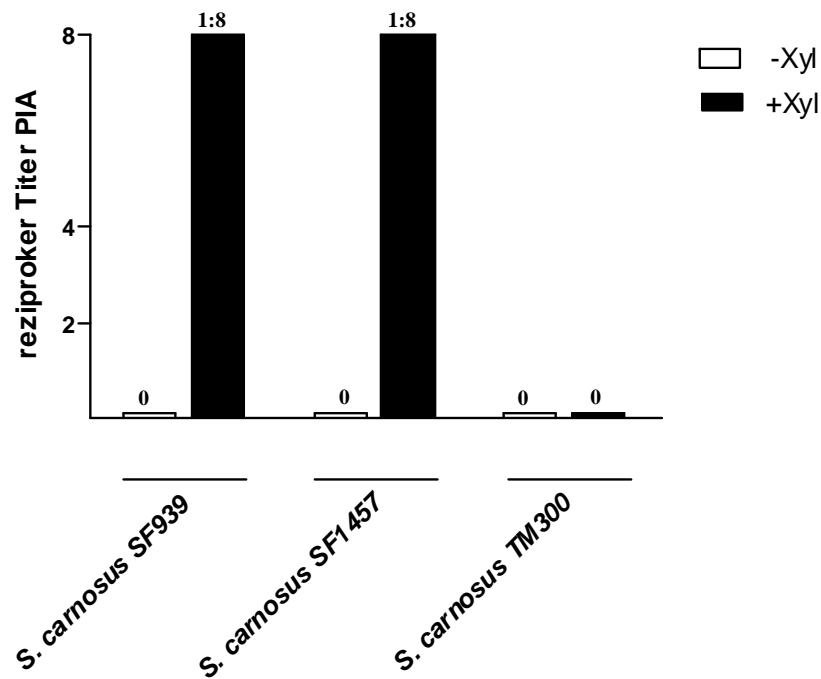


Abbildung 13: Quantitative Analyse der PIA Synthese in *S. carnosus* SF939 und SF1457. Die Zellen von *S. carnosus* SF939 und SF1457 wurden in glukosefreiem TSB-Medium kultiviert unter (□) nicht-induzierten wie auch durch Zugabe von 1,5% (w/v) Xylose unter (■) *icaADBC*-induzierenden Bedingungen. Als Negativkontrolle wurde *S. carnosus* TM300 ohne Plasmid mitgeführt. Nach 22 Stunden wurden die Extrakte gewonnen und daraus eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt. PIA wurde mit dem spezifischen anti-PIA Antiserums [1:30000] und einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper [1:10000] im DIA detektiert. Der angegebene reziproke PIA-Titer entspricht die Verdünnungsstufe des Extrakts, bei welcher gerade noch ein spezifisches Signal nachweisbar war.

5.3 Reinigung von Extrakt aus dem Wildtypstamm *S. epidermidis* 939 und 1457

Für die Gewinnung von Extrakt aus *S. epidermidis* 939, 1457 und 1457-M10 wurden die Stämme kultiviert und anschließend zur Gewinnung von Zelloberflächen-assoziierten Biofilmmatrixbestandteilen sonifiziert. Der daraus resultierende lösliche Überstand wurde durch Gelpermeationschromatographie (GPC), nach Größe der enthaltenen Moleküle getrennt. Die PIA-haltigen Anteile des 939-Extraktes aus *S. epidermidis* 939 wurden durch den Koagglutinationstest und den DIA mittels des PIA-spezifischen Antiserums detektiert. Antigenhaltige Fraktionen wurden vereinigt und mit einem zweiten Schritt durch die Anionenaustauschchromatographie in ihre ionischen Anteile getrennt. Dabei bindet die kationische Säulenmatrix freie anionische Gruppen, des über die Säule geleiteten Materials. Durch einen linear ansteigenden NaCl [1M] Gradient werden anschließend die gebundenen Moleküle wieder von der Säulenmatrix eluiert. In den aufeinanderfolgenden Fraktionen eluieren Moleküle mit zunehmendem anionischen Charakter. Da die Extrakte primär zur Präparation von interzellulären Polysaccharid-Adhäsine (PIA) hergestellt wurden, sollte vergleichsweise auch der Extrakt aus *S. epidermidis* 1457 (1457-Extrakt) und aus der PIA-negativen Mutante 1457-M10 (M10-Extrakt) mitgeführt werden.

Da die Bakterien des Stamms *S. epidermidis* 939 in dialysiertem TSB kultiviert werden sollten genauso wie es für 1457 beschrieben war (Mack et al., 1996a), musste der Aufreinigung vorausgehend die Biofilmbildung und PIA-Synthese geprüft werden.

Nachweis von Biofilmbildung und PIA im Extrakt von S. epidermidis bei Kultivierung in dialysiertem TSB

Der nächste Ansatz sollte den Einfluss von dialysiertem TSB auf die Biofilmbildung untersuchen. Durch die Dialyse werden die hochmolekularen Substanzen (≥ 10 kDa) ausgeschlossen, um Verunreinigungen durch Bestandteile des Mediums bei der Aufreinigung zu vermeiden. Jedoch musste sichergestellt werden, dass es durch den zusätzlichen Reinigungsschritt des Mediums, nicht zu einer Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Biofilmbildung von *S. epidermidis* 939 kam.

Die Biofilmbildung wurde vergleichsweise zur Kultivierung in nicht-dialysiertem Medium bei *S. epidermidis* 939 genauso wie bei 1457 reduziert (siehe Abbildung 6). Die Absorption bei 570 nm verringerte sich gleichermaßen um 0,4 Absorptionseinheiten, dabei handelt es sich jedoch um einen nicht signifikanten Unterschied. Durch die Verwendung von dialysiertem Medium zeigte sich zudem, wie sensibel die biofilmbildenden Bakterien auf veränderte Kulturbedingungen reagieren. Durch veränderte Umweltfaktoren kam es unmittelbar zu dynamischen Veränderungen des Biofilms.

Der Untersuchung im Biofilmtest schloss sich auch bei Verwendung von dialysiertem Kulturmedium ein DIA der ausverdünnten Extrakte von *S. epidermidis* 939, 1457 und 1457-M10 an. Dabei sollte PIA-Synthese in den Zellen überprüft werden, unter den Bedingungen, wie sie für die Aufreinigung des mit PIA-Antiserum reaktiven Materials notwendig waren.

In diesem Experiment wurden die PIA-Extrakte aus einer Schüttelkultur gewonnen, unter den Bedingungen wie sie für die Aufreinigung herrschen. Der Stamm *S. epidermidis* 1457-M10 bildete weder in dialysiertem noch in nicht-dialysiertem TSB-Standardmedium PIA. Bei *S. epidermidis* 1457 war der PIA-Titer in dialysiertem [1:8] und in nicht-dialysiertem TSB [1:16]. Im Extrakt von *S. epidermidis* 939 ließ sich PIA in dialysiertem TSB bis zu einer Verdünnungsstufe von [1:4] nachweisen und ohne die zusätzliche Aufreinigung bis zur Verdünnung von [1:8]. Der Titer wurde sowohl bei *S. epidermidis* 939 als auch bei 1457 durch die Dialyse um eine Verdünnungsstufe reduziert. Dennoch wurde in beiden Stämmen, nach der Dialyse des Mediums, synthetisiertes PIA bestimmt. Die Kultivierung der Bakterien für die Gewinnung von Extrakt aus *S. epidermidis* 939 wurde deshalb ebenso wie für 1457 und 1457-M10, in dialysiertem TSB durchgeführt.

Ob es sich bei der unterschiedlichen Immunreaktivität der 939- und 1457-Extrakte, durch das PIA-Antiserum, um einen quantitativen Unterschied des reaktiven Materials handelt, kann erst nach analytischer Aufarbeitung der Substanz geklärt werden.

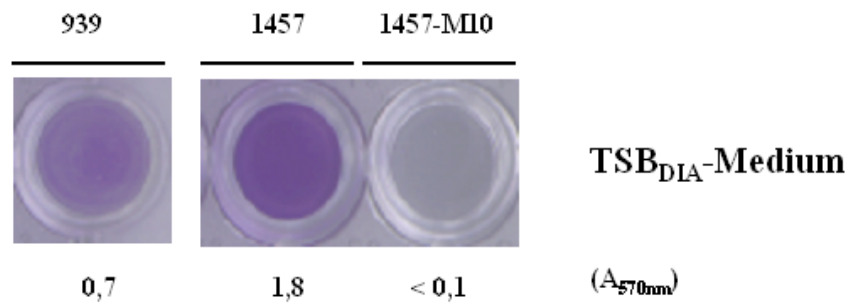


Abbildung 14: Biofilmbildung in dialysiertem TSB. Die Stämme *S. epidermidis* 939, 1457 und der isogenen Δ *icaA*-Mutante 1457-M10 wurden in dialysiertem TSB kultiviert. Nach 16 Stunden wurden angeheftete Zellen mit Gentianaviolett-Lösung angefärbt und die Absorption (A_{570}) im Photometer gemessen.

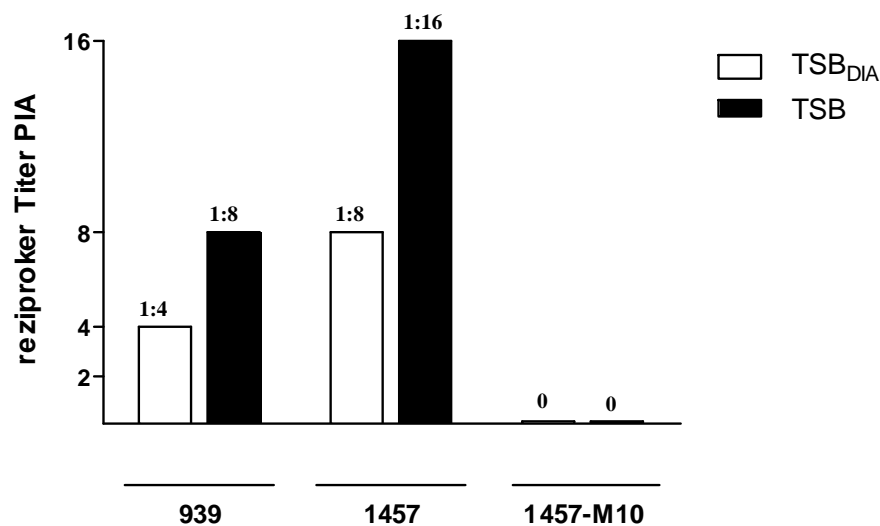


Abbildung 15: Einfluss von dialysiertem TSB auf die PIA Synthese. Die Bakterienstämme *S. epidermidis* 939, 1457 und 1457-M10 wurden in (□) dialysiertem (■) nicht dialysiertem TSB kultiviert. Nach 22 Stunden wurden die Rohextrakte extrahiert und im DIA dargestellt mit PIA-Antiserum [1:30000] und einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper [1:10000].

Gelpermeationschromatographie (GPC)

In der Sephacryl-200 Säule zeigte sich, dass die mit dem spezifischen PIA-Antiserum reagierenden Anteile des Biofilmmatrixextraktes von Stamm 939 analog zu Stamm 1457 als hochmolekulare Substanzen nahe dem Ausschlussvolumen der Säulenmatrix eluieren. Bei beiden Stämmen konnte ein einziger, mit anti-PIA-Antiserum darstellbarer *peak* nachgewiesen werden, der mit den hexosaminhaltigen Fraktionen korrespondiert. Das ermittelte Molekulargewicht der PIA-haltigen Biofilmmatrixbestandteile konnte durch vorausgehende Eichung der Säule mit, Blue Dextran 2000 (Amersham/Freiburg) mit etwa 2 MDa festgelegt werden und stimmt mit den Vergleichsdaten des Extraktes aus *S. epidermidis* 1457 überein (Diplomarbeit C. Fischer). In den Präparationen der Mutante 1457-M10 konnte in den zu 939 und 1457 korrespondierenden Fraktionen, kein mit anti-PIA-Antiserum reagierendes Material nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

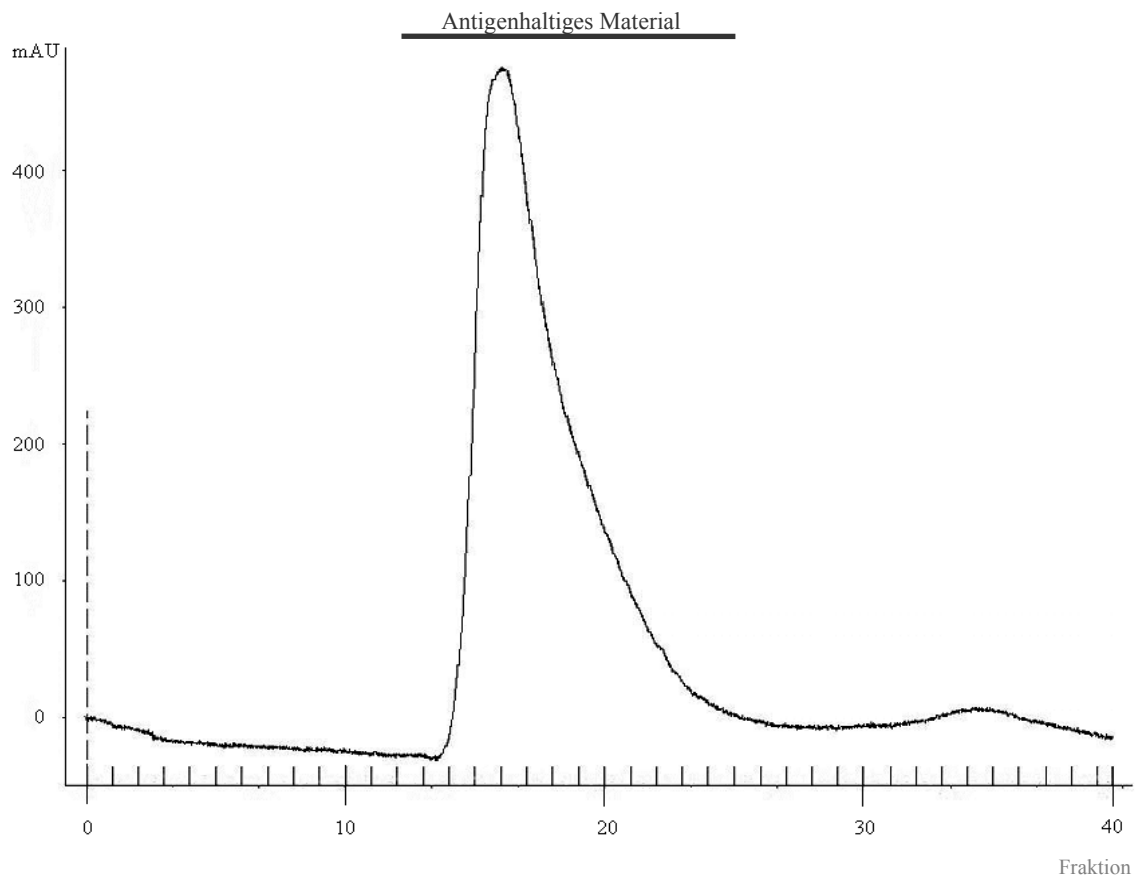


Abbildung 16: Elutionsprofil Biofilmmatrixextrakt des Stamms 939 nach GPC. Es wurden 10 ml 939-Matrixextrakt mit 45 ml PBS durch die Sephacryl-S200 Säulenmatrix geleitet. Das Eluat wurde fortlaufend in 1,5 ml Fraktionen gesammelt. Gezeigt ist das bei einer Wellenlänge von 255 nm aufgezeichnete Chromatogramm. Der Elutionsverlauf des Extraktes aus *S. epidermidis* 939 ist durch ein Absorptionsspektrum, im Größenbereich von 2 MDa. Gekennzeichnet. Die hier gefundenen Fraktionen (12 – 26) enthalten Material, welches mit PIA-Antiserum reagiert. Diese wurden vereinigt und in das Volumen von 10 ml eingengt. Anschließend wurde das Material unmittelbar in der Anionenaustauschchromatographie weiterverarbeitet. Ein vergleichbares Elutionsprofil wurde auch bei der Analyse von Matrixextrakten des Stamms 1457 gewonnen.

Hexosaminbestimmung

Die milde saure Hydrolyse deacetyliert die Aminogruppen an Hexosamin Molekülen vollständig und ermöglicht so eine absolute Hexosamin-Bestimmung der gereinigten Extrakte.

Durch den von Smith und Gilkerson beschriebenen Assay wurde für den Stamm *S. epidermidis* 939 ein maximaler Hexosamingehalt von 588 nmol/ml in Fraktion 17 bestimmt und für 1457 in Fraktion 19 ein maximaler Wert von 769 nmol/ml. In der Mutante 1457-M10 wurde in den Fraktionen 16 und 17 die maximale Hexosaminkonzentration von 105 nmol/ml nachgewiesen. Da der Hexosamingehalt in der Mutante 1457-M10 deutlich geringer ist als in *S. epidermidis* 939 und 1457, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Material dieser Stämme um PIA handelte und aus diesem Grund wurde es unmittelbar in der Anionenaustauschchromatographie weiterverarbeitet.

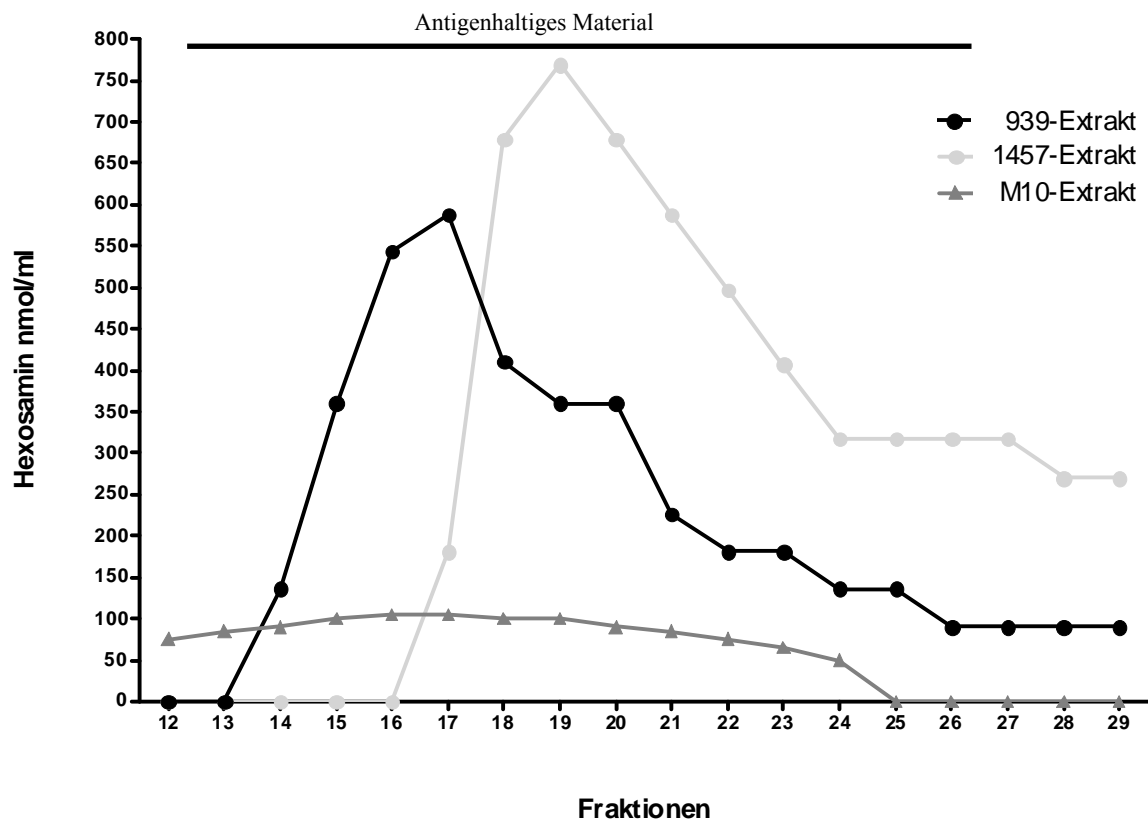


Abbildung 17: Hexosaminelutionsprofil der durch GPC gereinigten, hochmolekularen Biofilmextrakte der Stämme *S. epidermidis* 939, 1457 und der Mutante 1457-M10. Die Hexosaminkonzentration nach GPC bei [●] 939-Extrakt Max. 588 nmol/ml (Fraktion 17) [●] 1457-Extrakt Max. 769 nmol/ml (Fraktion 19). Die hexosaminhaltigen Fraktionen korrespondieren weitestgehend mit den Absorptionsmaxima *peak* des Extraktes (Abbildung y). [▲] Im M10-Extrakt aus der Mutante *S.epidermidis* 1457-M10 wurde hexosaminhaltiges Material Max. 105 nmol/ml (16, 17) nachgewiesen.

