

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. M. Aepfelbacher



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

**Etablierung eines GFP-basierten Reportersystems zur
Untersuchung der *icaADBC*-Expression in
Staphylococcus epidermidis Biofilmen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg

vorgelegt von

Chia-Jung Wang

aus Taipei, Taiwan

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 14.05.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. P.-M. Kaulfers

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J.-M. Pollok

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	5
3	Einleitung.....	6
3.1	Die Gattung der Staphylokokken.....	6
3.2	Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken.....	7
3.3	Der Prozess der Biofilmbildung.....	9
3.3.1	Primäre Bindung von <i>S. epidermidis</i> an Biomaterialien.....	10
3.3.2	Mechanismen der Biofilm Akkumulation.....	11
3.3.3	Regulation der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i>	14
3.4	Reportergene.....	16
3.5	Voraussetzungen der vorliegenden Arbeit.....	17
4	Material und Methoden.....	19
4.1	Material.....	19
4.1.1	Chemikalien und Einwegartikel.....	19
4.1.2	Laborgeräte.....	19
4.1.3	Medien.....	21
4.1.4	Lösungen.....	24
4.1.5	Bakterienstämme und Plasmide.....	26
4.1.6	Oligonukleotide und Sonden.....	27
4.1.7	Datenbanken und Programme.....	28
4.1.8	Allgemeine mikrobiologische Methoden.....	28
4.1.9	Molekularbiologische Methoden.....	30
4.1.10	Proteinchemische Methoden.....	37
4.1.11	Fluoreszenzmikroskopie.....	39

5	Ergebnisse	40
5.1	Erstellung eines GFP-Reporterkonstruktes zur Analyse der Expression von <i>icaA</i> in <i>S. epidermidis</i>	40
5.1.1	Klonierungsstrategie	40
5.1.2	Sequenzierung von pCR4 _{icagfpfus}	44
5.1.3	Ligation des Fragments <i>gfpsacnot</i> in pCR4 _{icagfpfus}	45
5.1.4	Sequenzierung von pCR4 _{fusgfp}	47
5.1.5	Überführung des Konstruktes in den Staphylokokkenvektor pRB472 48	
5.1.6	Ligation des Fragments <i>fusgfp</i> in den Staphylokokkenvektor pRB472 49	
5.1.7	Elektroporation von RN4220 mit pRB472 _{fusgfp}	50
5.1.8	Phagentransduktion von pRB472 _{fusgfp} in <i>S. epidermidis</i> 1457	51
5.2	Fluoreszenzanalyse von <i>S. epidermidis</i> 1457 x pRB472 _{fusgfp}	52
5.3	Untersuchung der GFP-Expression.....	53
6	Diskussion.....	55
7	Zusammenfassung.....	62
8	Literaturverzeichnis.....	63
9	Anhang	78
9.1	Abkürzungsverzeichnis	78
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	80
9.3	Danksagung.....	82
9.4	Curriculum Vitae.....	83
9.5	Publikationsverzeichnis.....	84
9.6	Erklärung.....	85

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

S. epidermidis ist der wichtigste Erreger Fremdkörper-assoziiierter Infektionen. Der bedeutendste Pathogenitätsfaktor ist die Fähigkeit des Erregers zur Ausbildung mehrschichtiger Biofilme auf der Oberfläche von implantierten Fremdkörpern. Biofilme sind komplexe bakterielle Konsortien, die sich hinsichtlich ihrer Stoffwechselaktivität, Antibiotikaempfindlichkeit und Expression von Virulenzfaktoren von planktonisch wachsenden Bakterien unterscheiden.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Expression der Gene, die für die Biofilmbildung von *S. epidermidis* relevant sind. Bislang konnten zwei Faktoren identifiziert werden, die essentiell diesen Prozess vermitteln: das interzelluläre Polysaccharidadhäsin PIA, welches durch im *icaADBC* Operon codierte Enzymsysteme synthetisiert wird, und *aap*, welches für das *accumulation associated protein* (Aap) codiert. Die Expression von *icaADBC* soll durch Konstruktion von Reportergensystemen untersucht werden. Hierzu wird der Promotor *icaA* vor das Gen *gfpmut_{3,1}* unter Verwendung gängiger molekulargenetischer Arbeitsmethoden in den Staphylokokkenvektor pRB472 kloniert. GFP_{mut3,1} ist ein *green fluorescence protein*, dessen Expression in Staphylokokken durch Franke *et. al.* optimiert wurde. Die resultierenden Plasmid-Konstrukte werden durch Elektroporation in *S. aureus* RN4220 eingeführt und durch Phagentransduktion in den zu untersuchenden Stamm *S. epidermidis* 1457 transduziert. In diesem Stamm soll dann die Expression von *icaADBC* sowohl in unterschiedlichen Wachstumsphasen als auch unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen durch Messung der relativen Fluoreszenz quantitativ und unter Einsatz eines konfokalen Laserscanningmikroskops qualitativ charakterisiert werden.

3 Einleitung

3.1 Die Gattung der Staphylokokken

Die Gattung *Staphylococcus* gehört neben den Gattungen *Micrococcus*, *Stomatococcus* und *Planococcus* der Familie der *Micrococcaceae* an. Von humanmedizinischer Bedeutung ist vor allem die Gattung *Staphylococcus*. Im Vergleich zu den anderen Gattungen weisen Staphylokokken einen sehr niedrigen GC-Gehalt der DNA von 30-39 Molprozent auf (Kloos, 1997; Wilkinson, 1997). Staphylokokken sind runde bis ovale, gram-positive Kokken mit einem Durchmesser von 0,5 bis 1,5 µm, die als einzelne Zellen, kurze Ketten oder unregelmäßige traubenartige Haufen angeordnet liegen können. Es handelt sich um fakultativ anaerobe, unbewegliche, nicht sporenbildenden Bakterien, die meist positiv für den Nachweis des Enzyms Katalase sind (Pfaller und Herwaldt, 1988).

Staphylokokken haben ein Temperaturoptimum zwischen 30 °C und 37 °C. Sie sind vergleichsweise unempfindlich und wachsen auch bei ungünstigeren Bedingungen aufgrund einer erhöhten pH-Toleranz und Resistenz gegen Austrocknung und Desinfektionsmittel.

Zurzeit lässt sich der Genus *Staphylococcus* durch biochemische, molekularbiologische und physiologische Untersuchungen in 43 Spezies einteilen, wovon mehrere in weitere Subspezies unterteilt werden können. Derzeit sind daher insgesamt 64 Taxa bekannt (Kloos *et al.*, 1997; Kloos *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 1998; Probst *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 1999; Place *et al.*, 2003; Spersger *et al.*, 2003; Pantucek *et al.*, 2005). Diese lassen sich durch den Nachweis der Prothrombin-aktivierenden Koagulase in Koagulase-positive und in Koagulase-negative Arten unterteilen (Sperber und Tatini, 1975). Die einzige bekannte Koagulase-positive Spezies mit human-pathogener Relevanz ist *Staphylococcus aureus*. Weitere wesentliche human-pathogene Spezies gehören in die Gruppe der Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) (Kloos und Bannerman, 1994; Kloos, 1997).

14 der bekannten KNS-Spezies kommen bei Menschen regelmäßig als Besiedlungsflora der Haut und Hautanhangsgebilde vor (Kloos und Bannerman, 1994; Kloos, 1997). Die höchste Dichte findet sich mit $10^4 - 10^6$ CFU / cm² an den

Ausführungsgängen von Schweißdrüsen, Haartalgdrüsen und Schleimhäuten an Körperöffnungen (Noble und Naidoo, 1986; Noble, 1997). Einige Spezies weisen eine deutliche Präferenz bezüglich der besiedelten Körperregion auf. So wird *S. capitis* typischerweise im Bereich der behaarten Kopfhaut, *S. auricularis* im äußeren Gehörgang und *S. haemolyticus* sowie *S. hominis* im Bereich apokriner Schweißdrüsen angetroffen. *S. epidermidis* dagegen kommt auf der gesamten Körperoberfläche vor und ist die am häufigsten von der Haut des Menschen isolierte Staphylokokkenspezies (Kloos und Bannerman, 1994; Kloos, 1997; Noble, 1997).

3.2 Infektionen durch Koagulase-negative Staphylokokken

KNS gehören zur normalen Bakterienflora der Haut und Schleimhäute des Menschen. Daher wurde der Nachweis von KNS in der Vergangenheit meistens als Kontamination von klinischen Untersuchungsmaterialien ohne wesentliche pathologische Bedeutung gewertet (Archer, 2000). Lediglich *Staphylococcus saprophyticus* war als Harnwegsinfektionserreger bei jungen Frauen bekannt (Marrie *et al.*, 1982). Erst in den letzten 25 Jahren haben epidemiologische Untersuchungen gezeigt, dass sie als wichtige, vor allem nosokomiale Krankheitserreger betrachtet werden müssen (Archer, 2000; Karlowsky *et al.*, 2004). Eine Surveillance Studie des *National Nosocomial Infections Surveillance System* (NNIS) in den U.S.A. auf Intensivstationen in dem Zeitraum von 1992 – 1998 zeigte, dass KNS bei Fremdkörper-assoziiierter Septikämie die mit Abstand häufigsten (39 %) der isolierten Pathogene darstellten (Richards *et al.*, 2000).

KNS werden als opportunistische Erreger im Rahmen einer spezifischen oder unspezifischen Immunsuppression, wie zum Beispiel im Zusammenhang mit einer Chemotherapie, Knochenmarktransplantation, Tumorleiden oder HIV-Infektion, als nosokomiale Sepsiserreger gefunden (Archer, 2000; Wisplinghoff *et al.*, 2003). Von besonderer Signifikanz ist dies für Frühgeborene auf neonatologischen Intensivstationen, da es hier häufig zu KNS-Septikämien kommt, die mit einer signifikanten Erhöhung der Mortalität assoziiert sind (Noel und Edelson, 1984; Simpson *et al.*, 1986; Jarvis, 1987).

75 % der signifikanten nosokomialen Infektionen durch KNS werden jedoch charakteristischerweise im Zusammenhang mit implantierten Polymermaterialien beobachtet (Fidalgo *et al.*, 1990). Der breite Einsatz dieser Materialien in der modernen Medizin, insbesondere auf Intensivstationen, bedingt, dass trotz der niedrigen Virulenz der meisten KNS-Spezies ein dramatischer Anstieg der Inzidenz in den letzten Jahren für nosokomiale Sepsis und Fremdkörper-assoziierte Infektionen zu verzeichnen ist (Edmont, 1999). Typische Ausgangspunkte Fremdkörper-assoziiierter Infektionen stellen im Allgemeinen therapeutisch implantierte Fremdkörper, wie etwa peripher- und zentralvenöse Katheter, Peritonealdialysekatheter, Liquorshunts, künstliche Herzklappen, Brustprothesen aus Silikon, Herzschrittmacher, Intraokularlinsen sowie Gelenk- und Gefäßprothesen, dar (Emori und Gaynes, 1993; Kloos und Bannerman, 1994; Rupp und Archer, 1994; Kloos, 1997; Archer, 2000). Die Infektionen verlaufen hierbei als „early-onset“-Infektionen, die Tage bis wenige Wochen nach Einbringen des Fremdmaterials beginnt, oder aber als „late-onset“-Infektionen nach einem Zeitintervall von Monaten oder Jahren (Rupp und Archer, 1994). Bei ersterer erfolgt die Besiedlung des Fremdkörpers mit dem Erreger mit der Kontamination durch die Hautflora des Patienten oder des Operateurs während der interventionellen Maßnahme. Bei letzterer kann eine Besiedlung auch *per continuitatem* über die Eintrittsstelle des Katheters oder durch eine transiente Bakteriämie erfolgen (Kloos und Bannerman, 1994).

Fremdkörper-assoziierte Infektionen stellen ein großes klinisches Problem dar, da zur Therapie häufig nur die Entfernung des entsprechenden Fremdkörpers bleibt (Younger *et al.*, 1987). Die Therapie durch Antibiotika wird zum einen dadurch erschwert, dass die meisten der im Krankenhaus vorkommenden *S. epidermidis* Stämme sich durch eine Vielzahl von Antibiotikaresistenzen auszeichnen. So sind bis zu 80 % der Stämme resistent gegen Methicillin und in mehr als 50 % der Fälle liegt eine β -Laktamase vor (Archer und Climo, 1994; Rupp und Archer, 1994; Archer, 2000). Es kommt hinzu, dass die Bakterien auf den Fremdkörperoberflächen als Biofilm wachsen (Chicurel, 2000; O'Toole *et al.*, 2000). Diese spezielle Organisationsform ist direkt verantwortlich für die eingeschränkte Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika (Knobloch *et al.*, 2002a).

3.3 Der Prozess der Biofilmbildung

Es wurde bereits früh beobachtet, dass *S. epidermidis*-Stämme, die Katheter-assoziierte Infektionen verursachen, auf Polymer-Oberflächen ein schon makroskopisch sichtbares mukoides Bakterienkonsortium bilden. Dieses Phänomen wurde zunächst als Schleimbildung bezeichnet (Bayston und Penny, 1972; Christensen *et al.*, 1982; Peters *et al.*, 1982). Da der Terminus Schleim jedoch bereits als Bezeichnung für nicht-kovalent an Bakterienoberflächen gebundene Polysaccharide verwendet wurde, wird diese spezielle Form des Staphylokokken-Wachstums heutzutage generell als Biofilmbildung benannt (Hussain *et al.*, 1993; Mack *et al.*, 2000a). Fremdkörper-assoziierte Staphylokokken Infektionen sind der Prototyp einer Biofilm-assoziierten Infektion. Mikrobiologische Biofilme sind definiert als komplexe Gruppe von anhaftenden Mikroorganismen, umhüllt von einer selbst synthetisierten Polymermatrix (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Für die Entwicklung von bakteriellen Biofilmen wurde ein generelles Prinzip vorgeschlagen, welches mindestens zwei Stadien beinhaltet (Costerton *et al.*, 1999). In einer ersten Phase treten planktonische Bakterien in Kontakt zu einer Oberfläche und binden an diese (Phase der primären Adhärenz). In einer zweiten Phase akkumulieren die Organismen in multiplen Schichten (Phase der Akkumulation). Später findet eine Phase der Biofilmreifung statt, in der charakteristische morphologische Veränderungen auftreten können. Anschließend kann eine Loslösung planktonischer Zellen vom Biofilm stattfinden, welche in der Umgebung einen neuen Zyklus der Biofilmbildung initiieren können (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

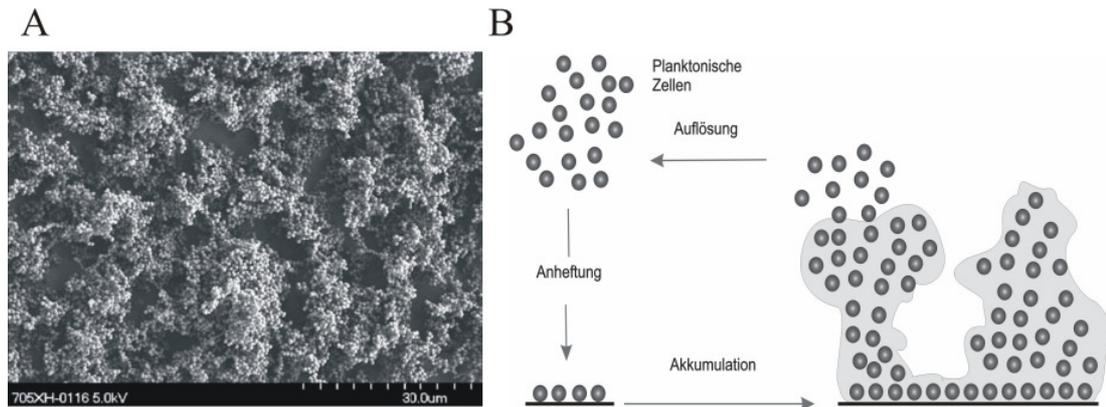


Abbildung 3.1: Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457. (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *S. epidermidis* 1457 Biofilm gebildet auf Edelstahl nach 18 h Inkubation. Aufnahme von Harris und Richards, 2004. (B) Schematische Darstellung des Modells der Biofilmbildung in *S. epidermidis* nach Mack *et al.*, 2005.

3.3.1 Primäre Bindung von *S. epidermidis* an Biomaterialien

Die primäre Bindung der Staphylokokken an Polymeroberflächen ist ein komplexer Vorgang, welcher verschiedene spezifische und unspezifische Faktoren beinhaltet. Nach einer Implantation von Fremdmaterial wird dieses schnell mit einer Schicht aus körpereigenen Plasmaproteinen, extrazellulären Matrixproteinen oder Thrombozyten überzogen (sogenannte Konitionierung) (Gristina, 1987). *S. epidermidis* kann sich entweder direkt an die native oder an die konditionierte Oberfläche anlagern. Hierbei verbessern angelagertes Fibronectin und Fibrinogen, aber auch aktivierte Thrombozyten die Adhäsion der Bakterien erheblich (Vaudaux *et al.*, 1989a; Wang *et al.*, 1993), wohingegen Serum, Plasma und Albumin die primäre Bindung inhibieren können (Hogt *et al.*, 1985; Vaudaux *et al.*, 1989b). Unspezifische Faktoren wie etwa Oberflächenbeschaffenheit, Ladung oder Hydrophobizität von Polymer- und Bakterienoberflächen beeinflussen ebenfalls die primäre Phase der Adhäsion (Ludwicka *et al.*, 1984; Hogt *et al.*, 1985; Mack *et al.*, 2001).

Die bekannten spezifischen bakteriellen Faktoren für die primäre Adhäsion sind in Tabelle 3.1 aufgezählt.

Tabelle 3.1: Spezifische Adhäsionsfaktoren von *S. epidermidis*

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

3.3.2 Mechanismen der Biofilm Akkumulation

In der akkumulativen Phase entsteht eine spezifische Biofilmarchitektur, in welcher nur die wenigsten Bakterienzellen direkten Kontakt zur besiedelten Polymeroberfläche haben. Die Stabilisierung dieser Architektur beruht auf der Bildung interzellulär adhäsiver Zelloberflächeneigenschaften. Das *polysaccharide intercellular adhesion* (PIA) wurde als wichtigste funktionelle Komponente im Prozess der interzellulären Adhäsion identifiziert (Mack *et al.*, 1992; Mack *et al.*, 1996b). Es ist ein lineares Homoglykan bestehend aus durchschnittlich 130 β -(1,6)-verknüpften N-Acetylglucosamineinheiten. Mittels Ionenaustauschchromatographie lässt sich PIA in zwei Polysaccharid-Fractionen aufteilen, PIA I und PIA II, wobei PIA I mehr als 80 % der Gesamtmenge ausmacht. 15-20 % der N-Acetylglucosamineinheiten sind nicht acetyliert, was wesentlich ist für die Funktionalität von PIA (Mack *et al.*, 1996a; Vuong *et al.*, 2004a).

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-assoziiertes 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 als die isogene Mutante 1457 M10 durch die wirtseigene Abwehr eradiziert werden konnte (Rupp *et al.*, 1999a; Rupp *et al.*, 1999b). Diese Ergebnisse konnten kürzlich in einem *Caenorhabditis elegans* Modell nachvollzogen werden (Begun, 2007).