Anionenaustauschchromatographie (AEC)

Die vereinigten und aufkonzentrierten, mit dem PIA-Antiserum reaktiven Fraktionen der GPC des Biofilmextrakts von *S. epidermidis* 939 und 1457, wie auch die korrespondierenden Fraktionen der PIA-negativen Mutante 1457-M10 wurden mittels Anionenaustauschchromatographie (AEC) weiter untersucht. Durch die AEC wird das Material in unterschiedlich anionisch geladenen Substanzen getrennt. Die Immunreaktivität des eluierten Materials wurde durch das PIA-spezifische Antiserum im DIA nachgewiesen (siehe Abschnitt 5.4). Die AEC wurde an der Q-Resource-Säule (Äkta „Purifier“ Amersham/Freiburg) etabliert. Die hier bei einer Wellenlänge von 230 nm aufgezeichneten Elutionsprofile, bei der Analyse von Extrakten der Stämme 939, 1457 und der Mutante 1457-M10, sind in den Abbildungen 18, 19 und 20 dargestellt.

Das Chromatogramm (Abbildung 18) zeigt das bei einer Wellenlänge von 230 nm aufgezeichnete Elutionsprofil des durch Gelfiltration vorgereinigten Extrakts von *S. epidermidis* 939 nach AEC. Dabei wird im Elutionsbereich (Fraktion 1-6) ein *peak A* detektiert, der dem bei der Analyse von PIA des Stamms 1457 beschriebenen „Polysaccharid I“ gleicht (Abbildung 19). Das „Polysaccharid I“ hat eine kationische Nettoladung aufgrund der Anwesenheit deacetylierter Aminogruppen und kann deswegen die Säule ungehindert passieren. Im Elutionsbereich der Fraktion 8-18 fand sich ein weiterer schwach anionischer *peak B*. Dieser fand sich sowohl in Präparationen des Stamms 939 wie auch 1457. In unabhängigen Voruntersuchungen war bei der Analyse von PIA des Stamms 1457 ein solcher *peak* beschrieben und dem „Polysaccharid II“ zugeordnet. Daher wurde rückgeschlossen, dass es sich bei dem hier gefundenen *peak* um das „Polysaccharid II“ handeln müsste. Das „Polysaccharid II“ ist ein Derivat von PIA, welches N-gebundenes Succinat und Acetat enthält und daher anionischen Charakter aufweist (Mack et al., 1996a). In *S. epidermidis* 939 wurde neben dem *peak A* und *B* ein weiterer stark anionischer *peak C* im Elutionsbereich (Fraktion 19 – 20) dargestellt. Dieser konnte weder bei *S. epidermidis* 1457 noch der Mutante 1457-M10 (Abbildung 20) gefunden werden. Unter der Vorstellung, dass das in *peak C* eluierte Material für die beobachteten Unterschiede in der immunologischen Reaktivität verantwortlich sein könnte, galt das analytische Interesse insbesondere diesem *peak*.

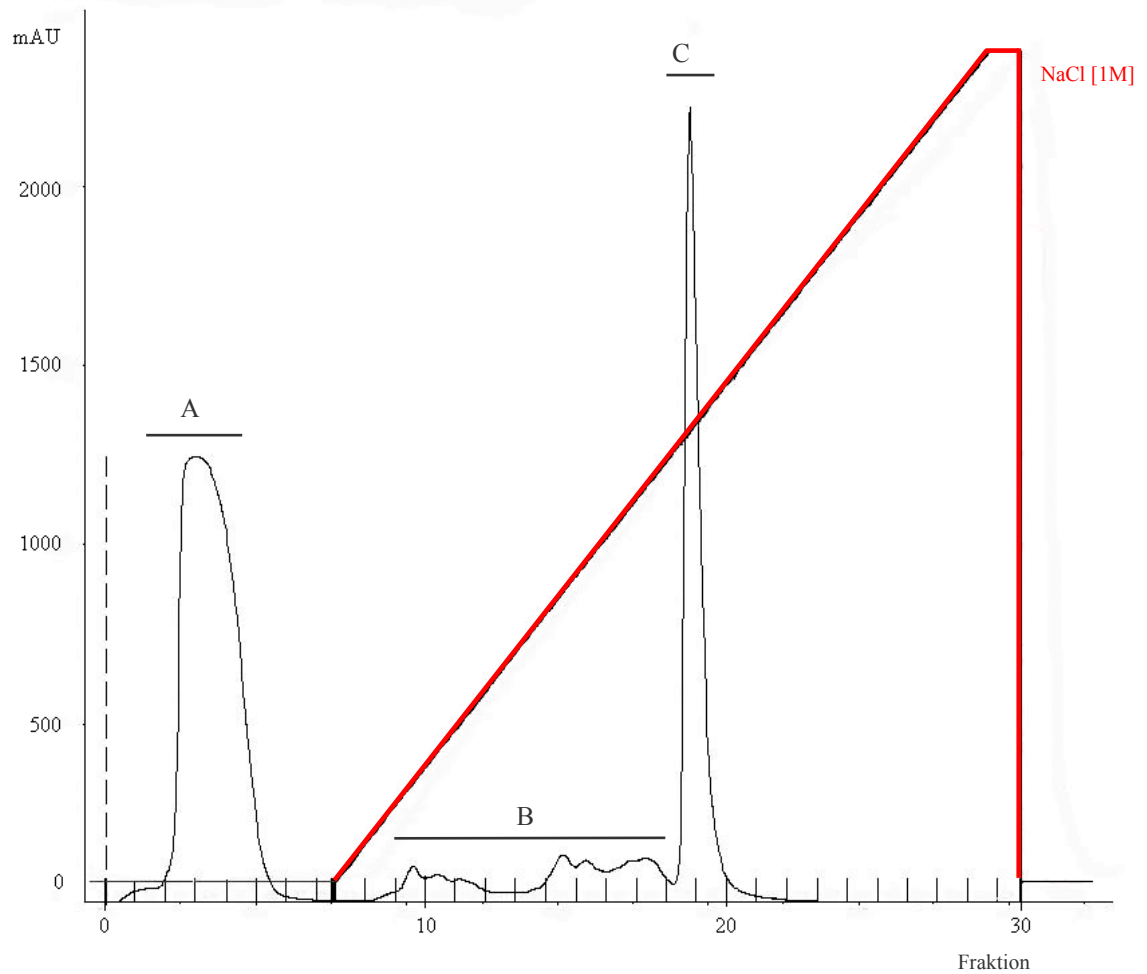


Abbildung 18: Elutionsprofil des durch GPC vorgereinigten, hochmolekularen Biofilm-Extrakt des Stamms 939 nach AEC. Das Chromatogramm (UV 230nm) zeigt den Elutionsverlauf von gefiltertem Extrakt aus *S. epidermidis* 939. Als Ausgangsvolumen wurden 5 ml konzentrierter Rohextrakt mit 15 ml PBS direkt über die Q-Resource Säulenmatrix geleitet. Die Elution erfolgte durch Anlage eines linear ansteigenden Gradienten mit NaCl [1M] über 45 ml. Der Extrakt wird in einen Elutionsbereich mit (A) kationischer/neutraler (B) schwach anionischer (C) stark anionischer Nettoladung getrennt.

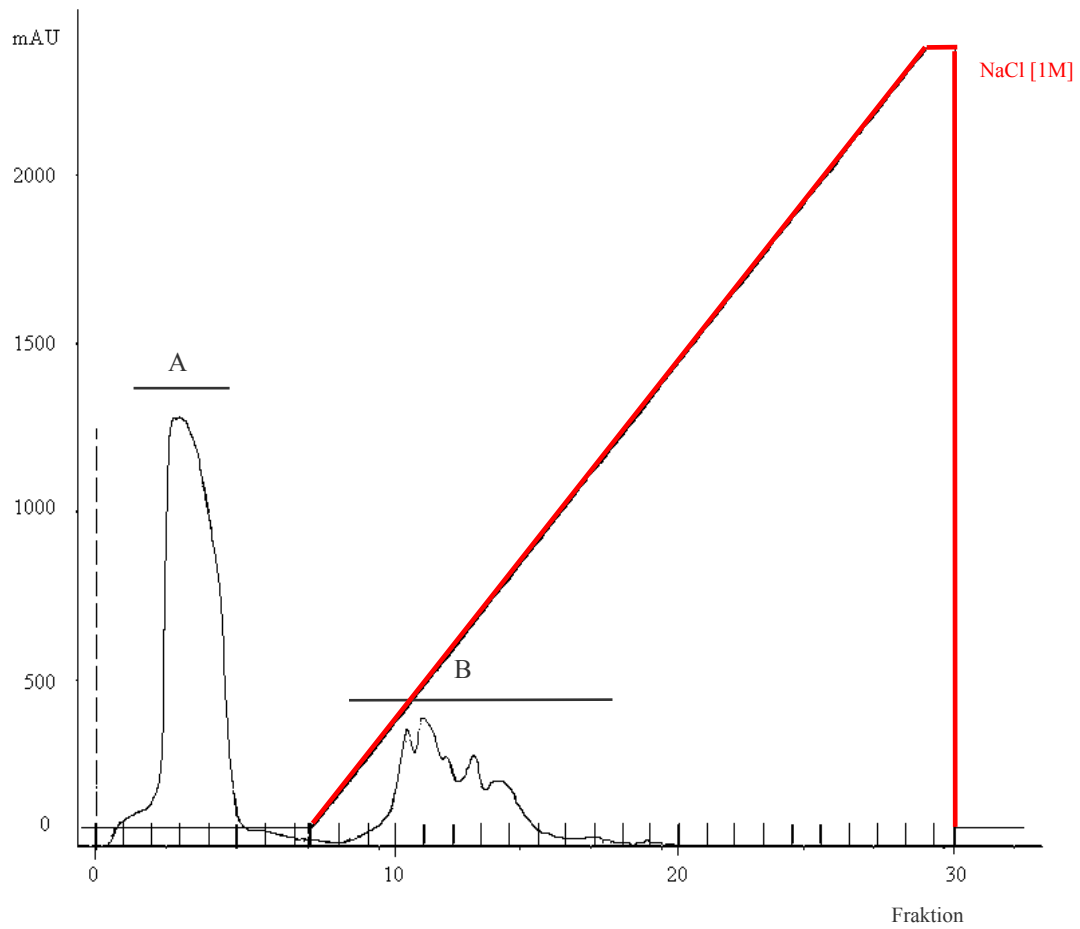


Abbildung 19: Elutionsprofil des durch GPC vorgereinigten, hochmolekularen Biofilmextrakts-des Stamms 1457 nach AEC. Das Chromatogramm (UV 230nm) zeigt den Elutionsverlauf von gelfiltriertem Extrakt aus *S. epidermidis* 1457. Als Ausgangsvolumen wurden 5 ml konzentrierter Rohextrakt mit 15 ml PBS direkt über die Q-Resource Säulenmatrix geleitet. Die Elution erfolgte durch Anlage eines linear ansteigenden Gradienten mit NaCl [1M] über 45 ml. Der Extrakt wird in einen Elutionsbereich mit (A) kationischer/neutraler (B) schwach anionischer Nettoladung getrennt.

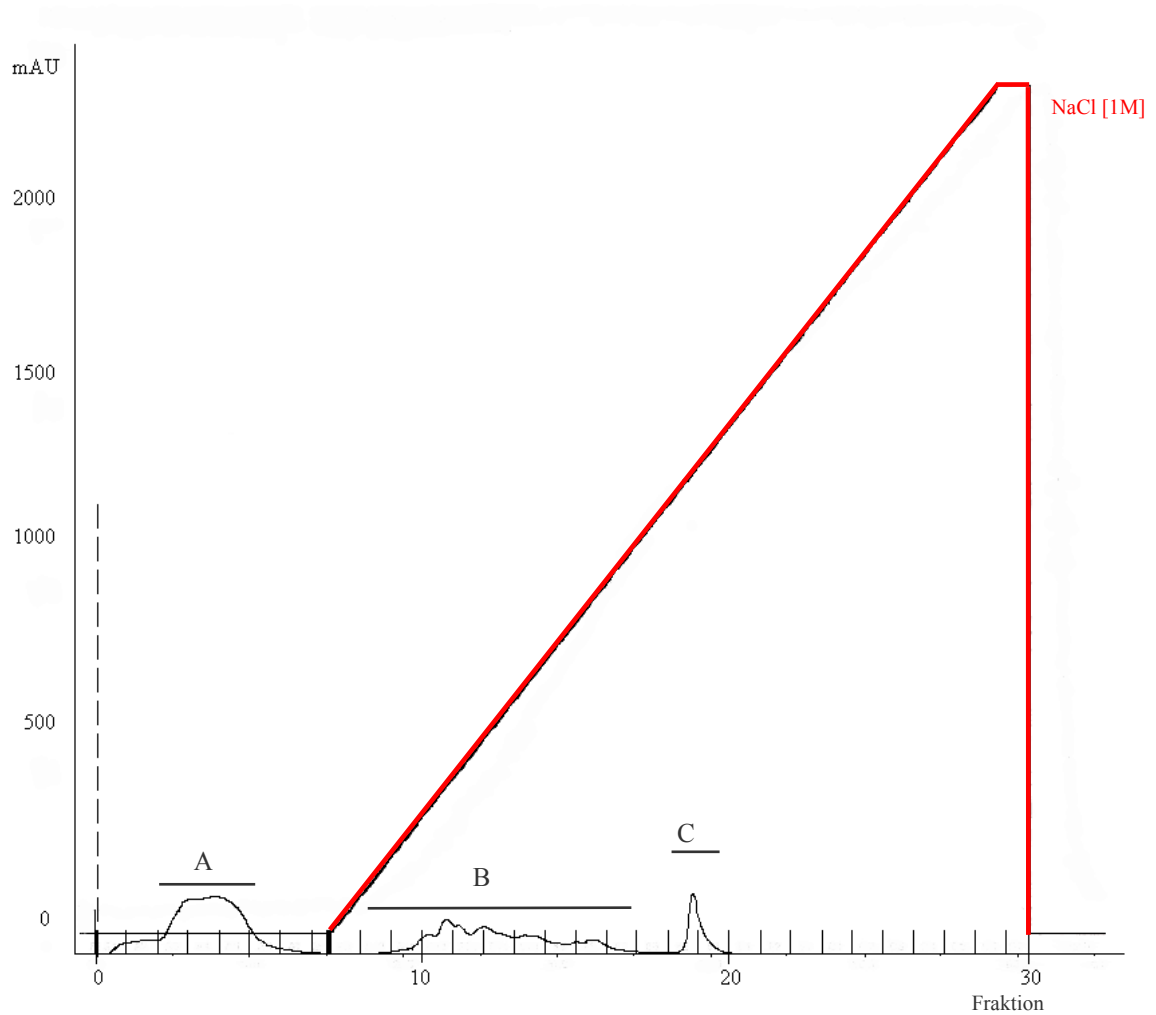


Abbildung 20: Elutionsprofil des durch GPC vorgereinigten Extrakts-der Mutante 1457-M10 nach AEC. Das Chromatogramm (UV 230nm) zeigt den Elutionsverlauf von gefiltertem Extrakt aus *S. epidermidis* 1457-M10. Als Ausgangsvolumen wurden 5 ml konzentrierter Rohextrakt mit 15 ml PBS direkt über die Q-Resource Säulenmatrix geleitet. Die Elution erfolgte durch Anlage eines linear ansteigenden Gradienten mit NaCl [1M] über 45 ml. Der Extrakt wird in einen Elutionsbereich mit (A) kationischer/neutraler (B) schwach anionischer (C) stark anionischer Nettoladung getrennt. Im Vergleich zum korrespondierenden, PIA-positiven Wildtypstamm *S. epidermidis* 1457 und dem Stamm 939 ist die Höhe der *peaks* deutlich niedriger.

5.4 Analyse von Biofilmmatrixextrakten der Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457 nach AEC

Unmittelbar nach der AEC wurde in allen eluierten Fraktionen der Stämme 939, 1457 und 1457-M10 mittels des Assays nach Smith und Gilkerson die Hexosaminkonzentration bestimmt. Durch diesen Test sollte untersucht werden, ob die bei einer Wellenlänge von 230 nm aufgezeichneten *peaks* in der AEC tatsächlich Hexosamin enthalten, was als Hinweis für die Anwesenheit von PIA gewertet werden könnte. Außerdem kann eine erste quantitative Aussage über das Material getroffen werden. Weitere biochemische Tests zum Nachweis von Hexose und Uronsäure blieben ergebnislos.

Hexosaminbestimmung

Der Assay zeigte, dass die bei *S. epidermidis* 1457 und 939 dargestellten *peaks* Hexosamin enthalten. Dabei wurde in *peak A* des Stamms 1457 ein maximaler Hexosamingehalt von 370 nmol/ml und in *peak B* von 130 nmol/ml ermittelt. Bei *S. epidermidis* 939 fand sich in *peak A* eine maximale Hexosaminmenge von 330 nmol/ml und in *peak B* von 50 nmol/ml. In *S. epidermidis* 1457 und 939 konnte somit ein Verhältnis der Hexosaminmengen in *peak A* und *B* von etwa 3:1 beziehungsweise 7:1 bestimmt werden. Dies entspricht etwa dem in *S. epidermidis* 1457 bereits unabhängig beschriebenen Verhältnis von „Polysaccharid I“ und „II“ (Mack et al., 1996a). In dem bei *S. epidermidis* 939 nachgewiesenen *peak C* konnte mit dem Smith Gilkerson Assay kein Hexosamin nachgewiesen werden.

Um zu klären, ob die hexosaminhaltigen Fraktionen auch mit dem Signal des PIA-spezifischen Antiserums korrespondieren, wurden die gereinigten Proben nach AEC im DIA getestet.

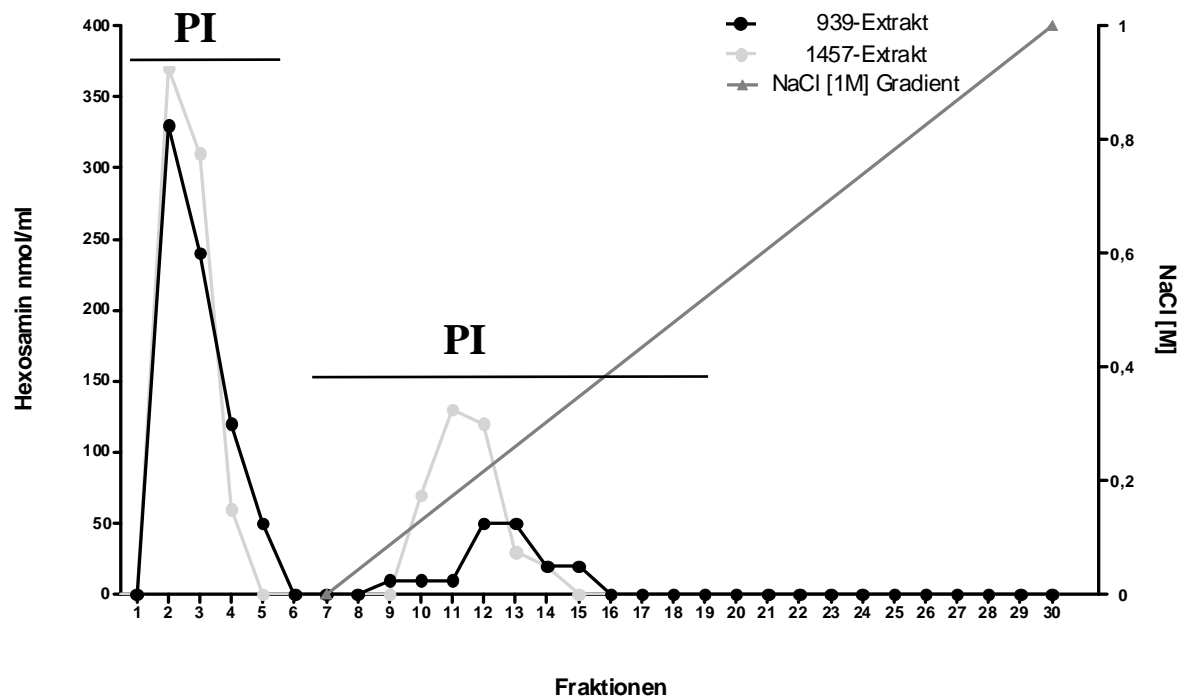


Abbildung 21: Hexosaminelutionsprofil der durch GPC vorgereinigten, hochmolekularen Biofilmextrakte der Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457. Die Hexosaminkonzentration nach AEC bei [●] 939-Extrakt (PI) Max. 330 nmol/ml (PII) Max. 50 nmol/ml [●] 1457-Extrakt (PI) Max. 370 nmol/ml (PII) Max. 130 nmol/ml. Die hexosaminhaltigen Fraktionen korrespondieren weitestgehend mit den Absorptionsmaxima *peak A* und *B* (Abbildung y und x). Im Extrakt von *S. epidermidis* 1457-M10 wurde kein hexosaminhaltiges Material nachgewiesen.

Dot-Immuno-Assay (DIA)

Zum Nachweis von PIA wurden die durch AEC getrennten Fraktionen der Biofilmmextrakte von *S. epidermidis* 939, 1457 und 1457-M10-Extrakt zusätzlich zum Hexosamintest unter Verwendung des PIA-spezifischen, an 1457-M10 präabsorbierten Antiserums mittels DIA untersucht.

Bei dem PIA-positiven *S. epidermidis* 1457 konnte in den in der AEC nach Ladung getrennten Fraktionen 1 – 3 sowie 15 – 17 PIA mittels DIA nachgewiesen werden. Grundsätzlich entspricht dieser Befund mit bereits beschriebenen Beobachtungen überein, nach welchen PIA in zwei unterschiedlich geladenen Isoformen vorkommt. Allerdings korrespondierte nur bei den Fraktionen 1 – 3 der immunologische PIA-Nachweis mit Absorptionsmaximum (UV 230) und Hexosamingehalt. In den PIA-positiven Fraktionen 15 – 17 hingegen konnte jedoch kein Hexosamin gefunden werden. Die fehlende Übereinstimmung von Hexosamin- und PIA-haltigen Fraktionen legt den Verdacht nahe, dass das nachgewiesene Hexosamin einer PIA-unabhängigen Substanz zugeordnet werden muss. Bei *S. epidermidis* 939 konnte unter Verwendung des am PIA-negativen *S. epidermidis* 1457-M10 präabsorbierten PIA-Antiserums in Fraktionen 1 – 23 Reaktivität nachgewiesen werden. Eine Akzentuierung fand sich in den Fraktionen 1 – 5, 10 – 13 und 15 – 20.

Demnach fand sich bei Stamm 939 Reaktivität sowohl in den hexosaminhaltigen wie auch hexosaminfreien Fraktionen. Hierzu zählten insbesondere auch die Fraktionen des stark anionischen *peaks C* (Abbildung). Dies weist darauf hin, dass bei Stamm 939 das PIA-Antiserum mit einer nicht-hexosaminhaltigen Substanz kreuzreagiert.

Um die Ursachen für die beobachteten immunologischen Phänomene näher zu beleuchten, wurden die durch AEC gewonnenen *peaks B* und *C* mittels NMR detaillierter untersucht.

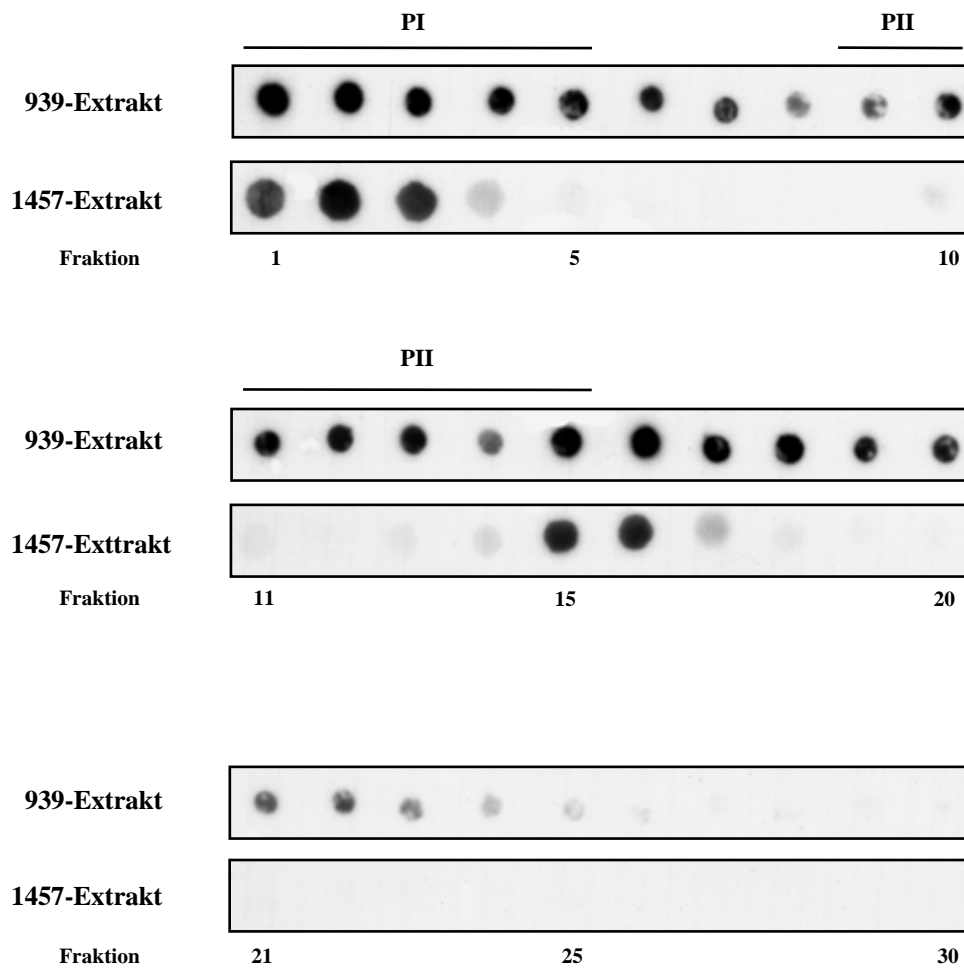


Abbildung 22: Untersuchung der durch AEC gewonnenen Fraktionen von hochmolekularen Biofilmmatrixextrakten der *S. epidermidis* Stämme 939 und 1457 unter Verwendung des anti-PIA-Antiserums im DIA. 5 μ l der unverdünnten Fraktionen 1 – 30 der Biofilmmatrixextrakte von Stamm *S. epidermidis* 1457 und 939 wurde auf eine PVDF aufgebracht und mittels PIA-Antiserum auf die Anwesenheit von PIA untersucht. Die stark hexosaminhaltigen Fraktionen sind durch Balken gekennzeichnet (PI und PII, Abbildung 21). Im aufgereinigtem Extrakt der Negativkontrolle *S. epidermidis* 1457-M10 wurde kein antigenhaltiges Material nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

NMR (nuclear magnetic resonance)-Spektroskopie

Aus den bisherigen Ergebnissen der ACE, Hexosamin-Bestimmung und des DIA geht hervor, dass der nicht anionisch geladene *peak A* (Fraktion 1 bis 5) der Stämme *S. epidermidis* 1457 und 939 am ehesten der kationischen PIA-Isoform „Polysaccharid I“ entspricht. Da diese PIA-Isoform bereits mehrfach strukturanalytisch untersucht wurde, richtete sich der Fokus dieser Untersuchung auf den hexosaminhaltigen *peak B* (Fraktionen 8 – 18) der Stämme 1457 und 939 und den hexosaminfreien *peak C* (Fraktionen 19, 20) des Stamms 939.

Innerhalb der korrespondierenden Fraktionen des *peak C* konnte aus dem 1457-Extrakt kein Material gewonnen werden. Ebenso konnte keinerlei Material aus den korrespondierenden Fraktionen der Extrakte von Mutante 1457-M10 gewonnen werden.

In den aus dem Material des schwach anionischen *peaks B* (Fraktionen 8 – 18) gewonnen ^1H NMR Spektren der Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457 fanden sich keine signifikanten Unterschiede. Beide Spektren zeigen die charakteristische Resonanz für $[\text{Gro-P}]_n$ *repeating units* (4 – 3,5 ppm), Resonanz der Substituenten $\text{H1}\alpha$ ($\alpha\text{-Glc}$; $\alpha\text{-GlcNAc}$; $\alpha\text{-GlcN}$) (5,5 ppm) sowie Succinat (2,2 ppm), N-Acetyl (1,5 ppm) und Alanin (1 ppm). Es konnten weder im Spektrum des Materials von Stamm *S. epidermidis* 939 noch des Stamms 1457 Hinweise für das Vorhandensein von β -(1,6)-N-Acetylglukosamin gefunden werden. Vielmehr entspricht die dargestellte Struktur bei beiden Stämmen der „wall teichoic acid“ (WTA) des *S. epidermidis* Stamms RP62A (Sadovskaya et al., 2004).

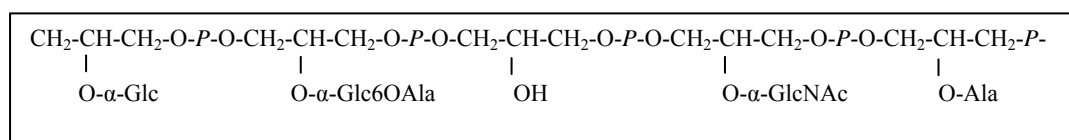


Abbildung 23: Schematische Darstellung der WTA aus *S. epidermidis* RP62A (Sadovskaya et al., 2004). Dabei ist $P = \text{PO}_2\text{H}$.

Der *peak C*, welcher ausschließlich im Extrakt von *S. epidermidis* 939 im Absorptionsspektrum A_{255} gefunden werden konnte, zeigt ein charakteristisches Resonanz-Spektrum für Lipoteichonsäure (LTA). Die ^1H NMR Signale von substituiertem H-2^{Gro} (5,45 p.p.m.) der $[\text{Gro-P}]_n$ *repeating units* (4 - 3,5 p.p.m.) und der Fettsäuren (1,2 – 0,8 p.p.m.) dominieren im Spektrum. Dieses Spektrum ist vergleichbar mit einer LTA-NMR-Analyse die bei *S. aureus* SA113 durchgeführt wurde (Fedtke et al, 2007). Resonanzen von Substituenten (D-Ala und α -GlcNAc) konnten in dieser Präparationen nicht eindeutig zugeordnet werden.

Somit konnten weder im hexosaminhaltigen *peak B* der Stämme *S. epidermidis* 1457 und 939 noch im hexosaminfreien *peak C* des Stamms *S. epidermidis* 939 PIA dargestellt werden. Bei der Untersuchung der durch AEC gewonnenen Fraktionen des Biofilmmatrixextrakts von *S. epidermidis* 939 im DIA konnte eine Reaktivität der WTA- und LTA-haltigen Fraktionen mit dem anti-PIA-Antiserum gefunden werden. Mit dem Ziel, die Spezifität des anti-PIA-Antiserums zu prüfen, wurde ein Kompetitions-DIA durchgeführt.

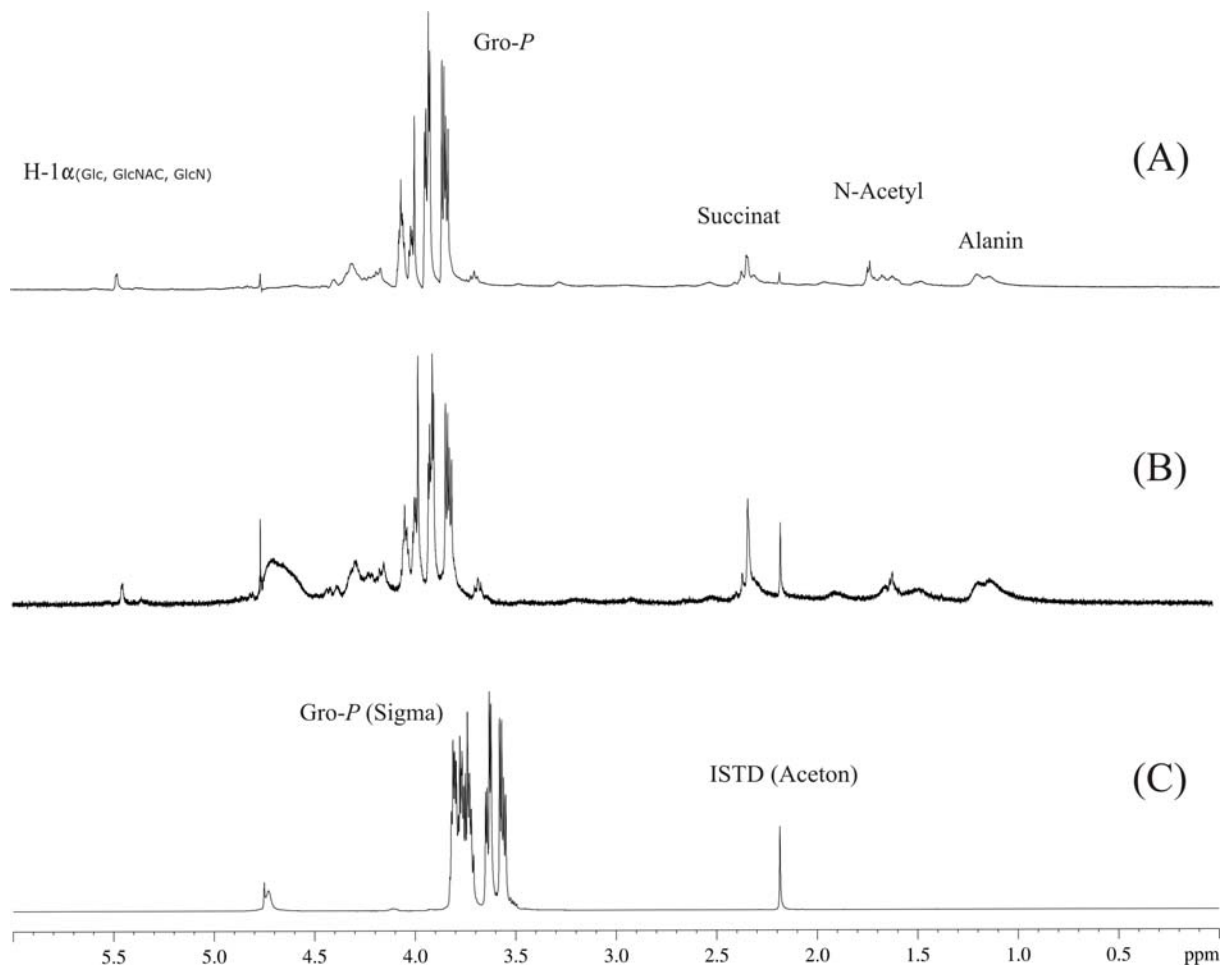


Abbildung 24: NMR Analyse *peak B*. Die ¹H NMR Spektren (600 MHz, D₂O, 300K) zeigen die Resonanz der gereinigten Extrakte (Fraktion 8-18) nach AEC. Extrakt aus (A) *S. epidermidis* 1457 (B) *S. epidermidis* 939 (C) interne Kontrolle Glycerolphosphat (Sigma/München). Alle Spektren zeigen die charakteristische Resonanz sich wiederholender Glycerolphosphat Einheiten, Substituenten H1α (α -Glc; α -GlcNAc; α -GlcN), Succinat, N-Acetyl und Alanin.

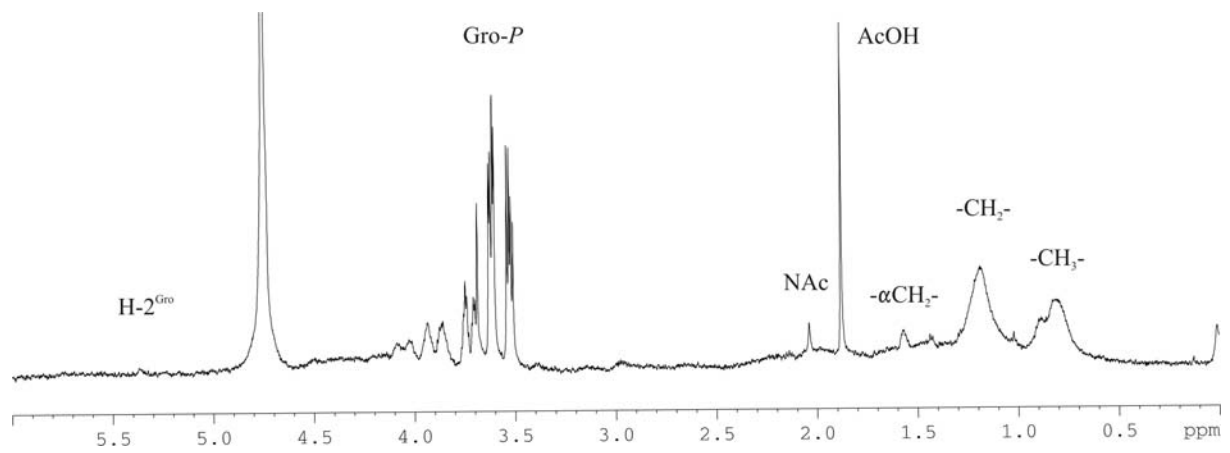


Abbildung 25: NMR Analyse *peak C* des 939-Extraktes. Die ^1H NMR Spektren (600 MHz, D_2O , 300K) zeigen die Resonanz des gereinigten 939-Extrakt (Fraktion 19-20) nach AEC. In diesem Spektrum dominieren Signale für substituiertes [$\text{H}-2^{\text{Gro}}$], repetitive Glycerolphosphat Einheiten [Gro-P] $_n$ und Fettsäuren [αCH_2 , CH_2 , CH_3].