PIA wird aus den Genprodukten des *icaADBC* (*intercellular adhesion ADBC*) Lokus synthetisiert (Heilmann *et al.*, 1996; Gehrke *et al.*, 1998). Der *icaADBC* Lokus wurde auch in weiteren Staphylokokken Spezies wie *S. aureus* (Cramton *et al.*, 1999; McKenney *et al.*, 1999) und *S. caprae* (Allignet *et al.*, 2001) entdeckt und in zahlreichen anderen Koagulase-negativen Staphylokokken wurden homologe DNA-Sequenzen nachgewiesen (Moretro *et al.*, 2003). Dem *ica*-Operon ist das Gen *icaR* vorgelagert, welches als Repressor der *icaADBC* Transkription fungiert (Conlon *et al.*, 2002; Knobloch *et al.*, 2004). IcaA hat die Funktion einer N-Acetylglucosaminyltransferase, die durch Koexpression mit IcaD gesteigert wird (Gerke *et al.*, 1998). IcaB ist ein sezerniertes Protein und hat die Funktion einer Deacetylase (Vuong *et al.*, 2004a). IcaC ist ein Transmembranprotein, welches möglicherweise am Export von PIA beteiligt ist (Heilmann *et al.*, 1996; Gerke *et al.*, 1998). Sowohl für *S. epidermidis* als auch für *S. aureus* konnte gezeigt werden, dass die Höhe der *icaADBC* Transkriptionsaktivität nicht direkt mit der produzierten PIA Menge korreliert (Dobinsky *et al.*, 2004).

Studien, die 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 (Ziebuhr *et al.*, 1997; Frebourg *et al.*, 2000; Galdbart *et al.*, 2000; Arciola *et al.*, 2005). *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 Knochenmarktransplantation ähnlich hoch ist wie bei invasiven Isolaten, die im Rahmen Katheter-assoziiertes Infektion isoliert wurden (Rohde *et al.*, 2004). Somit spielt *icaADBC* offensichtlich nicht nur bei Infektionen eine Rolle, sondern ist auch für die Besiedlung des natürlichen Habitats unter stark selektiven Krankenhausbedingungen notwendig.

Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass *icaADBC* nicht unter allen Umständen für die Etablierung Fremdmaterial-assoziiertes Infektionen notwendig ist. So konnte bei Isolaten aus infizierten Endoprothesen nur bei der Hälfte der Stämme *icaADBC* Prävalenz gefunden werden (Frank *et al.*, 2004; Rohde *et al.*, 2007). Ähnlich niedrige Prävalenzen bei invasiven *S. epidermidis* Isolaten konnten auch bei anderen Bakterienpopulationen gefunden werden (de Silva *et al.*, 2002; Klug *et al.*, 2003). *icaADBC* ist also nicht zwangsläufig häufiger bei pathogenen Stämmen vorzufinden. Verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen, wie auch die oben angeführten Studien zur Prävalenz von *icaADBC*, machen deutlich, dass die Fähigkeit zur PIA-Bildung keine notwendige Voraussetzung zur Etablierung einer Biofilm-assoziierten *S. epidermidis* Infektion ist.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Proteinfaktoren PIA funktionell als interzelluläre Adhäsine ersetzen können (Rohde *et al.*, 2005; Rohde *et al.*, 2007). Das erste in diesem Zusammenhang näher untersuchte Protein ist das *accumulation associated protein*.

Das *accumulation associated protein* (Aap) ist ein interzelluläres Adhäsins mit Bedeutung für die akkumulative Phase der Biofilmbildung, in welcher es PIA funktionell ersetzen kann (Rohde *et al.*, 2005). Es ist ein 220 kDa großes Zellwandprotein, das aus zwei Domänen besteht (Hussain *et al.*, 1997). Die Domäne A zeigt Homologien zum Oberflächenprotein SasG von *Staphylococcus aureus* (Foster, 2005; Bowden *et al.*, 2005). Die Domäne B ist 140 kDa groß und vermittelt interzelluläre Adhäsion und Biofilmbildung (Rohde *et al.*, 2005). Sie erlangt ihre Funktionsfähigkeit durch proteolytische Spaltung des nativen Aaps (Hussain *et al.*, 1997; Rohde *et al.*, 2005). Die funktionelle Bedeutung von Aap bei der

S. epidermidis Biofilmbildung konnte kürzlich unter Verwendung von spezifischen Antisera dokumentiert werden (Sun *et al.*, 2005; Rohde *et al.*, 2007).

Von Bedeutung für die Einschätzung der relativen Relevanz einzelner Faktoren ist die Tatsache, dass viele klinisch signifikante *S. epidermidis* Isolate grundsätzlich offenbar die Fähigkeiten haben, verschiedene Mechanismen zur interzellulären Adhäsion zu nutzen, da bei diesen Stämmen die entsprechenden Gene parallel im Genom nachgewiesen werden können (Vandecasteele *et al.*, 2003a; Rohde *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2005). Zum einen ist es möglich, dass diese verschiedenen Mechanismen in unterschiedlichen Infektionssituationen relevant werden (Rohde *et al.*, 2007), zum anderen erscheint es möglich, dass diese zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Prozess der Biofilmbildung genutzt werden (Vandecasteele *et al.*, 2003b). Diese Überlegungen verweisen auf die besondere Rolle der Expressionskontrolle von Biofilm-assoziierten Genen.

3.3.3 Regulation der Biofilmbildung in *S. epidermidis*

Phänotypisch werden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Variabilitäten der Biofilmbildung von *S. epidermidis* beobachtet (Baddour *et al.*, 1990; Ziebuhr *et al.*, 1999). Verschiedene Untersuchungen konnten anhand von Veränderungen externer Bedingungen, wie die O₂-Spannung (Cramton *et al.*, 2001), Temperatur (Rachid *et al.*, 2000b) oder Osmolarität im Medium (Rachid *et al.*, 2000a; Knobloch *et al.*, 2001) zeigen, dass äußere Einflussfaktoren zu einer Modifikation der quantitativen Biofilmbildung in *S. epidermidis* führen können. Dieses Phänomen lässt sich unter anderem durch die Einbindung der *icaADBC* Expression in übergeordnete Kontrollsysteme erklären. Durch Transposonmutagenese konnte gezeigt werden, dass mindestens vier ungebundene Loci Einfluss auf die *icaADBC* Expression und damit PIA-Synthese nehmen (Mack *et al.*, 2000b; Conlon *et al.*, 2002). Bei einem der Gene handelt es sich um *rsbU*, welcher für einen positiven Regulator der Expression des alternativen Sigmafaktors σ^B kodiert (Knobloch *et al.*, 2001). Dieser reprimiert durch einen noch unbekanntem Mechanismus den negativen Regulator der *icaADBC* Expression *icaR*, wodurch eine Verstärkung der Biofilmbildung stattfindet (Knobloch *et al.*, 2005).

Zusätzlich zu *sigB* konnte ein positiver regulativer Einfluss des *sarA* Gens (*staphylococcal accessory gene regulator A*) auf die *icaADBC* Transkription in *S. epidermidis* demonstriert werden (Conlon *et al.*, 2004; Tormo *et al.*, 2005). In einer Mutante mit inaktiviertem *sarA* konnte durch erhöhte Osmolarität und Supplementierung des Mediums mit Ethanol die *icaADBC* Transkription wiederhergestellt werden, jedoch ohne dass es zur Rekonstitution der Biofilmbildung kam. Dies lässt vermuten, dass die regulative Funktion von *sarA* auf einer post-transkriptionellen Stufe der PIA-Synthese ansetzt (Dobinsky *et al.*, 2003; Conlon *et al.*, 2004). Welche genaue Funktion *sarA* bei der *S. epidermidis* Biofilmbildung hat, ist bisher noch unklar.

Vor kurzem ist ein neues globales Regulationssystem, das *luxS quorum sensing* System, identifiziert worden, welches die Biofilmbildung in *S. epidermidis* beeinflusst. Die Deletion von *luxS* führt zur vermehrten Transkription von *icaADBC* und somit zu einer vermehrten PIA Synthese und Biofilmbildung (Xu *et al.*, 2006).

Weiterhin existiert ein globales Genregulationssystem, der *accessory gene regulator* (*agr*), welcher wachstumsabhängigen Einfluss auf die Biofilmbildung nimmt. In der exponentiellen Wachstumsphase, in der die Zelldichte gering ist, werden unter Einfluss von *agr* vermehrt Oberflächenproteine wie Autolysin E (AtlE) exprimiert, welches, wie bereits erwähnt, die primäre Adhäsion der Bakterien fördert (Batzilla *et al.*, 2006). Hingegen ist in der stationären Wachstumsphase die Expression von Exoproteinen erhöht. Auf die PIA-Synthese wird jedoch kein Einfluss genommen. Das *agr*-Operon ist also ein *quorum sensing* System, welches über Verstärkung und Hemmung der primären Bindung die Biofilmbildung in *S. epidermidis* steuert (Vuong *et al.*, 2000; Vuong *et al.*, 2003).

Eine vereinfachte Darstellung der Regulation der Biofilmbildung in *S. epidermidis* ist in Abbildung 3.2 zu sehen.

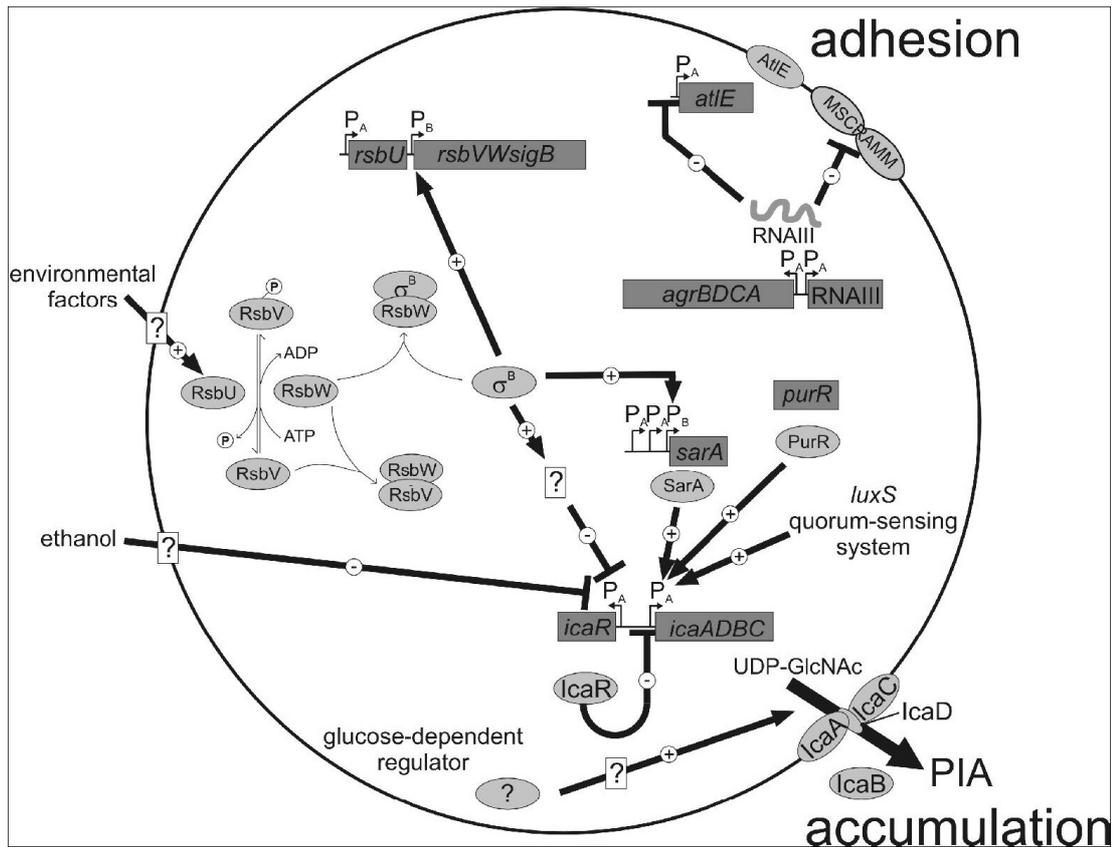


Abbildung 3.2: Vereinfachtes Modell der Regulation der Biofilmbildung in *S. epidermidis* (Mack *et al.*, 2006b). Primäre Adhäsion wird vom *agr* quorum sensing System negativ reguliert. Die Transkription von *icaADBC* wird induziert durch Genprodukte von *purR*, *sarA* und *luxS* quorum sensing System. *icaR* ist ein Repressor der *icaADBC* Transkription, dessen eigene Transkription negativ vom alternativen Sigmafaktor σ^B reguliert wird. Neben den transkriptionalen Regulationen des *icaADBC* Operons wird die PIA Expression durch ein Glukose abhängiges Protein beeinflusst. Rechtecke repräsentieren Gene. Ovale repräsentieren Proteine.

3.4 Reportergene

Als Reportergene werden Gene bezeichnet, deren Produkte (Proteine) aufgrund ihrer speziellen Eigenschaft leicht in einer Zelle nachgewiesen werden können. Sie werden genutzt, um komplexe Prozesse wie die Biofilmbildung direkt *in vivo* studieren zu können. Wird ein Reportergen unter Kontrolle eines speziellen Promotors in ein Bakterium eingebracht, so gibt die Aktivität des von diesem Gen kodierten Proteins Auskunft über Ort, Zeit und Intensität der Promotoraktivität (Voet, D. und Voet, J., 1995). Reportergene können daher zur Charakterisierung von Promotoraktivitäten verwendet werden. Zu den bekanntesten Beispielen zählen enzymbasierte Systeme

wie die β -Galaktosidase, die Chloramphenicol-Acyltransferase, die Luciferase oder das *green fluorescent protein* (Meighen, 1993; Tsien, 1998).

Notwendige Voraussetzung für die Untersuchung der Genexpression in einem Biofilm *in situ* ist ein Reportergen, welches ohne Zusatz von Substraten nachgewiesen werden kann (Andersen *et al.*, 1998). In der Biofilmforschung hat sich daher als Reportergen das *green fluorescent protein* bewährt (Davies *et al.*, 1998; Sternberg *et al.*, 1999), welches auch im Rahmen dieser Arbeit genutzt werden sollte.

3.5 Voraussetzungen der vorliegenden Arbeit

Voraussetzung für diese Arbeit war die Etablierung eines *green fluorescent protein* (GFP) basierten Reportergensystems in *S. epidermidis*, welches ermöglicht, *in situ* Untersuchungen verschiedener Genexpressionsmuster innerhalb eines lebenden Biofilms und im Verlauf seiner Entstehung durchzuführen (Franke *et al.*, 2007).

Mit dem Ziel, die Eigenschaften des GFP in Staphylokokken zu charakterisieren, wurde GFP_{mut3.1} im Shuttle-Plasmid pAS1 exprimiert (pASgfp_{mut3.1}). In diesem Vektor wird ein Gen unter der Kontrolle von *xylA/xylR*, einem xylose-induzierbaren Promotor aus *S. xylosus*, exprimiert. Exprimiert man GFP_{mut3.1} unter induzierten Bedingungen, so lässt sich kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität messen. Es wurde zunächst durch Insertion verschiedener staphylokokkeneigener Shine-Dalgarno-Sequenzen vor dem *gfp* Startcodon der Einfluss dieser Region auf die Expression in *S. epidermidis* 1457 mittels quantitativer und qualitativer Fluoreszenzanalyse untersucht. Die Voranstellung der SD-Sequenz des Haemolysin delta Gens (*hld*) führte zu einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Induktion (Franke, 2006). Im Vergleich zu anderen vorangestellten SD-Sequenzen konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenzintensität des GFP_{mut3.1} in *S. epidermidis* vor allem von der maßgeblich durch die SD-Sequenz beeinflussten Translationseffizienz abhängig ist.

Unter Verwendung der *hld* SD-Sequenz wurden die biologischen Eigenschaften des GFP_{mut3.1} in *S. epidermidis* 1457 charakterisiert (Franke, 2006). Vier Stunden nach Induktion ließ sich erstmals ein Fluoreszenzsignal detektieren. Die Halbwertszeit betrug sieben Stunden, wobei *Western-Blot* Untersuchungen zeigten, dass die

Abnahme der Fluoreszenzintensität hauptsächlich auf dem Abbau des GFPs beruht. Untersuchungen des Biofilmphänotyps von *S. epidermidis* 1457 zeigten, dass die Anwesenheit des Reporters keinerlei Einfluss auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung des Stammes nimmt, und dass es innerhalb des Biofilms zu einer homogenen GFP-Expression kommt. Somit stellte GFP_{mut3.1} unter Verwendung einer *hld* SD-Sequenz ein geeignetes Reportersystem zur Untersuchung differentieller Genexpression in *S. epidermidis* dar.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien und Einwegartikel

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien sind, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen) in *pro analysi*-Qualität bezogen. Plastikartikel und Einwegmaterialien stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Becton Dickinson (Cockeysville, MD, USA), Eppendorf (Hamburg) und Greiner (Nütingen).

4.1.2 Laborgeräte

Tabelle 4.1: Übersicht über verwendete Laborgeräte

	Gerätebezeichnung	Hersteller
Digital pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick (Berlin)
Elektroporator	Gene Pulser [®] II	BioRad (Hercules, USA)
Fluoreszenzmikroskop		Zeiss
Fluoreszenzobjektträger		BioMérieux (Marcy l'Etoile, Frankreich)
Geldokumentationssysteme	UV-Transilluminator	Phase (Lübeck)
Gelelektrophoresekammern		
Horizontal		Keutz (Reiskirchen)
Vertikal	X Cell Sure Look [™]	Invitrogen (Carlsbad, USA)
	Protean [®] II Xi Cell	BioRad (Hercules, USA)

Küvetten	Gene Pulser [®] 0,1cm electrode gap	Biorad (Hercules, USA)
	Quarz Spectrophotometer Cell	Biorad (Hercules, USA)
	VersaFluor [™] 4ml	Biorad (Hercules, USA)
Photometer	DU [®] 530	Beckmann (Fullerton, USA)
	Smart Spec [™] 3000	BioRad (Hercules, USA)
	ELISA Processor II	Behring (Marburg)
Röntgenfilme	Super RX	Fuji Photo Film Europe (Düsseldorf)
Röntgenfilmentwicklungs- maschine	Curix 60	Agfa Gevaert N.V. Germany
Rotoren	GS-3	Sorvall
	SS-34	
Schüttelinkubator		New Brunswick Scientific Co (New Brunswick, USA)
Spannungsquelle	Power Pac 1000	Pharmacia Fine Chemicals
	ECPS 3000/150	
Sterilfilter 0,22µm	Spitzenvorsatzfilter	Merck (Darmstadt)
Thermocycler	Primus 96 plus	MWG (Eberswalde)
	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)

Thermoinkubator	Blockthermostat BT 1006	Kleinfeld
	Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Vortex	Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Waage	PC 4400	Mettler (Giessen, Schweiz)
Westernblotkammern	X Cell II™ Blot Module	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Zellkulturschalen	96-Loch Mikrotiterplatte, NunclonΔ™-beschichtet	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus (Osterode)
	Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
	Megafuge 1.0 R	Heraeus (Osterode)
	RC-5B R	Sorvall

4.1.3 Medien

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

B2-Brühe zur Elektroporation

Caseinhydrolysat 10 g/l

Hefeextrakt (Difco) 25 g/l

K₂HPO₄ 1 g/l

Glucose 5 g/l

NaCl 25 g/l

Columbia Blutagar, pH 7,0

Columbia-Agar (Difco) 42 g/l

Bacto[®]-Agar (Difco) 1 g/l

Glucose 2,2 g/l

Schafsblut 72 ml/l

Hirn-Herz-Medium (*Brain Heart Infusion, BHI*); pH 7,4

BHI-Brühe pH 7,4 ± 0,2 (Difco) 37 g/l

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

Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Bacto[®]-Agar (Difco) zugesetzt.

Für Softagar wurde dem Medium 7 g/l Bacto[®]-Agar (Difco) sowie Natriumcitrat 5 g/l zugesetzt.

Luria Bertani-Medium (LB); pH 7

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

Hefeextrakt (Difco) 5 g/l

NaCl 10 g/l

Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Bacto[®]-Agar (Difco) zugesetzt.

NB2+ Brühe zur Phagentransduktion

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

CaCl₂ 0,4 g/l

NYE-Agar; pH 7,2

Caseinhydrolysat 10 g/l

Hefeextrakt (Difco) 5 g/l

NaCl 5 g/l

Bacto[®]-Agar (Difco) 15 g/l

ST-Agar (*Staphylococcus Typing Agar*)

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

CaCl₂ 0,4 g/l

NaCl 5 g/l

Bacto[®]-Agar (Difco) 12 g/l

Für Softagar wurde dem Medium 7 g/l Bacto[®]-Agar (Difco) zugesetzt.