Kompetitions Dot-immuno-Assay (^kDIA)

Durch die NMR-Spektrometrie konnte kein β -(1,6)-N-Acetylglukosamin im *peak B* des gereinigten Materials von *S. epidermidis* 939 und 1457 nachgewiesen werden. Vielmehr entspricht die dargestellte Struktur von beiden Stämmen der „*wall teichoic acid*“ (WTA) des *S. epidermidis* Stamms RP62A. Bereits bei der Untersuchung der gereinigten Probe nach AEC war im DIA eine Diskrepanz zwischen hexosaminhaltigen und mit PIA-spezifischen Antiserum detektiertem Material *peak B* von 1457-Extrakt aufgefallen. Daher wurde die Hypothese formuliert, dass das an der PIA-negativen Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 absorbierte anti-PIA-Antiserum offensichtlich nicht nur PIA sondern auch *wall teichoic acid* (WTA) bindet.

Um die Spezifität zu verifizieren sollte das an Mutante 1457-M10 präabsorbierte anti-PIA-Antiserum, mit der mittels AEC gereinigten und in durch NMR identifizierten WTA sowie dem durch GPC gewonnenen, hochmolekularen, PIA-haltigen Biofilmmatrixextrakt des Stamms 1457 präinkubiert werden und anschließend im DIA eingesetzt werden. Rohextrakte des Stamms *S. carnosus* TM300 (p*TxicaADBC*) (Gerke et al., 1998) wurden nach Wachstum in TSB+Xylose gewonnen. Das nach Gelfiltration gewonnene, mit dem anti-PIA-Antiserum reagierende Material konnte in Vorarbeiten auch mittels NMR-Spektroskopie als PIA identifiziert werden. Dieses Material (PIA_{Sc}) wurde auf eine PVDF-Membran aufgebracht.

Wie erwartet reagierte im DIA das an der Mutante 1457-M10 präabsorbierte anti-PIA-Antiserum stark mit dem durch Gelfiltration präparierten PIA_{Sc} (Daten nicht gezeigt). Durch Präinkubation dieses Antiserums mit WTA (*peak B* nach AEC) des Stamms 1457 konnte diese Reaktivität vollständig aufgehoben werden. Ebenso konnte durch Präinkubation des anti-PIA-Antiserums mit GPC-gereinigten, hochmolekularen Biofilmmatrixextrakten des Stamms 1457 die Reaktivität aufgehoben werden. Eine Präinkubation des anti-PIA-Antiserums mit PBS oder N-Acetylglukosamin führte zu keiner Veränderung der Reaktivität. Diese Experimente zeigen, dass offensichtlich auch nach Präabsorption des anti-PIA-Antiserums Antikörper in der Präparation enthalten sind, welche mit WTA reagieren. Hierbei kann es sich um die anti-PIA-Antikörper selbst handeln, oder aber um unabhängige Antikörper, welche auch nach Präabsorption im anti-PIA-Antiserum verblieben waren. Dies erklärt die Beobachtung der breiten Reaktivität mit den nach AEC von Biofilmmatrixextrakten gewonnenen Fraktionen im DIA (Abbildung 22).

Zusammenfassend lässt sich bei synoptischer Betrachtung der Ergebnisse zur Analyse von Biofilmmatrixextrakten feststellen, dass offensichtlich das in der GPC gewonnene,

hochmolekulare Material ein komplexes Gemisch bestehend aus PIA, WTA und, bei *S. epidermidis* 939, LTA, darstellt. Über die Frage, warum es zu der beobachteten heterogenen Immunreaktivität der *S. epidermidis* Stämme 1457 und 939 kommt, kann nur spekuliert werden. Strukturelle Unterschiede von PIA selbst scheinen jedoch hierfür nicht verantwortlich zu sein.

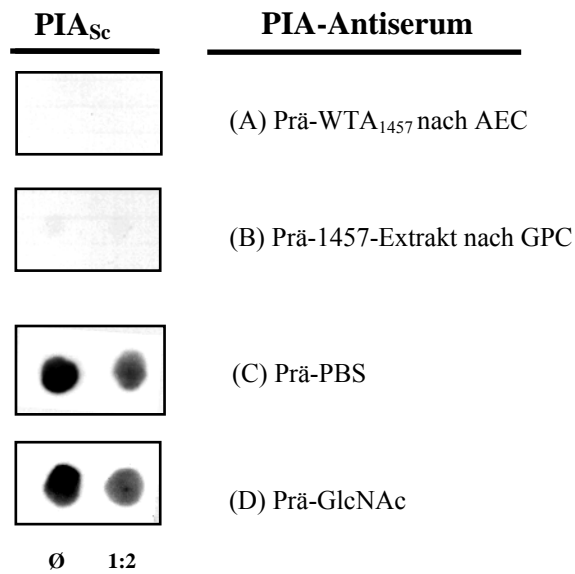


Abbildung 26: Kompetitiver DIA mit PIA_{Sc}-Extrakt und anti-PIA-Antiserum. Der gelfiltrierte PIA_{Sc}-Extrakt wird durch PIA-Antiserum welches mit (A) WTA nach AEC aus *S. epidermidis* 1457 (B) gelfiltrierten 1457-Biofilmmatrixextrakt (C) PBS (D) GlcNAC [Sigma] präinkubiert war, im DIA nachgewiesen.

5.5 Identifizierung von *S. epidermidis* Proteinen mit Biofilmmatrix-bindender Aktivität mittels *phage display*

Die Ergebnisse der Analyse von Biofilmmatrixextrakten machen deutlich, dass es sich bei der Biofilmstabilisierenden extrazellulären Matrix von *S. epidermidis* um eine komplex aufgebaute Struktur handelt, welche schließlich zur Integration von *S. epidermidis* Zellen in die Biofilmarchitektur führt. Unabhängig von der Frage, welche funktionelle Bedeutung die hier nachgewiesenen Strukturelemente wie WTA und LTA haben, ist es bislang völlig ungeklärt, welche Elemente auf der *S. epidermidis* Zelle mit der extrazellulären Matrix interagieren. Mit dem Ziel, Proteinstrukturen zu identifizieren, die mit der extrazellulären Biofilmmatrix von *S. epidermidis* interagieren, sollte eine *shotgun* Phagenbibliothek nach Proteinen mit Biofilmmatrix-bindender Aktivität durchsucht werden.

Hierzu wurde auf eine bereits etablierte *shotgun phage* Bibliothek des *S. epidermidis* Stamm 2 zurückgegriffen (Jacobsson and Frykberg, 2001). Durch Selektion der Phagen an einer mit durch GPC gereinigter, PIA-haltiger Biofilmmatrix beschichteten Oberflächen sollten Kandidatenproteine mit bindender Aktivität identifiziert werden. Hierzu war es zunächst notwendig, die optimale Beschichtung der zur Verwendung kommenden Maxi-Sorp (Nunc, Roskilde, Dänemark) zu ermitteln. In Experimenten, bei welchen unterschiedliche Mengen des gelfiltriertem Biofilmextrakts der Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457 auf die Oberfläche aufgebracht und anschließend mittels des anti-PIA-Antiserums dargestellt worden waren, zeigte sich, dass es bei Einsatz von Gelfiltrat mit einer Hexosaminkonzentration von 150 ng/ml zu einer Sättigung der Oberfläche mit Antigen kommt (Daten nicht gezeigt). Die Stabilität der Bindung zeigte sich darin, dass die Oberflächengebundene Antigenmenge auch durch 50-faches Spülen mit PBS nicht signifikant reduziert wurde (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle für unspezifisch bindende Phagen der Bibliothek wurde Bovines Serum Albumin (BSA) analog zu 939- und 1457-Extrakten eingesetzt (Mullen et al., 2006). Die folgende Tabelle zeigt die quantitativen Ergebnisse der schrittweisen Phagen-Selektion an mit Biofilmextrakten von *S. epidermidis* 939 und 1457 beschichteten Oberflächen.

Tabelle 2: Selektion affiner Phagen an beschichteten Oberflächen.

Oberfläche beschichtet mit	Selektionsschritt		
	I ^a	II ^{a, b}	III ^{a, b}
939-Extrakt	1,5 x 10 ³	1,4 x 10 ³	6 x 10 ³
BSA	n.d.	0,5 x 10 ³	1,5 x 10 ³
1457-Extrakt	1,5 x 10 ³	1 x 10 ²	n.d.
BSA	n.d.	1 x 10 ²	n.d.

^a Dargestellt ist die Zahl der *E. coli* TG1 Zellen [cfu/ml] nach Infektion mit Phagmidpartikeln die nach entsprechenden Waschschritten und Entfernung von Phagen mit schwacher Affinität von der Oberfläche gewonnen werden konnten.

^b Zur weiteren Selektion wurden jeweils Phagenlysate mit einer Ausgangsmenge von 10⁹ cfu/ml eingestzt.

n.d., nicht durchgeführt

Nach der primären Adaption der Phagenbibliothek (1,2 x 10⁹ cfu/ml) an 939- und 1457-Extrakt konnte unabhängig von der Beschichtung der Oberfläche ein Phagentiter von 1,5 x 10³ bestimmt werden. Vor dem nächsten Selektionsschritt wurden diese affinitätsangereicherten Phagenpartikel angereichert und erneut an den entsprechend beschichteten Oberflächen selektioniert. Es wurde erwartet, dass hierbei eine Zunahme der affinen Phagenpartikel beobachtet werden könnte. Dies bestätigte sich jedoch für die Adaption an Biofilmextrakten des Stamms 1457 nicht. Hier konnten nach Selektion nur ein Titer von 1 x 10² cfu/ml bestimmt werden. Im Vergleich zum ersten Selektionsschritt war der Titer der im zweiten Schritt selektionierten Phagenpartikel somit 15-fach geringer. Zudem konnte gefunden werden, dass das nach dem ersten Selektionsschritt erzeugte Phagenlysat offensichtlich mit vergleichbarer Affinität auch an BSA-beschichtete Oberflächen bindet. Im zweiten Selektionsschritt an Biofilmextrakten des Stamms *S. epidermidis* 939 konnte nach Entfernung niedrig affiner Phagen von der Oberfläche ein Titer von 1,4 x 10³ bestimmt werden. Dieser Titer ist zwar nicht signifikant höher im Vergleich zu dem nach dem ersten Selektionsschritt ermittelten Wert, liegt jedoch etwa 3-fach über dem nach Selektion an einer BSA beschichteten Oberfläche. Um eine weitere Anreicherung affiner Phagen zu erzielen wurde unter Verwendung der Phagen, die im zweiten Schritt an der mit *S. epidermidis* 939 beschichteten Biofilmextrakten beschichteten Oberfläche selektioniert worden waren, eine dritte Selektion durchgeführt. Im Anschluss an diese Selektion konnte der Titer der von der

Oberfläche geernteten Phagen mit 6×10^3 bestimmt werden. Er lag damit etwa 4-fach höher als der Titer der von der BSA-beschichteten Oberfläche geernteten Phagen ($1,5 \times 10^3$ cfu/ml).

Die an dem Biofilmextrakt selektierten Phagen wurden weiter analysiert. Hierzu war es zunächst notwendig, solche Phagen zu identifizieren, welche das genomische *S. epidermidis* Insert im korrekten Leserahmen exprimieren. Hierzu wurden die $2,5 \times 10^3$ Phagmidklone im Kolonieblot unter Verwendung eines E-Tag-spezifischen Antikörpers getestet. Solche Phagen die das E-Tag und damit auch vermutlich das genomische Insert exprimierten, wurden weiter analysiert.

Kolonie Blot *E.coli* TG1 x pG8SAET



(A)

(B)

Abbildung 27: Kolonie Blot *E.coli* TG1 x pG8SAET. Der Kolonieblot zeigt (A) keine Expression (B) Expression der Reportersequenz (E-tag). Für den Kolonie Blot wurden die Bakterien Kolonien direkt von der Agarplatte auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Chloroform und gebundenes Protein wurde durch den E-tag-spezifischen Antikörper [1:1000] und einen Alkalische Phosphatase konjugierten sekundären Antikörper [1:5000] detektiert.

Von etwa $2,5 \times 10^3$ im Kolonie Blot überprüften Klonen konnten $2,3 \times 10^2$ Klone isoliert werden, welche die Reportersequenz (E-tag) exprimierten. Von diesen 9,2 % E-tag positiv getesteten Klonen wurden Restriktionsanalysen mittels *SnaBI* und *NcoI* durchgeführt. Hierdurch konnte bei 120 Klonen eine Insertion nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass 50 % der isolierten Klone falsch positive waren oder nur eine sehr kleine Insertion besaßen. Der Restriktionsanalyse schloss sich eine Sequenzanalyse der genomischen *S. epidermidis* Inserts an. Dabei wurden bei 55 der bearbeiteten Phagmide Inserts, mit 100 % Sequenzhomologie zum publizierten Genom von *S. epidermidis* RP62A gefunden. Bei den verbleibenden 65 Phagmiden konnten die Inserts nicht *S. epidermidis* zugeordnet werden. Eine Übersicht über die identifizierten Sequenzen gibt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Sequenzanalyse isolierter Phagmid Klone.

Klon	Identifizierter <i>open reading frame</i> mit Homologie zum sequenzierten Insert ^a	Zahl der von 55 isolierten Klone mit dem jeweiligen Insert (n)
AS1	Hypothetisches Protein Acylphosphatase (SERP0973; 0974)	8
AS2	Anaerobe Ribonukleosid- Triphosphat Reduktase (SERP2183)	3
AS4	Aminosäure Permease-Familie- Protein (SERP2142)	16
AS5	Hypotetisches Protein (SERP0308)	3
AS6	Extracellular matrix binding protein Embp (SERP1011)	13
AS8	YpfP Protein (SERP0606)	3
AS10	GufA Protein; putativer ABC- Transporter, ATP Bindungsprotein (SERP0382)	2
AS18	DNA Polymerase III (SERP0114)	2
AS23	Kationen transportierende ATPase (SERP2438)	5

^a Die ermittelten Sequenzen der Inserts in pG8SAET wurden unter Verwendung des Blastn Algorithmus mit dem publizierten Genom von *S. epidermidis* RP62A verglichen.

Bei der Sequenzanalyse der 55 Phagmide mit Inserts homolog zu *S. epidermidis* Sequenzen zeigte, dass diese 9 unabhängigen *open reading frames* (ORF) von *S. epidermidis* RP62A zugeordnet werden konnten. Es konnten keine überlappenden Sequenzabschnitte gefunden werden. Von besonderem Interesse war der Nachweis von Sequenzen mit Homologie ORFs die natürlicherweise potentiell mit der Biofilmmatrix interagieren könnten. Hierzu gehören das *extracellular matrix binding protein embp* (Klon ; Embp weist Domänen mit hypothetischer Zucker-bindender Aktivität auf), *ypfP* (Klon ; YpfP ist bei *S. aureus* in die

Synthese von LTA involviert), *gufA* (Klon ; *GufA* ist ein Zelloberflächen-assoziiertes Protein), *asp* (Klon ; *Asp* besitzt als Aminosäuretransporter eine Zellwand-assoziierte Lokalisation). Die Affinität der Phagmide mit den entsprechenden Inserts zum Biofilmmatrixextrakt von *S. epidermidis* 939 sollten daher näher beschrieben werden. Hierzu fand ein *filamentous phage enzyme linked immunosorbent assay* (FP-ELISA) Verwendung (Yang et al., 2005). Bei diesem Assay wurde wie bereits bei der initialen Selektion der affinen Phagen die Oberfläche einer Mikrotiterplatte mit dem durch GPC vorgereinigten Biofilmmatrixextrakt des Stamms *S. epidermidis* 939 beschichtet. Die so beladene Oberfläche wurde dann mit angereicherten, das jeweilige interessierende Insert tragenden Phagmiden (3×10^5 cfu/ml) inkubiert. Zur Kontrolle der basalen Bindungskapazität wurde ein Phagenlysat des Phagmids ohne Insert im Experiment mitgeführt. Nach Spülen der Reaktionsnäpfechen wurden gebundene Phagen unter Verwendung des anti-M13-Antikörpers und einem Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper nachgewiesen. Die hierbei ermittelte Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm kann als Funktion der gebundenen Phagen und damit indirekt der Stärke der Interaktion des Phagen mit der Biofilmmatrix gewertet werden. Es zeigte sich, dass Phage AS 6 welcher ein *embp* Fragment als Insert trägt, deutlich stärker an die beschichtete Oberfläche band als der Phage ohne Insert. Alle anderen getesteten Phagen wiesen keine im Vergleich zum Wildtypphagen verbesserte Bindung an die Oberfläche auf.

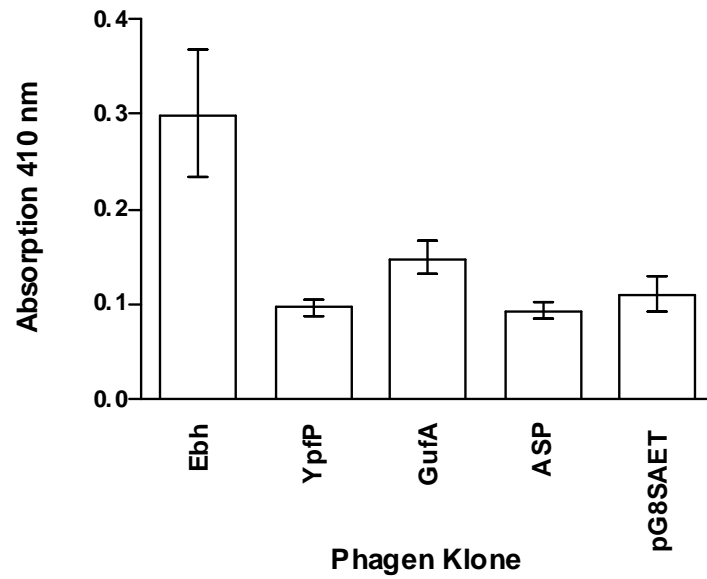


Abbildung 28: Bindung spezifischer Insert-tragender Phagen an Biofilmmatrixextrakt des Stamms *S. epidermidis* 939. Die Phagenklone, welche einen Sequenzabschnitt von Ebh, YpfP, GufA und ASP enthielten wurden im $_{FP}$ ELISA getestet. Die spezifischen Phagen wurden jeweils angereichert und an 939-Extrakt adaptiert. Nach dem Spülen anhaftende Phagen wurden durch den direkt mit Peroxidase-konjugierten Anti-M13-Antikörper [1:5000] quantifiziert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier Messungen an. Zur Kontrolle der basalen Bindungskapazität wurden Phagenklone aus dem Phagmid pG8SAET ohne Insertion mitgeführt.

Um tieferen Einblick in die mögliche Interaktion von Embp und extrazellulärer Biofilmmatrix zu gewinnen, wurde die Sequenz des im Phagen 6 AS inserierten *embp*(=*ebh*)-Fragments näher untersucht. Das 300 Basenpaare große Fragmenten lies sich eindeutig dem Abschnitt zwischen Basenpaar 11454 und 11753 der *embp* kodierenden Sequenz zuordnen. In diesem Bereich kodiert *embp* für eine sogenannte *found in various architectures*. (FIVAR-) Domäne (nt 11594 – 11764). Für diese wurden in unabhängigen bakteriellen Oberflächenproteinen Hinweise für Zucker- und speziell N-Acetylglukosamin-bindende Aktivität gefunden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das hier durchgeführte *phage display screening* erste funktionelle Hinweise für das Vorhandensein eines spezifischen *S. epidermidis* Oberflächenproteins mit Affinität zur Biofilmmatrix liefert.

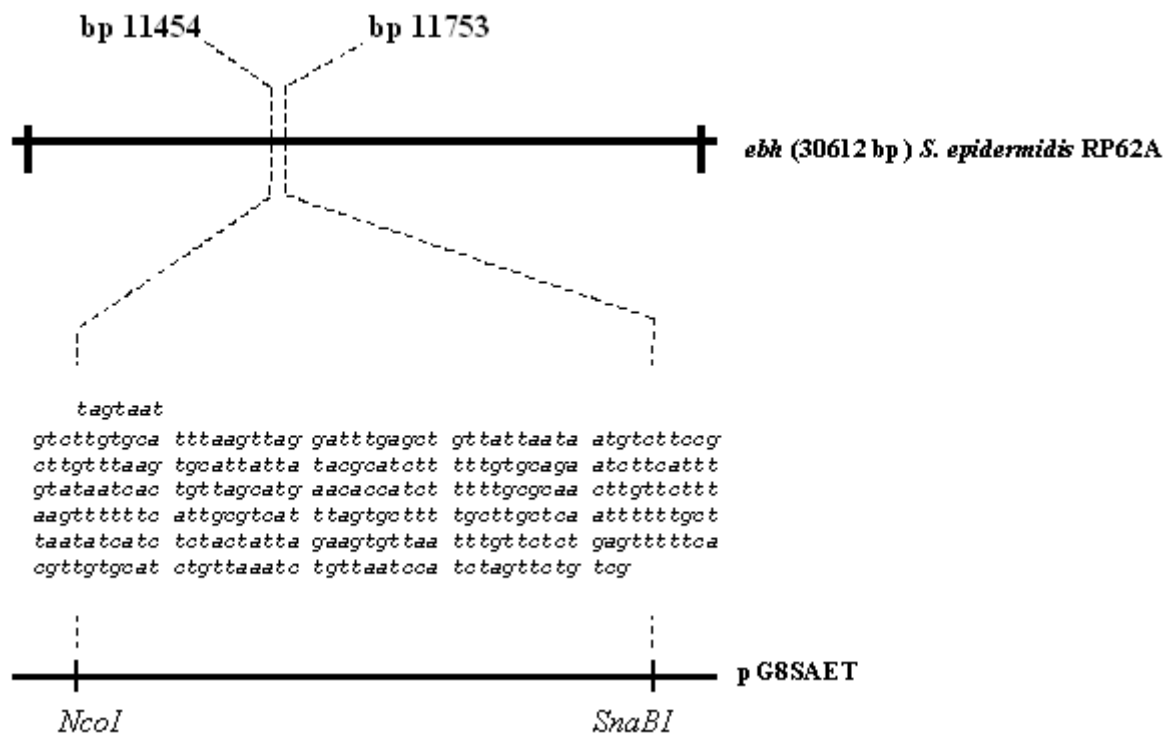


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Lokalisation untersuchter Genabschnitte in *ebh*. Die Darstellung zeigt die Lokalisation der identifizierten Sequenzabschnitte (11505-11591 bp) innerhalb *ebh* (30612 bp) von *S. epidermidis* RP62A. Die Insertion befindet sich im Phagmid pG8SAET zwischen den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *SnaBI*.

6 Diskussion

In den letzten Jahren hat *Staphylococcus epidermidis* als Erreger von Fremdmaterial-assoziierten Infektionen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Er ist einer der fünf häufigsten Organismen, die an nosokomial erworbenen Infektionen beteiligt sind (Rupp and Archer, 1994) (Wisplinghoff et al., 2003). Der entscheidende Pathogenitätsfaktor von *S. epidermidis* beruht auf seiner Fähigkeit, mehrschichtige Biofilme zu bilden (Mack et al., 2006a; Rohde et al., 2006) (Otto, 2004) (Götz, 2002). Während einer Infektion persistieren die Bakterien eingebettet in die Biofilmmatrix und schützen sich dadurch gegen die Immunabwehr des Patienten sowie vor der Wirkung antibiotischer Substanzen (Heinzelmann et al., 1997) (Knobloch et al., 2002).

Als Grundlage für die Biofilmbildung in Staphylokokken bedarf es mindestens zwei Eigenschaften. Die Bakterien müssen in der Lage sein an einer Oberfläche zu adhären, um anschließend als ein komplexer Zellverband zu aggregieren (Götz, 2002). Als markanteste Eigenschaft der biofilmbildenden Bakterien gilt die Produktion von Glykostrukturen, welche gemeinsam mit Oberflächen-assoziierten Proteinen die Zusammensetzung der Biofilmmatrix ausmachen. Das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsion (PIA) ist entscheidend an der Entstehung von *S. epidermidis* Biofilmen und damit an der Pathogenese von Fremdmaterial-assoziierten Infektionen beteiligt. Durch PIA werden jene Zellen im Biofilm gehalten, welche keinen direkten Kontakt zur primär besiedelten Oberfläche haben (Mack et al., 1996b). Die Enzyme für die PIA-Synthese, sind im Genort *icaADBC* kodiert (Heilmann et al., 1996b) (Gerke et al., 1998). Zusätzlich zu *icaADBC* scheinen aber noch weitere Faktoren indirekt an der Bildung von PIA beteiligt zu sein (Dobinsky et al., 2003). Der Schwerpunkt der Untersuchungen in dieser Dissertation war die Aufklärung eines mit PIA-kreuzreaktiven Faktors, der aus dem klinischen Isolat *S. epidermidis* 939 gefunden wurde. Zentrale Arbeitshypothese war, dass es sich hierbei um eine serologische Variante von PIA (PIAv) handeln könnte. Durch die Analyse qualitativer und quantitativer Veränderungen in der Struktur von PIAv im Vergleich zu PIA sollten Hinweise auf Struktur-Funktionsprinzipien von PIA bei der Vermittlung interzellulärer Adhäsion und Biofilmmakulation erkannt und weiter charakterisiert werden.

Der Stamm *S. epidermidis* 939 war im Rahmen von epidemiologischen Untersuchungen isoliert worden. Hierbei war in präliminären Experimenten aufgefallen, dass er trotz eines stark biofilmpositiven Phänotyps nur schwach mit einem gegen gereinigtes PIA erzeugten Antiserum reagierte (Knobloch et al., 2002). Gegen ganze Bakterienzellen von *S. epidermidis*

939 wurde ein Kaninchen-Antiserum generiert und, analog zur Gewinnung des PIA-spezifischen Antiserums, an der Δ ica-Mutante 1457-M11 absorbiert (Mack et al., 1994; Mack et al., 2001). Das absorbierte anti-939-Antiserum reagiert jedoch mit einer Vielzahl von *S. epidermidis* Oberflächenstrukturen (Daten nicht gezeigt) und konnte daher zur selektiven Darstellung von Strukturen aus *S. epidermidis* Zellextrakten nicht herangezogen werden. Um eine von immunologischen Determinanten unabhängige Charakterisierung der von *S. epidermidis* 939 gebildeten extrazellulären Biofilmmatrix zu erreichen, wurde eine kombinierte genetische und strukturanalytische Strategie verfolgt. Hierbei sollte vor allem die Frage geklärt werden, ob es sich bei PIAv um ein PIA nahe verwandtes, serologisch kreuzreaktives Antigen handelt.

Eine eingehende phänotypische Charakterisierung des Stamms *S. epidermidis* 939 zeigte, dass dieser vergleichbar mit dem PIA-positiven Referenzstamm *S. epidermidis* 1457 einen starken Biofilm bildet. Neben dem *S. epidermidis* 1457 wurde die isogene Δ ica-Mutante 1457-M10 mitgeführt, um zu demonstrieren dass ohne die Genprodukte von *icaADBC* keine PIA-Synthese und damit keine Biofilmmakkumulation möglich ist (Mack et al., 1994). Ungeklärt war die Frage, ob bei *S. epidermidis* 939 tatsächlich PIA funktionell an der Ausprägung eines biofilmpositiven Phänotyps beteiligt ist. Es ist zu bedenken, dass *S. epidermidis* unterschiedliche Mechanismen zur Biofilmmakkumulation nutzen kann. Bei den bislang beschriebenen, PIA-unabhängigen Mechanismen der *S. epidermidis* Biofilmbildung spielen Zellwandassoziierte Proteine eine zentrale Rolle. Dies konnte bislang insbesondere für das *accumulation associated protein* (Aap) gezeigt werden (Hussain et al., 1997). Dieses 220 kDa Oberflächenprotein (Banner et al., 2007) vermittelt nach proteolytischer Spaltung interzelluläre Aggregation und Biofilmmakkumulation (Rohde et al., 2005). Aap ist in klinischen *S. epidermidis* Populationen weit verbreitet (Rohde et al., 2004a; Rohde et al., 2005b; Vandecasteele et al., 2003) (Mack et al., 1999a; Petrelli et al., 2006; Stevens et al., 2008). Zudem gibt es Hinweise, dass neben Aap weitere Proteine eine Rolle bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung spielen (Lasa, et al. 2006; Lasa and Penades, 2006; Rohde et al., 2007). Der Stamm *S. epidermidis* 939 ist *aap*-positiv (Burandt und Rohde, nicht publizierte Daten). Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Protein essentiell an der Biofilmbildung dieses Stamms beteiligt ist. Dies könnte durchaus die Beobachtung erklären, dass *S. epidermidis* 939 trotz scheinbar geringer PIA-Synthese einen starken Biofilm bildet. Um zu prüfen, ob bei *S. epidermidis* 939 Proteine an der Biofilmmakkumulation beteiligt sind, wurde der Biofilmphänotyp dieses Stamms in der Anwesenheit der Protease Trypsin getestet.

Hierdurch sollte ein Protein-abhängiger Biofilm zerstört werden (Chaignon et al., 2007; Izano et al., 2008; Rohde et al., 2005; Rohde et al., 2007). In Analogie zum Stamm *S. epidermidis* 1457 hatte Trypsin jedoch keinen Einfluss auf die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 939. Die Beteiligung von Proteinen am Biofilmpositiven Phänotyp dieses Stammes erschien damit unwahrscheinlich. Im Gegensatz dazu führte jedoch die Supplementierung des Mediums mit dem Enzym Dispersin B (DspB) zu einer Zerstörung des Biofilms von *S. epidermidis* 939. DspB ist eine Hexosaminidase, welche aus *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isoliert wurde und welche hochspezifisch β -(1,6)-glykosidische Bindungen spaltet (Itoh et al., 2005; Kaplan et al., 2004a; Kaplan et al., 2004b). Es konnte bereits gezeigt werden, dass DspB durch Spaltung von PIA den Biofilm von *S. epidermidis* 1457 zerstören kann (Izano et al., 2008; Kaplan et al., 2004b). Da diese Wirkung von DspB auch bei dem Biofilm von *S. epidermidis* 939 beobachtet werden konnte, erschien es wahrscheinlich, dass PIA oder ein PIA verwandtes Molekül auch bei diesem Stamm funktionell am Aufbau des Biofilms beteiligt ist. Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die beobachtete, verminderte immunologische Reaktivität mit dem anti-PIA-Antiserum möglicherweise auf strukturellen Änderungen des Stammes *S. epidermidis* 939 produzierten PIA basiert. Mit dem anti-PIA-Antiserum konnte PIA direkt an den Zellclustern der biofilmbildenden Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457 durch den Immunfluoreszenztest nachgewiesen werden. Das Antigen war bei *S. epidermidis* 939 genauso wie bei 1457 um die dicht gelagerten Zellaggregate innerhalb der Biofilmmatrix lokalisiert. Dieser Test bestätigt, dass tatsächlich PIA bei der Biofilmmak-kumulation von *S. epidermidis* 939 genauso wie bei 1457 beteiligt ist. Da durch den Immunfluoreszenztest nur die generelle PIA Synthese festgestellt werden kann und keine Aussage über eine verminderte immunologische Reaktivität getroffen werden kann, sollten Zellextrakte aus Kulturen der Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457 mittels Titration bestimmt werden. Durch die geometrische Verdünnung der Extrakte beider Stämme, inkubiert mit dem anti-PIA-Antiserum, konnte ein direkter Vergleich des Antigen-Titer mittels Dot-Immuno-Assay (DIA) dargestellt werden. Auf diese Weise konnten die Zellen, nachdem sie unterschiedlich kultiviert waren, hinsichtlich der PIA-Synthese miteinander verglichen werden. Bei der Verwendung verschiedener Medien wurde PIA in *S. epidermidis* 939 vergleichsweise zu 1457 mit geringerem Titer nachgewiesen.

Die Auswahl des Kulturmediums nimmt entscheidenden Einfluss auf die Physiologie von Bakterien und kann hierdurch Biofilmphänotyp eines Stammes stark beeinflussen (Rohde et al., 2001b) (Barker et al., 1990) (Christensen et al., 1982; Cramton et al., 2001) (Hussain et al., 1992b) (Deighton and Borland, 1993). Die Synthese von PIA kann bereits durch die

Verwendung unterschiedlicher Chargen des Kulturmediums beeinflusst werden (Rohde et al., 2001a). Daher war es wichtig, das Wachstum und die Biofilmbildung von *S. epidermidis* 939 und 1457 unter verschiedenen Kulturbedingungen zu testen. Hierdurch sollten die optimalen Bedingungen zu Präparation von PIA beziehungsweise Biofilmmatrixbestandteilen ermittelt werden. Verglichen wurden TSB und BHI, da diese Medien in unabhängigen Studien zur Präparation von PIA und Biofilmmatrixbestandteilen eingesetzt worden waren (Sadovskaya et al., 2005). Durch die Dot-Immuno-Analyse (DIA) konnten die Veränderungen der PIA-Synthese bei Wachstum in TSB oder BHI dargestellt werden. Die Kultivierung von *S. epidermidis* 939 in BHI führte zu keinem Nachweis des PIA-Titers im Vergleich zur Kultur in TSB von 1:16, der unter diesen Bedingungen nur noch dem der *icaADBC*-Mutante 1457-M10 entsprach und daher am ehesten als Ausdruck der Expression von kreuzreagierenden Strukturen betrachtet werden muss. In der Literatur wird ein dynamisches Verhältnis der Synthese von PIA und extrazellulären Teichonsäuren (EC-TA) Synthese bei Kultur in TSB oder BHI beschrieben. Der Stamm *S. epidermidis* RP62A synthetisiert in BHI verstärkt EC-TA und in TSB wird stärker PIA synthetisiert (Sadovskaya et al., 2005). Die Reaktivität von Zellextrakten der Δ ica-Mutante 1457-M10 mit anti-PIA-Antiserum kann daher als ein erster Hinweis auf eine mögliche Kreuzreaktivität des Antiserums zum Beispiel mit EC-TA dargestellt werden.

Neben der unterschiedlichen Reaktivität des Stamms *S. epidermidis* 939 mit dem anti-PIA-Antiserum konnten durch Sequenzierung des *icaADBC* Operons dieses Stamms im Vergleich zu *icaADBC* von *S. epidermidis* 1457 distinkte Punktmutationen in *icaA* dargestellt werden. Diese Punktmutationen führten zu Aminosäurepolymorphismen in der Sequenz von IcaA, die ihrerseits für eine veränderte Substratspezifität verantwortlich sein könnten (Qasba et al., 2008). Aus dem Sachverhalt war die Motivation hervorgegangen, zu untersuchen ob ein Unterschied in der immunologischen Reaktivität erhalten bleibt, wenn der *icaADBC* Genort beider Stämme im Surrogatwirt *S. carnosus* TM300 exprimiert wird. Um den Einfluss der IcaA Polymorphismen auf die Struktur von PIA zu untersuchen, wurden *icaADBC* beider Stämme in den Vektor pAS1 (Tegmark et al., 2000) kloniert, bei welchem *icaADBC* unter die Kontrolle eines Xylose-induzierbaren Promotors gebracht wird. Tatsächlich bildet *S. carnosus* TM300 nach Transformation mit pASica₉₃₉ und pASica₁₄₅₇ unter induzierenden Bedingungen einen Biofilm. Das Material, welches durch die entsprechenden Stämme SF939 und SF1457 gebildet wird, reagierte im Immunfluoreszenztest gleichermaßen gut mit anti-PIA-Antiserum. Das entscheidende Ergebnis war jedoch der Antigen-Titer in den Extrakten induzierter Zellen.

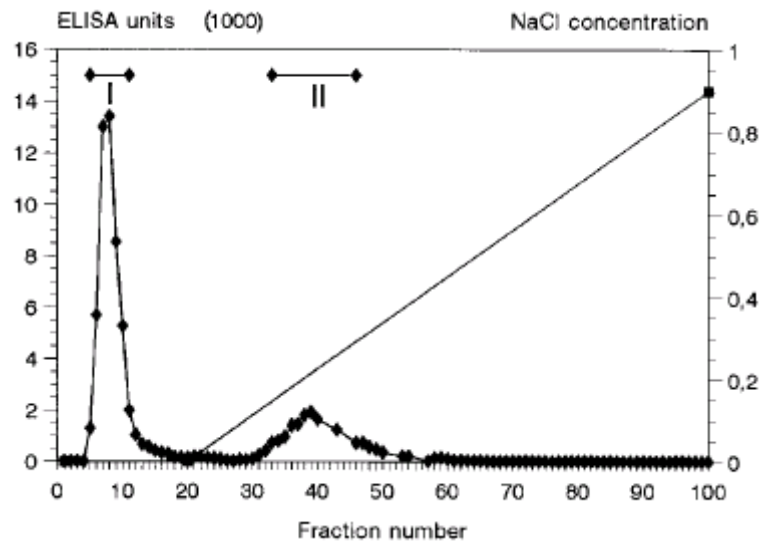
Es konnte kein Unterschied zwischen 939 und 1457 mit dem PIA-Antiserum im DIA detektiert werden. Aus diesem Ergebnis ließ sich folgern, dass nicht Veränderungen der Substratspezifität von IcaA für den Unterschiede in der Immunreaktivität verantwortlich sind. Dies wird durch die Arbeiten anderer Gruppen bestätigt, in welchen *icaADBC* des Stamms O-47 in pCN27 (Heilmann et al., 1996a) und des Stamms RP62A in pTX*icaADBC* (Gerke et al., 1998) in *S. carnosus* TM300 exprimiert wurden. Auch hier wurde im Vergleich mit *S. epidermidis* 1457 keine veränderte Immunreaktivität beobachtet. Die hier beschriebenen Ergebnisse wiesen darauf hin, dass, wenn PIA des Stamms *S. epidermidis* 939 tatsächlich Modifikationen aufweisen sollte, diese unabhängig von *icaADBC*, als sekundär nach Synthese des Polysaccharids, in das Molekül eingeführt werden. Aus diesem Grund war es konsequent, extrazelluläre Biofilmmatrix des Stamms 939 mit dem Ziel, die Natur der möglichen PIA Modifikationen darzustellen, zu präparieren und einer Strukturanalyse zuzuführen.