Trypticase Soya Broth (TSB-BBL)

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

TSB-BBL mit 2% NaCl [wt/vol]

Wie TSB-BBL, 20 g/l NaCl hinzugefügt

TSB mit 2% NaCl [wt/vol]; pH 7,3

Trypton (Oxoid) 17 g/l

Neutralized Soya Pepton (Oxoid) 3 g/l

NaCl 20 g/l

K₂HPO₄ 2,5 g/l

4.1.4 Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit entionisiertem Wasser angesetzt und durch 15-minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert.

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,25% [wt/vol]

Xylen Cyanol FF 0,25% [wt/vol]

Ficoll 15% [wt/vol]

Die Lösung wurde ohne Autoklavieren verwendet.

Ethidiumbromid-Stammlösung

Es wurde eine Ethidiumbromidlösung mit 10 mg/ml in dH₂O angesetzt und ohne Sterilisation verwendet.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS); pH 7,4

NaCl 8 g/l

KCl 0,2 g/l

Na₂HPO₄ 1,44 g/l

KH₂PO₄ 0,24 g/l

4x Probenpuffer zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

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

Glycerin 87% 1,6 ml

SDS 10% 1,6 ml

β -Mercaptoethanol 0,4 ml

Bromphenolblau 0,5% [wt/vol] 0,4 ml

dH₂O 3 ml

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

10x Tris-HEPES-SDS Laufpuffer

Tris Base 121 g/l

HEPES 238 g/l

SDS 10 g/l

5x TBE

Tris (Invitrogen) 54 g/l

Borsäure 27,5 g/l

EDTA 0,5 M (pH 8) 20 ml/l

TBE wurde ohne Autoklavieren verwendet.

TE (pH 8)

Tris (Invitrogen) 10 mM

EDTA 1 mM

X-Gal-Lösung

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

4.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 4.2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i> -Wirt zur Klonierung von Plasmiden	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>S. aureus</i> RN4220	8325-4r ⁻ , Restriktionsdefizienter Klonierungswirt	Fairweather <i>et al.</i> , 1983
<i>S. epidermidis</i> 1457	Blutkulturisolat (Institut für Infektionsmedizin, UKE), biofilmbildend, <i>ica</i> -positiv	Mack <i>et al.</i> , 1992
<i>S. epidermidis</i> 1457 -M10	<i>icaA</i> ::Tn917, Biofilm-negativ	Mack <i>et al.</i> , 1994

Tabelle 4.3: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmide	Charakteristika	Referenz
pCR4	Plasmid zur TA-Klonierung von PCR-Produkten, <i>blue-white screening</i> durch MCS in β -Galactosidase Gen	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pGFP _{mut3.1}	Plasmid enthält <i>gfp</i> _{mut3.1}	Clontech (Palo Alto, CA; USA)
pRB472	Klonierungsvektor mit Chloramphenicol Acetyltransferase Gen (<i>Cat</i>)	Brückner (Tübingen)
pCR4 _{icagfpfus}	<i>icaA</i> Promotor mit fusion- <i>gfp</i> in pCR4 kloniert	Diese Arbeit
pCR4 _{gfpsacnot}	<i>Gfp</i> mit <i>Sac</i> I und <i>Not</i> I Schnittstellen in pCR4 kloniert	Diese Arbeit
pCR4 _{fusgfp}	pCR4 _{icagfpfus} mit pCR4 _{gfpsacnot} über <i>Sac</i> I und <i>Not</i> I	Diese Arbeit

	ligiert
pRB472 _{fusgfp}	Staphylokokkenvektor über <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i> Diese Arbeit mit <i>fusgfp</i> ligiert

4.1.6 Oligonukleotide und Sonden

Tabelle 4.4: Übersicht über die verwendeten Primer

Name	Sequenz	Verwendung
M 13 for	5`-GTAAAACGACGGCCAG-3`	Sequenzierung von pCR4-Inserts
M 13 rev	5`-CAGGAAACAGCTATGAC-3`	Sequenzierung von pCR4-Inserts
GFP for	5`-CTTGTTGAATTAGATGGTGATG-3`	GFP Detektion
GFP rev	5`-GTACATAACCTTCGGGCATG-3`	GFP Detektion
<i>icapromfor</i>	5`- GAATTC TTCTAAAATCTCCCCCTT-3`	Forward-Primer für Amplifikation von <i>icaA</i> -Promotor; <i>EcoRI</i> -Schnittstelle fett
<i>Fusiongfp</i> <i>ica_{hld}rev</i>	5`- GAGCTC TTCTCCTTTACGCATTTTTACCTACT <u>CCTTGTTAGTTAGGTTG</u> -3`	Revers-Primer für Amplifikation von <i>ica</i> -Promotor mit

		<i>gfp</i> -kodierender Sequenz (kursiv); <i>SacI</i> -Schnittstelle fett; <i>hld</i> -RBS unterstrichen
<i>gfpstartsac</i>	5`- GAGCTC TTCACTGGAGTTGTCC-3`	Forward-Primer für Amplifikation von <i>gfp</i> ; <i>SacI</i> -Schnittstelle fett
<i>gfp3` rev</i>	5`-`	Revers-Primer für
<i>HindNot</i>	GCGGCCGCAAGCCTCTAATT <u>AAGCTT</u> TATTTGTA TAG-3`	Amplifikation von <i>gfp</i> ; <i>NotI</i> - und <i>HindIII</i> -Schnittstelle fett

4.1.7 Datenbanken und Programme

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

4.1.8 Allgemeine mikrobiologische Methoden

4.1.8.1 Kultivierung von Bakterien

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

bebrütet und anschließend bei 4°C gelagert. Gegebenenfalls wurden den Agarmedien Antibiotika zur Selektion zugesetzt.

4.1.8.2 Resistenztestung

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

4.1.8.3 Biofilmtestung

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

beurteilt. Hierbei gilt ein *cut-off* von A_{570} von 0,1 als Trennpunkt zwischen biofilm-positiven und -negativen Phänotyp. In den Biofilmtests dieser Arbeit wurde auf die Absorptionsmessung verzichtet, da sie nur als Kontrolle diente, um die Fähigkeit der Biofilmbildung in den einzelnen Klonen zu dokumentieren.

4.1.9 Molekularbiologische Methoden

4.1.9.1 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Die horizontale Gelelektrophorese wurde zur größenabhängigen Auftrennung von Plasmiden, von Fragmenten gespaltener Plasmide oder dem Nachweis von Amplifikaten aus der PCR eingesetzt (Sambrook *et al.*, 1989). Je nach Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 0,8 – 2,0%ige [w/v] Agarosegele verwendet. Hochreine Agarose (SeaKem ME Agarose, Cambrex Bioscience Rockland Inc., Rockland, ME USA) wurde in 100 ml 0,5-fach TBE-Puffer aufgekocht, mit 2,0 µl Ethidiumbromidkonzentrat versetzt und in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit 2 µl DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels eingefüllt. Eine Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 3-6 V/cm in 0,5-fach TBE als Laufpuffer. Als Größenstandard wurde ein Mix aus *HindIII*-gespaltener DNA des λ -Phagens und *HaeIII*-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Finnzymes, Espoo, Finnland) aufgetragen. Er enthält 19 Fragmente der folgenden Größen: 23 kb, 9,4 kb, 6,6 kb, 4,3 kb, 2,3 kb, 2,0 kb, 1,4 kb, 1,1 kb, 872 bp, 603 bp, 564 bp, 310 bp, 281 bp, 271 bp, 234 bp, 194 bp, 125 bp, 118 bp, 72 bp. Für alle durchgeführten Gelelektrophorese Gele dieser Arbeit wurde dieser Marker verwendet. In der folgenden Abbildung (Abbildung 4.1) werden die Größen der einzelnen Banden definiert. Diese gelten für alle folgenden Gelelektrophorese-Abbildungen.

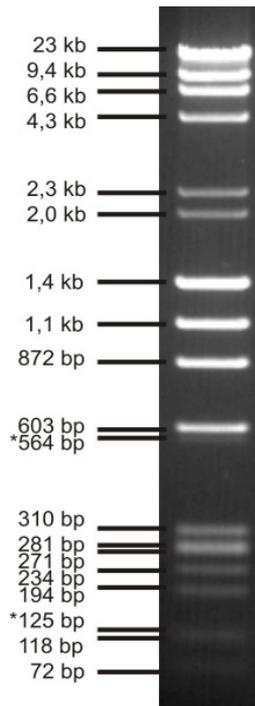


Abbildung 4.1: Größenstandard Marker für Gelelektrophorese Gele. Als Größenstandard wird ein Mix aus *Hind*III-gespaltener DNA des λ -Phagens und *Hae*III-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Die Größe der einzelnen Banden ist beschriftet. * markiert die Banden, die aufgrund der üblicherweise verwendeten DNA Menge kaum erkennbar sind.

4.1.9.2 Plasmidpräparation

Plasmidpräparation *E. coli* wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das System beruht auf alkalischer Lyse der Bakterienzellen gefolgt von einer Denaturierung und Präzipitation der chromosomalen DNA sowie der Proteine, wobei die Plasmid-DNA in Lösung verbleibt (Birnboim und Doly, 1979). Zur Aufreinigung erfolgt eine Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silicatmatrix in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Die anschließende Elution der DNA erfolgte in salzarmem Puffer. Für Plasmidpräparationen aus *E. coli* wurden die Bakterien in der Regel über Nacht in LB-Medium unter Zusatz von 100 μ g/ml Ampicillin angezüchtet. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Da sich die Zellwände von Staphylokokken durch das beschriebene Verfahren nicht aufschließen lassen, wurde das Protokoll für *S. aureus* RN4220, *S. epidermidis* 1457 und M10 um einen weiteren Lyseschritt ergänzt. Zunächst wurden die Bakterien auf antibiotikahaltigen Selektivagarplatten angezogen und direkt in Puffer 1 (Kit) resuspendiert, der mit 15 U/ml Lysostaphin versetzt war. Die

Suspension wurde für 30 min bei 37°C unter regelmäßigem Schwenken inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Eluate wurden zur Klonierung, Sequenzierung oder zu Restriktionsanalysen eingesetzt.

4.1.9.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standardmäßig wurde die PCR mit Hilfe des DyNAzyme™ Polymerasekit (Finnzyme) in einem DNA Thermal Cycler (MWG) mit beheiztem Deckel durchgeführt. In 50 µl Ansatz wurde ca. 100 ng *template*-DNA, Primer in einer Konzentration von 10 pM/µl, dNTPs mit je 200 µM, 1 U Polymerase und der zugehörige Mg²⁺-haltige Puffer (1,5 mM) eingesetzt. Initial wurde die DNA 2 min bei 94°C denaturiert, in den anschließenden Zyklen nur für 15 s. Für die Anlagerung der Primer wurde die Temperatur für 30 s auf 55°C abgesenkt. Je nach benutzten Primern variiert die optimale Annealing Temperatur. Der Zweitstrang wurde bei 72°C synthetisiert. Nach in der Regel 30-35 Zyklen schloss sich eine siebenminütige Synthesephase an um eine vollständige Komplementierung aller Einzelstränge zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt.

Die Kontrolle der PCR fand in einer Agarosegelelektrophorese statt. Für die Amplifizierung des GFP und seiner Mutanten aus dem Originalplasmid und um sie in der Klonierung zu verwenden, wurde das TripleMaster® PCR System (Eppendorf, Hamburg) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Es enthält eine *proofreading* DNA-Polymerase mit inhärenter Exonukleaseaktivität, die auftretende Synthesefehler reparieren kann, und so eine höhere Genauigkeit gewährleistet.

4.1.9.4 Restriktionsverdau

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* oder Staphylokokken extrahiert und einer Spaltung mit Restriktionsenzymen unterzogen (Sambrook *et al.*, 1989). Die Restriktionsansätze enthielten 5-15 µl DNA, 1 µl Enzym sowie den geeigneten Puffer und wurden mit sterilem dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation für 4-24 h bei 37°C. Bei einem Doppelverdau, bei dem die Puffer nicht kompatibel waren, wurde ein fragmentierter Verdau durchgeführt. Dabei wurde für den ersten Verdau 30 µl DNA, 2 µl Enzym und 4 µl Puffer mit sterilem dH₂O auf 40 µl aufgefüllt. Nach dem Verdau über Nacht wurde der Ansatz mit Säulen aus dem

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 30 µl Elution Buffer aufgenommen, um dann mit dem zweiten Restriktionsenzym im selben Verfahren verdaut zu werden. Die DNA wurde dann in einer horizontalen Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus wurde durch Betrachtung unter dem Transilluminator dokumentiert. Gegebenenfalls wurden die Banden ausgeschnitten und zur weiteren Verarbeitung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

4.1.9.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Das System beruht auf Lyse des Agarosegels, gefolgt von einer Adsorption der DNA an eine Silicatmatrix. Das Bindungsverhalten ist dabei abhängig vom pH-Wert und dem Salzgehalt der Lösung. Die anschließende Elution erfolgte in einem EDTA-freien Puffer. Zunächst wurden die gewünschten Banden auf einem Transilluminator aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit dem Kit aufgereinigt. Die DNA-Konzentration des Eluats wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft. So gereinigte Fragmente wurden zur Ligation in den linearisierten Shuttlevektor pRB472 eingesetzt.

4.1.9.6 Ligation

Ligationen wurden durchgeführt, um einzelne Gene (Insert) über Restriktionsschnittstellen in einen linearisierten Vektor einzufügen. Alle Ligationen fanden bei 16°C unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (Roche) und dem dazugehörigen Puffer statt. Die Dauer der Ligation variiert je nach Ansatz zwischen 5 h und 16 h. Anschließend wurden die Konstrukte in chemokompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert.

4.1.9.7 Klonierung

Eine Klonierung von PCR-Amplifikaten erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, K4700, Vers. J) nach Angaben des Herstellers. Dabei besitzt der linearisierte Vektor pCR4-TOPO beidseitig 3'-Desoxyadenosin-Überhänge. Mit Hilfe der Topoisomerase I wurden Vektor und Amplifikate ligiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Die *multiple cloning*

site des Vektors liegt in einem *lacZ* Gen. Somit können Klone mit erfolgreicher Insertion anhand eines *blue/white screenings* (Sambrook *et al.*, 1989) identifiziert werden. Es wurden 1-4 µl eines PCR-Amplifikats und 1 µl Salzlösung mit sterilem dH₂O auf 5 µl aufgefüllt und mit 1 µl Vektor gemischt. Die Ligation fand für 5 min bei Raumtemperatur statt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt.

4.1.9.8 Chemische Transformation

Chemokompetente *E. coli* TOP10 (im Kit enthalten) wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 30 s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und erneut auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit 250 µl SOC-Medium (Kit) versetzt und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für die Transformation von pCR4 wurde zunächst 40 µl X-Gal auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Platten bei 37°C vorgewärmt. Die Bakteriensuspension wurde unverdünnt auf 3 LB-Agarplatten ausplattiert. Nach 24 h wurden weiße Kolonien zur weiteren Analyse ausgewählt. Die Blaufärbung der Kolonien zeigt β-Galaktosidaseaktivität an, die nur im Falle einer erfolgreichen Integration in den Vektor aufgehoben wird.

4.1.9.9 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden aus mit den QIA-quick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigten PCR-Amplifikaten unter Verwendung der Primer M 13 for und M 13 rev und des CEQ[™] DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Fullerton, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. In einem Thermocycler mit beheiztem Deckel (MWG) wurde die DNA zunächst für 2 min denaturiert. Es schlossen sich 30 Zyklen mit jeweils 20 s Denaturierung bei 96°C, Anlagerung der Primer bei 50°C für 20 s und 4 min Synthesezeit bei 60°C an. Am Ende wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt. Eine Fällung mit eiskaltem Alkohol reinigte die Sequenzierreaktion von überschüssigen Nukleotiden, anschließend wurde die Sequenz mit dem automatischen 8-Kanal Kapillar-Sequencer (Beckman-Coulter) analysiert. Eine weitere Beurteilung der Sequenzen im Vergleich zur Originalsequenz des GFP und seiner Mutanten (Clontech) erfolgte mit dem Programm Vector NTI Version 8 (InforMaX).

4.1.9.10 Transformation durch Elektroporation

Herstellung elektrokompenter Zellen (Augustin und Götz, 1990)

Eine Bakterienkolonie wurde in B2-Brühe eingerührt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde 1:25 in B2-Brühe verdünnt und für etwa drei weitere Stunden inkubiert. Die Zellen wurden bei einer optischen Dichte OD₅₇₈ von 0,6-0,7 geerntet. Um weiteres Zellwachstum zu verhindern, wurden alle nachfolgenden Schritte der Zellernte auf Eis bzw. mit vorgekühlten Gefäßen und Lösungen durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten alle Zentrifugationsschritte für 10 min bei 4°C und 6238xg.

Um die Bakterien von jeglichen Salzurückständen zu befreien, wurde das Medium abzentrifugiert, und die Zellen durch dreimaliges Resuspendieren und Zentrifugieren in 25 ml dH₂O gewaschen. Daran schloss sich ein Waschschrift in 5 ml Glycerin 10% und Zentrifugation für 5 min an. Das Pellet wurde in 2,5 ml Glycerin 10% resuspendiert, für 15 min bei Raumtemperatur stengelassen und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um eine Zellkonzentration von 10⁹-10¹⁰ zu erhalten, wurden die Zellen in ca. 800 µl Glycerin 10% resuspendiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder in Aliquots von 70 µl bei -80°C eingefroren. Durch die Lagerung trat allerdings eine Verminderung der Transformationseffizienz um etwa den Faktor 100 auf. Zur Dokumentation der Zellzahl wurde eine Verdünnungsreihe von 10⁻³-10⁻¹⁰ der Bakteriensuspension auf Blutplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Elektroporation

Für die Transformation wurden entweder frische elektrokompente Zellen oder auf Eis aufgetaute Aliquots eingesetzt und mit 2-6 µl eines Plasmids versetzt. 60 µl dieser Mischung wurden blasenfrei in den Spalt einer 0,1 cm *gap* Küvette (Biorad) eingefüllt. Die Elektroporation erfolgte bei 100 Ω, 2,3 kV und Raumtemperatur für etwa 2,3-2,5 ms. Die transformierten Zellen wurden für 1 h in 390 µl B2-Brühe bei 37°C geschüttelt, um die Expression der plasmidkodierte Resistenzgene zu gewährleisten, und sodann auf NYE-Agarplatten mit 20 µg/ml Chloramphenicol ausplattiert. Transformanden erschienen in der Regel nach 2-4 Tagen.

4.1.9.11 Phagentransduktion (Mack et al., 2001)

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

Herstellung eines plasmidtragenden Phagenlysates

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

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

Plaquetitration

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

Transduktion

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

4.1.10 Proteinchemische Methoden

4.1.10.1 Präparation von Proteinen aus *S. epidermidis*

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

Um die Bakterienzellwände aufzuschließen verdaute man das in 635 µl PBS resuspendierte Pellet mit 15 U Lysostaphin unter Zugabe von 105 µl Complete, Mini (Roche) zur Proteinaseinhibition für 30 min bei 37°C. Nach Zugabe von 250 µl 4x LDS-Probenpuffer wurde der Ansatz für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Zelltrümmer 30 min bei 13280xg und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand konnte bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert werden.

4.1.10.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen

Für die SDS-PAGE wurden entweder Fertig-Gele von PIERCE (Precise™ Protein Gels) oder NuPage™ 4-12% Bis-Tris Gradientengele (Invitrogen) benutzt. Die Gele

wurden mit Proteinen beladen, die mit 1x LDS-Probenpuffer versetzt waren. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in einer X Cell Sure Lock™ Elektrophoresekammer bei 150V für 45min. Als Laufpuffer diente entweder Tris-HEPES-SDS Laufpuffer oder der NuPage® MES SDS Running Buffer (Invitrogen). Die Gele wurden nach der Proteinauftrennung mit SimplyBlue™ SafeStain Microwave (Invitrogen) gefärbt.

4.1.10.3 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF- und Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF)-Nitrozellulosemembran (NCF) übertragen.

Die Gele wurden im X Cell II™ Blot Module (Invitrogen) für 1 h bei 30 V auf eine Invitrolon™ PVDF-Membran (Invitrogen) transferiert. Als Laufpuffer diente der NuPage® Transferpuffer. Es wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

Die Membran wurde danach zunächst mit 3% BSA in 15ml PBST 0,05% über Nacht bei 4°C geblockt. Zur **Detektion** des GFP wurde die Membran mit dem BD Living Colors™ *Aequorea victoria* Peptid-Antikörper (#632377, Clontech, hergestellt im Kaninchen, 1:400 in PBST verdünnt) für 2 h inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf dem Schüttelinkubator und wurden zwischendurch jeweils einmal 15min und zweimal 5min mit PBST 0,05% gewaschen. Danach wurde dieser mit einem biotinylierten Anti-Kaninchen-Zweitantikörper (Sigma), der 1:5000 in PBST verdünnt war, gekoppelt. Es folgte die Konjugation des Zweitantikörpers mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Amersham Bioscience). Das Konjugat wurde in einer Konzentration von 6,25 µl auf 10 ml PBST eingesetzt und für eine Stunde inkubiert. Vor Zugabe des Substrats wurde die Membran 2 min in entionisiertes Wasser eingelegt. Die Chemilumineszenz-Detektion der GFP-spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte mit jeweils 1 ml ECL *Western blotting detection reagent* 1 und 2 (Amersham Bioscience) für 1 min. Die Detektion der Banden erfolgte mit der Röntgendetektionsmaschine Curix 60 (Agfa).

4.1.11 Fluoreszenzmikroskopie

20 µl einer auf die OD₆₀₀ von 0,1-0,3 verdünnten Bakterienkultur wurde auf Fluoreszenzobjektträger (BioMérieux) aufgebracht. Die getrockneten Proben wurden in Methanol auf dem Objektträger fixiert und bei 1000-facher Vergrößerung mikroskopiert, wobei die Anregung einer Wellenlänge von 488 nm erfolgte und Licht der Wellenlänge 500 bis 600 nm detektiert wurde.

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Expression von Biofilm-assoziierten Genen in *S. epidermidis* 1457 unter Verwendung des *green fluorescent proteins* (GFP). Für die Analyse der *icaADBC*-Expression wurde ein Konstrukt erstellt, in welchem das *gfp* unmittelbar an den *icaA* Promotor anschließt.

5.1 Erstellung eines GFP-Reporterkonstruktes zur Analyse der Expression von *icaA* in *S. epidermidis*

5.1.1 Klonierungsstrategie

Ziel der Klonierungsstrategie war die Fusionierung des *icaA*-Promotors mit der GFP-kodierenden Sequenz. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde der *icaA*-Promotor unter Verwendung der Primer *icapromfor* und *fusiongfpica_{hld}rev* sowie *gfp* unter Verwendung der Primer *gfpstartsac* und *gfp3`revHindNot* amplifiziert. Das resultierende Amplifikat des *icaA*-Promotors stellt ein Hybrid dar, in welchem die Sequenz des Promotors mit den ersten 21 Basenpaaren der GFP-kodierenden Sequenz fusioniert vorliegt. Zusätzlich umfasst das Amplifikat eine *EcoRI*- sowie eine *SacI*- Schnittstelle (Abbildung 5.1.B1). Das Amplifikat der GFP-kodierenden Sequenz umfasst eine *SacI*- sowie eine *NotI*-Schnittstelle (Abbildung 5.1.B2).

Eine Übersicht über die gesamte Klonierungsstrategie gibt die Abbildung 5.1.

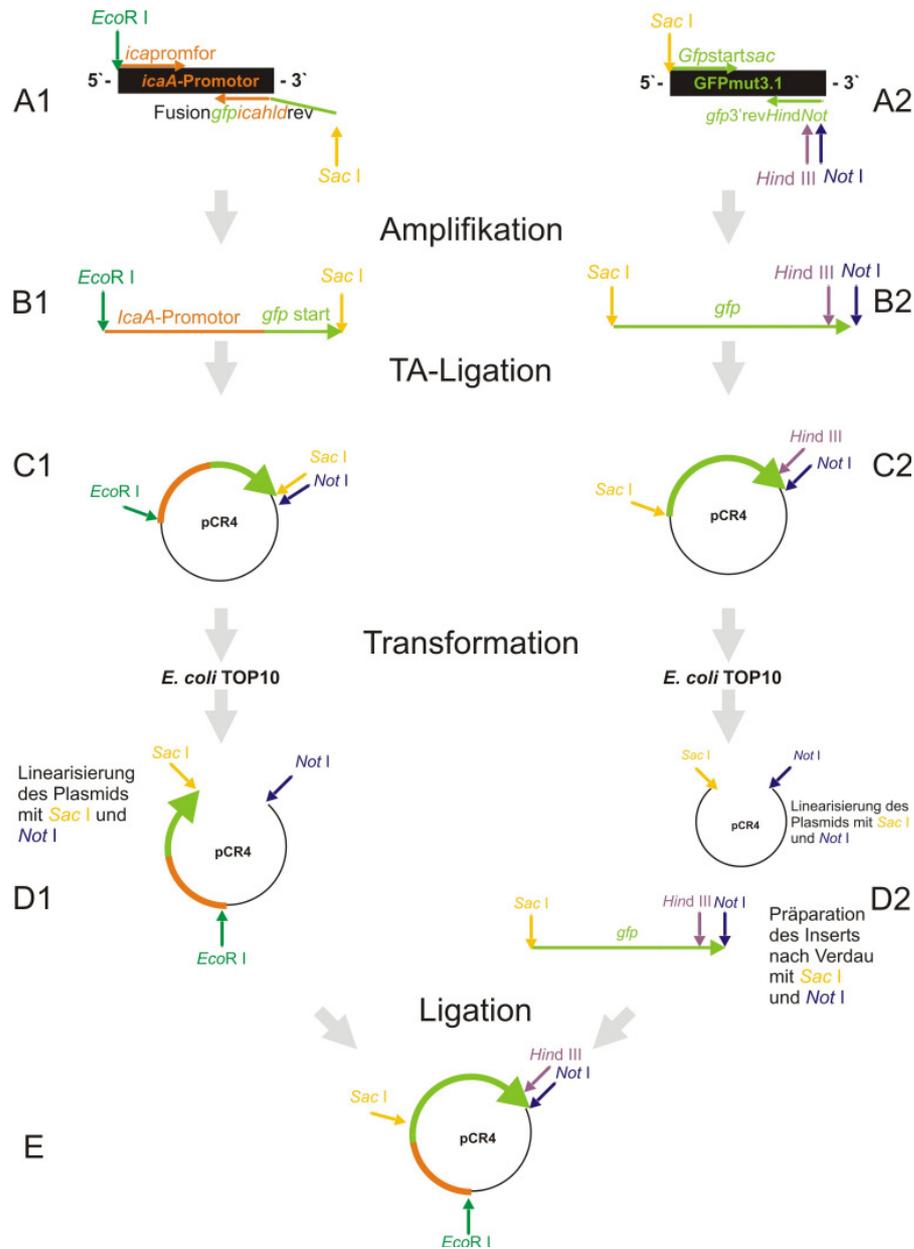


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Fusionierung des *icaA*-Promotor mit der GFP-kodierenden Sequenz. (A1) zeigt das zu klonierende Amplifikat resultierend aus der PCR unter Verwendung des *icapromfor*-Primers (enthält eine *EcoRI*-Schnittstelle) und des Primers *Fusiongfpica_{hld}rev* (enthält eine *SacI*-Schnittstelle). Dieses umfasst den gesamten *icaA*-Promotor mit einer modifizierten SD-Sequenz sowie die ersten 21 bp der GFP-kodierenden Sequenz (hängender Teil). In (A2) ist das Amplifikat mit dem *gfpstartsac*-Primer (enthält eine *SacI*-Schnittstelle) und dem *gfp3' revHindNot*-Primer (enthält eine *HindIII* und eine *NotI*-Schnittstelle) zu sehen. (B1)-(D1) zeigt den weiteren Verlauf der Bearbeitungsschritte des Promotor-*gfp*-Fusionsamplifikats und (B2)-(D2) den Verlauf des *gfp*-Amplifikats. In (E) ist das fertige Konstrukt aus beiden Amplifikaten sichtbar. Weiterführende Beschreibungen siehe Text. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Problematisch für die Generierung des Promotor-*gfp*-Fusionsamplifikats (*icagfpfus*) war der 21 bp lange, zur Zielsequenz nicht komplementäre Überhang des Primers *fusiongfpica_{hla}rev* (Abbildung 5.1.A1). Um die optimale Amplifikationsbedingungen für diesen Primer zu ermitteln, wurden mit Hilfe des Mastercycler gradient Gradienten-PCRs unter Einsatz unterschiedlicher Magnesium-Konzentrationen durchgeführt. In Abbildung 5.2 wird deutlich, dass bei einer Annealing-Temperatur von 61,9°C und einer Magnesiumkonzentration von 2,5 mM ein spezifisches Amplifikat resultiert. Dieses wurde für die weiteren Klonierungsschritte verwendet.

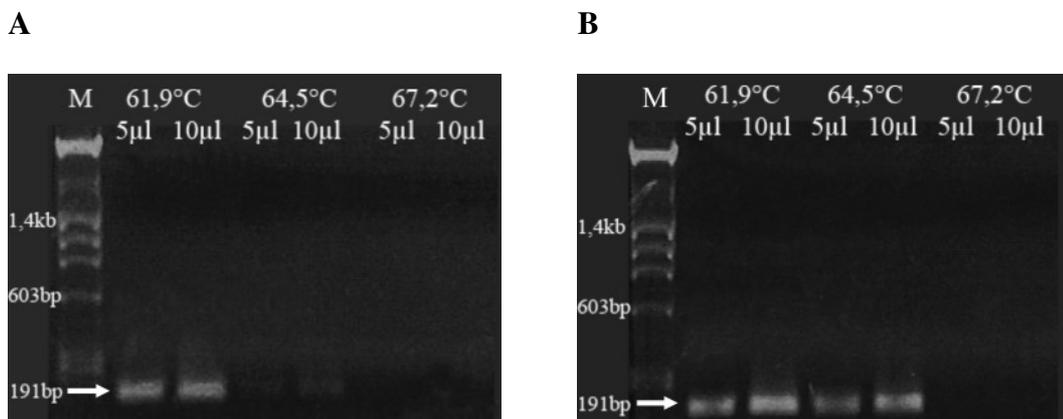
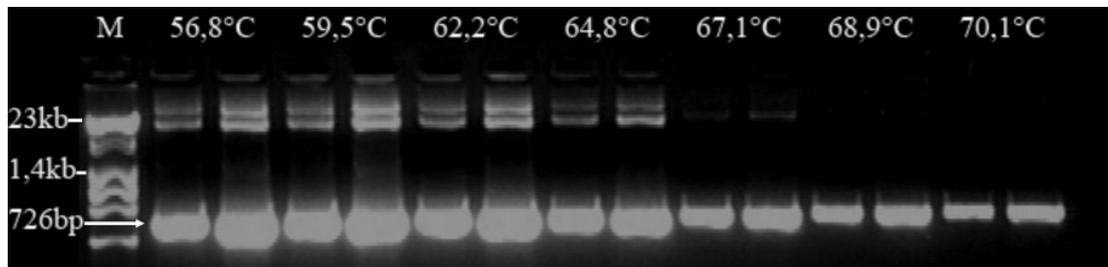


Abbildung 5.2: Optimierung der PCR-Bedingungen für die Primer *icapromfor* und *fusiongfpica_{hla}rev*. Nach Durchführung einer Gradienten-PCR unter Verwendung der dargestellten Annealingtemperaturen wurden die resultierenden Amplifikate in einem 1,0% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *Hind*III-gespaltener DNA des λ -Phagens und *Hae*III gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1). In (A) wurde eine Magnesium-Konzentration von 2,5 mM verwendet, in (B) hingegen von 3,5 mM. Um subtile Differenzen der Amplifikationseffizienz unter den verschiedenen Bedingungen zu detektieren, wurden in (A) und (B) jeweils pro Annealing-Temperatur 5 beziehungsweise 10 μ l des Amplifikationsansatzes auf das Gel aufgetragen. Es zeigte sich, dass die Primer in Abhängigkeit der Magnesiumkonzentration unterschiedliche Temperaturoptima aufwiesen. Die gut sichtbaren Banden bei der Temperatur von 61,9°C in beiden Gelen und bei 64,5°C in (B) hat eine Größe von 191 bp und entspricht damit der erwarteten Fragmentgröße.

In Analogie zur oben beschriebenen Strategie wurden auch für die Erzeugung des *gfp*-Amplifikats (*gfpsacnot*) die PCR-Bedingungen optimiert. Es zeigte sich, dass bei einer Annealingtemperatur von 70,1°C und einer Magnesiumkonzentration von

2,5 mM Mg^{2+} eine hochspezifische Bande mit der erwarteten Größe erzeugt werden konnte (Abbildung 5.3).

A



B

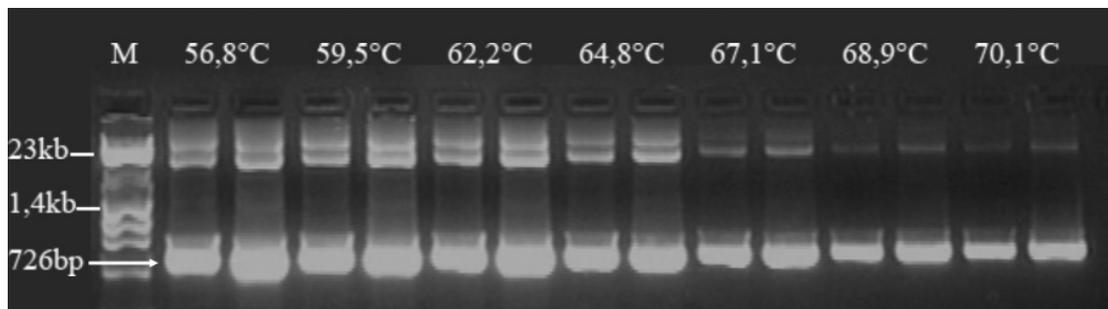


Abbildung 5.3: Optimierung der PCR-Bedingungen für die Primer *gfpstartsac* und *gfp3`revHindNot*. Nach der Gradienten-PCR wurden die Amplifikate der Primer *gfpstartsac* und *gfp3`revHindNot* in einem 1,0% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *HindIII*-gespaltener DNA des λ -Phagens und *HaeIII*-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1). Auch hier wurden auf beiden Gelen jeweils für einen Ansatz einer Annealing-Temperatur zwei verschiedene Mengen (5 μ l und 10 μ l) des Amplifikationsansatzes auf das Gel aufgetragen. Die in Abbildung 5.2 aufgeführten Magnesiummengen für A und B gelten auch hier. Außer dem spezifischen Amplifikat bei einer Größe von 726 bp sind vor allem bei den niedrigeren Annealing-Temperaturen unspezifische, höher molekulare Banden zu erkennen.

Die Amplifikate *icagfpfus* und *gfpsacnot* wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits in den Vektor pCR4 ligiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert (Abbildung 5.1.C1 und C2). Die resultierenden Plasmide wurden mittels Restriktionsenzymen analysiert.

Abbildung 5.4 beweist durch den *EcoRI*-Verdau, dass alle acht untersuchten Klone das Plasmid mit dem Insert *icagfpfus* enthalten.

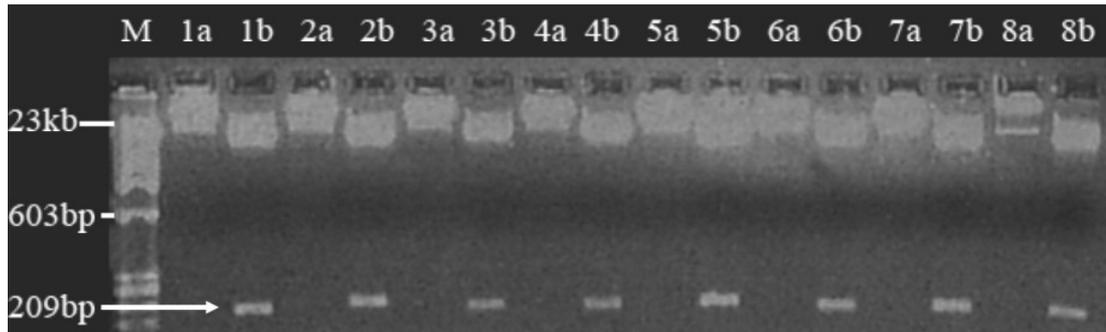


Abbildung 5.4: Analyse von pCR4_{icaGfpfus} Klonen. Die pCR4_{icaGfpfus} Konstrukte 1-8 wurden unverdaut (a) und nach Spaltung mit *EcoRI* (b) in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *HindIII*-gespaltener DNA des λ -Phagens und *HaeIII*-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1). Das herausgeschnittene Fragment entspricht der erwarteten Größe von 209 bp. Die großen Banden bei (b) entsprechen dem linearisierten Vektor pCR4.

In Abbildung 5.5 ist zu sehen, dass nur die Klone 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10 und 15 das Plasmid mit dem Insert *gfpsacnot* aufgenommen haben.

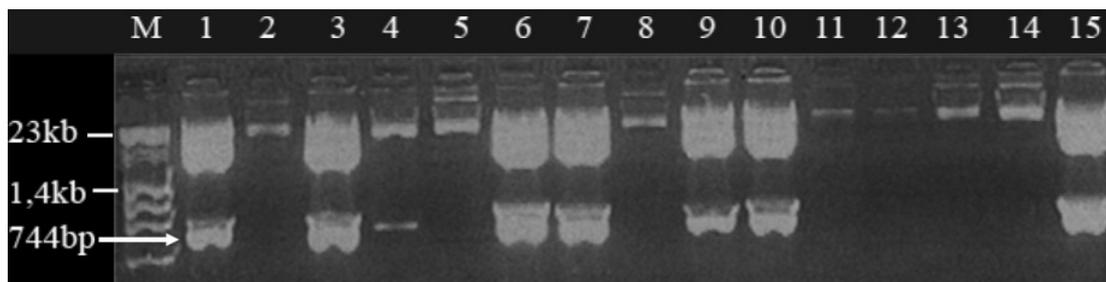


Abbildung 5.5: Analyse von pCR4_{gfpsacnot} Klonen. Plasmid DNA von pCR4_{gfpsacnot} mit *EcoRI*-Verdau in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *HindIII*-gespaltener DNA des λ -Phagens und *HaeIII*-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1). Bei den Banden 2, 5, 8 und 11-14 ist sowohl wenig Plasmid sichtbar als auch keine Spaltung nachweisbar. Bei den restlichen Banden hingegen ist ein Fragment der erwarteten Größe 744 bp sichtbar. Die großen Banden über dem Fragment entsprechen dem linearisierten Vektor pCR4.

5.1.2 Sequenzierung von pCR4_{icaGfpfus}

Um sicher zu gehen, dass der Übergang vom *icaA*-Promotor zum *gfp* auch wie geplant amplifiziert wurde, wird das Insert in Plasmid pCR4_{icaGfpfus} sequenziert. Es konnte gezeigt werden, dass der *icaA*-Promotor mit der *hld*-SD-Sequenz sowie die

Anfangssequenz des *gfp* und die Schnittstellen ohne Punktmutationen und in korrekter Lage in das Plasmid integriert waren.