Hierbei ist vor allem das Problem der Kontamination von Biofilmmatrixkomponenten durch hochmolekulare Bestandteile des TSB zu beachten. In der Vergangenheit waren viele Ansätze zur Darstellung der *S. epidermidis* Biofilmmatrix gescheitert (Maira-Litran et al., 2002) (Drewry et al., 1990; Maira-Litran et al., 2004). Um dieses Problem zu umgehen, sollte dialysiertes TSB zur Anzucht der *S. epidermidis* Stämme verwendet werden. Hierdurch kann eine Kontamination mit Mediumbestandteilen effizient vermieden werden (Mack et al., 1996a). Allerdings sollte vorab geprüft werden, ob die Anzucht in dialysiertem TSB einen Einfluss auf die PIA-Synthese und Biofilmbildung der Stämme *S. epidermidis* 1457 und 939 nimmt. Daher wurde eine vergleichende Untersuchung des Biofilmphänotyps in nicht-dialysiertem und dialysiertem TSB durchgeführt. Durch die zusätzliche Dialyse des Mediums wurde die quantitative Biofilmbildung von *S. epidermidis* 939 und 1457 reduziert. Ein durchgeführter Immunfluoreszenztest konnte zwar durch spezifisches PIA-Antiserum das Antigen an der Oberfläche der Zellen lokalisieren, nicht aber quantifizieren. Im DIA zeigte sich, dass die Kultur von *S. epidermidis* 1457 und 939 in dialysiertem TSB in geringem Umfang zu einer Reduktion der PIA-Synthese führt. Im Hinblick auf die für eine strukturelle Untersuchung benötigte Reinheit des zu präparierenden Materials wurde dies jedoch akzeptiert. Für eine aussagekräftige Strukturanalyse sind ausreichende Mengen der zu untersuchenden Substanz notwendig. Um den Substanzverlust durch die verschiedenen, aufeinanderfolgenden Reinigungsmethoden möglichst gering zu halten, mussten stabile Parameter etabliert werden, um beständig und reproduzierbar ausreichende Mengen des

extrahierten Materials bereitzustellen. Eine Ausfällung des PIA-haltigen Materials war beschrieben worden, das unlösliche Material sollte sich jedoch in HCl [5M] wieder lösen (Maira-Litran et al., 2002; Sadovskaya et al., 2004). In der Tat konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden, dass das durch GPC gewonnene, hochmolekulare Material nach Vereinigung der Proben und Konzentration ausfiel. Dieses Material konnte durch Aufnahme in HCL [5M] wieder gelöst werden. Bei weiteren notwendigen Umpufferungsschritten kam es jedoch erneut zu einer Präzipitatbildung. Um dies zu verhindern, wurde daher auf Kosten der Konzentration in einem größeren Volumen gearbeitet. Hierdurch wurden die biochemischen wie auch serologischen Untersuchungen nicht durch Unterschreitung der Nachweisgrenzen beeinträchtigt.

Zunächst wurde das mit einem angenommenen Molekulargewicht von 2 MDa eluierte Material nach GPC weiter untersucht. Das von *S. epidermidis* 939 und 1457 gewonnene Material reagierte gleichermaßen stark mit dem anti-PIA-Antiserum. Ein Hinweis auf eine differentielle immunologische Reaktivität zwischen den beiden Stämmen ließ sich hier nicht nachvollziehen. Bei beiden Stämmen konnte im hochmolekularen *peak* Hexosamin nachgewiesen werden. Es wurde daher versucht, dieses Material direkt einer NMR Analyse zu unterziehen. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse waren jedoch nicht aussagekräftig. Für eine Resonanzmessung waren die notwendigen H-Atome in der Molekülstruktur nicht ausreichend zugänglich verfügbar. Um daher einzelne Bestandteile, in den vereinigten Fraktionen des *peaks* der GPC zu bestimmen, folgte auf die GPC eine AEC.

Die in der Anionenaustauschchromatographie gewonnenen Elutionsprofile der durch GPC vorgereinigten Biofilmextrakte von *S. epidermidis* 939 und 1457 glichen sich im wesentlichen. Bei beiden Stämmen konnte ein nicht-anionischer *peak A* sowie ein leicht anionischer zweiter *peak B* nachgewiesen werden. In dieser Hinsicht erscheinen die hier aufgezeichneten Elutionsprofile dem bereits publizierten des Stamms 1457 (Abbildung 30) annähernd ähnlich. Hier konnten auch zwei unterschiedlich geladene PIA-Isoformen getrennt werden, die als Polysaccharid I und II bezeichnet werden (Mack et al., 1996a). Die Präpartionen der Mutante 1457-M10 konnten die bei *S. epidermidis* 939 und 1457 dargestellten *peaks* nicht gefunden werden. Dies gibt indirekten Hinweis darauf, dass sowohl die bei *S. epidermidis* 1457 wie auch 939 gefundenen *peaks A* und *B* direkt oder indirekt auf die Synthese von PIA zurückgeführt werden können.



Mack et al., 1996

Abbildung 30: Fraktionierung des spezifischen Antigens durch Anionenaustauschchromatographie. Das Antigen-reaktive Material von *S. epidermidis* 1457 war durch Sephadex G-200 und durch eine Q-Sepharose Säule chromatographisch getrennt worden. Der Durchfluss war mittels ELISA Inhibition mit dem spezifischen, absorbierten Antiserum analysiert worden. Das Material aus Fraktion 4-10 und aus 30-45 wurde separat isoliert und als Polysaccharid I und II bezeichnet (Mack et al., 1996b).

Durch den Vergleich der vorliegenden Ergebnisse der GPC und der AEC mit bereits publizierten Ergebnissen zur Analyse von PIA muss man den Schluss ziehen, dass unter Anwendung der hier beschriebenen Präparationsmethode das Material der *peaks A* und *B* sowohl bei *S. epidermidis* 1457 wie auch *S. epidermidis* 939 PIA beziehungsweise seinen unterschiedlich geladenen Isoformen Polysaccharid I und II entspricht.

Die analytische Untersuchung des *peak A* durch den Hexosamin Test konnte für diesen sowohl für *S. epidermidis* 939 als auch für 1457 eindeutig, eine maximale Konzentration von absolut gemessenem Hexosamin in den dazugehörigen Fraktionen zeigen. Bei der Darstellung der Fraktionen des *peak A* im Dot-Immuno-Blot, mit dem spezifischen PIA-Antiserum war durch die exakte Übereinstimmung der detektierten Signale mit den hexosaminhaltigen Fraktionen gezeigt, dass es sich bei dem getrennten Material um das Polysaccharid I, wie durch Mack et al. beschrieben, handelt. Die Analyse der Extrakte aus der Mutante *S. epidermidis* 1457-M10 erbrachte zudem in den analogen Fraktionen erwartungsgemäß keinen Nachweis für PIA. Im *peak A* der Mutante wurde weder Hexosamin nachgewiesen, noch konnte ein Signal mit dem PIA-spezifischen Antiserum detektiert werden.

Der schwach anionische, vermutete „dem Polysaccharid II“ von PIA entsprechende Absorption *peak B* der Extrakte aus *S. epidermidis* 939 und 1457 lieferte im Gegensatz zu *peak A* nicht eindeutig deckungsgleiche Ergebnisse im Hexosamin-Test und im DIA. In den

hexosaminhaltigen Fraktionen des *peaks B* von *S. epidermidis* 1457 wurde kein Signal mit dem PIA-spezifischen Antiserum detektiert. Ein Signal konnte hier nur in der unmittelbar auf die hexosaminhaltigen Fraktionen folgenden Fraktionen detektiert werden. Aus den Ergebnissen des Hexosamin-Tests und des DIA ergab sich die Hypothese, dass das anti-PIA-Antiserum hier mit einer weiteren, schwach anionischen, nicht Hexosamin-haltigen Struktur kreuzreagiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich neben PIA auch andere Moleküle in Ultraschall-Extrakten von *S. epidermidis* Oberflächenstrukturen befinden. Im Stamm *S. epidermidis* RP62A besteht das Material aus 20% (w/w) Protein und 80% (w/w) Polysaccharid. Der Polysaccharid-haltige Anteil besteht im wesentlichen aus Glycerol-Phosphat, Glukose, N-Acetylglukosamin und D-Alanin. Eine Präparation der *wall teichoic acid* (WTA) von *S. epidermidis* RP62A ergab eine ähnliche Zusammensetzung (Hussain et al., 1991; Hussain et al., 1992a). Es wäre also denkbar, dass durch die zur Anwendung gekommenen Präparationsmethoden tatsächlich PIA-unabhängige, jedoch mit dem anti-PIA-Antiserum kreuzreaktiven Strukturen über die GPC gereinigt und in der AEC aufgetrennt worden sind.

Als ein besonderes Merkmal trat in der Präparation von *S. epidermidis* 939 ein zusätzlicher, weder bei *S. epidermidis* 1457 noch bei der Mutante M10 nachweisbarer, stark anionischer *peak C* auf. Ein solcher *peak* wurde, auch aufgrund der Tatsache, dass bislang AEC Elutionsprofile von GPC-gereinigtem Biofilmmatrixmaterial nicht mittels Absorptionsmessung bei 230 nm ermittelt worden sind, noch nicht berichtet. Mittels Hexosamin-Test ließ sich in *peak C* kein Hexosamin nachweisen. Im Gegensatz dazu reagierte jedoch das an der Mutante 1457-M10 präabsorbierte Antiserum stark mit den entsprechenden Fraktionen. Da hier eine Kreuzreaktivität des anti-PIA-Antiserums besteht, scheint es sich um eine von *S. epidermidis* 939 synthetisierte Struktur zu handeln, die offenbar von der isogenen Mutante 1457-M10 nicht oder nur in geringem Umfang gebildet wird. Ansonsten hätten die entsprechenden Antikörper durch die Präabsorption aus dem anti-PIA-Antiserum entfernt worden sein müssen. Andererseits kann die verbleibende Reaktivität mit den Fraktionen des *peak C* auch aus der Tatsache resultieren, dass das entsprechende Antigen im Stamm *S. epidermidis* 939 quantitativ stärker gebildet wird als in Mutante 1457-M10.

Da also das Verhalten von Polysaccharid I des Stamms *S. epidermidis* 939 keine wesentlichen Unterschiede zu dem von 1457 erbrachte, erschien die Wahrscheinlichkeit größer, eine sekundäre Modifikation, die eine Kreuzreaktivität beider Strukturen mit dem anti-PIA-Antiserum begünstigen würde, im Bereich des *peak B* und bei 939 *C* zu finden. Deshalb fokussierte sich die Arbeit für eine Strukturanalyse fortan auf darin enthaltene Strukturen.

Die Strukturanalyse des schwach anionischen *peaks B*, des aufgereinigten Extraktes von *S. epidermidis* 939 und 1457 führte nicht zur Identifikation des erwarteten β -(1,6)-N-Acetylglukosamins mit N-Acetyl und geringen Mengen Hydroxylgruppen verestert mit Acetat und Succinat (Joyce et al., 2003; Mack et al., 1996a) sondern ebenfalls wie bereits durch Hussain et. al., 1992 beschriebenen WTA. Die Spektren zeigten die typischen, sich wiederholenden 1,3-Poly(glycerol-phosphat) [-Gro-P]_n Einheiten. Die vorliegende WTA Struktur gleicht der von *S. epidermidis* RP62A mit den Substituenten α -Glc, α -GlcNAc, α -GlcN sowie Alanylierungen und wurde beschrieben (Sadovskaya et al., 2004).

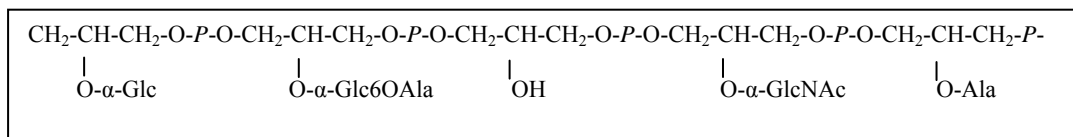


Abbildung 23 (Wh.): Schematische Darstellung der WTA aus *S. epidermidis* RP62A (Sadovskaya et al., 2004). Dabei ist $P = PO_2H$.

Der Nachweis von WTA in den Ultraschallextrakten der Stämme *S. epidermidis* 939 und *S. epidermidis* 1457 könnte darauf hinweisen, dass, anders als dies in bisherigen Publikationen hervorgehoben wurde, die extrazelluläre Biofilmmatrix aus weiteren, auch funktionell bedeutsamen Strukturen besteht und eine komplexere, eventuell analog zu eukaryotischen Zellsystemen, differenzierte supramolekulare Organisation aufweist. Die WTA könnte aufgrund ihrer anionischen Ladung und damit möglichen elektrostatischen Wechselwirkungen hieran beteiligt sein. Zwar konnte kürzlich bei *S. aureus* durch die Untersuchung einer WTA-defizienten Mutante nachgewiesen werden, dass in dieser Spezies WTA nicht für die Bindung von PIA an der Zelloberfläche verantwortlich ist (Vergara-Irigaray et al., 2008). Dies schließt jedoch keineswegs aus, dass die WTA für die Organisation der extrazellulären, PIA-haltigen Matrix Bedeutung besitzt. Eine mögliche Funktion könnte hier eine allgemein stabilisierende Rolle sein. Hinweise für eine Interaktion von PIA und WTA ergeben sich bereits aus dem Befund, dass die WTA in GPC unter Verwendung sowohl einer S-200 wie auch S-300 Säule sowohl bei *S. epidermidis* 1457 als auch 939 in den PIA-haltigen Fraktionen hochmolekularer Substanzen nahe des Ausschlussvolumens von etwa 2 MDa eluiert.

In einer unabhängigen Arbeit war es Sadovskaya und Mitarbeitern gelungen, PIA und Teichonsäuren durch die Verwendung einer S-300 Säulenmatrix in der Gelfiltration zu trennen (Sadovskaya et al., 2005). Diese Ergebnisse konnten hier nicht nachvollzogen werden, allerdings wurden in der genannten Arbeit auch keine immunologischen

Untersuchungen zur Anwesenheit von PIA durchgeführt. Des Weiteren wurde von der Arbeitsgruppe der Stamm *S. epidermidis* RP62A untersucht, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Zusammensetzung der extrazellulären Biofilmmatrix von Stamm zu Stamm unterscheidet.

Eine mögliche Ursache für das Fehlen im Hexosamin-Test oder der NMR-Spektroskopie, PIA zumindest in *peak B* nachzuweisen, könnte in der Prozessierung der Proben nach der Auftrennung mittels AEC begründet sein. Wurde die Probe zwischen GPC und AEC zu stark konzentriert, kam es erneut zur Kristallbildung und damit Unbrauchbarkeit. Da *S. epidermidis* 939 wie auch 1457 in der Lage ist, Biofilm zu bilden, und der stark hexosaminhaltige, neutrale Anteil *peak A* von PIA synthetisiert wird ist davon auszugehen, dass die Konzentration von PIA vergleichsweise zu Teichonsäure im *peak B* zu gering war um diese separat darzustellen.

Inhibiert man das PIA-Antiserum durch die Präinkubation mit der aufgereinigten WTA aus *S. epidermidis* 1457, so wird der Extrakt von *S. carnosus* x pTXicaADBC (Gerke et al., 1998), der beschriebenermaßen PIA ist, im Dot-Immuno Assay nicht mehr durch das spezifische PIA-Antiserum erkannt. Das Experiment zeigt, dass das verwendete anti-PIA-Antiserum eine Kreuzreaktivität gegenüber WTA aufweist.

Der stark anionische *peak C* wurde durch die NMR-Spektroskopie als Lipoteichonsäure (LTA) identifiziert. LTA ist normalerweise an der Oberfläche grampositiver Bakterien lokalisiert und durch einen Glykolipidanker in der äußeren Schicht der Zytoplasmamembran verankert, während WTA kovalent mit der Peptidoglycanschicht gebunden ist (Neuhaus and Baddiley, 2003). Die meisten Teichonsäureproduzierenden Bakterien präsentieren beides, WTA und LTA. Gewöhnlich unterscheidet sich WTA von LTA vielfältig durch Struktur, Biosynthese und Funktionen. Die molekulare Basis für die Synthese oder Funktion ist derzeit nicht bekannt (Gründling and Schneewind, 2007). Aufgrund der unterschiedlichen Biosynthesewege in verschiedenen Organismen könnte die LTA als Nebenprodukt im Extrakt von *S. epidermidis* 939 verblieben sein. Allerdings ist es auch möglich, dass LTA durch einen Mangel an D-Alanin eine stärkere negative Nettoladung durch Phosphat Gruppen erhält. Hierfür könnte ein Defekt im *dltA* Gen verantwortlich sein (Gross et al., 2001). Im NMR Profil des *peak C* aus der Präparation von *S. epidermidis* 939 kann dem D-Alanin kein eindeutiges Signal zugeordnet werden, was den Mangel dieses Substituenten bestätigen

würde. Vergleichbare Spektren von *S. aureus* LTA zeigen repräsentative Signale (Fedtke et al., 2007).

Es stellt sich zukünftig die Frage wieso in der Präparation von *S. epidermidis* 939 LTA enthalten war und ob die Bestandteile dieser zu einer Kreuzreaktivität mit dem PIA-spezifischen Antiserum führen könnten.

Wie bereits für die WTA diskutiert, muss angenommen werden, dass bei *S. epidermidis* 939 LTA in GPC im Komplex mit PIA eluiert wird. Die scheinbar eng miteinander assoziierten Strukturen könnten aufgrund der molekularen Eigenschaften durch van der Waals Kräfte zusammengehalten werden und sind deshalb leicht im Ionentauscher zu trennen. Als funktioneller Ladungsträger könnte auch das D-Alanin der LTA an einer Interaktion mit PIA oder anderen Elementen dieses Komplexes beteiligt sein. Eine Möglichkeit wäre, durch An- und Abwesenheit von D-Alanin die Nettoladung an der Bakterienoberfläche zu regulieren und dadurch strukturgebende PIA-Moleküle an der Oberfläche zu koordinieren.

Die D-Alanin Substitution ist bei *S. aureus* notwendig für die Biofilmbildung (Gross et al., 2001), ein Mangel des Substituenten würde also auch eine verringerte Biofilmbildung bei *S. epidermidis* 939 erklären, durch verringerte Biofilmmakulation wäre folglich sekundär auch die Synthese von PIA eingeschränkt. Zur Klärung dieser Frage wäre es möglich, die primäre Adhäsion an die Plastikoberfläche einer 96-Well Mikrotiterplatte zu quantifizieren (Mack et al., 2001). Diese Untersuchung war jedoch aufgrund des Umfangs in dieser Dissertation nicht mehr möglich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *S. epidermidis* 939 wie in der AEC und anschließendem DIA darstellbar PIA produziert. Hierbei scheint es wie auch bei *S. epidermidis* 1457 zur Synthese von unterschiedlich geladenen Isoformen, analog zu Polysaccharid I und II, zu kommen. Zusätzlich können sowohl bei *S. epidermidis* 939 wie auch 1457 WTA in den Präparationen extrazellulärer Biofilmmatrix nachgewiesen werden. Diese kreuzreagieren mit an der PIA-negativen Mutante 1457-M10 präbasorbierten anti-PIA-Antiserum. Da bei *S. epidermidis* 1457 diese Aktivität nicht gefunden werden kann, weist darauf hin, dass *S. epidermidis* 939 WTA wie auch LTA in größerem Umfang in die Biofilmmatrix integriert als *S. epidermidis* 1457. Die Diskrepanz zwischen dem stark biofilmpositiven Phänotyp des Stamms 939 und seiner geringen PIA-Synthese muss daher am ehesten nicht auf einer veränderten PIA-Struktur basieren, sondern könnte auch durch die funktionelle Substitution der interzellulär adhäsiven Funktion von PIA durch WTA und LTA erklärt werden. Zukünftige Untersuchungen sollen dieser Frage nachgehen. Hierbei wird es

notwendig sein, zum einen eine WTA und LTA in den Biofilmmatrixextrakten der Stämme *S. epidermidis* 939 und 1457 zu quantifizieren. Zusätzlich kann die funktionelle Bedeutung von WTA und LTA bei der interzellulären Aggregation und Biofilmmakkumulation durch Generierung einer spezifischen *dltA*-Mutante im genetischen Hintergrund von *S. epidermidis* 1457 und 939 Aufschluss hierüber erbringen.

Interaktion von S. epidermidis mit Bestandteilen der extrazellulären Biofilmmatrix

Die akkumulative Phase der *S. epidermidis* Biofilmbildung ist durch den Aufbau einer vielschichtigen Bakterienzellarchitektur gekennzeichnet. Die Bakterien werden durch die Integration in die, wie bereits im vorausgehenden Abschnitt diskutiert, aus PIA, WTA und, zumindest bei *S. epidermidis* 939, LTA sowie Proteinen aufgebaute extrazelluläre Biofilmmatrix eingebettet und dadurch im Zellverband gehalten (Rohde et al., 2006). Hierfür ist notwendiger Weise eine Interaktion der Bakterienzelloberfläche mit der Biofilmmatrix nötig. Auch vor dem Hintergrund, dass die Kenntnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen interessante neue Möglichkeiten zur Therapie von Fremdmaterial-assoziierten *S. epidermidis* Infektionen zulassen könnten (Götz, 2004), sollte daher die Möglichkeit geprüft werden, ob spezifische Oberflächenproteine mit einer entsprechenden Funktion identifiziert werden können.