Die folgende Sequenz zeigt die wichtigsten Übergänge:

```

                                EcoRI
Amplifikat gfp Fusion    1  GAATTC TTCTAAAATCTCCCCCTTATTCAATTTTCTAAAA
icaA-Promotor           -163 .....TTCTAAAATCTCCCCCTTATTCAATTTTCTAAAA

Amplifikat gfp Fusion    41  ATATATTACAGAAAAATTAAGTTAAAATTACAAATATTAC
icaA-Promotor           -129 ATATATTACAGAAAAATTAAGTTAAAATTACAAATATTAC

Amplifikat gfp Fusion    81  TGTTTCAGTATAACAACATTCTATTGCAAATTGAAATACT
icaA-Promotor           -89  TGTTTCAGTATAACAACATTCTATTGCAAATTGAAATACT

                                hld-SD
Amplifikat gfp Fusion    121  TTCGATTAGCATATGCTTTACAACCTAACTAACAGGAGT
icaA-Promotor           -49  TTCGATTAGCATATGCTTTACAACCTAACTAACGAAAGGT

                                gfp Start      SacI
Amplifikat gfp Fusion    141  AGGTGAAAAATGCGTAAAGGAGAAGAGCTC.....
icaA-Promotor           -9   AGGTGAAAA.....

```

Abbildung 5.6: Sequenz des *icaA* Promotors und der *gfp* Anfangssequenz mit veränderter Shine Dalgarno Sequenz (*hld*-SD) und eingefügter *Eco*RI- und *Sac*I-Schnittstelle. In der Zeile darunter ist die Wildtypsequenz des *icaA*-Promotors mit der ursprünglichen Shine Dalgarno Sequenz, ohne den *gfp*-Start und ohne die Schnittstellen, zu sehen.

5.1.3 Ligation des Fragments *gfpsacnot* in pCR4_{*icagfp*plus}

Die Klonierungsstrategie sah vor, das Fragment *gfpsacnot* über eine *Sac*I- und eine *Not*I- Schnittstelle in einen Vektor zu ligieren (Abbildung 5.1.D). Als Vektor dient dabei das pCR4_{*icagfp*plus}, welches nach dem Restriktionsverdau mit *Sac*I und *Not*I als ein linearisiertes Plasmid vorliegt (Abbildung 5.1.D1). Das Insert besteht aus dem 726 bp großen *gfpsacnot* Fragment, welches aus dem pCR4_{*gfpsacnot*} herausgeschnitten wurde (Abbildung 5.1.D2). In Abbildung 5.7 sind sowohl Vektor als auch Insert nach der Spaltung dargestellt.

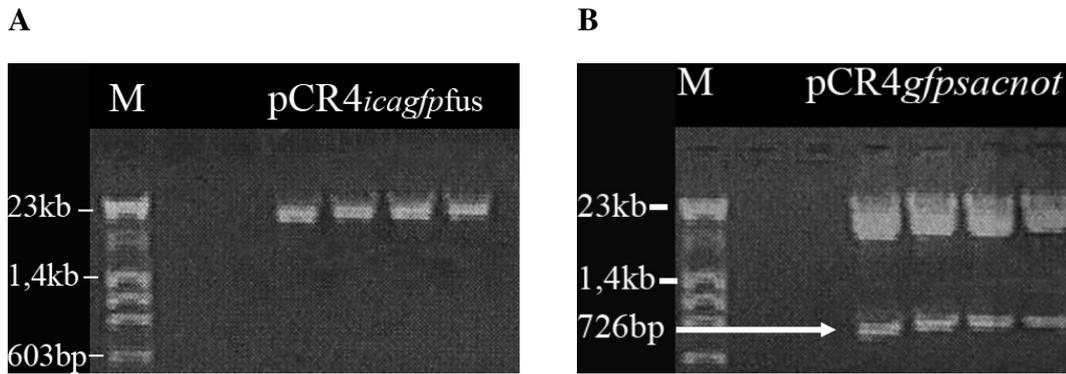


Abbildung 5.7: (A) Restriktionsverdau von $pCR4_{icaGfpfus}$ und (B) $pCR4_{gfpSacnot}$ mit *SacI* und *NotI*. Die Plasmide $pCR4_{icaGfpfus}$ 3 und $pCR4_{gfpSacnot}$ 1 wurden nach der Spaltung mit *SacI* und *NotI* in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *HindIII*-gespaltener DNA des λ -Phagens und *HaeIII*- gespaltener DNA des Phagens $\phi X174$ (Abbildung 4.1). Das $pCR4_{icaGfpfus}$ liegt nach Spaltung als linearisiertes Plasmid vor. Aus dem $pCR4_{gfpSacnot}$ hingegen wurde ein Fragment der Größe 726 bp ausgeschnitten. Auf dieses Gel wurden jeweils vier Banden parallel aufgetragen, da für die Gelextraktion der Fragmente mehr DNA benötigt wurde.

Die Ligation des aufgereinigten Vektors mit dem Insert erfolgte mit der T4-DNA-Ligase bei 16°C für 20 Stunden. Anschließend wurde der Ligationsansatz in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert.

Zum Nachweis der Klone mit dem Plasmid bestehend aus dem $pCR4$ mit dem *icaA*-Promotor und der anschließenden Sequenz des *gfp* ($pCR4_{fusgfp}$; Abbildung 5.1.E) wurde als Methode eine PCR mit spezifischen GFP-Primern gewählt (Abbildung 5.8). Für diese PCR wurde als Negativkontrolle das Plasmid $pCR4_{icaGfpfus}$ gewählt, welches nur die Anfangssequenz des *gfp* enthält. Das Plasmid $pCR4_{gfpSacnot}$ wurde als Positivkontrolle verwendet.

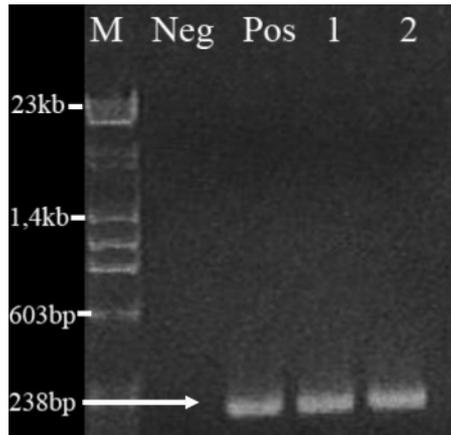


Abbildung 5.8: PCR zur Kontrolle der Klone mit pCR4_{fusgfp}. Es wurde eine PCR mit den Primern GFP for und GFP rev zum Nachweis der Klone mit dem Plasmid pCR4_{fusgfp} (1 und 2) durchgeführt. Als Negativkontrolle (Neg) diente das Plasmid pCR4_{icagfpfus} und als Positivkontrolle (Pos) das Plasmid pCR4_{gfpsacnot}. Die Amplifikate der Größe 238 bp wurde in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *Hind*III-gespaltener DNA des λ -Phagens und *Hae*III-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1).

5.1.4 Sequenzierung von pCR4_{fusgfp}

Zur Sicherstellung, dass das Plasmid pCR4_{fusgfp} die Sequenz des *icaA*-Promotors mit der GFP-kodierenden Sequenz enthält, wurde dieser Abschnitt sequenziert. Es wurde bestätigt, dass das *gfp* sowie der vor dem Startcodon befindliche *icaA*-Promotor mit der *hld*-SD-Sequenz und die Schnittstellen ohne Punktmutationen und in korrekter Lage in das Insert integriert waren.

5.1.5 Überführung des Konstruktes in den Staphylokokkenvektor pRB472

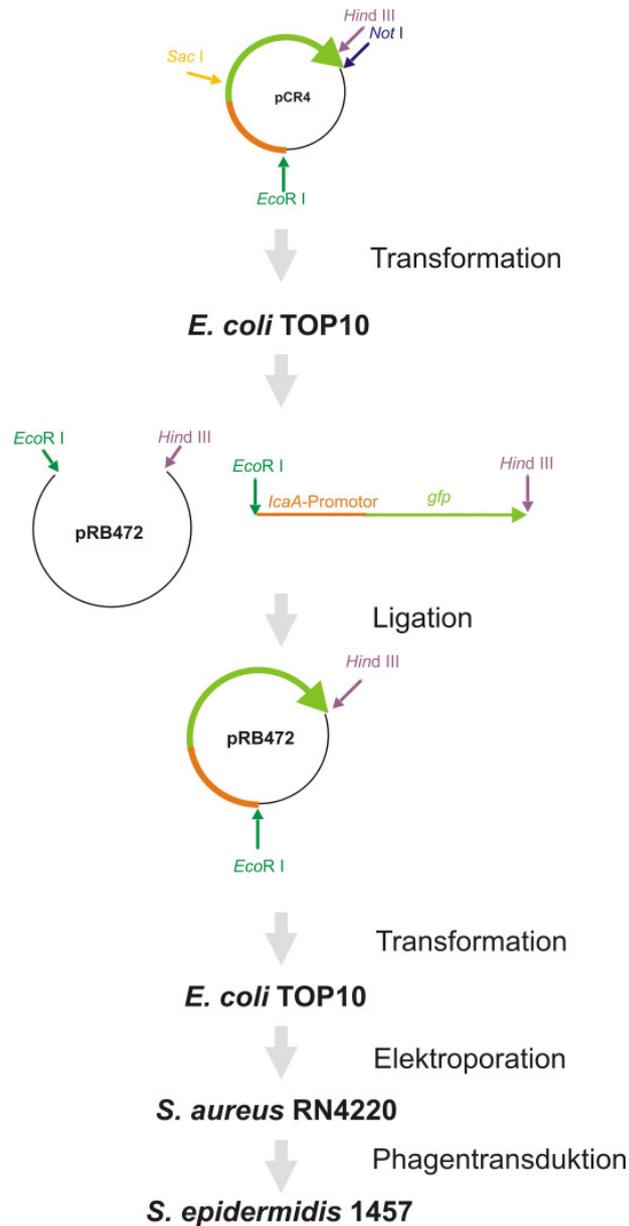


Abbildung 5.9: Schematische Darstellung von der Klonierung in den Staphylokokkenvektor bis zur Phagentransduktion in *S. epidermidis* 1457. Die einzelnen Schritte werden im Text erläutert. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Da der Vektor pCR4 nicht in Staphylokokken repliziert werden kann und somit eine direkte Überführung von pCR4_{fusgfp} nicht möglich war, musste das Insert fusgfp in den Staphylokokkenvektor pRB472 subkloniert werden. Dieses Plasmid enthält das Chloramphenicol Acetyltransferase Gen (*cat*) für die Selektion erfolgreich transformierter Klone. Über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Hind*III wurden

das pRB472 und das Fragment *fusgfp* aus pCR4_{*fusgfp*} ligiert. Abbildung 5.10 zeigt die Plasmide nach dem Enzymverdau.

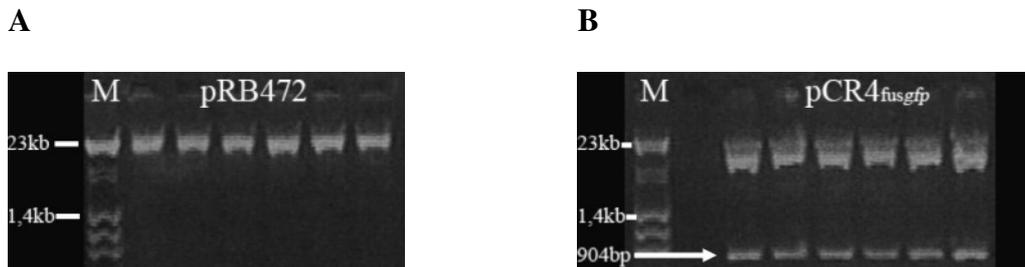


Abbildung 5.10: Restriktionsverdau von pRB472 und pCR4_{*fusgfp*} mit *EcoRI* und *HindIII*. Die Plasmide pRB472 und pCR4_{*fusgfp*} wurden nach der Spaltung mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* in einem 1,0% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *HindIII*-gespaltener DNA des λ -Phagens und *HaeIII*-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1). Das pRB472 liegt als ein linearisiertes Plasmid vor. Aus dem pCR4_{*fusgfp*} wurde ein Fragment der Größe 904 bp herausgeschnitten, welches den modifizierten *icaA*-Promotor mit der GFP-kodierenden Sequenz enthält. Sowohl für pRB472 als auch für pCR4_{*fusgfp*} wurden mehrere Banden parallel aufgetragen, da die Menge an DNA für die Aufreinigung aus dem Gel benötigt wird.

5.1.6 Ligation des Fragments *fusgfp* in den Staphylokokkenvektor pRB472

Das durch *EcoRI*- und *HindIII*-Spaltung linearisierte pRB472 und das 904 bp große *EcoRI*- / *HindIII*-Fragment aus dem pCR4_{*fusgfp*} wurden aus dem Gel geschnitten und aufgereinigt. Zur Verringerung der Religationen des Vektors pRB472 bei der Ligrationsreaktion wurden die DNA-Enden des Fragments direkt nach der Restriktionsspaltung dephosphoryliert. Dazu wurde Alkalische Phosphatase aus Garnelen (SAP) verwendet.

Die Ligation des aufgereinigten Vektors mit dem Insert erfolgte mit der T4-DNA-Ligase bei 16°C für 10 Stunden. Anschließend wurde der Ligrationsansatz in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert.

Zur Analyse der Klone wurden Plasmidpräparationen und nachfolgend eine Analyse durch *EcoRI*- und *HindIII*-Spaltung durchgeführt.

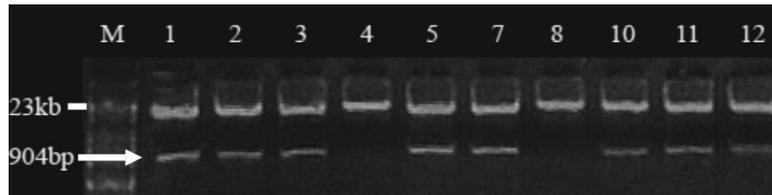


Abbildung 5.11: Restriktionsverdau von pRB472_{fusgfp} mit *EcoRI* und *HindIII*. Das Plasmid pRB472_{fusgfp} wurde nach der Spaltung mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* in einem 1,0% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *HindIII*-gespaltener DNA des λ -Phagens und *HaeIII*-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1). Das herausgeschnittene Fragment entspricht der Größe des Inserts (904 bp), welches vorher über dieselben Schnittstellen in den Vektor pRB472 ligiert wurde. Bei den Klonen 4 und 8 ist kein Fragment nachweisbar.

Als zusätzlicher Nachweis, dass das Fragment *fusgfp* sich in dem pRB472 befindet, wurde eine PCR mit GFP-spezifischen Primern durchgeführt. Sowohl bei dem Restriktionsverdau als auch bei der GFP-PCR haben sich die Klone 10, 11 und 12 als *fusgfp*-integrierte Klone herausgestellt. Für die weiteren Schritte wurden diese Klone verwendet.

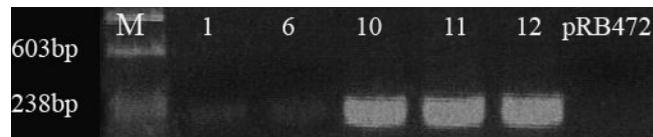


Abbildung 5.12: PCR zur Kontrolle der Klone mit pRB472_{fusgfp}. Es wurde eine PCR mit den Primern GFP for und GFP rev zum Nachweis der Klone mit dem Plasmid pRB472_{fusgfp} (1, 6, 10, 11 und 12) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente das pRB472 ohne Insert. Die Amplifikate wurden in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *HindIII*-gespaltener DNA des λ -Phagens und *HaeIII*-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1). Bei den Klonen 10, 11 und 12 waren GFP-Amplifikate der Größe 238 bp sichtbar. Auf dieser Höhe ließen sich bei den Klonen 1 und 6 nur unscharfe Banden erahnen. Auch bei der Negativkontrolle war kein Amplifikat sichtbar.

5.1.7 Elektroporation von RN4220 mit pRB472_{fusgfp}

Das Plasmid pRB472_{fusgfp} musste zunächst durch Elektroporation in *S. aureus* RN4220 eingeführt werden. In diesem restriktionsdefizienten Wirt erhält die Plasmid-DNA das für Staphylokokken typische Methylierungsmuster.

Es wurden hierfür elektrokompente Zellen hergestellt. Das Plasmid pRB472_{fusgfp} 10 wurde für die Transformation verwendet. Um die durch die Elektroporation entstandenen Klone zu analysieren, wurde eine PCR mit GFP-spezifischen Primern durchgeführt. Das aus der PCR resultierende Amplifikat beweist die erfolgreiche Transformation von RN4220 mit pRB472_{fusgfp}.

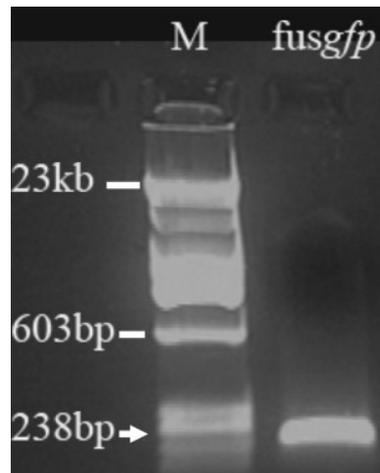


Abbildung 5.13: PCR zur Analyse der Klone RN4220 x pRB472_{fusgfp}. Mit dem Plasmid pRB472_{fusgfp} aus RN4220 wurde eine PCR mit den *gfp*-spezifischen Primern GFP for und GFP rev durchgeführt. Das entstandene Amplifikat der Größe 238 bp wurde in einem 1,3% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *Hind*III-gespaltener DNA des λ -Phagens und *Hae*III-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1).

5.1.8 Phagentransduktion von pRB472_{fusgfp} in *S. epidermidis* 1457

Für die Phagentransduktion wurde der Phage Φ B1 verwendet. Es wurde ein Phagenlysat aus RN4220 x pRB472_{fusgfp} hergestellt, welches für die Phagentransduktion verwendet wurde. Mittels Plaquetitration wurde ermittelt, ob das Phagenlysat die optimale Phagenkonzentration für eine erfolgreiche Transduktion enthält. Die Phagen wurden in den Empfängerstamm *S. epidermidis* 1457 transduziert. Nach 48 Stunden konnten Klone auf den Chloramphenicol-haltigen (20 μ g/ml) BHI-Agar-Platten isoliert werden.

Zunächst wurde eine Biofilmtestung mit den Klonen durchgeführt. Sämtliche untersuchten Klone stimmten mit der Positivkontrolle überein und waren Biofilm-positiv.

Zur weiteren Analyse der Klone wurde eine PCR mit GFP-spezifischen Primern durchgeführt. Mit der PCR konnte nachgewiesen werden, dass alle Klone einen Abschnitt besitzen, der anhand der GFP for und GFP rev Primer amplifiziert werden kann. Jedoch ist die Effizienz der Amplifikation nicht so groß wie bei den vorherigen PCRs.



Abbildung 5.14: PCR zum Nachweis der Klone *S. epidermidis* 1457 x pRB472_{fusgfp}. Es wurde mit acht der *S. epidermidis* 1457 x pRB472_{fusgfp}-Klonen eine PCR mit den GFP-spezifischen Primern GFP for und GFP rev durchgeführt. Das sichtbare Amplifikat ist in einer Größenordnung zwischen 234 bp und 194 bp des Markers sichtbar. Die Proben wurden in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid dargestellt. Als Marker (M) diente ein Mix aus *Hind*III-gespaltener DNA des λ -Phagens und *Hae*III-gespaltener DNA des Phagens ϕ X174 (Abbildung 4.1).