Bisher sind noch keine Zelloberflächen-assoziierten Interaktionspartner von PIA oder anderen Bestandteilen der Biofilmmatrix beschrieben. Das *Accumulation associated protein* (Aap), galt als potentieller PIA-Rezeptor auf der Oberfläche von *S. epidermidis* (Mack et al., 1999a). Diese Annahme basierte auf der Beobachtung, dass durch chemische Mutagenese aus *S. epidermidis* RP62A erzeugte, Aap-negative Mutante M7 nicht nur Biofilm-negativ ist (Hussain et al., 1997), sondern PIA im Vergleich zum Wildtyp in vermehrtem Umfang in den Überstand abgibt (de Grahl, Mack, nicht publizierte Daten). Tatsächlich findet sich, wie oben beschrieben, besteht die repetitive Domäne-B von Aap aus sogenannten *G5 repeats* (Bateman et al., 2004). Diesen wird eine N-Acetylglukosamin-bindende Aktivität zugesprochen (Bateman et al., 2004). Eine spezifische *aap* knock-out Mutante von *S. epidermidis* RP62A zeigte jedoch keine veränderte PIA-Bindungskapazität (Hussain, Heilmann, Rohde, nicht publizierte Daten). Zusätzlich konnte in Untersuchungen, bei welchen die Interaktion von rekombinant exprimierter Aap Domäne-B (Rohde et al., 2005) und aufgereinigtem PIA mittels *surface plasmon resonance* Spektroskopie analysiert wurde, kein Hinweis auf eine spezifische Interaktion von PIA und Aap Domäne-B gefunden werden (Frankenberger,

Burdelski, Rohde, nicht publizierte Daten). Somit scheint es sich bei Aap nicht um ein Oberflächenprotein mit relevanter, PIA-bindender Aktivität zu handeln. Somit muss der vermehrte Nachweis von PIA in den Überständen der Mutante M7 auf einem Defekt Aap-unabhängiger Strukturen beruhen.

Um das Genom von *S. epidermidis* nach möglichen Proteinen mit der Fähigkeit zur Bindung an extrazelluläre Biofilmmatrix zu screenen, wurde eine *phage display library* von *S. epidermidis* 2 (Jacobsson et al., 2003) auf die Anwesenheit von Klonen mit erhöhter Affinität für hochmolekulare Biofilmmatrixbestandteilen untersucht. Hierbei wurden die Phagen an Oberflächen selektioniert, welche zuvor mittels GPC vorgereinigten, hochmolekulare Biofilmmatrixbestandteilen des Stamms beschichtet worden waren. Diese Präparationen enthalten, wie oben diskutiert, neben PIA auch WTA und LTA.

Normalerweise werden mit „*phage display*“ Protein-Protein Interaktionen getestet, jedoch können die präsentierten Proteine auch mit spezifischen Liganden, wie Polysaccharid Bindungen eingehen (Jacobsson et al., 2003). Mit „*phage display*“ konnte bereits die Fibronectin Bindungsdomäne Embp32 in *S. epidermidis* identifiziert werden (Williams et al., 2002). Tatsächlich gelang es hier, durch Selektion an den beschichteten Oberflächen Phagen mit einer scheinbar erhöhten Affinität zu extrazellulärer Biofilmmatrix zu selektionieren.

Ein Phage enthielt Sequenzfragment, welches für das Ypfp Protein von *S. aureus* kodiert. Das Ypfp (Diacylglycerol Glukosyltransferase) ist eine Glykolipid Synthase und vermittelt bei *S. aureus* die Synthese von LTA (Jorasch et al., 2000). Beschrieben ist diese Funktion auch für *B. subtilis* (Jorasch et al., 1998). Da es sich bei dem untersuchten Material um gefilterten Extrakt aus *S. epidermidis* 939 handelt, der nachweislich LTA enthält, spricht die gefundene Interaktion auch für eine Beteiligung von Ypfp an der LTA-Synthese in *S. epidermidis*. Die Identifikation der gefundenen Moleküle bildet die Grundlage für weitere Untersuchungen an Strukturen die von *S. epidermidis* 939 und 1457 gebildet werden. In den weiteren Untersuchungen konnte jedoch mittels eines ELISA nur für einen der selektionierten Phagen eine erhöhte Affinität zur beschichteten Oberfläche im Vergleich zum *insert*-freien Phagen dargestellt werden. Dieser affine Phage trug ein Insert, welches durch Sequenzierung eindeutig als Fragment des *extracellular matrix binding protein embp* identifiziert werden konnte. *embp* ist ein aus 30612 bp aufgebaute offener Leserahmen und kodiert für das größte bekannte Oberflächenprotein von *S. epidermidis* mit einem berechneten Molekulargewicht von etwa 1 MDa. Embp besitzt ein Exportsignal und findet sich dementsprechend auf der Oberfläche von *S. epidermidis* (Christner, Rohde, nicht publizierte Daten). Somit könnte Embp potentiell an der Interaktion der *S. epidermidis* Oberfläche mit PIA oder anderen

Matrixbestandteilen beteiligt sein. Embp ist durch eine hochgradig modulare Architektur gekennzeichnet. Besonders prominent ist der Nachweis sogenannter *found in various architectures* (FIVAR) Domänen. Das in dem Phagen mit erhöhter Affinität zur extrazellulären Biofilmmatrix nachgewiesene Fragment kodiert für zwei dieser FIVAR Domänen. FIVAR Domänen finden sich auch im FmtB Protein von *S. aureus* (Komatsuzawa et al., 2004) und der Gellan-Lyase von *Bacillus sp.* (Hashimoto et al., 1998). Beide Proteine sind am Zellwand turn-over beteiligt und besitzen Affinität zu Peptidoglykan. Da dieses sowohl bei *S. aureus* als auch bei *Bacillus sp.* aus N-Acetylglukosamin aufgebaut ist, wird den FIVAR Domänen eine N-Acetylglukosamin-bindende Aktivität zugesprochen. In den hier zur Selektion der Phagen verwendeten Präparationen konnten keine Peptidoglykanbestandteile nachgewiesen werden. Aus diesem Grunde scheint es wahrscheinlich, dass die Phagen tatsächlich spezifisch mit einem der Bestandteile der Biofilmmatrix interagieren. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass alle hier nachgewiesenen Bestandteil auch N-Acetylglukosamin enthalten. Hierbei ist PIA eine besonders interessante Struktur. Unabhängige Hinweise für eine PIA-bindende Aktivität von Embp wurde durch Untersuchung eines Embp-positiven beziehungsweise negativen Stammpaares 1585-Ra und 1585 gewonnen, bei welchem PIA durch *in trans* Expression von *icaADBC* synthetisiert wurde (Wendt, Rohde, nicht publizierte Daten). Es zeigte sich, dass nur der Embp-positive *S. epidermidis* 1585-Ra nach Expression von *icaADBC* PIA auf der Oberfläche fixierte und einen Biofilm ausbildete. Der Embp-negative *S. epidermidis* 1585 bildete zwar PIA, konnte dies jedoch nicht auf der Oberfläche binden und einen Biofilm bilden (Wendt, Rohde, nicht publizierte Daten). Zukünftige Untersuchungen werden die genauen strukturellen Determinanten der PIA-Embp Interaktion klären müssen. Des Weiteren muss geklärt werden, ob Embp auch Affinität zu WTA und LTA aufweist. Durch diese Untersuchungen wird ein vertieftes Verständnis der komplexen, zur *S. epidermidis* Biofilmbildung führenden, molekularen Interaktionen erzeugen. Hieraus können sich neue Möglichkeiten zur Prävention oder Therapie von Fremdmaterial-assoziierten *S. epidermidis* Infektionen resultieren.

7 Literaturverzeichnis

Allignet,J., Aubert,S., Dyke,K.G., and El Solh,N. (2001). *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* 69, 712-718.

Archer, G. L. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R. (eds). p. 2092-2100. (2000). Churchill Livingstone, Philadelphia.

Arciola,C.R., Baldassarri,L., and Montanaro,L. (2001). Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2151-2156.

Arciola,C.R., Baldassarri,L., and Montanaro,L. (2002). In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* the intercellular adhesion (ica) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains. *J. Biomed. Mater. Res.* 59, 557-562.

Arciola,C.R., Campoccia,D., Baldassarri,L., Donati,M.E., Pirini,V., Gamberini,S., and Montanaro,L. (2006). Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of ica genes with two classic phenotypic methods. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 76A, 425-430.

Arvaniti,A., Karamanos,N.K., Dimitracopoulos,G., and Anastassiou,E.D. (1994). Isolation and characterization of a novel 20-kDa sulfated polysaccharide from the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 432-438.

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.

Baldassarri,L., Donnelli,G., Gelosia,A., Voglino,M.C., Simpson,A.W., and Christensen,G.D. (1996). Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermis* clinical isolates. *Infect. Immun.* 64, 3410-3415.

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 Blood-Stream Infections in the United-States, 1980-1989. *American Journal of Medicine* 91, 86-89.

Banner,M.. (2007). Localized tufts of fibrils on *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047 are comprised of the accumulation-associated protein. *J. Bacteriol.* 189, 2793-2804.

Barker,L.P., Simpson,W.A., and Christensen,G.D. (1990). Differential production of slime under aerobic and anaerobic conditions. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2578-2579.

Bateman,A., Holden,M.T., and Yeats,C. (2004). The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics* 21, 1301-3.

- Begun,J., Gaiani,J.M., Rohde,H., Mack,D., Calderwood,S.B., Ausubel,F.M., and Sifri,C.D. (2007). Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *Plos Pathogens* 3, 526-540.
- Bishop-Hurley,S.L., Schmidt,F.J., Erwin,A.L., and Smith,A.L. (2005). Peptides selected for binding to a virulent strain of *Haemophilus influenzae* by phage display are bactericidal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 2972-2978.
- Bjerketorp,J., Jacobsson,K., and Frykberg,L. (2004a). The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of *Staphylococcus aureus* is a coagulase. *Fems Microbiology Letters* 234, 309-314.
- Bjerketorp,J., Nilsson,M., Ljungh,A., Flock,J.I., Jacobsson,K., and Frykberg,L. (2002). A novel von Willebrand factor binding protein expressed by *Staphylococcus aureus*. *Microbiology-Sgm* 148, 2037-2044.
- Bjerketorp,J., Rosander,A., Nilsson,M., Jacobsson,K., and Frykberg,L. (2004b). Sorting a *Staphylococcus aureus* phage display library against ex vivo biomaterial. *Journal of Medical Microbiology* 53, 945-951.
- Blumenkrantz,N and Asboe-Hansen,G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484-489.
- Boyce, J. M. Epidemiology and Prevention of Nosocomial Infections. In *Staphylococci in Human Disease*. Crossley, K.B. and Archer, G.L. (eds). p. 309-329. (1997) Churchill Livingstone, New York.
- Chaignon,P., Sadovskaya,I., Ragunah,C., Ramasubbu,N., Kaplan,J.B., and Jabbouri,S. (2007). Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 125-132.
- Christensen,G.D., Barker,L.P., Mawhinney,T.P., Baddour,L.M., and Simpson,W.A. (1990). Identification of an antigenic marker of slime production for *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 58, 2906-2911.
- 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.
- Conlon,K.M., Humphreys,H., and O'Gara,J.P. (2002a). *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. (2002b). Regulation of *icaR* gene expression in *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 171-177.
- Costerton,J.W., Stewart,P.S., and Greenberg,E.P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Cramton,S.E., Gerke,C., Schnell,N.F., Nichols,W.W., and Gotz,F. (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun.* 67, 5427-5433.

- 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.
- Deighton,M. and Borland,R. (1993). Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infect. Immun.* 61, 4473-4479.
- Dobinsky,S., Kiel,K., Rohde,H., Bartscht,K., Knobloch,J.K., Horstkotte,M.A., and Mack,D. (2003). Glucose-related dissociation between icaADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *J. Bacteriol.* 185, 2879-2886.
- Drewry,D.T., Galbraith,L., Wilkinson,B.J., and Wilkinson,S.G. (1990). Staphylococcal slime: a cautionary tale. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1292-1296.
- Dubois,M. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Emori,T.G. and Gaynes,R.P. (1993). An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 428-442.
- Espersen,F., Wilkinson,B.J., Gahrn-Hansen,B., Thamdrup,R., V, and Clemmensen,I. (1990). Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. *APMIS* 98, 471-478.
- Fedtke,I., Mader,D., Nicholson,G., Henseler,K., Goetz,F., Zaehringer,U., and Peschel,A. (2007). A *Staphylococcus aureus* mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity. *International Journal of Medical Microbiology* 297, 122-128.
- Fey,P.D., Ulphani,J.S., Gotz,F., Heilmann,C., Mack,D., and Rupp,M.E. (1999). Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Infectious Diseases* 179, 1561-1564.
- 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. *Reviews of Infectious Diseases* 12, 520-528.
- Frebourg,N.B., Lefebvre,S., Baert,S., and Lemeland,J.F. (2000). PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 38, 877-880.
- Gacesa,P. (1998). Bacterial alginate biosynthesis - recent progress and future prospects. *Microbiology-Uk* 144, 1133-1143.
- Galdbart,J.O., Allignet,J., Tung,H.S., Ryden,C., and El Solh,N. (2000). Screening for *Staphylococcus epidermidis* markers discriminating between skin-flora strains and those responsible for infections of joint prostheses. *J. Infect. Dis.* 182, 351-355.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18586-18593.

- Götz,F. (2002). Staphylococcus and biofilms. *Mol. Microbiol.* *43*, 1367-1378.
- Götz,F. (2004). Staphylococci in colonization and disease: prospective targets for drugs and vaccines. *Current Opinion in Microbiology* *7*, 477-487.
- Götz,F. and Schumacher,B. (1987). Improvements of Protoplast Transformation in *Staphylococcus carnosus*. *Fems Microbiology Letters* *40*, 285-288.
- Gross,M., Cramton,S.E., Götz,F., and Peschel,A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* *69*, 3423-3426.
- Gründling,A. and Schneewind,O. (2007). Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 8478-8483.
- Hall-Stoodley,L., Costerton,J.W., and Stoodley,P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* *2*, 95-108.
- Hartford,O., O'Brien,L., Schofield,K., Wells,J., and Foster,T.J. (2001). The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology-Sgm* *147*, 2545-2552.
- Hashimoto W. (1998). Polysaccharide lyase molecular cloning of gellan lyase gene and formation of the lyase from a huge precursor protein in *Bacillus sp.* GL1. *Arch Biochem Biophys.* *354*, 9-31.
- He,Q.L., Jiang,H., Zhang,F., Chen,H.B., and Tang,G.L. (2008). Simultaneous identification of multiple receptors of natural product using an optimized cDNA phage display cloning. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* *18*, 3995-3998.
- 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., 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.
- Heilmann,C., Schweitzer,O., Gerke,C., Vanittanakom,N., Mack,D., and Gotz,F. (1996b). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology* *20*, 1083-1091.
- 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.
- Hoess,R.H. (1993). Phage Display of Peptides and Protein Domains. *Current Opinion in Structural Biology* *3*, 572-579.
- Hoess,R.H. (2001). Protein design and phage display. *Chemical Reviews* *101*, 3205-3218.

- Hogt,A.H., Dankert,J., and Feijen,J. (1985). Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to A Hydrophobic Biomaterial. *Journal of General Microbiology* 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., Hastings,J.G., and White,P.J. (1991). Isolation and composition of the extracellular slime made by coagulase-negative staphylococci in a chemically defined medium. *J. Infect. Dis.* 163, 534-541.
- Hussain,M., Hastings,J.G., and White,P.J. (1992a). Comparison of cell-wall teichoic acid with high-molecular-weight extracellular slime material from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 37, 368-375.
- Hussain,M., Heilmann,C., Peters,G., and Herrmann,M. (2001). Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microbial Pathogenesis* 31, 261-270.
- 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.
- Hussain,M., Wilcox,M.H., White,P.J., Faulkner,M.K., and Spencer,R.C. (1992b). Importance of Medium and Atmosphere Type to Both Slime Production and Adherence by Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Hospital Infection* 20, 173-184.
- Itoh Y. (2008). Roles of pgaABCD genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J. Bacteriol.* 190, 3670-3680.
- Itoh,Y., Wang,X., Hinnebusch,B.J., Preston,J.F., III, and Romeo,T. (2005). Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J. Bacteriol.* 187, 382-387.
- Izano,E.A., Amarante,M.A., Kher,W.B., and Kaplan,J.B. (2008). Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 470-476.
- Jacobsson,K. and Frykberg,L. (1998). Gene VIII-based, phage-display vectors for selection against complex mixtures of ligands. *Biotechniques* 24, 294-301.
- Jacobsson,K. and Frykberg,L. (2001). Shotgun phage display cloning. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 4, 135-143.
- Jacobsson,K., Rosander,A., Bjerketorp,J., and Frykberg,L. (2003). Shotgun Phage Display - Selection for Bacterial Receptors or other Exported Proteins. *Biol. Proced. Online* 5, 123-135.

- Jorasch,P., Warnecke,D.C., Lindner,B., Zähringer,U., and Heinz,E. (2000). Novel processive and nonprocessive glycosyltransferases from *Staphylococcus aureus* and *Arabidopsis thaliana* synthesize glycoglycerolipids, glycophospholipids, glycosphingolipids and glycosylsterols. *Eur. J. Biochem.* 267, 3770-3783.
- Jorasch,P., Wolter,F.P., Zähringer,U., and Heinz,E. (1998). A UDP glucosyltransferase from *Bacillus subtilis* successively transfers up to four glucose residues to 1,2-diacylglycerol: expression of ypfP in *Escherichia coli* and structural analysis of its reaction products. *Mol. Microbiol.* 29, 419-430.
- Joyce,J.G., Abeygunawardana,C., Xu,Q.W., Cook,J.C., Hepler,R., Przysiecki,C.T., Grimm,K.M., Roper,K., Ip,C.C.Y., Cope,L., Montgomery,D., Chang,M., Campie,S., Brown,M., McNeely,T.B., Zorman,J., Maira-Litran,T., Pier,G.B., Keller,P.M., Jansen,K.U., and Mark,G.E. (2003). Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high molecular weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 226, U205.
- Kaplan,J.B., Rangunath,C., Velliyagounder,K., Fine,D.H., and Ramasubbu,N. (2004a). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2633-2636.
- Kaplan,J.B., Velliyagounder,K., Rangunath,C., Rohde,H., Mack,D., Knobloch,J.K.M., and Ramasubbu,N. (2004b). Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms. *Journal of Bacteriology* 186, 8213-8220.
- Karlowsky, J. A., Jones, M. E., Draghi, D. C., Thornsberry, C., Sahm, D. F., and Volturo G.A. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002 (2004). *Ann Clin Microbiol Antimicrob* (3)
- Klingenberg,C., Ronnestad,A., Anderson,A.S., Abrahamsen,T.G., Zorman,J., Villaruz,A., Flaegstad,T., Otto,M., and Sollid,J.E. (2007). Persistent strains of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: virulence factors and invasiveness. *Clinical Microbiology and Infection* 13, 1100-1111.
- 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., deLencastre,H., Sanches,I.S., Health,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 (vol 47, pg 313, 1997). *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 1279.
- 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., 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 799-812.