5.2 Fluoreszenzanalyse von *S. epidermidis* 1457 x pRB472_{fusgfp}

Die Funktionalität des Konstruktes pRB472_{fusgfp} sollte in dem Staphylokokkenstamm *S. epidermidis* 1457 durch quantitative Fluoreszenzmessung im Fluorometer untersucht werden. Als Referenz wurde der nicht Plasmid-tragende Wildtypstamm *S. epidermidis* 1457 verwendet.

Drei der Plasmid-tragenden Klone wurden unter verschiedenen *icaA*-induzierenden Bedingungen (Dobinsky *et al.*, 2003) angezchtet. Hierfür wurde sowohl Glukose-freies TSB als auch TSB mit 2% NaCl (wt/vol) verwendet (Dobinsky *et al.*, 2003; Knobloch *et al.*, 2001; Knobloch *et al.*, 2004). Unter keiner der genannten Bedingungen konnte eine relevante Fluoreszenz mikroskopisch nachgewiesen werden (Abbildung 5.15). Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass unter Bedingungen, die bei *S. epidermidis* 1457 üblicherweise zu einer Verstärkung der

icaA-Promotoraktivität führen, bei den getesteten Klonen 1457xpRB_{fusgfp} 1 – 3 keine verstärkte GFP-Bildung zur Folge haben.

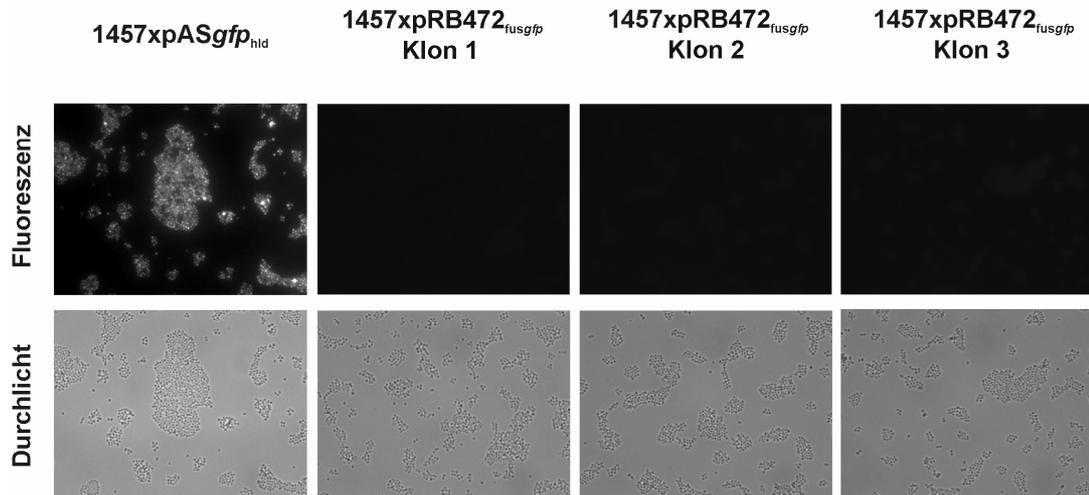


Abbildung 5.15: Analyse der Klone 1457 x pRB472_{fusgfp} 1 – 3 mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Stämme wurden in TSB + 2 % NaCl über Nacht unter statischen Bedingungen angezchtet. Die Auswertung der Präparate erfolgte bei einer 1000fachen Vergrößerung bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsspektrum von 500 – 600 nm. Bei keinem der untersuchten Klone konnte ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei der Kultur in TSB ohne Glucose erzielt. Als Kontrolle wurde der Stamm 1457 x pASgfp_{hld} nach Wachstum unter *gfp*-induzierenden Bedingungen (TSB + 4 % Xylose) mitgeführt. Im unteren Panel sind zu den fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen korrespondierende Ausschnitte bei durchlichtmikroskopischer Betrachtung gezeigt.

Grundsätzlich kann diese Beobachtung auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das GFP nicht mehr exprimiert wurde und zum anderen, dass das exprimierte GFP, z.B. durch fehlerhafte Faltung, funktionell inaktiv war. Um diese Hypothesen zu prüfen, sollte GFP in den Klonen *S. epidermidis* 1457 x pRB472_{fusgfp} 1-8 direkt durch *Western-Blot* Analysen dargestellt werden.

5.3 Untersuchung der GFP-Expression

Aufgrund der Tatsache, dass die Fluoreszenz der Klone *S. epidermidis* 1457 x pRB472_{fusgfp} mit dem Konstrukt des GFPs unter maximaler Induktion des *icaA*-

Promoters nicht anstieg, sollte versucht werden GFP mittels Immunoblot in Ganzzell-Proteinpräparationen nachzuweisen.

Hierfür wurden zunächst Gesamtzellproteine extrahiert und mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Die Proteine wurden auf PVDF-Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem GFP-spezifischen Antikörper dargestellt. Als Positivkontrolle diente der Stamm *S. epidermidis* 1457 x pASgfp_{hld} nach Induktion mit Xylose, welcher unter diesen Bedingungen GFP in großen Mengen synthetisiert (Franke *et al.*, 2007). Als Negativkontrolle diente der Wildtypstamm *S. epidermidis* 1457.

Das negative Ergebnis des *Western-Blots* in Abbildung 5.16 zeigt, dass die untersuchten Klone *S. epidermidis* 1457 x pRB472_{fusgfp} 1-4 kein GFP bilden. Somit liegt die Ursache für die fehlende Fluoreszenz der Klone *S. epidermidis* 1457 x pRB472_{fusgfp} 1-8 in einer fehlenden Expression von GFP.

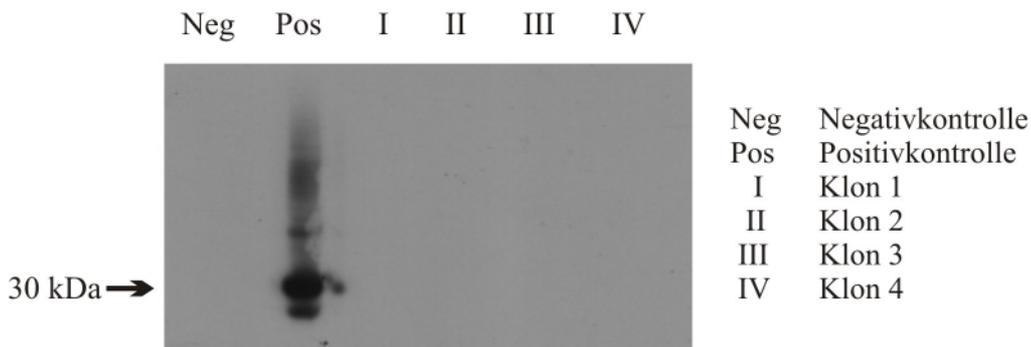


Abbildung 5.16: Western-Blot Analyse der Klone *S. epidermidis* 1457 x pRB472_{fusgfp} 1-4. Untersuchung der GFP-Expression in Gesamtzellproteinpräparationen der Klone *S. epidermidis* x pRB472_{fusgfp} 1-4, welche unter *icaA*-induzierenden Bedingungen hergestellt wurden. Als Negativbeziehungsweise Positivkontrolle dienten Präparationen des Wildtypstamms *S. epidermidis* 1457 und *S. epidermidis* 1457 x pASgfp_{hld} nach Induktion mit Xylose (Franke *et al.*, 2007). GFP wurde mittels eines anti-GFP-Peptidantikörpers (Invitrogen) und eines Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörpers detektiert. Im Gegensatz zur Positivkontrolle, bei welcher das etwa 30 kDa große GFP zur Darstellung kommt, konnte trotz langer Belichtungsdauer von 5 min bei keinem der vier untersuchten Klone ein spezifisches Signal gefunden werden.

6 Diskussion

S. epidermidis ist einer der häufigsten Erreger Fremdkörper-assoziiierter Infektionen (U.S.Department of Health and Human Services, 1999; Wisplinghoff *et al.*, 2003). Die Fähigkeit von *S. epidermidis* zur Anlagerung an Polymeroberflächen und zur Biofilmbildung ist dabei der entscheidende Pathogenitätsfaktor (Rupp *et al.*, 1999a; Rupp *et al.*, 1999b; Rupp *et al.*, 2001; Götz, 2002; Mack *et al.*, 2006b). Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ermöglicht den Bakterien die Adaptation an verschiedenste Habitate und macht sie widerstandsfähig gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen (Costerton, 2001). Dies gilt insbesondere auch für die Wirkung von Antibiotika und Effektoren der frühen Immunantwort (Dunne, Jr. *et al.*, 1993; Stewart und Costerton 2001; Knobloch *et al.*, 2002b; Otto, 2004; Vuong *et al.*, 2004a; Vuong *et al.*, 2004c; Foster, 2005; Vuong *et al.*, 2005; Kong *et al.*, 2006). Dies führt dazu, dass bei Fremdkörper-assoziierten Infektionen ein endgültiger Therapieerfolg in der Mehrzahl der Fälle oftmals erst nach der Entfernung des Fremdmaterials eintritt (Younger *et al.*, 1987; Götz und Peters, 2000).

Die *S. epidermidis* Biofilmbildung ist durch die konzertierte, koordinierte Aktivität einer Vielzahl von verschiedenen Faktoren gekennzeichnet. Für die Bildung eines funktionsfähigen Biofilms ist sowohl die Expression von Adhäsionsfaktoren für die primäre Bindung als auch die Expression von interzellulären Adhäsinen für die Akkumulation erforderlich. Für die primäre Bindung sind eine Reihe von Adhäsionsfaktoren beschrieben worden (Heilmann *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 1998; Hartford *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2002; Heilmann *et al.*, 2003). Von den für die Akkumulation erforderlichen Faktoren sind vor allem das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsine PIA und das *accumulation associated protein* Aap gut charakterisiert (Mack *et al.*, 1992; Mack *et al.*, 1994; Mack *et al.*, 1996a; Mack *et al.*, 1996b; Fey *et al.*, 1999; Mack *et al.*, 1999). Der *icaADBC*-Locus kodiert die Enzyme, die für die Synthese von PIA zuständig sind (Heilmann *et al.*, 1996; Gerke *et al.*, 1998; Vuong *et al.*, 2004a). PIA stellt einen der Hauptvirulenzfaktoren in *S. epidermidis* dar (Rupp *et al.*, 1999a; Rupp *et al.*, 1999b; Rupp *et al.*, 2001; Vuong *et al.*, 2004c; Begun *et al.*, 2007). Es muss allerdings darauf hingewiesen werden,

dass bestimmte *S. epidermidis* Stämme trotz Fehlens des *icaADBC*-Locus Biofilme bilden können (Rohde *et al.*, 2007). Bei diesen Stämmen kann das *acumulation associated protein* Aap die interzellulär adhäsive Funktion von PIA übernehmen (Rohde *et al.*, 2005; Rohde *et al.*, 2007; Hennig *et al.*, 2007).

Die Expression der an der Etablierung des Biofilms beteiligten Polysaccharide und Proteine sind einer äußerst komplexen Regulation unterworfen (Conlon *et al.*, 2004; Knobloch *et al.*, 2004; Mack *et al.*, 2004; Vuong *et al.*, 2004b; Rohde *et al.*, 2005). Diverse übergeordnete Kontrollelemente, wie z.B. Sigma Faktor σ^B , *sar*, *sae* oder *agr*, sind charakterisiert (Knobloch *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Gill *et al.*, 2005). Die zeitliche und räumliche Expression dieser Gene im Prozess der Biofilmbildung ist jedoch noch größtenteils unbekannt. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass bei klinischen Isolaten in der Regel sowohl *icaADBC* als auch *aap* kombiniert im Genom vorkommen (Vandecasteele *et al.*, 2003a; de Araujo *et al.*, 2006; Petrelli *et al.*, 2006; Rohde *et al.*, 2007), stellt sich die Frage, ob diese unterschiedlichen Faktoren zu definierten Zeitpunkten im Verlauf der Biofilmmorphogenese exprimiert werden.

Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung der Transkriptionsaktivität von *icaADBC* in lebenden Biofilmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Schichten des Biofilms. Mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) sollte die räumliche Verteilung der Genprodukte visualisiert werden. Als Reporter der Promotoraktivität sollte das *green fluorescent protein* (GFP) verwendet werden. GFP wurde bereits in erheblichem Umfang zur Darstellung von Expressionsaktivität bei gram-negativen Bakterien, wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* und *E. coli*, eingesetzt (Heim *et al.*, 1995; Tsien, 1998). Dies führte auch zur Verwendung von GFP bei Untersuchungen der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* (Davies *et al.*, 1998; Costerton *et al.*, 1999; Sternberg *et al.*, 1999). Folglich erschien GFP auch für die Untersuchung der Genaktivität im Rahmen der Biofilmbildung bei Staphylokokken nützlich (Rani *et al.*, 2007; Franke *et al.*, 2007). GFP wurde tatsächlich bereits verschiedentlich als Reporter bei *S. epidermidis* verwendet (Hoffmann *et al.*, 2004; Vuong *et al.*, 2004b). Ein umfassender Einsatz von GFP bei *S. epidermidis* ist jedoch durch die Tatsache eingeschränkt, dass viele wichtige funktionelle Aspekte, wie die posttranslationale

Faltung von GFP sowie der Abbau des Proteins, bislang unerforscht sind (Qazi *et al.*, 2001). Es kommt hinzu, dass die Translationseffizienz von heterologem Genmaterial mit geringem G/C Anteil in gram-positiven Bakterien häufig äußerst gering ausfällt. Ursache hierfür ist die geringe Translationsinitiation an den Ribosomen (Vellanoweth, 1993; Qazi *et al.*, 2001). Für diese stellt die Shine-Delgarno (SD)-Sequenz die entscheidende Determinante dar (Rocha *et al.*, 1999). Ihre Rolle besteht in der Vermittlung einer Interaktion zwischen der mRNA und der ribosomalen RNA, womit sie der 30S Ribosomen-Untereinheit das korrekte Auffinden des Startcodons ermöglicht (Shine und Dalgarno, 1974; Rocha *et al.*, 1999). In ersten Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass bei Vorliegen der natürlichen, der GFP-kodierenden Sequenz vorgeschalteten SD-Sequenz, die Translationseffizienz und daraus resultierende GFP-Fluoreszenzintensität bei *S. epidermidis* zu gering war, um effizient Promotoraktivitäten darzustellen (Franke, 2006; Franke *et al.*, 2007). Unter Verwendung verschiedener staphylokokkeneigener SD-Sequenzen vor dem *gfp* Startcodon wurde der Einfluss dieser Region auf die Expression in *S. epidermidis* 1457 mittels quantitativer und qualitativer Fluoreszenzanalyse untersucht (Franke *et al.*, 2007). Es wurden die SD-Sequenzen dreier gut charakterisierter Staphylokokkengene bezüglich ihres Einflusses auf die Translationseffizienz des GFP für die Optimierung der Expressionsbedingungen des GFP_{mut3.1} in *S. epidermidis* 1457 untersucht: die SD-Sequenzen der kodierenden Gene für den *staphylococcal accessory regulator* SarA, die Superoxiddismutase Sod und die SD-Sequenz des Hämolyisin delta Gens (*hld*). Sie wurden in ihrem natürlichen Abstand vor das GFP-Startcodon kloniert. Unter maximal induziertem Promotor wurde die Fluoreszenz der unterschiedlichen Konstrukte in dem Wirt *S. epidermidis* 1457 nach 24 Stunden gemessen. Dabei wurden erhebliche Unterschiede in der Fluoreszenzintensität festgestellt: während bei dem Konstrukt mit der *sarA*-assoziierten SD-Sequenz beispielsweise kaum ein Fluoreszenzsignal gemessen werden konnte, wurde ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal gefunden, wenn *gfp* die *hld*-SD-Sequenz vorangestellt wurde (Franke *et al.*, 2007).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Transkriptionsaktivität von *icaADBC* mittels GFP zu untersuchen. Um eine effiziente Translation von GFP zu gewährleisten, wurde eine Klonierungsstrategie entworfen, die es möglich machte

die *hld*-SD-Sequenz in den natürlichen Promotor einzubringen. Dieser wurde dann vor das GFP-kodierende Gen kloniert (Abbildung 5.6). Das so generierte Fusionskonstrukt aus *icaA*-Promotor, modifizierter SD-Sequenz und *gfp* wurde in den prototypischen, stark Biofilm-positiven *S. epidermidis* 1457 eingebracht. Die resultierenden Klone bildeten weiterhin unter *in vitro* Bedingungen einen Biofilm, so dass im Weiteren die *icaA*-Promotor Aktivität quantitativ mittels Fluorometrie wie auch qualitativ durch Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden sollte. Hierzu wurden verschiedene Anzuchtbedingungen gewählt, unter welchen eine maximale *icaADBC* Transkription angenommen werden kann. Dies gilt sowohl für die Anzucht in Glukose-freiem (Dobinsky *et al.*, 2003) wie auch in NaCl-supplementiertem TSB (Knobloch *et al.*, 2001; Knobloch *et al.*, 2004). Überraschenderweise konnte durch Fluoreszenzmikroskopie keine relevante GFP-Aktivität nachgewiesen werden. Dieser Befund ließ sich durch *Western-Blot* Untersuchungen auf eine völlig fehlende GFP-Bildung zurückführen.

Für diese Beobachtung können verschiedene Gründe verantwortlich sein. Es kann zum Beispiel die Modifikation der natürlichen SD-Sequenz stromaufwärts des Translationsstarts dazu geführt haben, dass für die Transkriptionsinitiation von *icaADBC* notwendige Faktoren nicht mehr an die Zielsequenz binden können (Jefferson *et al.*, 2003). Verschiedene Faktoren können die Transkription von *icaA* beeinflussen. Hier ist vor allem der alternative Sigma Faktor *sigB* zu nennen. Dieser entfaltet seinen positiven Effekt auf die *icaADBC* Transkription unter anderem indirekt durch Suppression des negativen Regulators *IcaR* (Knobloch *et al.*, 2004). Eine verminderte *IcaR* Bindung sollte jedoch in einer Zunahme der *icaADBC* Transkription resultieren (Conlon *et al.*, 2002). Da jedoch in den hier untersuchten Klonen keine Aktivität des *icaADBC* Promotors messbar war, scheint die Bindung von *IcaR* an die Zielsequenz (Abbildung 5.6) offensichtlich nicht gestört zu sein. *SigB* entfaltet jedoch auch *IcaR*-unabhängige, positive Effekte auf die *icaADBC* Transkription, so dass zum jetzigen Zeitpunkt die Möglichkeit einer Interferenz mit diesem positiven Regulator nicht ausgeschlossen werden kann (Knobloch *et al.*, 2001; Knobloch *et al.*, 2004).

Eine weitere mögliche Ursache für die fehlende Expression von *gfp* selbst unter maximal *icaADBC* induzierenden Bedingungen ist, dass die Transkription von

icaADBC weiter stromaufwärts außerhalb des in dem hier untersuchten Konstrukt repräsentierten Bereichs beginnt. Derzeit ist der definitive Start der *icaADBC* Transkription unbekannt (Heilmann *et al.*, 1996). Indirekte Hinweise können jedoch durch Untersuchungen geliefert werden, in welchen *icaADBC in trans* von einem Plasmid exprimiert werden. Bei genauer Analyse der bislang hierzu publizierten Studien zeigt sich jedoch, dass regelhaft die *icaADBC* Expression durch induzierbare, das heißt nicht den natürlichen, Promotor realisiert wurde (Gerke *et al.*, 1998; Mack *et al.*, 2000c). Hier spielen demnach außerhalb der kodierenden Sequenz gelegene Abschnitte keine Rolle für die funktionale Aktivität von *icaADBC*. Ausschließlich im Plasmid pCN27 (Heilmann *et al.*, 1996) erfolgt die Steuerung der Transkription von *icaADBC* durch den natürlichen Promotor. Die Analyse dieses Konstrukts zeigt jedoch, dass hier 760 vor dem Startkodon von *icaADBC* lokalisierte Basenpaare enthalten sind (Heilmann *et al.*, 1996). Somit kann im Plasmid pCN27 nicht ausgeschlossen werden, dass auch Sequenzen außerhalb der putativen Promotorstrukturen zwischen *icaR* und *icaA* relevant für die *icaADBC* Expression sind. Dass dies tatsächlich der Fall sein könnte, zeigt sich durch Untersuchungen in *S. aureus*, bei welchem *icaR* und *icaADBC* eine zu *S. epidermidis* homologe Architektur aufweisen. Hier konnte demonstriert werden, dass der eigentliche *icaADBC* Transkriptionsstart etwa 1 kb oberhalb des *icaA* Startkodons, also innerhalb der IcaR-kodierenden Sequenz, lokalisiert ist. Fehlt diese Sequenz, so werden *icaADBC* in *S. aureus* nicht transkribiert (Abbildung 6.1).



Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Organisation von *icaR* und *icaA* in *S. epidermidis* und *S. aureus*. Der *icaADBC* Transkriptionsstart in *S. aureus* (grauer Pfeil) liegt etwa 1 kb oberhalb des *icaA* Startkodons, also innerhalb der IcaR-kodierenden Sequenz. Der durch die gewählte Klonierungsstrategie bedingte, frühest mögliche Transkriptionsstart im Konstrukt pRB472_{fusgfp} ist 164 bp vor dem *icaA*-Startcodon lokalisiert (schwarzer Pfeil). Somit fehlen in diesem Konstrukt möglicherweise die für die Transkription entscheidenden Sequenzen. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Das Konstrukt in dem Plasmid pRB472_{fusgfp}, welches für die Expression von *gfp* in *S. epidermidis* 1457 in dieser Arbeit verwendet wurde, enthält die Sequenzen welche 164 bp vor dem *icaA*-Startcodon liegen (Abbildung 6.1). Unmittelbar stromaufwärts vor diesem Bereich ist das *icaR*-Startcodon gelegen. Somit enthält das hier untersuchte Konstrukt keine kodierenden Sequenzen aus *icaR* (Abbildung 6.1). Die in *S. aureus* für die Transkription von *icaADBC* notwendigen Sequenzen sind innerhalb der *IcaR*-kodierenden Sequenz lokalisiert. Somit kann die fehlende pRB472_{fusgfp}-basierte GFP *in trans* Expression in *S. epidermidis* ein Hinweis dafür sein, dass auch bei *S. epidermidis* die Expression von *icaADBC* von Sequenzen abhängig ist, die sich stromaufwärts außerhalb des putativen *icaA*-Promotors befinden. Dies würde die fehlende Expression von *gfp* in pRB472_{fusgfp} trotz Anzucht unter Bedingungen, die üblicher Weise den *icaADBC* Promotor maximal induzieren, gut erklären.

Um zu zeigen, ob die Sequenzen außerhalb der angenommenen Promotorstrukturen zwischen *icaR* und *icaA* tatsächlich wie bei *S. aureus* für die *icaADBC* Expression relevant sind, müssen weitere Versuche mit einem veränderten pRB472_{fusgfp} durchgeführt werden. Das Konstrukt muss hierbei so modifiziert werden, dass auch Sequenzabschnitte 1000 bp stromaufwärts des *icaADBC* Startcodons, und damit auch die *IcaR*-kodierenden Sequenzen, enthalten sind. Diese Strategie garantiert, dass alle für die Transkription von *icaADBC* eventuell bedeutsamen Abschnitte zwischen *icaR* und *icaA* integriert sind. Falls bei diesem Konstrukt GFP exprimiert wird, so spricht dies für die Relevanz dieser Sequenzen für die Transkriptionsinitiation von *icaADBC*.

Sollte trotz der oben genannten Modifikationen weiterhin keine GFP-Expression nachweisbar sein, so müssen Störungen der Transkriptionsinitiation durch die Modifikation der SD-Sequenz in Betracht gezogen werden. Die *hld*-SD-Sequenz ermöglichte ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal im Vektor pAS1 (Franke *et al.*, 2007). Hier wurde jedoch nicht ein kompletter, Staphylokokken-eigener Promotor modifiziert. Ob die *hld*-SD-Sequenz jedoch die Funktion des natürlichen *icaADBC* Promotors aufgrund der veränderten Basensequenz hervorruft, kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Um diese Hypothese zu testen, müssen

systematisch einzelne Basenpaare der modifizierten SD-Sequenz getauscht und der Einfluss auf die GFP-Expression untersucht werden.

Weitere Anstrengungen zur Optimierung eines GFP-basierten Reportersystems zur Analyse der Genexpression in lebenden *S. epidermidis* Biofilmen sind in jedem Falle notwendig, denn diese Untersuchungen werden zu einem vertieften Verständnis der *S. epidermidis* Biofilmbildung und damit der Pathogenese von *S. epidermidis* führen. Diese Kenntnisse sind notwendige Voraussetzungen für die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie und Prophylaxe Fremdmaterial-assoziiierter Infektionen.

7 Zusammenfassung

Die Pathogenität von *S. epidermidis* im Zusammenhang mit implantierten Fremdmaterialien wird wesentlich durch die Fähigkeit des Erregers zur Ausbildung mehrlagiger Biofilme bestimmt. Das interzelluläre Polysaccharid-Adhäsin PIA, welches durch *icaADBC* kodierte Proteine synthetisiert wird, ist wesentlich an der Biofilmbildung beteiligt. Hierbei unterliegen die Regulation der *icaADBC* Expression und damit die PIA-Synthese einer strengen Kontrolle, die eine zeitliche Koordination ermöglicht. Die zeitliche wie auch räumliche Dynamik der *icaADBC* Expression in lebenden Biofilmen ist jedoch nur unzureichend untersucht. Ziel dieser Arbeit war es, mittels eines Reportergens Auskunft über Ort, Zeit und Aktivität des *icaA*-Promotors *in situ* zu erlangen, wobei das *green fluorescent protein* (GFP) als Reporter gewählt wurde. Um eine optimale Translationsinitiierung in *S. epidermidis* zu erreichen, wurde in dieser Arbeit die natürliche SD-Sequenz des putativen *icaADBC* Lokus durch die des Haemolysin delta Gens ersetzt. Der so modifizierte Promotor wurde vor *gfpmut3.1* kloniert und das Konstrukt in *S. epidermidis* 1457 eingebracht. Die Analyse des Konstrukts in *S. epidermidis* 1457 mittels Fluoreszenzmikroskopie erbrachten jedoch selbst unter maximal *icaADBC*-induzierenden Bedingungen keine signifikante Fluoreszenz. Weitere Untersuchungen mittels Western Blot zeigten, dass unter diesen Bedingungen kein GFP gebildet wurde. Diese Beobachtung kann im Wesentlichen zwei Ursachen haben. (1.) Der Transkriptionsstart von *icaADBC* liegt stromaufwärts der hier verwendeten, putativen *icaADBC*-Promotorsequenz. In diesem Falle würden relevante Strukturen für die Transkriptionsinitiation in dem hier charakterisierten Konstrukt fehlen. (2.) Durch die Einführung der *hld*-SD-Sequenz in den natürlichen *icaADBC* Promotor werden essentielle Strukturmerkmale der Transkriptions- oder Translationsinitiation zerstört, so dass kein GFP gebildet werden kann. Die *in situ* Darstellung der *icaADBC* Expression ist weiterhin von großem Interesse für das Verständnis der *S. epidermidis* Biofilmbildung. Die hier gewonnenen Erkenntnisse werden in Zukunft helfen, dieses Ziel zu erreichen.

8 Literaturverzeichnis

- Allignet, J., S. Aubert, K. G. Dyke, und N. el Solh 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.
- Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjorn, M. Givskov, und S. Molin 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2240-2246.
- Archer, G. L. 2000. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. Pp. 2092-2100 in *Principles and practice of infectious disease* (G. L. Mandell, J. E. Bennett, and R. Dolin, Eds.). Churchill Livingstone, Philadelphia, U.S.A.
- Archer, G. L. und M. W. Climo 1994. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2231-2237.
- Arciola, C. R., S. Gamberini, D. Campoccia, L. Visai, P. Speziale, L. Baldassarri und L. Montanaro 2005. A multiplex PCR method for the detection of all five individual genes of *ica* locus in *Staphylococcus epidermidis*. A survey on 400 clinical isolates from prosthesis-associated infections. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 75(2):408-13.
- Baddour, L. M., L. P. Barker, G. D. Christensen, J. T. Parisi, and W. A. Simpson 1990. Phenotypic variation of *Staphylococcus epidermidis* in infection of transvenous endocardial pacemaker electrodes. *J. Clin. Microbiol.* 28:676-679.
- Batzilla, C. F., S. Rachid, S. Engelmann, M. Hecker, J. Hacker und W. Ziebuhr 2006. Impact of the accessory gene regulatory system (*agr*) on extracellular proteins, *codY* expression and amino acid metabolism in *Staphylococcus epidermidis*. *Proteomics.* 6(12):3602-13.
- Bayston, R. und S. R. Penny 1972. Excessive production of mucoid substance in *Staphylococcus SIIA*: a possible factor in colonisation of Holter shunts. *Dev. Med. Child Neurol. Suppl* 27:25-28.
- Begun, J., J. M. Gaiani, H. Rohde, D. Mack, S. B. Calderwood, F. M. Ausubel und C. D. Sifri 2007. Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS. Pathog.* 3:e57.

- Bowden M. G., W. Chen, J. Singvall, Y. Xu, S. J. Peacock, V. Valtulina, P. Speziale und Höök M 2005. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. 151(Pt 5):1453-64.
- Chicurel, M. 2000. Bacterial biofilms and infections. *Slimebusters*. *Nature* 408:284-286.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, A. L. Bisno, und E. H. Beachey 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 37:318-326.
- Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, und E. H. Beachey 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22:996-1006.
- Conlon, K. M., H. Humphreys, und J. P. O'Gara 2002. *icaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 184:4400-4408.
- Conlon, K. M., H. Humphreys, und J. P. O'Gara 2004. Inactivations of *rsbU* and *sarA* by IS256 represent novel mechanisms of biofilm phenotypic variation in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 186:6208-6219.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, und E. P. Greenberg 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
- Costerton, J.W. 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol.* 9(2):50-2.
- Cramton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, und F. Götz 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., M. Ulrich, F. Götz, und G. Döring 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 69:4079-4085.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, und E. P. Greenberg 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295-298.
- de Araujo, G. L., L. R. Coelho, C. B. de Carvalho, R. M. Maciel, A. Z. Coronado, R. Rozenbaum, B. T. Ferreira-Carvalho, A. M. Figueiredo, und L. A. Teixeira

2006. Commensal isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:855-864.
- de Silva, G. D., M. Kantzanou, A. Justice, R. C. Massey, A. R. Wilkinson, N. P. Day, und S. J. Peacock 2002. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative Staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 40:382-388.
- Dobinsky, S., K. Kiel, H. Rohde, K. Bartscht, J. K. Knobloch, M. A. Horstkotte, und D. Mack 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.
- Dobinsky, S., H. Rohde, J. K. Knobloch, M. A. Horstkotte, und D. Mack 2004. Transcriptional activity of *icaADBC* is not correlated with the degree of biofilm formation in clinical *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* strains. *Biofilms* 1:101-106.
- Dunne, W. M., Jr., E. O. Mason, Jr., und S. L. Kaplan 1993. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:2522-2526.
- Edmond, M.B., S.E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. N. Jones, R. P. Wenzel 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* 29(2):239-44.
- Emori, T. G. und R. P. Gaynes 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:428-442.
- Fey, P. D., J. S. Ulphani, F. Götz, C. Heilmann, D. Mack, und M. E. Rupp 1999. Characterization of the Relationship between Polysaccharide Intercellular Adhesin and Hemagglutination in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Infect. Dis.* 179:1561-1564.
- Fidalgo, S., F. Vazquez, M. C. Mendoza, F. Perez, und F. J. Mendez 1990. Bacteremia due to *Staphylococcus epidermidis*: microbiologic, epidemiologic, clinical, and prognostic features. *Rev. Infect. Dis.* 12:520-528.
- Foster, T. J. 2005. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:948-958.
- Frank, K. L., A. D. Hanssen, und R. Patel 2004. *icaA* is not a useful diagnostic marker for prosthetic joint infection. *J. Clin. Microbiol.* 42:4846-4849.

- Franke, G. 2006. Etablierung eines GFP-basierten Reportergensystems in Staphylokokken. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- Franke, G. C., S. Dobinsky, D. Mack, C. J. Wang, I. Sobottka, M. Christner, J. K. Knobloch, M. A. Horstkotte, M. Aepfelbacher, und H. Rohde 2007. Expression and functional characterization of *gfpmut3.1* and its unstable variants in *Staphylococcus epidermidis*. *J Microbiol. Methods*. 71:123-132.
- Frebourg, N. B., S. Lefebvre, S. Baert, und J. F. Lemeland 2000. PCR-Based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:877-880.
- Galdbart, J. O., J. Allignet, H. S. Tung, C. Ryden, und N. el Solh 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., A. Kraft, R. Süssmuth, O. Schweitzer, und F. Götz 1998. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J. Biol. Chem.* 273:18586-18593.
- Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. Deboy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson, und C. M. Fraser 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J. Bacteriol.* 187:2426-2438.
- Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43:1367-1378.
- Götz, F. und G. Peters 2000. Colonization of Medical Devices by Coagulase-Negative Staphylococci. Pp. 55-88 in *Infections Associated with Indwelling Medical Devices* (F. A. Waldvogel and A. L. Bisno, Eds.). ASM Press, Washington DC.
- Gristina, A. G. 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 237:1588-1595.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, und P. Stoodley 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:95-108.
- Harris, L. G. und R. G. Richards 2004. *J. Mater. Sci., Mater. Med* 15:311-314.

- Hartford, O., L. O'Brien, K. Schofield, J. Wells, and T. J. Foster 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology* 147:2545-2552.
- Heilmann, C., M. Hussain, G. Peters, and F. Götz 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* 24:1013-1024.
- Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack, and F. Götz 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20:1083-1091.
- Heilmann, C., G. Thumm, G. S. Chhatwal, J. Hartleib, A. Uekotter, and G. Peters 2003. Identification and characterization of a novel autolysin (Aae) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 149:2769-2778.
- Heim, R., A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien 1995. Improved green fluorescence. *Nature* 373:663-664.
- Hennig, S., S. Nyunt Wai, and W. Ziebuhr 2007. Spontaneous switch to PIA-independent biofilm formation in an *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* isolate. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:117-122.
- Higashi, J. M., I. W. Wang, D. M. Shlaes, J. M. Anderson, and R. E. Marchant 1998. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. *J. Biomed. Mater. Res.* 39:341-350.
- Hoffmann, A., T. Schneider, U. Pag, and H. G. Sahl 2004. Localization and functional analysis of PepI, the immunity peptide of Pep5-producing *Staphylococcus epidermidis* strain 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3263-3271.
- Hogt, A. H., J. Dankert, and J. Feijen 1985. Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. *J. Gen. Microbiol.* 131 (Pt 9):2485-2491.
- Hussain, M., M. Herrmann, C. von Eiff, F. Perdreau-Remington, and G. Peters 1997. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect. Immun.* 65:519-524.
- Hussain, M., M. H. Wilcox, and P. J. White 1993. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiol. Rev.* 10:191-207.
- Jarvis, W. R. 1987. Epidemiology of nosocomial infections in pediatric patients. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:344-351.

- Jefferson, K. K., S. E. Cramton, F. Gotz, and G. B. Pier 2003. Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of *IcaR*. *Mol. Microbiol.* 48:889-899.
- Karlowsky, J. A., M. E. Jones, D. C. Draghi, C. Thornsberry, D. F. Sahn, and G. A. Volturo 2004. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 3:7.
- Kloos, W. E. 1997. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. Pp. 113-137 in *The staphylococci in human disease* (K. B. Crossley and G. L. Archer, Eds.). Churchill Livingstone, New York.
- Kloos, W. E., D. N. Ballard, J. A. Webster, R. J. Hubner, A. Tomasz, I. Couto, G. L. Sloan, H. P. Dehart, F. Fiedler, K. Schubert, H. de Lencastre, I. S. Sanches, H. E. Heath, P. A. Leblanc, and A. Ljungh 1997. Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:313-323.
- Kloos, W. E. und T. L. Bannerman 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:117-140.
- Kloos, W. E., C. G. George, Olgiate J.S., L. Van Pelt, M. L. McKinnon, B. L. Zimmer, E. Muller, M. P. Weinstein, und S. Mirrett 1998. *Staphylococcus hominis* subsp. novobiosepticus subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt. 3:799-812.
- Klug, D., F. Wallet, S. Kacet, und R. J. Courcol 2003. Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections. *J. Clin. Microbiol.* 41:3348-3350.
- Knobloch, J. K. M., K. Bartscht, A. Sabottke, H. Rohde, H. H. Feucht, und D. Mack 2001. Biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* depends on RsbU, a functional activator of the *sigB* operon: differential activation mechanisms due to ethanol and salt stress. *J. Bacteriol.* 183:2624-2633.
- Knobloch, J. K., M. A. Horstkotte, H. Rohde, und D. Mack 2002a. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 191:101-106.
- Knobloch, J. K., H. Von Osten, M. A. Horstkotte, H. Rohde, und D. Mack 2002b. Minimal attachment killing (MAK): a versatile method for susceptibility

testing of attached biofilm-positive and -negative *Staphylococcus epidermidis*. Med. Microbiol. Immunol. (Berl) 191:107-114.

Knobloch, J. K., S. Jäger, M. A. Horstkotte, H. Rohde, und D. Mack 2004. RsbU-dependent regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation is mediated via the alternative sigma factor sigmaB by repression of the negative regulator gene *icaR*. Infect. Immun. 72:3838-3848.

Knobloch, J. K., S. Jäger, J. Huck, M. A. Horstkotte und D. Mack 2005. *mecA* is not involved in the sigmaB-dependent switch of the expression phenotype of methicillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 49(3):1216-9.

Kong, K. F., C. Vuong, und M. Otto 2006. *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. Int. J. Med. Microbiol. 296:133-139.

Lambert, L.H., T. Cox, K. Mitchell, R. A. Rossello-Mora, C. Del Cueto, D. E. Dodge, P. Orkand, und R. J. Cano 1998. *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. Int. J. Syst. Bacteriol. 48 Pt. 2:511-518.

Lasa, I. und J. R. Penades 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. Res. Microbiol. 157:99-107.

Ludwicka, A., B. Jansen, T. Wadstrom, und G. Pulverer 1984. Attachment of staphylococci to various synthetic polymers. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A] 256:479-489.

Mack, D., K. Bartscht, S. Dobinsky, M. A. Horstkotte, K. Kiel, J. K. M. Knobloch, und P. Schäfer 2000a. Staphylococcal factors involved in adhesion and biofilm formation on biomaterials. Pp. 307-330 in Handbook for studying bacterial adhesion: Principles, methods, and applications (Y. H. An and R. J. Friedman, Eds.). Humana Press, Totowa, N.J.

Mack, D., K. Bartscht, C. Fischer, H. Rohde, C. de Grahl, S. Dobinsky, M. A. Horstkotte, K. Kiel, und J. K. M. Knobloch 2001. Genetic and biochemical analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm accumulation. Meth. Enzymol. 336:215-239.

Mack, D., P. Becker, I. Chatterjee, J. K. M. Knobloch, G. Peters, H. Rohde, und M. Herrmann 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., W. Fischer, A. Krokotsch, K. Leopold, R. Hartmann, H. Egge, und R. Laufs 1996a. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of

- Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *J. Bacteriol.* 178:175-183.
- Mack, D., M. Haeder, N. Siemssen, und R. Laufs 1996b. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *J. Infect. Dis.* 174:881-884.
- Mack, D., M. A. Horstkotte, H. Rohde, und J. K. Knobloch 2005. Coagulase-negative staphylococci. Pp. 109-153 in *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy* (J. L. Pace, M. E. Rupp, and G. Finch, Eds.). CRC Press, London, UK.
- Mack, D., M. A. Horstkotte, H. Rohde, und J. K. M. Knobloch 2006a. Coagulase-Negative *Staphylococci*. Pp. 109-153 in *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy* (J. L. Pace, M. E. Rupp, and R. G. Finch, Eds.). CRC Press, Boca Raton.
- Mack, D., M. Nedelmann, A. Krokotsch, A. Schwarzkopf, J. Heesemann, und R. Laufs 1994. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infect. Immun.* 62:3244-3253.
- Mack, D., J. Riedewald, H. Rohde, T. Magnus, H. H. Feucht, H. A. Elsner, R. Laufs, und M. E. Rupp 1999. Essential functional role of the polysaccharide intercellular adhesin of *Staphylococcus epidermidis* in hemagglutination. *Infect. Immun.* 67:1004-1008.
- Mack, D., H. Rohde, S. Dobinsky, J. Riedewald, M. Nedelmann, J. K. M. Knobloch, H.-A. Elsner, und H. H. Feucht 2000b. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect. Immun.* 68:3799-3807.
- Mack, D., H. Rohde, L. G. Harris, A. P. Davies, M. A. Horstkotte, und J. K. Knobloch 2006b. Biofilm formation in medical device-related infection. *Int. J. Artif. Organs* 29:343-359.
- Mack, D., N. Siemssen, und R. Laufs 1992. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infect. Immun.* 60:2048-2057.
- Marrie, T. J., C. Kwan, M. A. Noble, A. West, und L. Duffield 1982. *Staphylococcus saprophyticus* as a cause of urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 16:427-431.

- McKenney, D., K. L. Pouliot, Y. Wang, V. Murthy, M. Ulrich, G. Doring, J. C. Lee, D. A. Goldmann, und G. B. Pier 1999. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 284:1523-1527.
- Meighen, E.A. 1993. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J* 7:1016-1022.
- Moretro, T., L. Hermansen, A. L. Holck, M. S. Sidhu, K. Rudi, und S. Langsrud 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.
- Muller, E., J. Hübner, N. Gutierrez, S. Takeda, D. A. Goldmann, und G. B. Pier 1993. Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide/adhesin and slime. *Infect. Immun.* 61:551-558.
- Nilsson, M., L. Frykberg, J. I. Flock, L. Pei, M. Lindberg, und B. Guss 1998. A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 66:2666-2673.
- Noble, W. C. 1997. Staphylococcal carriage and skin and soft tissue infection. Pp. 401-412 in *The staphylococci in human disease* (K. B. Crossley and G. L. Archer, Eds.). Churchill Livingstone, New York.
- Noble, W. C. und J. Naidoo 1986. Coagulase-negative staphylococci as skin commensals. *J. Med. Microbiol.* 22:287.
- Noel, G. J. und P. J. Edelson 1984. *Staphylococcus epidermidis* bacteremia in neonates: further observations and the occurrence of focal infection. *Pediatrics* 74:832-837.
- O'Toole, G., H. B. Kaplan, und R. Kolter 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79.
- Otto, M. 2004. Quorum-sensing control in Staphylococci - a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS Microbiol. Lett.* 241:135-141.
- Pantucek, R., I. Sedlacek, P. Petras, D. Koukalova, P. Svec, V. Stetina, M. Vancanneyt, L. Chrastinova, Vokurkova J., V. Ruzickova, J. Doskar, J. Swings, und V. Hajek 2005. *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South American squirrel monkeys. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1953-1958.

- Pei, L., M. Palma, M. Nilsson, B. Guss, and J. I. Flock 1999. Functional studies of a fibrinogen binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 67:4525-4530.
- Peters, G., R. Locci, and G. Pulverer 1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J. Infect. Dis.* 146:479-482.
- Petrelli, D., C. Zampaloni, S. D'Ercole, M. Prenna, P. Ballarini, S. Ripa, and L. A. Vitali 2006. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25:773-781.
- Pfaller, M. A. und L. A. Herwaldt 1988. Laboratory, clinical and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 1:281-299.
- Place, R. B., D. Hiestand, H. R. Gallmann, and M. Teuber 2003. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:30-37.
- Probst, A. J., C. Hertel, L. Richter, L. Wassill, W. Ludwig, and W. P. Hammes 1998. *Staphylococcus condimenti* sp. nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt. 3:651-658.
- Qazi, S. N., C. E. Rees, K. H. Mellits, and P. J. Hill 2001. Development of *gfp* Vectors for Expression in *Listeria monocytogenes* and Other Low G+C Gram Positive Bacteria. *Microb. Ecol.* 41:301-309.
- Rachid, S., K. Ohlsen, U. Wallner, J. Hacker, M. Hecker, and W. Ziebuhr 2000a. Alternative transcription factor sigma(B) is involved in regulation of biofilm expression in a *Staphylococcus aureus* mucosal isolate. *J. Bacteriol.* 182:6824-6826.
- Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker, and W. Ziebuhr 2000b. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3357-3363.
- Rani, S. A., B. Pitts, H. Beyenal, R. A. Veluchamy, Z. Lewandowski, W. M. Davison, K. Buckingham-Meyer, and P. S. Stewart 2007. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J Bacteriol.* 189:4223-4233.

- Richards, M. J., J. R. Edwards, D. H. Culver, und R. P. Gaynes 2000. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 21:510-515.
- Rocha, E. P., A. Danchin, und A. Viari 1999. Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. *Nucleic Acids Res.* 27:3567-3576.
- Rohde, H., E. Burandt, N. Siemssen, L. Frommelt, C. Burdelski, S. Wurster, S. Scherpe, A. P. Davies, L. G. Harris, M. A. Horstkotte, J. K. M. Knobloch, C. Rangunath, J. B. Kaplan, und D. Mack 2007. Polysaccharide intercellular adhesin 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., C. Burdelski, K. Bartscht, M. Hussain, F. Buck, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, C. Heilmann, M. Herrmann, und D. Mack 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., M. Kalitzky, N. Kroger, S. Scherpe, M. A. Horstkotte, J. K. Knobloch, A. R. Zander, und D. Mack 2004. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *J. Clin. Microbiol.* 42:5614-5619.
- Rupp, M. E. und G. L. Archer 1994. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin. Infect. Dis.* 19:231-243.
- Rupp, M. E., P. D. Fey, C. Heilmann, und F. Götz 2001. Characterization of the Importance of *Staphylococcus epidermidis* Autolysin and Polysaccharide Intercellular Adhesin in the Pathogenesis of Intravascular Catheter-Associated Infection in a Rat Model. *J. Infect. Dis.* 183:1038-1042.
- Rupp, M. E., J. S. Ulphani, P. D. Fey, K. Bartscht, und D. Mack 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., J. S. Ulphani, P. D. Fey, und D. Mack 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.

- Shine, J. und L. Dalgarno 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 71:1342-1346.
- Simpson, R. A., A. F. Spencer, D. C. Speller, und R. R. Marples 1986. Colonization by gentamicin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in a special care baby unit. J. Hosp. Infect. 7:102-120.
- Sperber, W. H. und S. R. Tatini 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. 29:502-505.
- Spergser, J., M. Wieser, M. Taubel, R. A. Rossello-Mora, E. Rosengarten, und H. J. Busse 2003. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:2007-2011.
- Sternberg, C., B. B. Christensen, T. Johansen, N. A. Toftgaard, J. B. Andersen, M. Givskov, und S. Molin 1999. Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 65:4108-4117.
- Stewart, P. S. und J. W. Costerton 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 358:135-138.
- Sun, D., M. A. Accavitti, und J. D. Bryers 2005. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. Clin. Diagn. Lab Immunol. 12:93-100.
- Takahashi, T., I. Satoh, und N. Kikuchi 1999. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. Int. J. Syst. Bacteriol. 49 Pt. 2:725-728.
- Tojo, M., N. Yamashita, D. A. Goldmann, und G. B. Pier 1988. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis* [published erratum appears in J Infect Dis 1988 Jul;158(1):268]. J. Infect. Dis. 157:713-722.
- Tormo, M. A., M. Marti, J. Valle, A. C. Manna, A. L. Cheung, I. Lasa, und J. R. Penades 2005. *SarA* is an essential positive regulator of *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. J. Bacteriol. 187:2348-2356.
- Tsien, R. Y. 1998. The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67:509-544.
- U.S. Department of Health and Human Services 1999. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from january 1990-May 1999, issued june 1999. Am. J. Infect. Control 27:520-532.
- Vandecasteele, S. J., W. E. Peetermans, R. Merckx, B. J. Rijnders, und J. Van Eldere 2003a. 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.

Vandecasteele, S. J., W. E. Peetermans, R. Merckx, and J. Van Eldere 2003b. Expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus epidermidis* during in vitro and in vivo foreign body infections. J. Infect. Dis. 188:730-737.

Vaudaux, P., D. Pittet, A. Haerberli, E. Huggler, U. E. Nydegger, D. P. Lew, and F. A. Waldvogel 1989a. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen or fibrin. J. Infect. Dis. 160:865-875.

Vaudaux, P. E., E. Huggler, P. G. Lerch, J. J. Morgenthaler, U. E. Nydegger, F. Schumacher-Perdreau, P. D. Lew, and F. A. Waldvogel 1989b. Inhibition by immunoglobulins of *Staphylococcus aureus* adherence to fibronectin-coated foreign surfaces. J. Invest Surg. 2:397-408.

Veenstra, G. J., F. F. Cremers, H. van Dijk, and A. Flier 1996. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. J. Bacteriol. 178:537-541.

Vellanoweth, R. L. 1993. Translation and its regulation. Pp. 699-711 in *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics (A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and A. Losick, Eds.). American Society for Microbiology, Washington DC.

Voet D. und Voet J. 1995. The expression and transmission of genetic information. Pp. 829-1261 in Biochemistry (Voet D. and Voet J., Eds.). Sumersset NJ.

Vuong, C., C. Gerke, G. A. Somerville, E. R. Fischer, and M. Otto 2003. Quorum-sensing control of biofilm factors in *Staphylococcus epidermidis*. J. Infect. Dis. 188:706-718.

Vuong, C., J. B. Kidder, E. R. Jacobson, M. Otto, R. A. Proctor, and G. A. Somerville 2005. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress. J. Bacteriol. 187:2967-2973.

Vuong, C., S. Kocianova, J. M. Voyich, Y. Yao, E. R. Fischer, F. R. DeLeo, and M. Otto 2004a. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J. Biol. Chem. 279:54881-54886.

Vuong, C., S. Kocianova, Y. Yao, A. B. Carmody, and M. Otto 2004b. Increased colonization of indwelling medical devices by quorum-sensing mutants of *Staphylococcus epidermidis* in vivo. J. Infect. Dis. 190:1498-1505.

- Vuong, C., H. L. Saenz, F. Gotz, and M. Otto 2000. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 182:1688-1693.
- Vuong, C., J. M. Voyich, E. R. Fischer, K. R. Braughton, A. R. Whitney, F. R. DeLeo, and M. Otto 2004c. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 6:269-275.
- Wang, I. W., J. M. Anderson, and R. E. Marchant 1993. *Staphylococcus epidermidis* adhesion to hydrophobic biomedical polymer is mediated by platelets. *J. Infect. Dis.* 167:329-336.
- Wilkinson, B. J. 1997. Biology. Pp. 1-38 in *The staphylococci in human disease* (K. B. Crossley and G. L. Archer, Eds.). Churchill Livingstone, New York.
- Williams, R. J., B. Henderson, L. J. Sharp, and S. P. Nair 2002. Identification of a Fibronectin-Binding Protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 70:6805-6810.
- Wisplinghoff, H., H. Seifert, S. M. Tallent, T. Bischoff, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond 2003. Nosocomial bloodstream infections in pediatric patients in United States hospitals: epidemiology, clinical features and susceptibilities. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 22:686-691.
- Xu, L., H. Li, C. Vuong, V. Vadyvaloo, J. Wang, Y. Yao, M. Otto, and Q. Gao 2006. Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 74:488-496.
- Yao, Y., D. E. Sturdevant, A. Villaruz, L. Xu, Q. Gao, and M. Otto 2005. Factors characterizing *Staphylococcus epidermidis* invasiveness determined by comparative genomics. *Infect. Immun.* 73:1856-1860.
- Younger, J. J., G. D. Christensen, D. L. Bartley, J. C. Simmons, and F. F. Barrett 1987. Coagulase-negative staphylococci isolated from cerebrospinal fluid shunts: importance of slime production, species identification, and shunt removal to clinical outcome. *J. Infect. Dis.* 156:548-554.
- Zhang, Y. Q., S. X. Ren, H. L. Li, Y. X. Wang, G. Fu, J. Yang, Z. Q. Qin, Y. G. Miao, W. Y. Wang, R. S. Chen, Y. Shen, Z. Chen, Z. H. Yuan, G. P. Zhao, D. Qu, A. Danchin, and Y. M. Wen 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* 49:1577-1593.
- Ziebuhr, W., C. Heilmann, F. Götz, P. Meyer, K. Wilms, E. Straube, and J. Hacker 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., V. Krimmer, S. Rachid, I. Löbner, F. Götz, und J. Hacker 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.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A ₅₇₀	Absorption gemessen bei einer Wellenlänge von 570 nm
Aap	englisch: <i>accumulation associated protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (englisch: <i>bovine serum albumin</i>)
C	Celsius
CFU	koloniebildende Einheiten (englisch: <i>colony forming units</i>)
cm	Zentimeter
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxy-Nukleotidyl-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (englisch: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	englisch: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GFP	englisch: <i>green fluorescent protein</i>
<i>ica</i>	interzelluläre Adhäsion (<i>intercellular adhesion</i>)
IS256	Insertionselement 256
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
M	Mol
min	Minute
ml	Milliliter

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
ms	Millisekunden
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Ω	Ohm
OD ₅₇₈	optische Dichte bestimmt bei einer Wellenlänge von 578 nm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)
PIA	interzelluläres Polysaccharid Adhäsion (englisch: <i>polysaccharide intercellular adhesin</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>)
SD	Shine-Dalgarno
Tn917	Transposon 917
TSB BBL	Trypton Soja Brühe (englisch: <i>trypticase soy broth</i>) der Firma Becton Dickinson, Cockseyville, MD, USA
TSBØ	Trypton Soja Brühe ohne Glucose
U	enzymatische Einheit (englisch: <i>unit</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: <i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	x-fache Erdbeschleunigung

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Biofilmbildung von <i>S. epidermidis</i> 1457.....	10
Abbildung 3.2: Vereinfachtes Modell der Regulation der Biofilmbildung in <i>S. epidermidis</i> (Mack <i>et al.</i> , 2006b).....	16
Abbildung 4.1: Größenstandard Marker für Gelelektrophorese Gele.	31
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Fusionierung des <i>icaA</i> -Promotor mit der GFP-kodierenden Sequenz.	41
Abbildung 5.2: Optimierung der PCR-Bedingungen für die Primer <i>icapromfor</i> und <i>fusiongf_{pica}_{hld}rev</i>	42
Abbildung 5.3: Optimierung der PCR-Bedingungen für die Primer <i>gfpstartsac</i> und <i>gfp3`revHindNot</i>	43
Abbildung 5.4: Analyse von pCR4 _{<i>icagfpfus</i>} Klonen.	44
Abbildung 5.5: Analyse von pCR4 _{<i>gfpsacnot</i>} Klonen.....	44
Abbildung 5.6: Sequenz des <i>icaA</i> Promotors und der <i>gfp</i> Anfangssequenz mit veränderter Shine Dalgarno Sequenz (<i>hld</i> -SD) und eingefügter <i>EcoRI</i> - und <i>SacI</i> -Schnittstelle.....	45
Abbildung 5.7: (A) Restriktionsverdau von pCR4 _{<i>icagfpfus</i>} und (B) pCR4 _{<i>gfpsacnot</i>} mit <i>SacI</i> und <i>NotI</i>	46
Abbildung 5.8: PCR zur Kontrolle der Klone mit pCR4 _{<i>fusgfp</i>}	47
Abbildung 5.9: Schematische Darstellung von der Klonierung in den Staphylokokkenvektor bis zur Phagentransduktion in <i>S. epidermidis</i> 1457.....	48
Abbildung 5.10: Restriktionsverdau von pRB472 und pCR4 _{<i>fusgfp</i>} mit <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i>	49
Abbildung 5.11: Restriktionsverdau von pRB472 _{<i>fusgfp</i>} mit <i>EcoRI</i> und <i>HindIII</i>	50
Abbildung 5.12: PCR zur Kontrolle der Klone mit pRB472 _{<i>fusgfp</i>}	50
Abbildung 5.13: PCR zur Analyse der Klone RN4220 x pRB472 _{<i>fusgfp</i>}	51

Abbildung 5.14: PCR zum Nachweis der Klone <i>S. epidermidis</i> 1457 x pRB472 _{fusgfp}	52
Abbildung 5.15: Analyse der Klone 1457 x pRB472 _{fusgfp} 1 – 3 mittels Fluoreszenzmikroskopie.	53
Abbildung 5.16: <i>Western-Blot</i> Analyse der Klone <i>S. epidermidis</i> 1457 x pRB472 _{fusgfp} 1-4.	54
Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Organisation von <i>icaR</i> und <i>icaA</i> in <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i>	59
Tabelle 3.1: Spezifische Adhäsionsfaktoren von <i>S. epidermidis</i>	11
Tabelle 4.1: Übersicht über verwendete Laborgeräte	19
Tabelle 4.2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.....	26
Tabelle 4.3: Übersicht über die verwendeten Plasmide	26
Tabelle 4.4: Übersicht über die verwendeten Primer	27

9.3 Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. med. Ingo Sobottka danke ich ganz herzlich für seine Unterstützung in seiner Funktion als Doktorvater.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. med. Holger Rohde, der mir dieses Thema überlassen hat und mich stets mit höchstem Engagement und Kompetenz ausgezeichnet unterstützt hat. Er war über meine gesamte Doktorarbeit hinweg ein ständig geduldiger und hilfsbereiter Ansprechpartner sowohl innerhalb als auch außerhalb des Labors. Seiner unermüdlichen Freude an experimenteller Arbeit verdanke ich meine Fertigstellung dieser Arbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. med. Gefion Franke für die kompetente Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden und die Einführung in das Arbeitsthema bedanken. Ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre freundschaftliche Unterstützung war mir immer eine große Hilfe.

Meinen Eltern Chi-Ping und Li-Chin und meinem Freund Timo Busch möchte ich von ganzem Herzen für die zu jeder Zeit bestehenden Unterstützung und aufmunternden Worte danken.

Frau Stephanie Frankenberger, Frau Gesche Kroll, und Herrn Martin Christner möchte ich ganz herzlich für die kompetente wissenschaftliche Unterstützung und anregenden Diskussionen danken. Bei Philip Pehle, Sandra Schewe, Kim Wegert, Ulrike Wendt, Jan Wietz, Manuel Wolters, Christoph Burdelski und Julia von Freyberg-Rohde sowie allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für die unvergesslich schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors bedanken.

9.4 Curriculum Vitae

9.5 Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Franke, G. C., S. Dobinsky, D. Mack, **C.-J. Wang**, I. Sobottka, M. Christner, J. K. Knobloch, M. A. Horstkotte, M. Aepfelbacher, and H. Rohde 2007. Expression and functional characterization of *gfpmut3.1* and its unstable variants in *Staphylococcus epidermidis*. *J Microbiol. Methods*. 71:123-132.

Publizierte Abstracts

Rohde, H., E. Burandt, L. Frommelt, N. Siemssen, C. Burdelski, **C.-J. Wang**, S. Scherpe, J.K.-M. Knobloch, J. Kaplan, D. Mack. 2006. Differential role of protein and polysaccharide intercellular adhesin mediated biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* from prosthetic joint infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, Suppl. 2: 423.

9.6 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen oder Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um die Zulassung zur Promotion beworben habe.

Chia-Jung Wang