- Knobloch, J.K., Horstkotte, M.A., Rohde, H., Kaulfers, P.M., and Mack, D. (2002). Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 683-687.
- Knobloch, J.K.M., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H.H., and Mack, D. (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: Differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *Journal of Bacteriology* 183, 2624-2633.
- Knobloch, J.K.M., 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 sigma(B) by repression of the negative regulator gene icaR. *Infection and Immunity* 72, 3838-3848.
- Knobloch, J.K.M., Jager, S., Huck, J., Horstkotte, M.A., and Mack, D. (2005). mecA is not involved in the sigma(B)-dependent switch of the expression phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 1216-1219.
- Komatsuzawa (2004). The gate controlling cell wall synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 53, 1221-1231.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 511-518.
- Lane-Smith, R. and Gilkerson, E. (1979). Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal. Biochem.* 98, 478-480.
- Lasa, I. (2006). Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International Microbiology* 9, 21-28.
- Lasa, I. and Penades, J.R. (2006). Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology* 157, 99-107.
- Ludwicka, A., Jansen, B., Waldström, T. and Pulverer, G. Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. 256, 479-489. 1984. *Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A.*
- 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. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene [A]* 258, 256-267.
- Mack, D. (1999a). Molecular mechanisms of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Journal of Hospital Infection* 43, S113-S125.
- Mack, D., Bartscht, K., Fischer, C., Rohde, H., De Grahl, C., Dobinsky, S., Horstkotte, M.A., Kiel, K., and Knobloch, J.K.M. (2001). Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. *Microbial Growth in Biofilms, Pt A* 336, 215-239.

- Mack,D., Becker,P., Chatterjee,I., Dobinsky,S., Knobloch,J.K.M., 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. *International Journal of Medical Microbiology* 294, 203-212.
- 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. *Journal of Bacteriology* 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. *Journal of Infectious Diseases* 174, 881-884.
- 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. *Infection and Immunity* 62, 3244-3253.
- Mack,D., Riedewald,J., Rohde,H., Magnus,T., Feucht,H.H., Elsner,H.A., Laufs,R., and Rupp,M.E. (1999b). Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infection and Immunity* 67, 1004-1008.
- Mack,D., Rohde,H., Harris,L.G., Davies,A.P., Horstkotte,M.A., and Knobloch,J.K.M. (2006a). Biofilm formation in medical device-related infection. *International Journal of Artificial Organs* 29, 343-359.
- 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. *Infection and Immunity* 60, 2048-2057.
- Mack,D., Horstkotte,M.A., Rohde,H., and Knobloch,J.K.M. (2006b). Coagulase-Negative *Staphylococci*. In *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*, Pace,J.L., Rupp,M.E., and Finch,R.G., ed. (Boca Raton: CRC Press), pp. 109-153.
- Maira-Litran,T., Kropec,A., Abeygunawardana,C., Joyce,J., Mark,G., III, Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (2002). Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. *Infect. Immun.* 70, 4433-4440.
- Maira-Litran,T., Kropec,A., Goldmann,D., and Pier,G.B. (2004). Biologic properties and vaccine potential of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. *Vaccine* 22, 872-879.
- Maira-Litran,T., Kropec,A., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (2005). Comparative opsonic and protective activities of *Staphylococcus aureus* conjugate vaccines containing native or deacetylated staphylococcal poly-N-acetyl-beta-(1-6)-glucosamine (vol 73, pg 6752, 2005). *Infection and Immunity* 73, 7789.
- McKenney,D., Hubner,J., Muller,E., Wang,Y., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (1998). The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin. *Infect. Immun.* 66, 4711-4720.

- McKenney,D., Pouliot,K., Wang,Y., Murthy,V., Ulrich,M., Doring,G., Lee,J.C., Goldmann,D.A., and Pier,G.B. (2000). Vaccine potential of poly-1-6 beta-D-N-succinylglucosamine, an immunoprotective surface polysaccharide of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Biotechnology* 83, 37-44.
- 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.
- Moretro,T., Hermansen,L., Holck,A.L., Sidhu,M.S., Rudi,K., and Langsrud,S. (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5648-5655.
- Mullen,L.M., Nair,S.P., Ward,J.M., Rycroft,A.N., and Henderson,B. (2006). Phage display in the study of infectious diseases. *Trends in Microbiology* 14, 141-147.
- Navarre,W.W. and Schneewind,O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, 174-+.
- Neuhaus,F.C. and Baddiley,J. (2003). A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-Alanyl-Teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 686-+.
- Ninin,E., Caroff,N., Espaze,E., Marailac,J., Lepelletier,D., Milpied,N., and Richet,H. (2006). Assessment of *ica* operon carriage and biofilm production in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing bacteraemia in bone marrow transplant recipients. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 446-452.
- NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from October 1986-April 1996 (1996). *Am J Infect Control.* 24, 380-388
- NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999. (1999) *Am J Infect Control.* 27, 520-532
- Nobel, W. C. Staphylococci carriage and skin and soft tissue infection. In Crossley K. B. and Archer G. L. *The staphylococci in human disease.* p. 401-412 (1997) New York: Churchill Livingstone.
- O'Toole,G., Kaplan,H.B., and Kolter,R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* 54, 49-79.
- Otto,M. (2004). Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Front Biosci.* 9, 841-863.
- Parise,G., Mishra,M., Roh,Y., Romeo,T., and Deora,R. (2007). Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *Journal of Bacteriology* 189, 750-760.
- Peters, G. and Pulverer, G. Die Familie der Micrococcaceae. In *Medizinische Mikrobiologie.* Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H. and Pulverer, G. (eds.). p. 250-260. (2001). Urban und Fischer, München.

- 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.
- Petrelli,D., Zampaloni,C., D'Ercole,S., Prenna,M., Ballarini,P., Ripa,S., and Vitali,L.A. (2006). Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 25, 773-781.
- 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. Systematic and Applied Microbiology 26, 30-37.
- Probst,A.J., Hertel,C., Richter,L., Wassill,L., Ludwig,W., and Hammes,W.P. (1998). *Staphylococcus condimenti sp. nov.*, from say sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. utilis subsp. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology 48, 651-658.
- Qasba,P.K., Ramakrishnan,B., Boeggeman,E. (2008). Structure and function of beta -1,4-galactosyltransferase. Curr Drug Targets 9, 292-309.
- 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.
- Ramasubbu,N., Thomas,L.M., Rangunath,C., and Kaplan,J.B. (2005). Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Journal of Molecular Biology 349, 475-486.
- Rohde,H., Bartscht,K., Hussain,M., Buck,F., Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K.M., Heilmann,C., Herrmann,M., and Mack,D. (2004a). The repetitive domain B of the accumulation associated protein Aap mediates intercellular adhesion and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. International Journal of Medical Microbiology 294, 128.
- Rohde,H., Burandt,E.C., Siemssen,N., Frommelt,L., Burdelski,C., Wurster,S., Scherpe,S., Davies,A.P., Harris,L.G., Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K.M., Rangunath,C., Kaplan,J.B., and Mack,D. (2007). Polysaccharide intercellular adhesion or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. Biomaterials 28, 1711-1720.
- 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.
- Rohde,H., Kalitzky,M., Kroger,N., Scherpe,S., Horstkotte,M.A., Knobloch,J.K., Zander,A.R., and Mack,D. (2004b). 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., Knobloch,J.K.M., Horstkotte,M.A., and Mack,D. (2001a). Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of icaADBC genotype-independent factors. *Medical Microbiology and Immunology* 190, 105-112.
- Rohde,H., Knobloch,J.K.M., Horstkotte,M.A., and Mack,D. (2001b). Correlation of *Staphylococcus aureus* icaADBC genotype and biofilm expression phenotype. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 4595-4596.
- Rohde,H., Mack,D., Christner,M., Burdelski,C., Franke,G., and Knobloch,J.K.M. (2006). Pathogenesis of staphylococcal device-related infections: from basic science to new diagnostic, therapeutic and prophylactic approaches. *Reviews in Medical Microbiology* 17, 45-54.
- Rupp,M.E. and Archer,G.L. (1994) Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis.* 19, 231-243.
- 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.
- Russel,M. (1995). Moving Through the Membrane with Filamentous Phages. *Trends in Microbiology* 3, 223-228.
- Russel,M., Linderoth,N.A., and Sali,A. (1997). Filamentous phage assembly: Variation on a protein export theme. *Gene* 192, 23-32.
- Sadovskaya,I., Faure,S., Watier,D., Leterme,D., Chokr,A., Girard,J., Migaud,H., and Jabbouri,S. (2007). Potential use of poly-N-acetyl-beta-(1,6)-glucosamine as an antigen for diagnosis of staphylococcal orthopedic-prosthesis-related infections. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1609-1615.
- Sadovskaya,I., Vinogradov,E., Flahaut,S., Kogan,G., and Jabbouri,S. (2005). Extracellular carbohydrate-containing polymers of a model biofilm-producing strain, *Staphylococcus epidermidis* RP62A. *Infection and Immunity* 73, 3007-3017.
- Sadovskaya,I., Vinogradov,E., Li,J., and Jabbouri,S. (2004). Structural elucidation of the extracellular and cell-wall teichoic acids of *Staphylococcus epidermidis* RP62A, a reference biofilm-positive strain. *Carbohydr. Res.* 339, 1467-1473.
- Schaberg,D.R., Culver,D.H., and Gaynes,R.P. (1991). Major Trends in the Microbial Etiology of Nosocomial Infection. *American Journal of Medicine* 91, S72-S75.
- Smith,G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.

- Somers, V.A., Brandwijk, R.J., Joosten, B., Moerkerk, P.T., Arends, J.W., Menheere, P., Pieterse, W.O., Claessen, A., Scheper, R.J., Hoogenboom, H.R., and Hufton, S.E. (2002). A panel of candidate tumor antigens in colorectal cancer revealed by the serological selection of a phage displayed cDNA expression library. *Journal of Immunology* *169*, 2772-2780.
- Sperber, W.H. and Tatini, S.R. (1975). Interpretation of Tube Coagulase Test for Identification of *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology* *29*, 502-505.
- Spargser, 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* *53*, 2007-2011.
- Stevens, N.T., Tharmabala, M., Dillane, T., Greene, C.M., O'Gara, J.P., and Humphreys, H. (2008). Biofilm and the role of the ica operon and aap in *Staphylococcus epidermidis* isolates causing neurosurgical meningitis. *Clinical Microbiology and Infection* *14*, 719-722.
- Takahashi, T., Satoh, I., and Kikuchi, N. (1999). Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* *49*, 725-728.
- Tegmark, K., Karlsson, A., Arvidson, S. (2000). Identification and characterization of SarH1, a new global regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* *37*, 398-409.
- Tenover, F.C. and Gaynes, R. The epidemiology of Staphylococcus infections. In Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., and Rood J.I. (eds.). *Gram-Positive Pathogens*. p. 414-421. (2000) ASM Press Washington D.C.
- Timmerman, C.P., Fleer, A., Besnier, J.M., Degraaf, L., Cremers, F., and Verhoef, J. (1991). Characterization of A Proteinaceous Adhesin of *Staphylococcus epidermidis* Which Mediates Attachment to Polystyrene. *Infection and Immunity* *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. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* *43*, 175-182.
- van Beijnum, J.R., Moerkerk, P.T.M., Gerbers, A.J., de Brune, A.P., Arends, J.W., Hoogenboom, H.R., and Hufton, S.E. (2002). Target validation for genomics using peptide-specific phage antibodies: A study of five gene products overexpressed in colorectal cancer. *International Journal of Cancer* *101*, 118-127.
- Vandecasteele, S.J., Peetermans, W.E., Merckx, R., Rijnders, B.J., and Van Eldere, J. (2003). Reliability of the ica, aap and atlE genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clin. Microbiol. Infect.* *9*, 114-119.
- Vaudaux, P., Pittet, D., Haerberli, 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.C., Cremers,F.F.M., vanDijk,H., and Fleer,A. (1996). Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology* 178, 537-541.
- Vergara-Irigaray,M., Maira-Litran,T., Merino,N., Pier,G.B., Penades,J.R., and Lasa,I. (2008). Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Microbiology-Sgm* 154, 865-877.
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1521-1527.
- Vuong,C., Durr,M., Carmody,A.B., Peschel,A., Klebanoff ,S.J., and Otto,M. (2004a). Regulated expression of pathogen-associated molecular pattern molecules in *Staphylococcus epidermidis*: quorum-sensing determines pro-inflammatory capacity and production of phenol-soluble modulins. *Cellular Microbiology* 6, 753-759.
- Vuong,C., Gerke,C., Somerville,G.A., Fischer,E.R., and Otto,M. (2003). Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Infectious Diseases* 188, 706-718.
- Vuong,C., Gotz,F., and Otto,M. (2000). Construction and characterization of an agr deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* 68, 1048-1053.
- Vuong,C., Kocianova,S., Voyich,J.M., Yao,Y., Fischer,E.R., DeLeo,F.R., and Otto,M. (2004b). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J. Biol. Chem.* 279, 54881-54886.
- Vuong,C., Voyich,J.M., Fischer,E.R., Braughton,K.R., Whitney,A.R., DeLeo,F.R., and Otto,M. (2004c). Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 6, 269-275.
- Waldvogel,F.A. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin (1989). *J. Infect Dis.*160, 865-875.
- 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.
- Wang,X. (2004). The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186, 2724-2734.
- Williams,R.J., Henderson,B., Sharp,L.J., and Nair,S.P. (2002). Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* 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. *Pediatric Infectious Disease Journal* 22, 686-691.

- Yang,G., Gao,Y., Dong,J., Liu,C., Xue,Y., Fan,M., Shen,B., Shao,N. (2005) A Novel Peptide Screened by Phage Display Can Mimic TRAP Antigen Epitope against *Staphylococcus aureus* Infections. *J.Biol.Chem.* *280*, 27431-27435.
- 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.
- Zhang,L.H., Jacobsson,K., Strom,K., Lindberg,M., and Frykberg,L. (1999). *Staphylococcus aureus* expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta(2)-glycoprotein I. *Microbiology-Sgm* *145*, 177-183.
- Zhang,Y.Q., Ren,S.X., Li,H.L., Wang,Y.X., Fu,G., Yang,J., Qin,Z.Q., Miao,Y.G., Wang,W.Y., Chen,R.S., Shen,Y., Chen,Z., Yuan,Z.H., Zhao,G.P., Qu,D., Danchin,A., and Wen,Y.M. (2003). Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* *49*, 1577-1593.
- 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.

8 Abkürzungsverzeichnis

A ₄₁₀	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 405nm
A ₅₇₀	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 570nm
AAP	<i>Accumulation-associated-protein</i>
AEC	<i>Anion exchange chromatography</i>
AtIE	Autolysin
BAP	<i>Biofilm-associated protein</i>
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
cfu	<i>Cell forming unit</i>
DIA	<i>Dot-immuno-assay</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DspB	Dispersin B
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMBP	<i>Extracellular matrix binding protein</i>
FIVAR	<i>Found in various architectures</i>
g	Gramm od. Gravitationskonstante
GlcNAc	N-Acetyl-Glukosamin
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	<i>Hour</i>
ica	<i>Intercellular adhesion</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
KDa	Kilodalton
KNS	Koagulase negative Staphylokokken
l	Liter
LTA	<i>Lipoteichoic acid</i>
M	Mutante
MDa	Megadalton
mg	Milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mol	Stoffmenge
MQ-H ₂ O	Entionisiertes Wasser
ms	Millisekunden
MSCRAMM	<i><u>M</u>icrobial <u>s</u>urface <u>c</u>omponents <u>r</u>ecognizing <u>a</u>dhesive <u>m</u>atrix <u>m</u>olecules</i>
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	<i><u>N</u>uclear <u>m</u>agnetic <u>r</u>esonance</i> Spektrometrie
OD ₆₅₀	Optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 650nm
PBS	<i><u>P</u>hosphate <u>b</u>uffered <u>s</u>aline</i>
PCR	<i><u>P</u>olymerase <u>c</u>hain <u>r</u>eaction</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIA	<i><u>P</u>olysaccharide <u>i</u>ntercellular <u>a</u>dhesin</i>
PNAG	<i><u>P</u>oly-<u>N</u>-<u>A</u>cetyl glucosamin</i>
PNSG	<i><u>P</u>oly-<u>N</u>-<u>S</u>uccinyl glucosamin</i>
PS/A	<i><u>C</u>apsular <u>p</u>olysaccharide/<u>a</u>dhesin</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAA	<i><u>S</u>lime-<u>a</u>ssociated <u>a</u>ntigen</i>
Ssp 1	<i><u>S</u>taphylococcal <u>s</u>urface <u>p</u>rotein 1</i>
TSB	<i><u>T</u>rypticase <u>s</u>oya <u>b</u>roth</i>
U	<i><u>u</u>nit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	<i><u>V</u>olume per <u>v</u>olume</i>
(w/v)	<i><u>W</u>eight per <u>v</u>olume</i>
Wh.	Wiederholung
WTA	<i><u>w</u>all <u>t</u>eichoic <u>a</u>cid</i>
Ypfp	Diacylglycerol Gucosyltransferase

9 Anhang

9.1 Aminosäurepolymorphismen IcaA

S. epidermidis 939 (1) MHVFNLLFYPIFMSIYWIVGSIYYFFIKE**KPFNR L LLVKSEHQQVEGIS**
 S. epidermidis 1457 (1) MHVFNLLFYPIFMSIYWIVGSIYYFFIKE**KPFNR S LLVKSEHQQVEGIS**

S. epidermidis 939 (51) FLLACYNESETVQDTLSSVLSLEYPEKEIIIIINDGSSDNT**AELIY E FKKN**
 S. epidermidis 1457 (51) FLLACYNESETVQDTLSSVLSLEYPEKEIIIIINDGSSDNT**AELIY D FKKN**

S. epidermidis 939 (101) HDFKFDVLEVNREGKANALNEGKQASYEYVMCLDADTVIDDDAPFYMIED
 S. epidermidis 1457 (101) HDFKFDVLEVNREGKANALNEGKQASYEYVMCLDADTVIDDDAPFYMIED

S. epidermidis 939 (151) FKKNPKLGAVTGNPRIRNKSSILGKIQTIEYASIIGCIKRSQSLAGAIN**T**
 S. epidermidis 1457 (151) FKKNPKLGAVTGNPRIRNKSSILGKIQTIEYASIIGCIKRSQSLAGAIN**T**

S. epidermidis 939 (201) ISGVFTLFKKSALKDVGWDTDMITEDIAVSWKLHLFDYEIKYEPRALCW
 S. epidermidis 1457 (201) ISGVFTLFKKSALKDVGWDTDMITEDIAVSWKLHLFDYEIKYEPRALCW

S. epidermidis 939 (251) MLVPETIGGLWKQVRWAQGGHEVLL**RDFW S TIKTKKLSLYILMFEQIAS**
 S. epidermidis 1457 (251) MLVPETIGGLWKQVRWAQGGHEVLL**RDFW P TIKTKKLSLYILMFEQIAS**

S. epidermidis 939 (301) ITWVYIVLCYLSFLVITANILDYTYLKYSFSIFFSSFTMTFINIIQFTV
 S. epidermidis 1457 (301) ITWVYIVLCYLSFLVITANILDYTYLKYSFSIFFSSFTMTFINIIQFTV

S. epidermidis 939 (351) ALFIDSRYEKKNIVGLIFLSWYPTLYWVINAADVIMAFPKALKRKKGGYA
 S. epidermidis 1457 (351) ALFIDSRYEKKNIVGLIFLSWYPTLYWVINAADVIMAFPKALKRKKGGYA

S. epidermidis 939 (401) TWSSPDRGNIQR
 S. epidermidis 1457 (401) TWSSPDRGNIQR

L 36 S
E 96 D
S 281 P